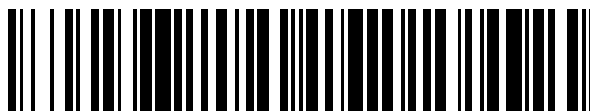


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 159**

51 Int. Cl.:

C07D 493/22 (2006.01)

A61K 31/365 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2012 PCT/US2012/067215**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13082373**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2012 E 12798570 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.11.2017 EP 2785719**

54 Título: **Formulaciones de moxidectina inyectable de acción prolongada y nuevas formas cristalinas de moxidectina**

30 Prioridad:

02.12.2011 US 201161566336 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.03.2018

73 Titular/es:

**MERIAL, INC. (100.0%)
3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500
Duluth, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**CADY, SUSAN, MANCINI;
MA, BAOQING;
CHAPMAN, ROBERT, CLARK;
YANG, CHUNHUA y
JAIN, UDAY**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 659 159 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de moxidectina inyectable de acción prolongada y nuevas formas cristalinas de moxidectina

5 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La presente invención se refiere a nuevos procedimientos para preparar polimorfos y solvatos (pseudopolimorfos) antiparasitarios de moxidectina. Las formas de moxidectina se pueden usar en formulaciones veterinarias orales, parenterales o tópicas para el tratamiento, control y prevención de infecciones/infestaciones de endoparásitos y ectoparásitos en mamíferos, aves o peces, tales como caballos y animales domésticos.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0002] Los animales y los seres humanos sufren de infecciones endoparasitarias incluyendo, por ejemplo, helmintiasis, que con mayor frecuencia está causada por un grupo de gusanos parasitarios descritos como nematodos o gusanos redondos. Estos parásitos causan graves pérdidas económicas en cerdos, ovejas, caballos y ganado, así como aves de corral. Otros parásitos que se producen en el tracto gastrointestinal de animales y seres humanos incluyen Ancylostoma, Necator, Ascaris, Strongyloides, Trichinella, Capillaria, Toxocara, Toxascaris, Trichuris, Enterobius y parásitos que se encuentran en la sangre u otros tejidos y órganos, tales como gusanos filariales y las etapas extraintestinales de Strongyloides, Toxocara y Trichinella.

[0003] Debido a las preocupaciones de conveniencia por la biodisponibilidad, eficacia o dosificación, muchos agentes beneficiosos se administran preferiblemente por vía parenteral. Dado que un receptor podría recibir varias formas de dosificación durante toda la vida, es esencial que la forma de dosificación deje pocos residuos o ningún residuo indeseable. Las formas de dosificación poliméricas bioerosionables son ideales para estas aplicaciones, y proporcionan la ventaja adicional de que la liberación de fármacos a partir de una forma de dosificación única puede tratar eficazmente el estado de la enfermedad durante un período prolongado.

[0004] Los dispositivos de liberación controlada poliméricos bioerosionables conocidos pueden generalmente clasificarse como dispositivos encapsulados o dispositivos de matriz. En dispositivos encapsulados, el agente beneficioso (por ejemplo, un fármaco) está rodeado por una capa de polímero que controla la liberación del agente beneficioso. El agente beneficioso en un dispositivo de matriz, sin embargo, se disuelve o suspende en la matriz polimérica y se difunde a través de la matriz, o se libera en conjunción con la disolución, disgregación, descomposición, o erosión de la matriz.

[0005] Con dispositivos de matriz, los agentes beneficiosos se pueden incorporar en la matriz mediante atrapamiento físico o están unidos químicamente a la matriz. Cuando se exponen a un ambiente biológico de uso, la matriz polimérica se disuelve, disgrega, descompone, o se erosiona (es decir, se degrada) para liberar el agente beneficioso. Se requiere un esfuerzo experimental significativo para "afinar" la formulación de polímero/agente beneficioso para que pueda ser estable y para liberar a la velocidad deseada.

[0006] En cuanto al tratamiento y prevención de la infestación parasitaria, una clase particularmente importante de agentes beneficiosos es la lactona macrocíclica, que puede ser utilizada para tratar las infecciones endoparasitarias y ectoparasitarias en los mamíferos y aves. Los compuestos que pertenecen a esta clase incluyen las avermectinas y milbemicinas. Estos compuestos son agentes antiparasitarios potentes contra una amplia gama de parásitos internos y externos. Las avermectinas y las milbemicinas comparten el mismo anillo de lactona macrocíclico de 16 miembros común; sin embargo, las milbemicinas no poseen el sustituyente disacárido en la posición 13 del anillo de lactona. Además de tratar insectos parasitarios, las avermectinas y milbemicinas se utilizan para tratar endoparásitos, por ejemplo, infecciones por gusanos redondos, en animales de sangre caliente.

[0007] Las avermectinas se pueden aislar del caldo de fermentación de una cepa productora de avermectina de *Streptomyces avermitilis* y derivados de la misma. La producción, aislamiento y determinación estructural de las avermectinas se documentan en Albers-Schonberg, et. al, J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 4216-4221 y las referencias citadas en el mismo. La descripción de las características morfológicas del cultivo se describe en la patente de Estados Unidos N° 4.310.519.

[0008] Las milbemicinas son los derivados de aglicona de las avermectinas, tales como los descritos, por ejemplo en las patentes de Estados Unidos N° 4.144.352; 4.791.134 y 6.653.342. Un antihelmíntico particularmente importante de esta familia incluye la moxidectina, como se describe, por ejemplo en las patentes de Estados Unidos N° 7.348.417; US4900753; US4988824; US5106994; US7645863; y 4.916.154 (y las referencias citadas en las mismas). Para milbemicinas, se puede hacer referencia, entre otras cosas, a Vercruysse, J. y Rew, RS, editores, Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy, CABI Internacional 2002; Campbell, William C., editor, Ivermectin and

Abamectin, Springer-Verlag, 1989; Davies HG et al., 1986, "Avermectins and Milbemycins", Nat. Prod. Rep., 3, 87-121, Mrozik H. et al., 1983, Synthesis of Milbemycins from Avermectins, Tetrahedron Lett., 24, 5333-5336, la patente de Estados Unidos N° 4.134.973 y EP 0 677 054. Como se evidencia por las numerosas referencias, la moxidectina amorfa es bien conocida en la técnica. Otras formas sólidas se han descrito en los documentos EP 1.505.069 y US 4.900.753.

[0009] El documento US 6.162.820 (de Merial) da a conocer combinaciones de acción prolongada de fipronil e ivermectina (una avermectina).

[0010] El documento US 6.733.767 (de Merck) describe una composición polimérica líquida para la liberación controlada de eprinomectina, que consiste esencialmente en el principio activo, PLGA, y mezcla de disolventes. La composición forma un depósito tras la inyección en el animal.

[0011] El documento US 6.797.701 (de Pfizer) describe formulaciones de 13-monosacárido 5-oxima de avermectina que consisten esencialmente en el principio activo y glicol éter.

[0012] El documento US 7.326.428 (de la Universidad de Rutgers) describe (en su sección de antecedentes) ivermectina encapsulada en microesferas de PLGA (50:50). La liberación pulsada posterior de este agente, in vivo, se demostró que era dependiente de la velocidad de degradación de la matriz polimérica.

[0013] El documento US 2004/0241204 (de Martinod et al.) da a conocer miniimplantes o gránulos de liberación prolongada en combinación que pueden proporcionar un nivel en sangre de ivermectina activa preferiblemente de 1 a 4 semanas. Se da a conocer una lista de polímeros potenciales, incluyendo PLGA, ácidos poliamino, PGS y Biopol.

[0014] La ivermectina también se combinó con éxito con PLGA para producir una matriz de liberación de fármaco biodegradable para su uso en perros (Clark et al., AJVR 2004).

[0015] ProHeart 6 (producto de moxidectina de liberación prolongada de Pfizer) proporcionó microesferas estériles de moxidectina, sin embargo, el producto se retiró el 3 de septiembre, 2004, debido a eventos adversos, incluyendo la muerte, ilustrando así el desafío significativo en la producción de formulaciones capaces de liberar de forma segura agentes beneficiosos, en particular de moxidectina, durante largos períodos de tiempo.

[0016] En vista de las referencias anteriores, existen varios ejemplos de formulaciones de "microesferas" de lactona macrocíclica, así como formulaciones "de tipo depósito de polímero líquido", pero los inventores no son conscientes de cualquier ninguna de dosificación de *implante sólido* de moxidectina polimérica en el momento de la presentación de esta divulgación.

[0017] A pesar del excelente progreso en la investigación antiparasitaria, siguen habiendo dudas con respecto a los informes cada vez más frecuentes de la resistencia entre los parásitos veterinarios (Parasitology 2005, 131, S179-190). Otras preocupaciones relacionadas con los efectos adversos potenciales de insectos que viven en el estiércol esenciales para la degradación del estiércol se han planteado con respecto a los endectocidas. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad continua de nuevos tratamientos endectocidas y antihelmínticos en la medicina veterinaria. Es un objetivo de esta invención proporcionar nuevos procesos para la fabricación de una forma cristalina de moxidectina.

[0018] La cita o identificación de cualquier documento en esta solicitud no constituye una admisión de que dicho documento está disponible como técnica anterior de la presente invención.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

[0019] La presente invención proporciona, entre otras cosas, un procedimiento para fabricar la forma cristalina A de moxidectina, caracterizada por un punto de fusión de aproximadamente 210°C, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de calentar moxidectina amorfa en un baño de aceite mantenido a una temperatura de aproximadamente 190°C durante un período de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 minutos, seguido de enfriamiento.

[0020] En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para fabricar la forma cristalina A de moxidectina, caracterizada por un punto de fusión de aproximadamente 210°C, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de desolvatación rápida [moxidectina·1,5 BuOH] del solvato.

[0021] En otro aspecto, la invención se refiere también a un procedimiento para preparar [moxidectin·1,5 BuOH] mediante la adición de moxidectina amorfa a n-butanol gradualmente a la saturación, mientras se mantiene la temperatura de 50°C a 60°C, seguido de la transferencia a -10°C durante la noche.

[0022] Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de y son abarcadas por la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

<*> = (cifras con asterisco representan materia incluida solamente para referencia)

[0023] La siguiente descripción detallada, proporcionada a modo de ejemplos, pero sin pretender limitar la invención únicamente a las realizaciones específicas descritas, pueden entenderse mejor conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

- 10 La figura 1 representa un diagrama de flujo que resume las formas cristalinas de moxidectina descritas y las transformaciones a las mismas y desde las mismas;
- la figura 2A representa un DSC de la moxidectina (lote S090601, forma amorfa);
- la figura 2B representa una DSC de la moxidectina (lote S080701, forma amorfa);
- 15 la figura 3 representa una PRXD de la moxidectina (lote S090601, forma amorfa);
- la figura 4 representa un ciclo de DSC de calentamiento-enfriamiento-calentamiento (20-193-20-250°C) de la moxidectina (lote S090601);
- la figura 5 representa un ciclo de DSC de calentamiento-enfriamiento-calentamiento (20-198-20-250°C) de la moxidectina (lote S090601);
- 20 la figura 6 representa un ciclo de DSC de calentamiento-enfriamiento-calentamiento (20-220-20-250°C) de la moxidectina (lote S090601);
- la figura 7 representa una curva de MDSC de la moxidectina (lote S090601);
- la figura 8 representa un patrón de difracción en polvo de rayos X (PXR) de la moxidectina (ahora Forma A) después de calentar a 190°C (lote S090601);
- 25 la figura 9 representa los espectros de IR de la moxidectina (parte superior: moxidectina amorfa, lote S090601; parte inferior: moxidectina cristalina transformada térmicamente, Forma A);
- la figura 10 representa los espectros Raman para la moxidectina (negro: moxidectina amorfa, lote S090601; gris: moxidectina cristalina transformada térmicamente);
- la figura 11 presenta imágenes microscópicas de moxidectina en fase caliente (lote S090601);
- 30 * la figura 12 es una imagen de cristal de moxidectina/recristalizada en MeOH (moxidectina (MeOH)_x);
- * la figura 13 presenta la PXR de cristales de moxidectina/MeOH secados al aire (moxidectina·(MeOH)_x);
- * la figura 14 es un TGA de cristales de moxidectina/MeOH secados al aire;
- * la figura 15. DSC de cristales de moxidectina/MeOH secados al aire;
- * la figura 16 presenta una imagen de cristal de moxidectina resultante de la recristalización (lote S090601) en EtOH (forma amorfa);
- 35 * la figura 17 presenta la PXR de cristales de moxidectina/EtOH secados al aire (moxidectina·(EtOH)_x);
- * la figura 18 presenta el TGA de cristales de moxidectina/EtOH secados al aire;
- * la figura 19 presenta la DSC de cristales de moxidectina/EtOH secados al aire;
- * la figura 20 presenta la DSC cristales de moxidectina/EtOH secados al vacío;
- 40 * la figura 21 presenta la PXR de cristales de moxidectina/EtOH después de secado al vacío a 95°C;
- * la figura 22 presenta la estructura molecular de moxidectina/EtOH que muestra su conexión con enlace de hidrógeno;
- * la figura 23 presenta un diagrama de empaquetamiento que muestra sus canales de poros a lo largo dirección [100];
- * la figura 24 presenta una imagen de cristal de moxidectina resultante de la recristalización (lote S090601) (amorfo) en IPA (moxidectina·(iPrOH)_x);
- 45 * la figura 25 presenta la PXR de cristales de moxidectina/IPA secados al aire (moxidectina·(iPrOH)_x);
- * la figura 26 presenta una imagen de cristal de moxidectina/recristalizado en IPA (lote 070201);
- * la figura 27 presenta el TGA de cristales de moxidectina/IPA secados al aire;
- * la figura 28 presenta la DSC de cristales de moxidectina/IPA secados al aire;
- * la figura 29 presenta la DSC de cristales de moxidectina/IPA secados al vacío;
- 50 la figura 30 presenta una imagen de cristal de moxidectina/recristalizado en n-butanol (moxidectina·(n-BuOH)_x);
- la figura 31 presenta la PXR de cristales de moxidectina/n-butanol secados al aire (moxidectina·(n-BuOH)_x);
- la figura 32 presenta el TGA de cristales de moxidectina/n-butanol secados al aire;
- la figura 33 presenta la DSC de cristales de moxidectina/n-butanol secados al vacío a 60°C;
- 55 la figura 34 presenta la DSC de cristales de moxidectina/n-butanol secados al vacío a 65°C;
- la figura 35 presenta la PXR de cristales de moxidectina/n-butanol después de secado a vacío a temperatura ambiente (moxidectina·(n-BuOH)_x);
- * la figura 36 presenta una imagen de cristal de moxidectina/recristalizado en metilciclohexano (moxidectina·(MCH)_x);
- * la figura 37 presenta la PXR de cristales de moxidectina/MCH secados al aire (moxidectina·(MCH)_x);
- 60 * la figura 38 presenta el TGA de cristales de moxidectina/MCH secados al aire;
- * la figura 39 presenta la DSC de cristales de moxidectina/MCH secados al aire;

la figura 41 presenta una superposición de PXRD de moxidectina/MCH secado al aire, moxidectina/MeOH y moxidectina transformada térmicamente;

* la figura 42 representa implantes poliméricos de acuerdo con la presente invención;

* la figura 43 representa DSC de flujo de calor para 2 implantes poliméricos diferentes;

* la figura 44 presenta la liberación in vitro de una formulación de acción prolongada (Lote 438-148) que contiene moxidectina amorfa, 75:25 DLG, 0,4 iv;

* la figura 45 presenta la liberación in vitro de una formulación de acción prolongada (Lote 588-17) que contiene moxidectina cristalina (Forma A), 75:25 DLG, 0,4 iv;

* la figura 46 presenta los niveles plasmáticos de moxidectina para caninos implantados con la formulación de acción prolongada con moxidectina amorfa.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0024] Las formas cristalinas de moxidectina descritas en este documento y las composiciones que comprenden las formas son muy eficaces para el tratamiento o la profilaxis de parásitos en o sobre mamíferos, peces y aves, y, en particular, gatos, perros, caballos, pollos, cerdos, ovejas y ganado con el objetivo de liberar a estos huéspedes de todos los parásitos que suelen encontrarse en los mamíferos, peces y aves.

[0025] Los compuestos y composiciones descritos son también activos contra plagas que dañan el material agrícola, y pueden ser utilizados eficazmente para tratar y proteger plantas, cultivos, material de propagación vegetal, propiedades que contienen madera o derivados de madera, de plagas nocivas.

[0026] Las formas y solvatos de moxidectina se preparan mediante la aplicación o adaptación de procedimientos conocidos (es decir, procedimientos usados hasta ahora o descritos en la bibliografía química); o procedimientos descritos en una o más de las patentes de Estados Unidos 4.199.569; 4.310.519; 4.423.209; 4.427.663; 4.457.920; 4.806.527; 4.831.016; 4.855.317; 4.859.657; 4.871.719; 4.873.224; 4.874.749; 4.895.837; 4.906.619; 4.920.148; 4.963.582; 4.973.711; 4.978.677; 5.015.630; 5.023.241; 5.030.622; 5.055.454; 5.055.596; 5.057.499; 5.077.308; 5.089.490; 5.162.363; 5.169.839; 5.208.222; 5.244.879; 5.262.400; 5.830.875; 7.250.402; y EP 0 214 731. Se entenderá por los expertos en la materia que el orden de transformaciones sintéticas empleadas puede variarse y dependerá de factores, tales como la naturaleza de otros grupos funcionales presentes en un sustrato particular, la disponibilidad de intermedios clave, y la estrategia de grupos protectores a adoptar.

[0027] En una realización de la invención, las formas de moxidectina pueden producirse de acuerdo con los procedimientos resumidos en la figura 1.

[0028] En otra realización de la invención, la moxidectina amorfa se convierte en la nueva forma cristalina mediante la inmersión de la moxidectina en un baño de aceite a 190°C durante de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 minutos, seguido por enfriamiento. La moxidectina amorfa puede ser distinguida de la nueva moxidectina cristalina (polimorfo A), por ejemplo, mediante cristalografía de rayos x (figura 2A).

[0029] Con el aumento de la temperatura, la moxidectina amorfa presenta una transición vítrea a 115°C, cristaliza a 175°C a Polimorfo A, funde a 206°C, y finalmente se descompone a 230°C. La moxidectina fundida se vuelve amorfa al enfriar. La moxidectina (lote 090601) cristalizó a 175°C, y la moxidectina (lote 080701) no se cristalizó.

[0030] Los términos utilizados en el presente documento tendrán su significado habitual en la técnica a menos que se especifique lo contrario.

[0031] La descripción anterior de la invención pretende ser ilustrativa y no limitante. Pueden haber diversos cambios o modificaciones en las realizaciones descritas para los expertos en la materia. Éstos se pueden realizar sin apartarse del alcance o espíritu de la invención.

[0032] La presente invención se describe adicionalmente, por ejemplo, en los siguientes ejemplos no limitativos. Una mejor comprensión de la presente invención y de sus muchas ventajas se obtendrá a partir de los siguientes ejemplos no limitantes, proporcionados a modo de ilustración. Será evidente para los expertos en la materia que estos ejemplos son procedimientos no limitativos, y que son posibles procedimientos similares para lograr las siguientes transformaciones.

<*> (Ejemplos y secciones con asterisco representan materia incluida solamente para referencia).

Ejemplo 1 - Producción y análisis de formas cristalinas de moxidectina

Procedimientos.

[0033] Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC). Las muestras se sometieron a tres modos de prueba con instrumentos TA Q100' para determinar las posibilidades térmicas.

1. Se utilizó el procedimiento DSC convencional que implicaba las siguientes etapas:

- a) Equilibrar a 20°C durante 3 minutos.
- b) Rampa de 10°C/minuto hasta 250°C [HEAT]

2. El DSC modulado con la siguiente secuencia de etapas:

- a) Equilibrar a 200°C.
- b) Modular $\pm 1^\circ\text{C}$ cada 60 segundos.
- c) Isotérmico durante 5 minutos.
- d) Rampa de 50°C por minuto hasta 200°C.

3. El procedimiento de calor-frío-calor en un mayor intervalo de temperatura:

- a) Equilibrar a 20°C durante 3 minutos.
- b) Rampa de 10°C/minuto hasta 200°C [HEAT]
- c) Rampa de 10°C/minuto hasta 20°C [COOL]
- d) Rampa de 10°C/minuto hasta 250°C [HEAT]

[0034] Análisis termogravimétrico (TGA). El TGA se realizó en instrumento TGA Perkin Elmer Pyris 1. Las muestras se equilibraron a 22°C durante 1 minuto, a continuación, se aplicó calor en una rampa de 10°C/minuto hasta 300°C.

[0035] Difracción de rayos X por polvo (XRPD). Los patrones se obtuvieron a temperatura ambiente en XRD-6000 de Shimadzu. Las condiciones de medición isotérmica fueron las siguientes:

Objetivo:	Cu
Tensión:	40 kV
Corriente:	40 mA
Rendija de divergencia:	1,0 mm
Rendija anti-dispersión:	1,0 mm
Rendija de recepción:	0,15 mm
Monocromador:	Ninguno
Rendija de detección:	0,15 mm
Intervalo de barrido:	2 a 40 grados
Velocidad de barrido:	1 grado/minuto
Tamaño de la etapa:	0,02 grados
Tiempo de preajuste:	1,20 s

[0036] Los difractogramas de XRPD de las muestras se compararon con respecto a la posición del pico e intensidad relativa, desplazamiento del pico, y la presencia o ausencia de picos en ciertas regiones angulares.

[0037] Microscopía Óptica. Las fotomicrografías ópticas se obtuvieron a temperatura ambiente en un microscopio de luz polarizada Axioskop 40 de Zeiss. Bajo luz reflejada e iluminación rasante, se capturaron imágenes con un aumento de 5X a través de una cámara con dispositivo (CCD) de carga acoplada, y se procesaron y mejoraron utilizando software Axiovision Versión 4.3.

[0038] Espectroscopía infrarroja de reflectancia total atenuada (ATR-IR). Se utilizaron un accesorio ATR de diamante (Smart Orbit) y un FTIR Nicolet 6700 de ThermoFisher con las siguientes condiciones instrumentales: 1) Intervalo de barrido: 4.000 a 650 cm^{-1} ; 2) 32 barridos; y 3) resolución de 4 cm^{-1} .

[0039] Espectroscopia Raman. Se utilizó microscopio DXR Raman de ThermoFisher con las siguientes condiciones instrumentales: 1) Tiempo de exposición = 20 s; 2) 32 barridos; 3) 24 barridos de muestra; y 4) 32 barridos de fondo.

[0040] Análisis gravimétrico por absorción de humedad (SGA). Utilizando un SGA100 dinámico de VTI, se obtuvieron los perfiles de adsorción y desorción con las siguientes condiciones: 1) isotérmica a 25°C; 2) Tiempo máximo de equilibrado de 10 minutos; 3) 0,0010% en peso en 5 minutos; y 4) Etapas del % de HR (humedad relativa) 5 a 95, y 95 a 5 en incrementos de 5 a 5%.

[0041] Análisis térmico de la moxidectina comercial (Lote # S090601). El DSC convencional del lote S090601 se representa en la figura 2A. Se muestra un evento endotérmico a 114°C, que se atribuye a la transición vítrea de la moxidectina. A partir de 174°C, presenta una amplia exotermia centrada a 186°C, que es presumiblemente la cristalización de moxidectina

gomosa. Inmediatamente después de la cristalización, aparece una endotermia estrecha a 206°C, lo que demuestra el punto de fusión de la forma A de moxidectina cristalina. La moxidectina comienza a descomponerse por encima de 230°C. El PXRD confirma que la moxidectina original (lote S090601) es amorfa, tal como se muestra en la figura 3.

5 **[0042]** Para entender mejor su comportamiento térmico, se llevaron a cabo varios experimentos de ciclo de calentamiento-enfriamiento-calentamiento. En el primer experimento, la moxidectina se enfrió por debajo de 193°C, que era justo por encima de la temperatura de cristalización, tal como se muestra en la figura 4. El experimento de recalentamiento mostró que la muestra todavía contenía una cierta cantidad de material amorfo debido a la presencia de la transición vítrea a 105°C. En cambio, el segundo ciclo de calentamiento mostró una endotermia de fusión sin evidencia de cristalización. Esto
10 indica que la cristalización de la moxidectina fue completa durante el ciclo de calentamiento inicial. Después de enfriar la muestra desde 198°C a una temperatura inferior a la temperatura de cristalización observada previamente, (figura 5), el recalentamiento no mostró evidencias de la transición vítrea observada previamente, lo que sugiere que toda la moxidectina cristalizó durante el primer ciclo de calentamiento. Esto es apoyado además por la observación del punto de fusión a pesar de que no se observó la transición de cristalización durante el segundo ciclo de calentamiento. Después de
15 enfriar la muestra desde 220°C (Figura 6), que era mayor que el punto de fusión pero por debajo de la temperatura de descomposición, el segundo ciclo de calentamiento mostró sólo la transición vítrea, lo que indica que la muestra se volvió en amorfa después de enfriamiento del material fundido.

20 **[0043]** La DSC modulada se muestra en la figura 7. Este resultado es consistente con los obtenidos a partir de DSC convencional. Apareció una transición vítrea en el experimento de flujo de calor reversible, mientras que se observaron la entalpía de relajación, la cristalización y la descomposición bajo condiciones de flujo de calor irreversibles. La fusión se produjo en ambos modos de flujo de calor reversible e irreversible.

25 **[0044]** *Moxidectina transformada térmicamente.* Se colocó aproximadamente 1 g de moxidectina (lote S090601) en un vial de vidrio, que se colocó después en un baño de aceite caliente a ~ 190°C y se mantuvo a esa temperatura durante aproximadamente 5 minutos. Después de enfriar, el material se había amarilleado ligeramente. El sólido amarillento se recogió y se molió en un mortero y mano de mortero. Para evaluar la pureza de la moxidectina que se había sometido a estas condiciones, se realizaron HPLC y LC-MS. El polvo se analizó mediante espectroscopia de difracción de rayos X por
30 polvo (PXRD). El patrón de PXRD muestra picos de difracción significativos indicativos de la presencia de una cantidad considerable de material cristalino, aunque una cierta cantidad de material amorfo aún permanecía, tal como se evidencia por la envoltura de halo en el patrón de difracción. Esto indica que la moxidectina amorfa cristaliza después de calentamiento hasta 190°C (Figura. 8).

35 **[0045]** Los espectros IR y Raman de la moxidectina amorfa y cristalina térmicamente transformada se muestran en la figura 9 y la figura 10. En comparación con la moxidectina amorfa, la moxidectina cristalina muestra dos picos agudos, 3471 cm⁻¹ y 3541 cm⁻¹ superpuestos sobre el pico ancho alrededor de 3500 cm⁻¹. La vibración de la tensión del carbonilo de la moxidectina cristalina muestra un ligero desplazamiento hacia rojo a 1707 cm⁻¹ desde 1712 cm⁻¹. Esto demuestra que estos picos en el IR se pueden utilizar para distinguir esta forma cristalina de la moxidectina amorfa.

40 **[0046]** Se tomó una imagen microscópica de fase caliente (Figura 11) de esta transición térmica. La moxidectina amorfa mayoritaria demostró un fenómeno de humectación alrededor de 120°C. La humectación aumentó significativamente con el aumento de la temperatura y la muestra pareció fluir, lo que indica que la muestra había experimentado una transición vítrea. Esto es paralelo a la observación de DSC. Entre 120 y 170°C, la muestra mantuvo este estado gomoso. A
45 aproximadamente 185°C, empezaron a aparecer puntos blancos y un gran parche de "cristales prismáticos" apareció a 190°C. Se desarrollaron más cristales al aumentar la temperatura a 205°C. Por encima de 210°C, los cristales comenzaron a fundirse terminando a 218°C. El compuesto se descompuso alrededor de 230°C. El experimento microscópico en fase caliente verificó el resultado de DSC, lo que confirma la transformación de la moxidectina de un estado amorfo a través de transición vítrea a un estado gomoso, seguido de cristalización y la posterior fusión, a continuación descomposición.

50 **[0047]** * *Preparación y caracterización de moxidectina/MeOH.* A 0,5 ml de metanol se añadió gradualmente a 50-60°C moxidectina amorfa (lote # S090601) hasta que la solución se saturó. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente y se formaron cristales de tipo varilla después de un corto período de tiempo. El sólido se filtró y la imagen de cristal se presenta en la figura 12. Los cristales eran birrefringentes, indicativo de cristalinidad. Los cristales de moxidectina/MeOH se secaron al aire durante 1 h. La difracción de rayos X por polvo confirmó su alto grado de cristalinidad
55 (Figura 13).

[0048] El análisis térmico de los cristales de Moxidectina·MeOH secados al aire mostró una pérdida de peso del 0,98% entre 50-150°C (Figura 14). El compuesto se descompone por encima de 250°C.

60 **[0049]** La DSC no mostró la pérdida de disolvente correspondiente debido a su bajo contenido. Muestra una pequeña exoterma alrededor de 150°C, a continuación se funde a 214°C (Figura 15). El pico pequeño a 150°C resulta de cualquiera

de la evaporación del disolvente o de la transición de fase. El punto de fusión está muy cerca del obtenido de la moxidectina amorfa, lo que sugiere que podrían ser la misma forma.

[0050] * *Preparación y caracterización de Moxidectina-EtOH*. A 1 ml de etanol, se añadió gradualmente moxidectina amorfa (lote # S090601) a 50-60°C hasta que se saturó la solución. La mezcla resultante se dejó a temperatura ambiente y se formaron rápidamente cristales grandes que tenían unas dimensiones aproximadas de aproximadamente 2 mm x 2 mm x 0,5 mm. Un cristal representativo se deshizo y se tomó la imagen del cristal que se representa en la Figura 16.

[0051] Los cristales de moxidectin-EtOH se separaron y se secaron al aire durante 2 h. Los cristales se trituraron con un mortero y mano de mortero y se analizaron por difracción de rayos X por polvo y análisis térmico. La PXRD muestra un fuerte patrón de difracción (Figura 17), que es diferente del de moxidectina-MeOH, lo que indica que tienen diferentes formas cristalinas.

[0052] El análisis termogravimétrico de moxidectina-EtOH secado al aire demostró una pérdida de peso del 11,87% tras calentamiento de 25 a 200°C (Figura 18). Esta pérdida de peso corresponde aproximadamente a dos moles de etanol por mol de moxidectina. El cálculo teórico basado en la moxidectina:etanol = 1:2 da un contenido en peso de etanol del 12,57%, que es consistente con el valor experimental. El compuesto se descompone por encima de 250°C.

[0053] La DSC de este material muestra una endotermia estrecha con un hombro a 90°C, lo que probablemente corresponde a la pérdida de etanol tal como se muestra en la Figura 19.

[0054] Los cristales moxidectina-EtOH se secaron bajo vacío a 100°C durante 4 h. La DSC muestra que la moxidectina secado al vacío se convertía en amorfa (Figura 20). Esto se confirma adicionalmente mediante difracción de rayos X. Sólo unos pocos picos pequeños dispersos aparecen en la PXRD (Figura 21), debido probablemente a una desestructuración incompleta de la estructura después de la extracción del disolvente.

[0055] Se determinó la estructura cristalina única de moxidectina-EtOH cristalina que demostró un grupo espacial $P2_1$ monoclinico con el parámetro de celda $a = 11,2731$ (15) Å, $b = 8,9286$ (12) Å, $c = 21,955$ (3) Å, $\beta = 93,623$ (2)°, $V = 2205,4$ (5) Å³, $Z = 2$.

[0056] Hay una molécula de moxidectina y dos moléculas de etanol por unidad asimétrica tal como se representa en la figura 22. Esto es consistente con el resultado de TGA. Un etanol está unido por el hidrógeno con un grupo hidroxilo de la moxidectina como donante y el otro etanol está unido por el hidrógeno a otro grupo hidroxilo de la moxidectina como aceptor. Las moléculas de moxidectina están conectadas entre sí por enlaces de hidrógeno, formando un canal a lo largo de la dirección a cristalográfica, en la que se encuentran las moléculas de etanol (Figura 23).

[0057] * *Preparación y caracterización de Moxidectina-IPA*. A 1 ml de solución de isopropanol, se añadió gradualmente hasta la saturación a 50-60°C moxidectina amorfa (lote # S090601). La solución resultante se enfrió y se mantuvo a temperatura ambiente dando lugar a una rápida formación de grandes cristales prismáticos. Se tomó la imagen del cristal y se representa en la Figura 24. Los cristales de moxidectina-IPA se aislaron y se secaron al aire durante 2 h. La difracción de rayos X por polvo muestra que estos cristales son altamente cristalinos (Figura 25). Cuando se utilizó la moxidectina (lote # 070201, que no contiene BHT) para la cristalización, también se formaron los cristales como se muestra en la Figura 26. El análisis térmico de cristales Moxidectina-IPA secados al aire mostró una única pérdida de peso del 14,87% a partir de 25-200°C (Figura 27). Esta pérdida de peso corresponde aproximadamente a dos moles de IPA por moxidectina. El cálculo teórico basado en la moxidectina:IPA = 1:2 da un contenido en % en peso de del 15,78%, que está en buena concordancia con los datos experimentales. El compuesto se descompone por encima de 250°C.

[0058] La DSC de este material demostró una endotermia estrecha con un hombro a 90°C (Figura 28), lo que probablemente corresponde a la pérdida del disolvente de IPA. El pico pequeño a 130°C resulta de cualquiera de evaporación del disolvente o de transición de fase, y necesita mayor investigación.

[0059] Los cristales de Moxidectina-IPA se secaron bajo vacío a 100°C durante 30 min. La DSC muestra que la moxidectina secada al vacío se vuelve amorfa (Figura 29).

[0060] *Preparación y caracterización de Moxidectina-n-butanol*. A 0,5 ml de n-butanol, se añadió gradualmente moxidectina amorfa (lote # S090601) hasta la saturación (manteniendo la temperatura entre 50-60°C). A continuación, la mezcla se transfirió a -10°C durante la noche, durante cuyo tiempo se habían formado cristales (Figura 30). Los cristales de moxidectina/n-butanol se separaron y se secaron al aire durante 2 h. La difracción de rayos X por polvo muestra que estos cristales son altamente cristalinos (Figura 31).

[0061] El análisis térmico de Moxidectina-n-butanol secado al aire muestra una pérdida de peso del 14,94% tras calentar desde 25 a 150°C (Figura 32). Esta pérdida de peso corresponde a 1,5 moles de n-butanol por mol de moxidectina. El cálculo teórico basado en la moxidectina:n-butanol = 1:1,5 da un contenido en peso del 14,78% de n-butanol. El compuesto se descompone por encima de 250°C.

[0062] La DSC muestra una endotermia estrecha a 65°C (Figura 33), lo que probablemente corresponde a la pérdida del n-butanol. La moxidectina desolvatada se funde a 215°C, lo que corresponde al punto de fusión del polimorfo A. La temperatura de desolvatación es relativamente baja en comparación con moxidectina-EtOH y moxidectina-IPA, lo que sugiere que el n-butanol se une muy ligeramente con la molécula de moxidectina.

[0063] Para confirmar el proceso de desolvatación de moxidectina-n-butanol, los cristales se secaron al vacío a 60°C durante 2 h. La DSC y PXRD muestran que la moxidectina secada al vacío se volvió amorfa después del secado (Figura 34 y Figura 35). Las condiciones de secado menos rigurosas no desolvataron con éxito el material (Figura 36).

[0064] * *Preparación y caracterización de Moxidectin-MCH.* A una solución de 1 ml de metilciclohexano (MCH), se añadieron aproximadamente 500 mg de moxidectina amorfa (lote # S090601) mientras se calentaba hasta 50-60°C y la mezcla se concentró por evaporación. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se añadió hexano y se formó un precipitado sólido. El sólido se lavó con hexano y se secó a temperatura ambiente durante un corto periodo de tiempo (imagen, Figura 37) de. La difracción de rayos X por polvo demostró su cristalinidad (Figura 38).

[0065] El análisis térmico de cristal de Moxidectina-MCH secado al aire demostró una pérdida de peso del 1,68% después de calentamiento de 50 a 150°C (Figura 39). El compuesto se descompone por encima de 250°C. La DSC demostró un punto de fusión aparente a 211°C (Figura 40). Esta temperatura de fusión está de acuerdo con la del sólido transformado térmicamente y la Moxidectina-MeOH, lo que implica que son la misma forma cristalina. Además, los patrones de PXRD de los cristales de moxidectina obtenidos a partir de metanol y MCH son idénticos (Figura 13 para MeOH vs. Figura 41 para MCH), confirmando adicionalmente la similitud de las formas cristalinas de los dos sistemas de disolventes.

[0066] *Conclusiones.* Se obtuvieron una serie de formas de moxidectina cristalina a partir de disolventes de alcohol incluyendo metanol, etanol, IPA y butanol etc. Las preparadas a partir de metanol y metilciclohexano tienen esencialmente los mismos patrones de PXRD que la transformada térmicamente, lo que indica que tienen una forma cristalina similar. La recrystalización de la moxidectina en etanol, IPA y n-butanol produce sus respectivos solvatos. Los solvatos moxidectina-EtOH y moxidectina-IPA se vuelven amorfas después de la pérdida de disolventes, mientras que sorprendente e inesperadamente, la moxidectina-n-butanol permanece cristalina después de la extracción rápida del disolvente. La moxidectina cristalina es casi no higroscópica, mientras que la moxidectina amorfa es ligeramente higroscópica.

*** Ejemplo 2 - Preparación de implantes poliméricos de liberación lenta que comprenden moxidectina, y perfiles de liberación in vitro.**

[0067] *Resumen.* Las propiedades de la forma cristalina del API moxidectina se representan en las figuras 2-8 y las figuras 10-12, incluyendo la temperatura de transición vítrea, la cristalización y la fusión del cristal. Se prepararon implantes poliméricos que contenían moxidectina amorfa o cristalina. Para los implantes de moxidectina amorfa, se mantuvo la temperatura del proceso a ~ 120-170°C. Los inventores prevén que cualquier temperatura por encima de 120°C (pero por debajo de la temperatura de descomposición de la moxidectina) sería aceptable, ya que la moxidectina sería fluida por encima de su temperatura de transición vítrea y sería más fácil de extruir con el aumento de temperatura (es decir, de 120 a 170°C). Los inventores encontraron sorprendente e inesperadamente que la moxidectina cristaliza por encima de 170°C. Por lo tanto, hay un estrecho intervalo de temperatura que es óptimo para la preparación de los implantes de la invención, y el procesamiento a una temperatura superior a la temperatura de recrystalización, aunque va en contra de las expectativas, no es deseable para la producción de implantes que contienen moxidectina amorfa. Cuando se procesa a temperaturas entre 180 y 210°C, la moxidectina amorfa cristaliza, y esta transición tiene el efecto de alterar el perfil de liberación de cualquier implante polimérico producido.

[0068] *Implantes poliméricos.* Se preparó una solución de moxidectina (40% p/p), BHT (1,4%) y poli d láctido-glicólido (75:25 L:G; 0,4 iv) en cloruro de metileno y se secó por pulverización en un secador por pulverización Buchi. El polvo secado por pulverización se colocó en el plastómetro Tenius Olsen y extruyó a 118°C. La hebra de polímero resultante con diámetro de ~ 0,8 mm se cortó en gránulos pequeños de ~ 2 mm de longitud. Se colocaron cinco gránulos en un vial de centelleo que contenía 10 ml de SDS al 2% en PBS, pH 7. Se prepararon viales por triplicado y se colocaron en un baño de agua con agitación a 37°C (120 rpm). Se extrajo solución en cada punto de muestreo, se sustituyó con SDS al 2% fresco en PBS y ensayó por HPLC. Los resultados se muestran en la Figura 44. El perfil de liberación in vitro se proporciona en la Figura 44. Además, las muestras se ensayaron por DSC (Figura 43). La moxidectina era amorfo en las muestras de gránulos.

- 5 **[0069]** En un lote alternativo, se preparó una solución de moxidectina (40% p/p), BHT (1,4%) y poli d láctido-glicólido (75:25 L:G; 0,4 iv) en cloruro de metileno y se secó por pulverización en un secador por pulverización Buchi. El polvo secado por pulverización se colocó en un extrusor de un husillo de 3/8" (boquilla de tierra corta de 0,75 mm, husillo de mezclado elongacional, microalimentador K-Tron fijado a 24 g/h). La hebra de polímero resultante con diámetro de ~ 0,8 mm se cortó en gránulos pequeños de ~ 2 mm de longitud. Se colocaron cinco gránulos en un vial de centelleo que contenía 10 ml de SDS al 2% en PBS, pH 7. Se prepararon viales por triplicado y se colocaron en un baño de agua con agitación a 37°C (120 rpm). Se extrajo solución en cada punto de muestreo, se sustituyó con SDS al 2% fresco en PBS y se ensayó por HPLC. Los datos de disolución in vitro se muestran en la figura 45.
- 10 *** Ejemplo 3 - Perfil de moxidectina en plasma en caninos inyectados con implantes poliméricos.**
- 15 **[0070]** En el Día 0, se administraron cinco animales caninos por vía subcutánea una inyección de 4 implantes (que contenían 2.000 mcg de moxidectina amorfa, 75:25 DLG (0,4 iv), preparada como el lote # 438-148), se utilizó una aguja de implante separado que contenía el número apropiado de implantes para cada animal tratado. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente de 5 a 7 ml) en tubos heparinizados etiquetados individualmente. El plasma se recuperó y se almacenó congelado en alícuotas hasta el momento del ensayo. Los resultados de los datos del estudio canino se muestran en la Figura 46. Además, las muestras de implantes también se ensayaron mediante DSC e IR que determinaron que la moxidectina era amorfa en el implante.
- 20 **[0071]** Habiendo descrito de este modo en detalle las realizaciones preferidas de la presente invención, debe entenderse que la descripción anterior de la invención pretende ser ilustrativa y no limitada a los detalles particulares expuestos en la descripción anterior, ya que son posibles muchas variaciones aparentes de la misma.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para fabricar la forma A de moxidectina cristalina, **caracterizada por** un punto de fusión de aproximadamente 210°C, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de calentamiento de moxidectina amorfa en un baño de aceite mantenido a una temperatura de aproximadamente 190°C durante un período de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 minutos, seguido de enfriamiento.
- 10 2. Procedimiento para fabricar la forma A de moxidectina cristalina, **caracterizada por** un punto de fusión de aproximadamente 210°C, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de desolvatación rápida del solvato de [moxidectina·1,5 BuOH].
- 15 3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que el solvato de [moxidectina·1,5 BuOH] se prepara mediante las etapas de adición de moxidectina amorfa a n-butanol gradualmente hasta la saturación, mientras se mantiene la temperatura de 50°C a 60°C, seguido de la transferencia a -10°C durante la noche.

Figura 1

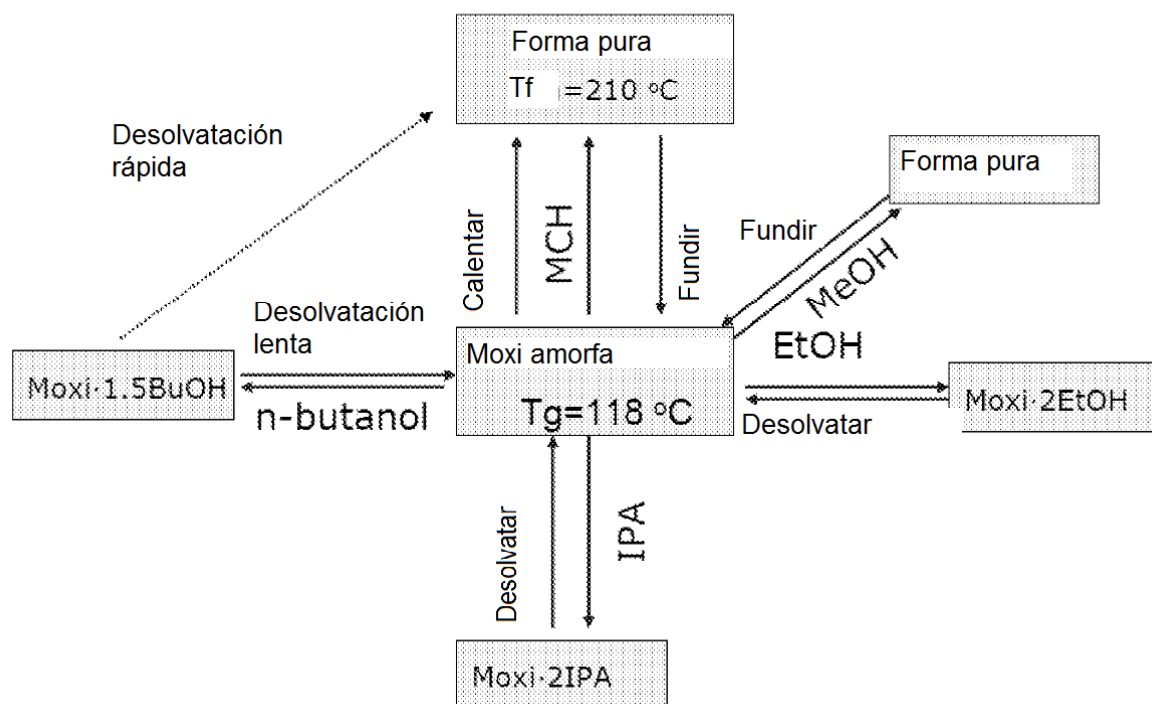


Figura 2A

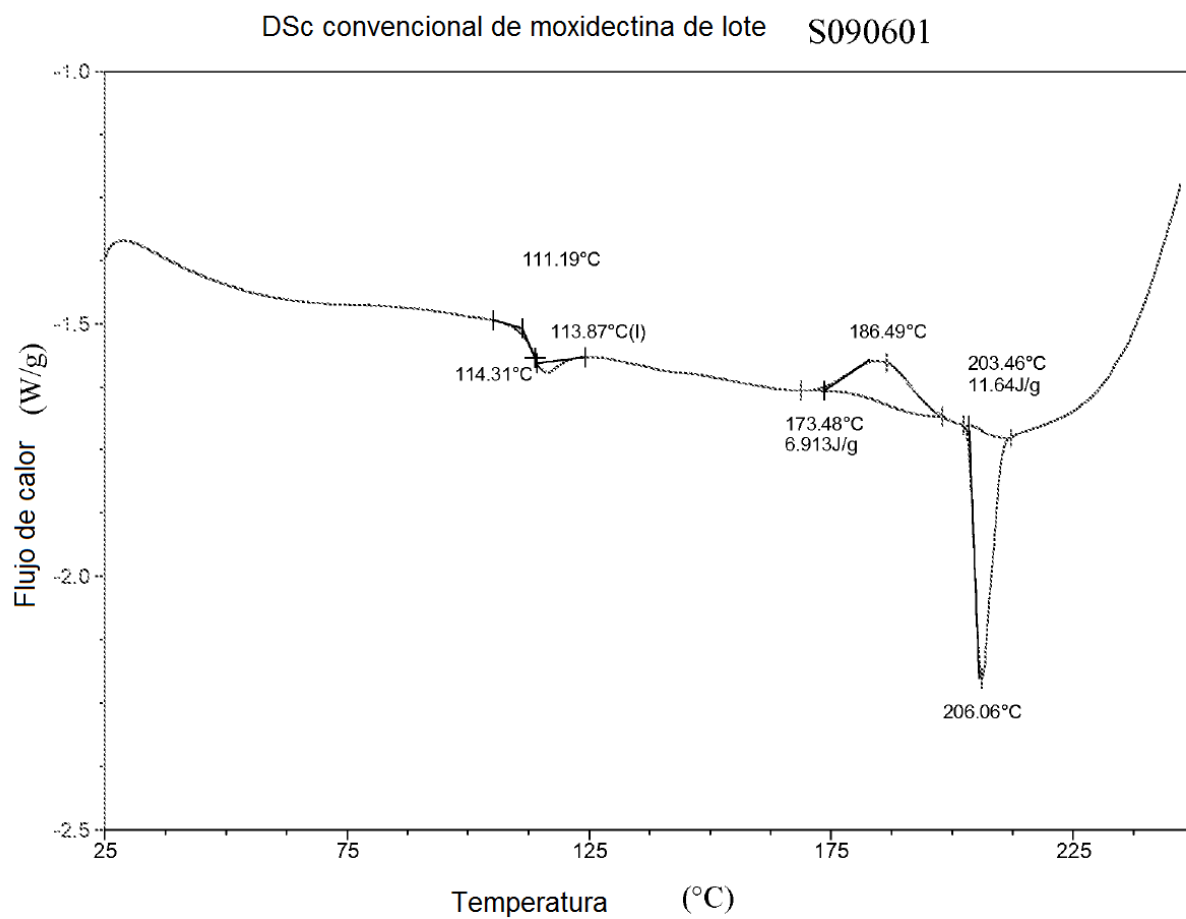


Figura 2B

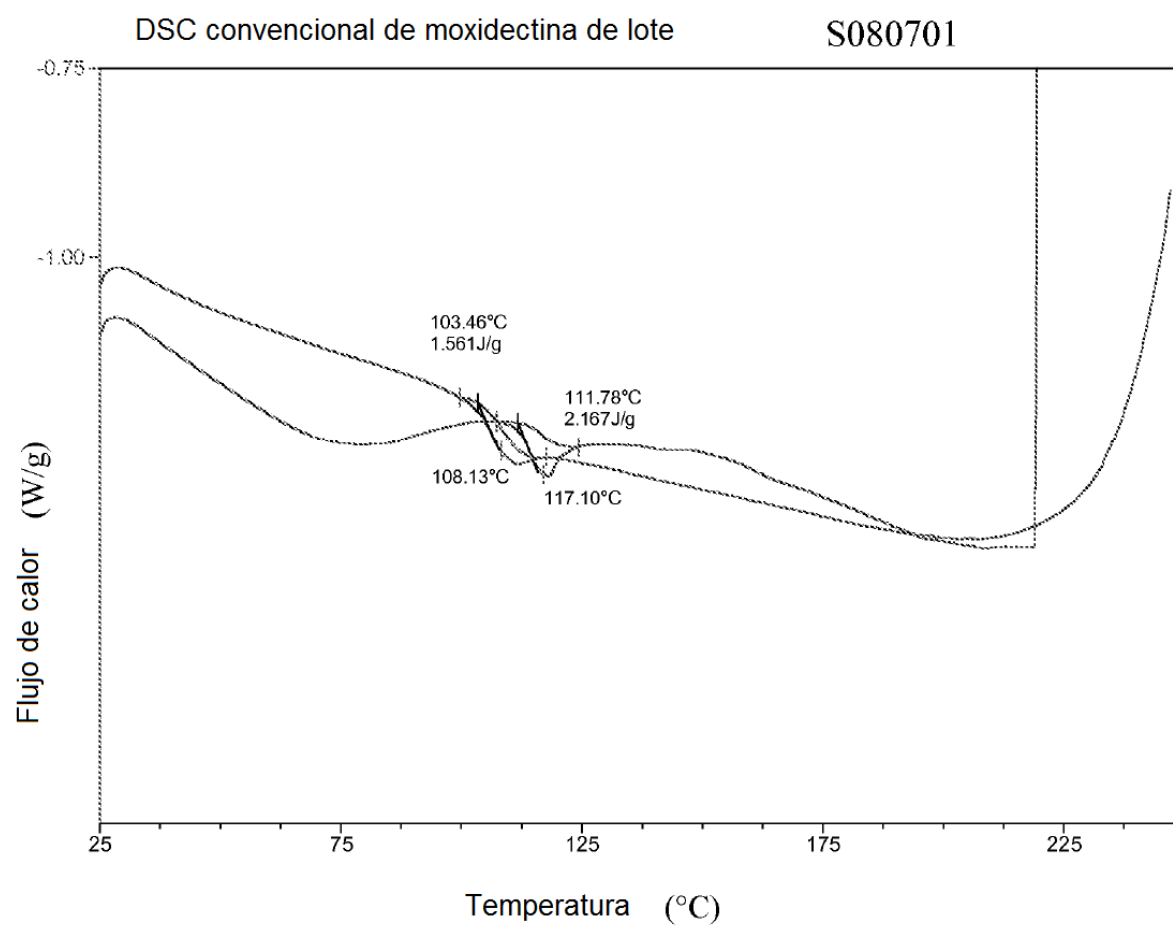


Figura 3

PRXD de moxidectina de lote S090601

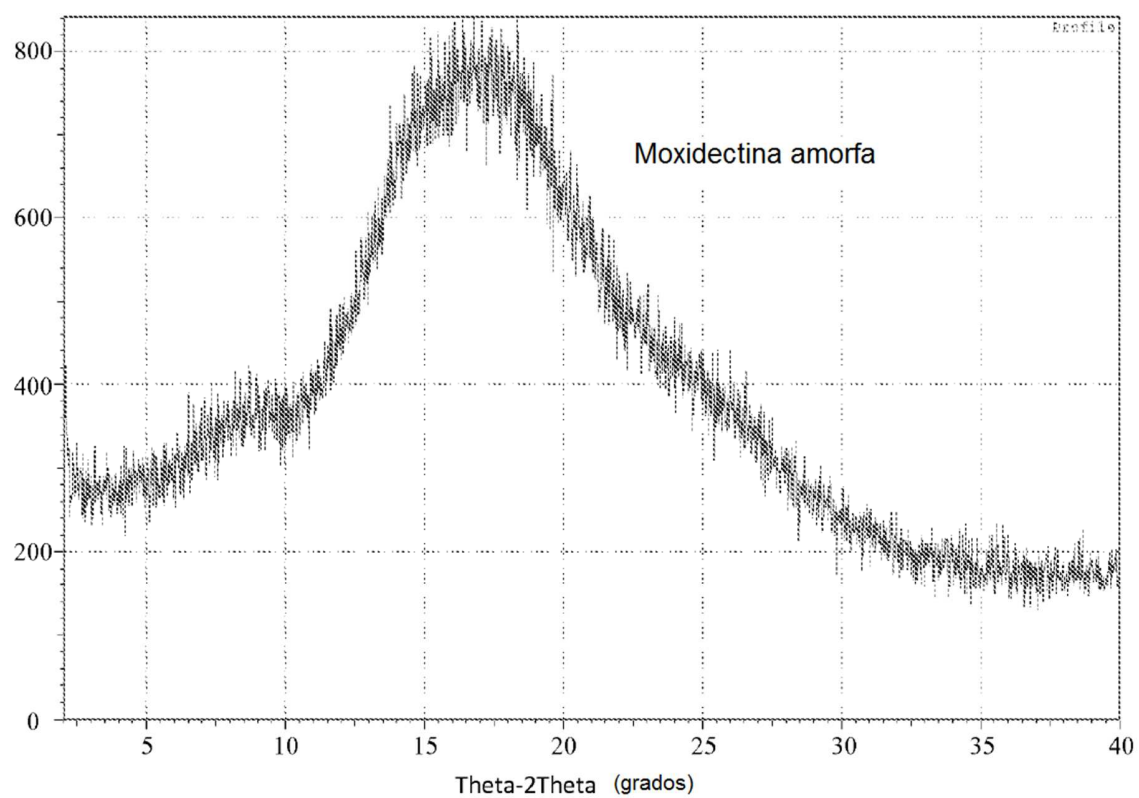


Figura 4

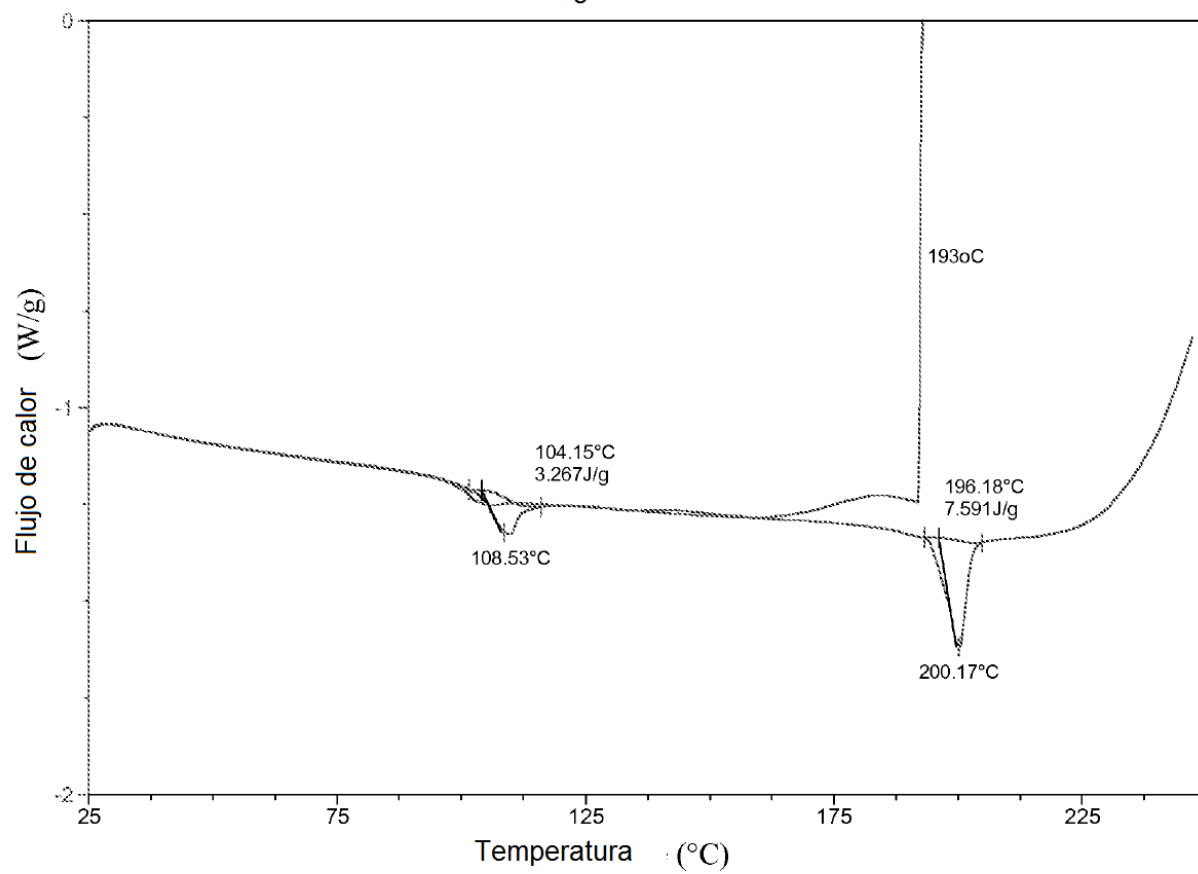


Figura 5

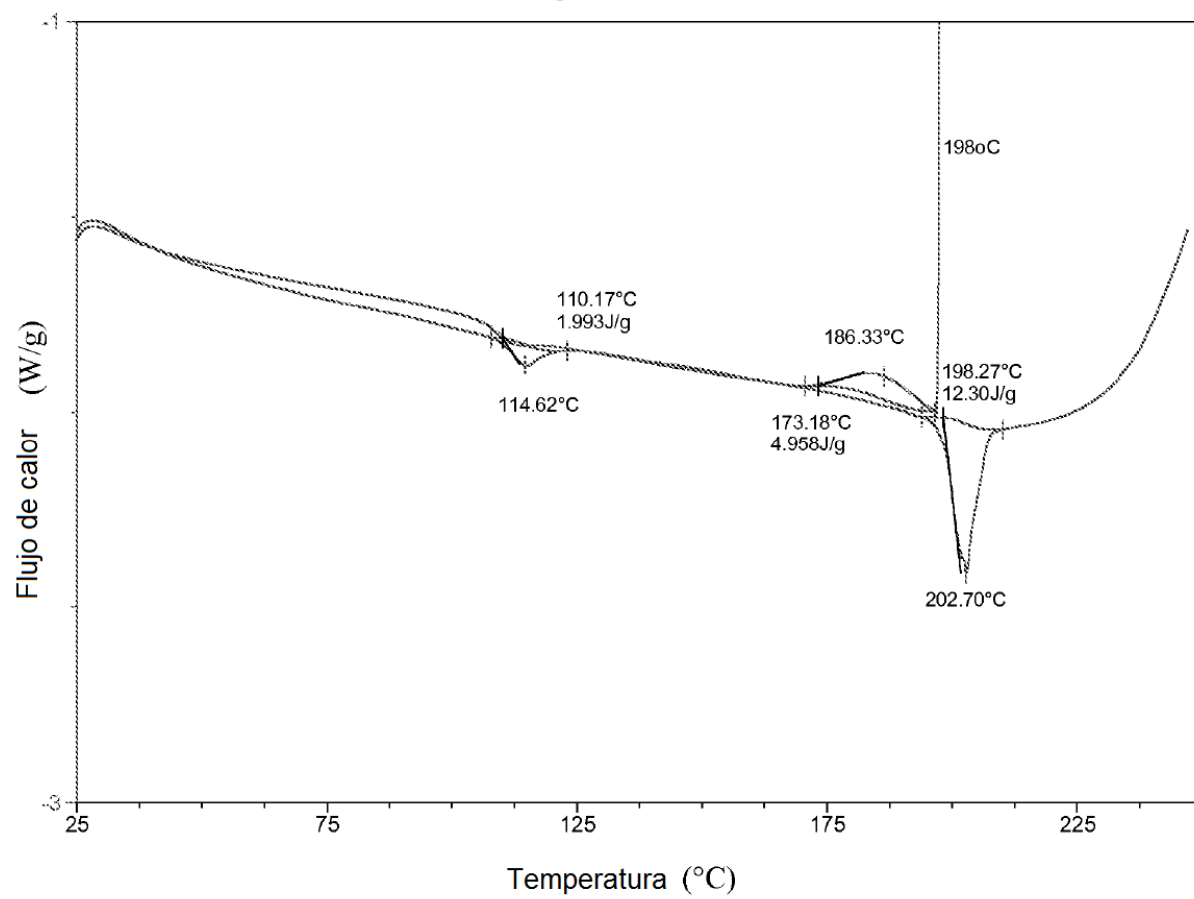


Figura 6

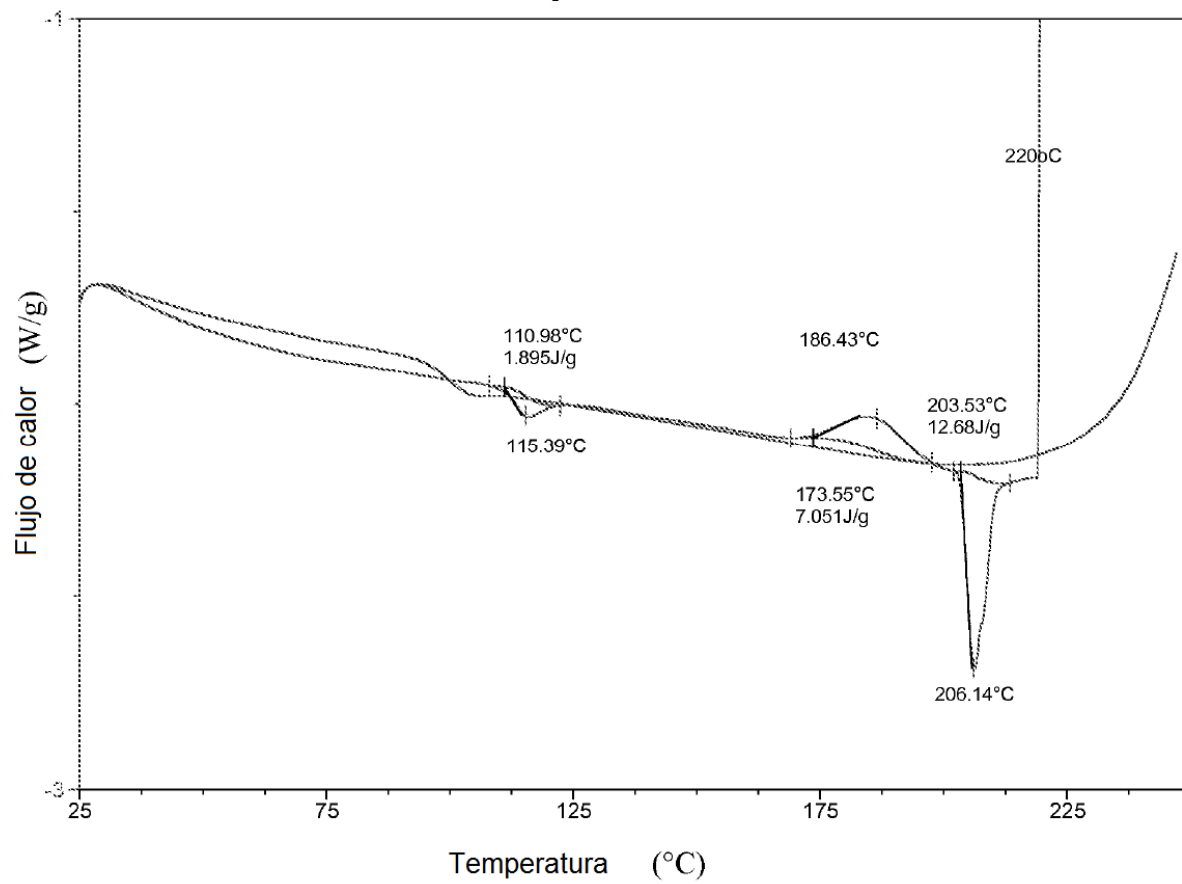


Figura 7

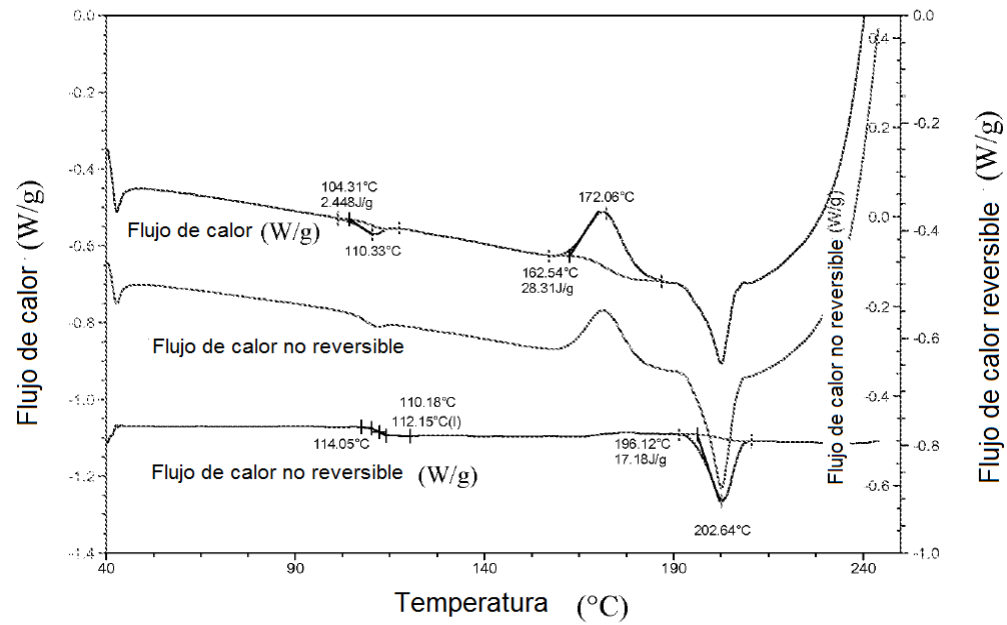


Figura 8

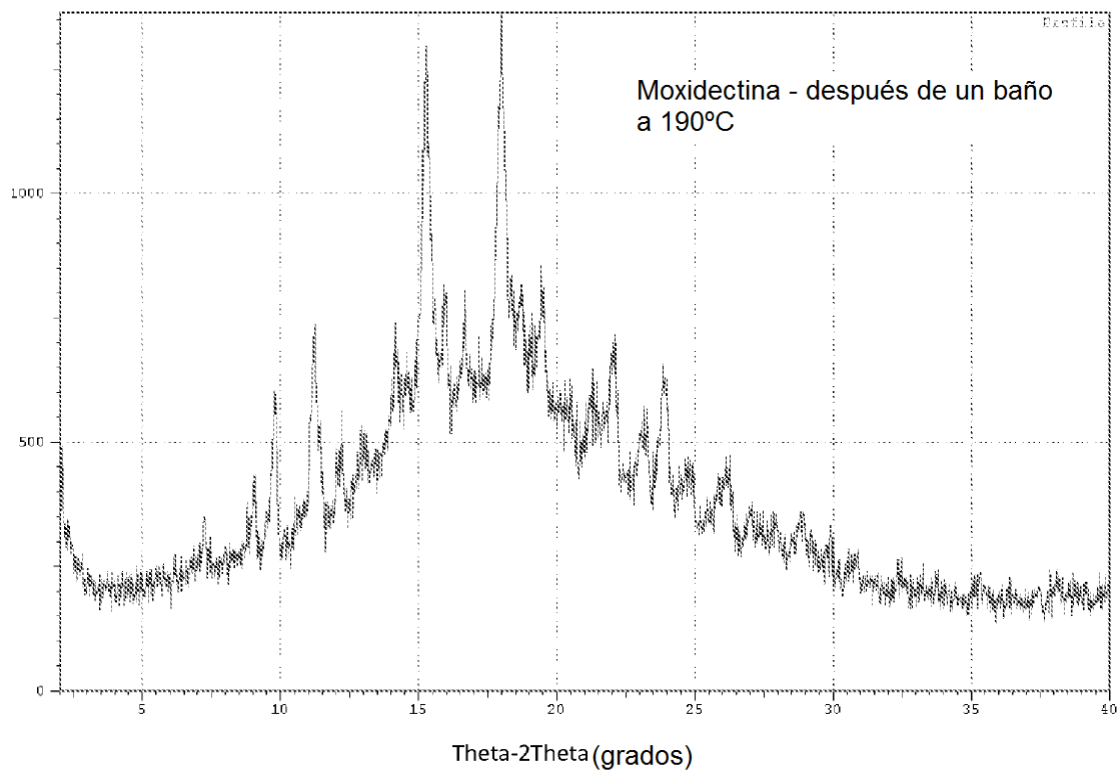


Figura 9

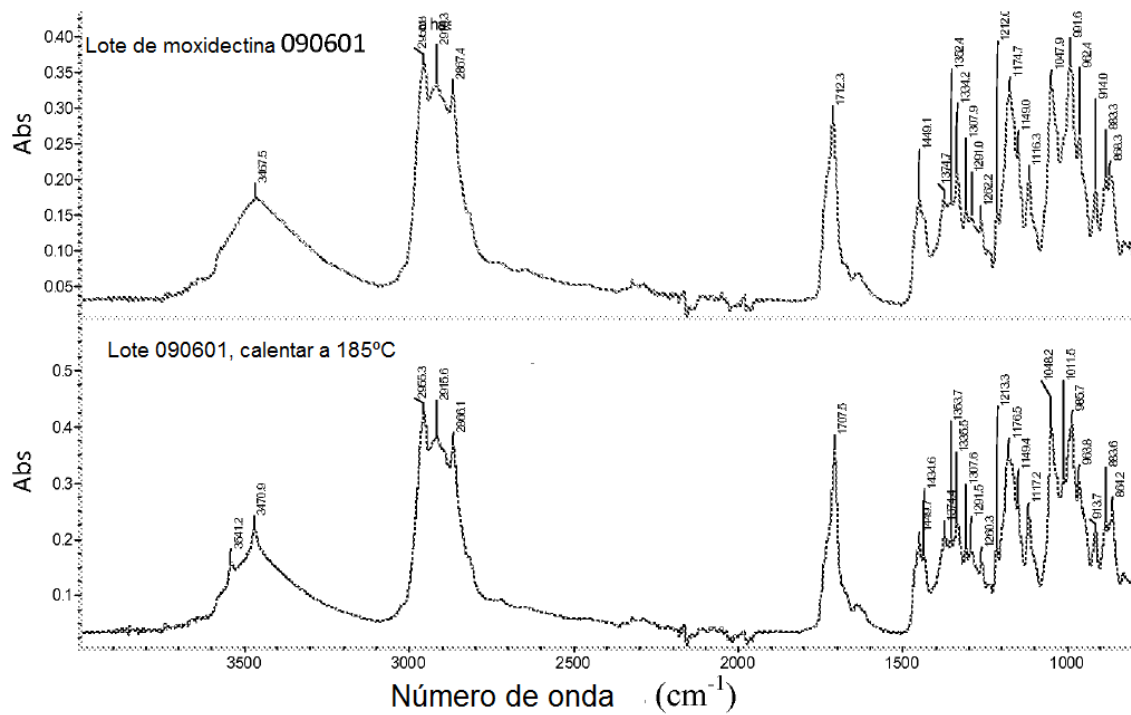


Figura 10

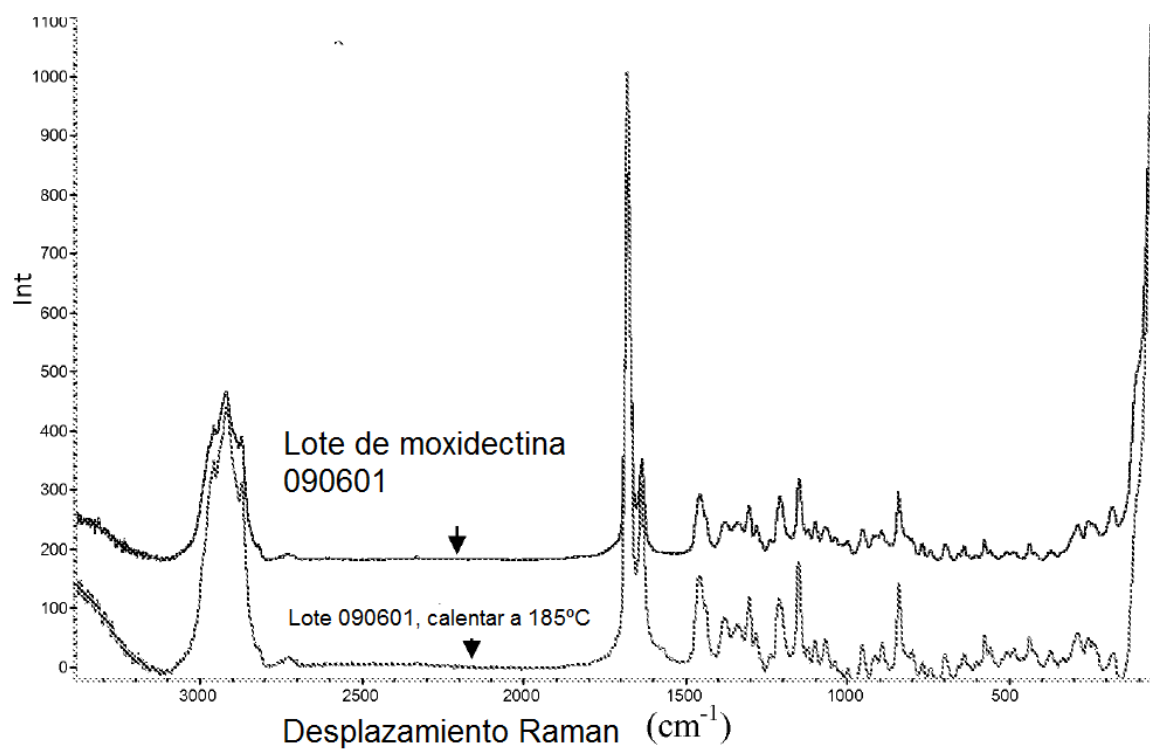


Figura 11(1/2)

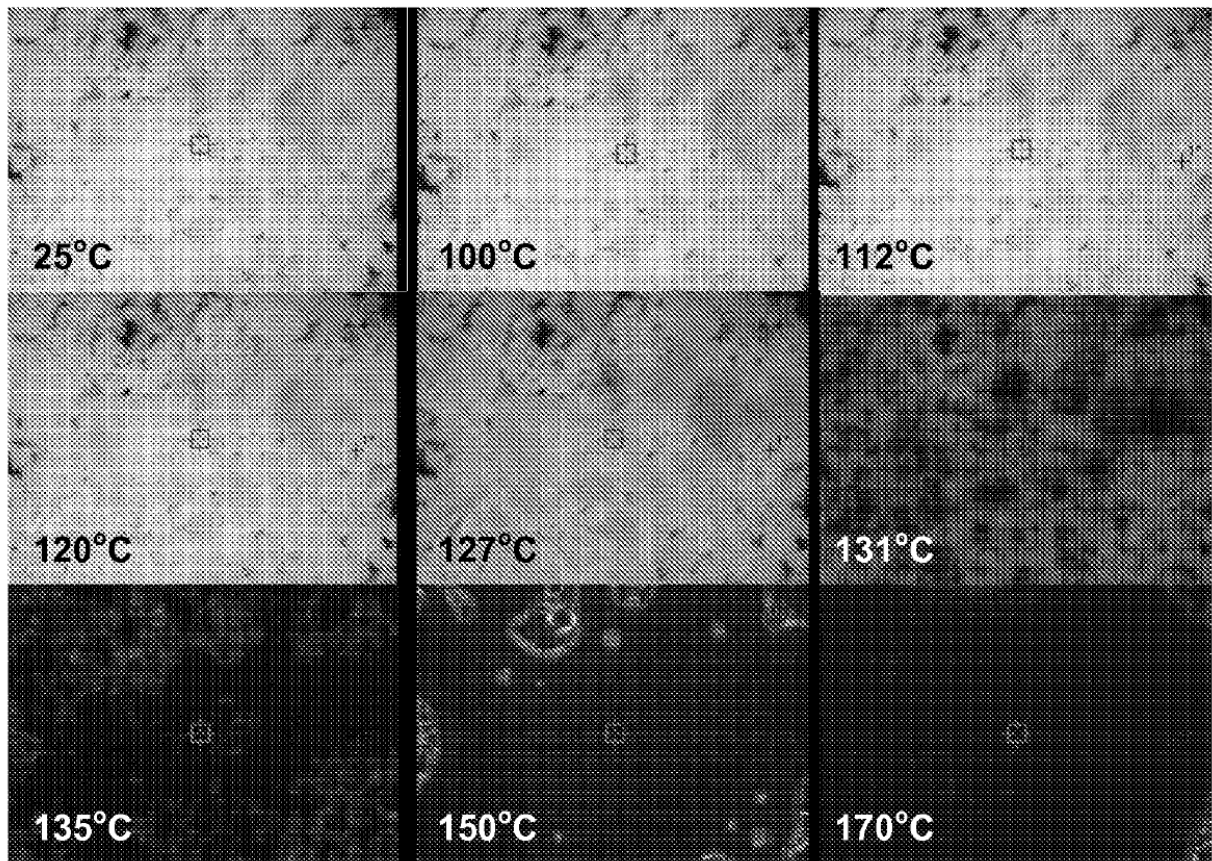
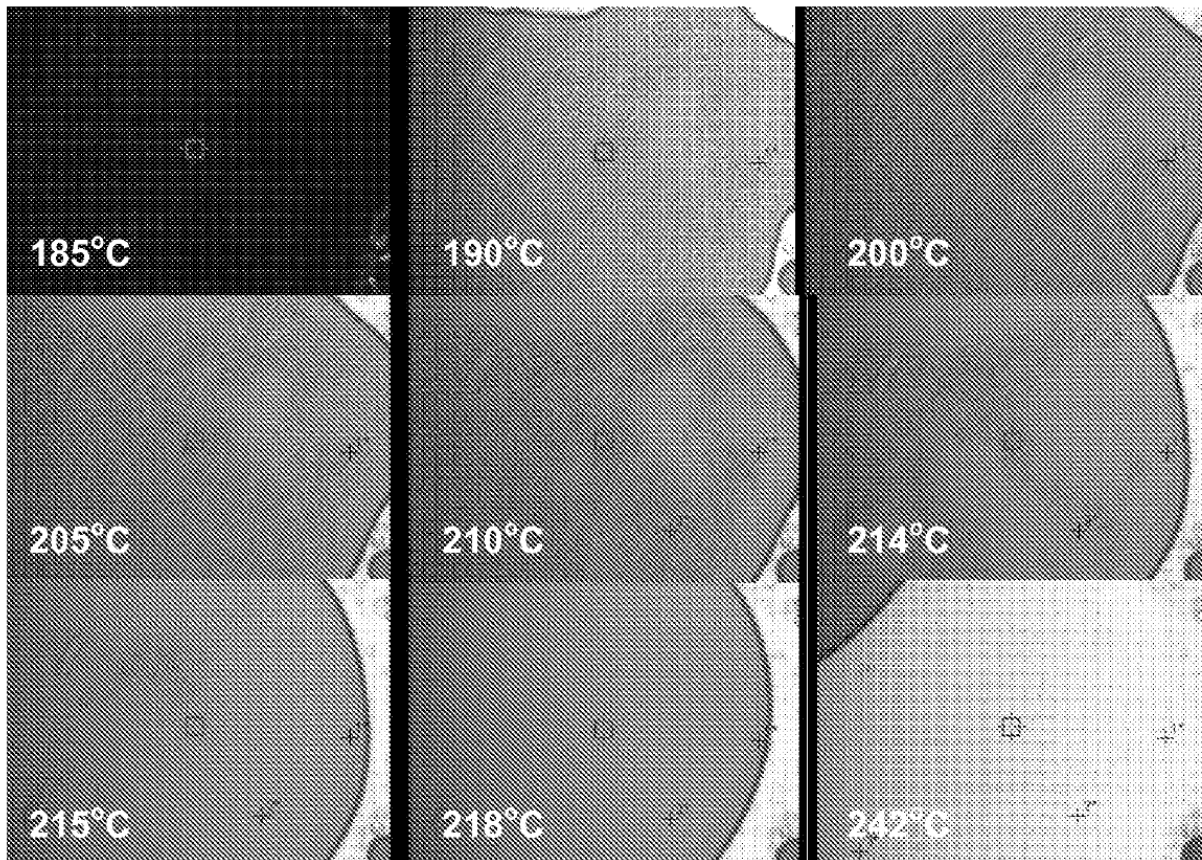
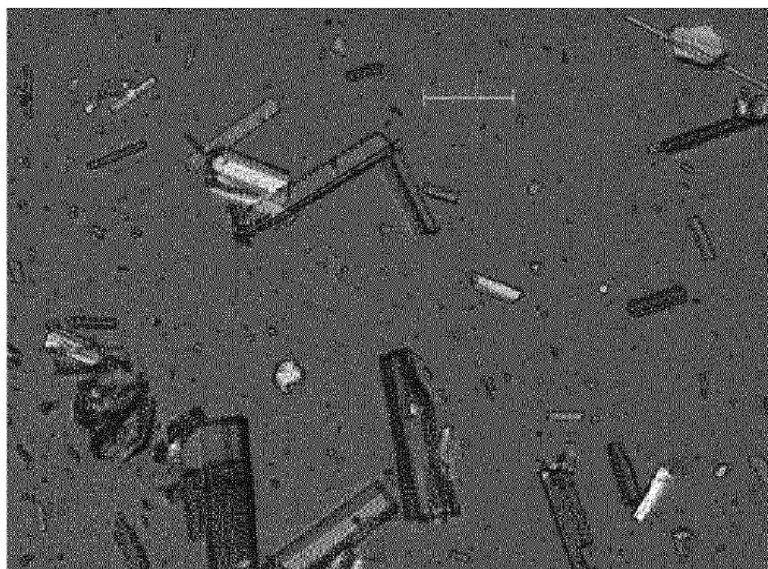


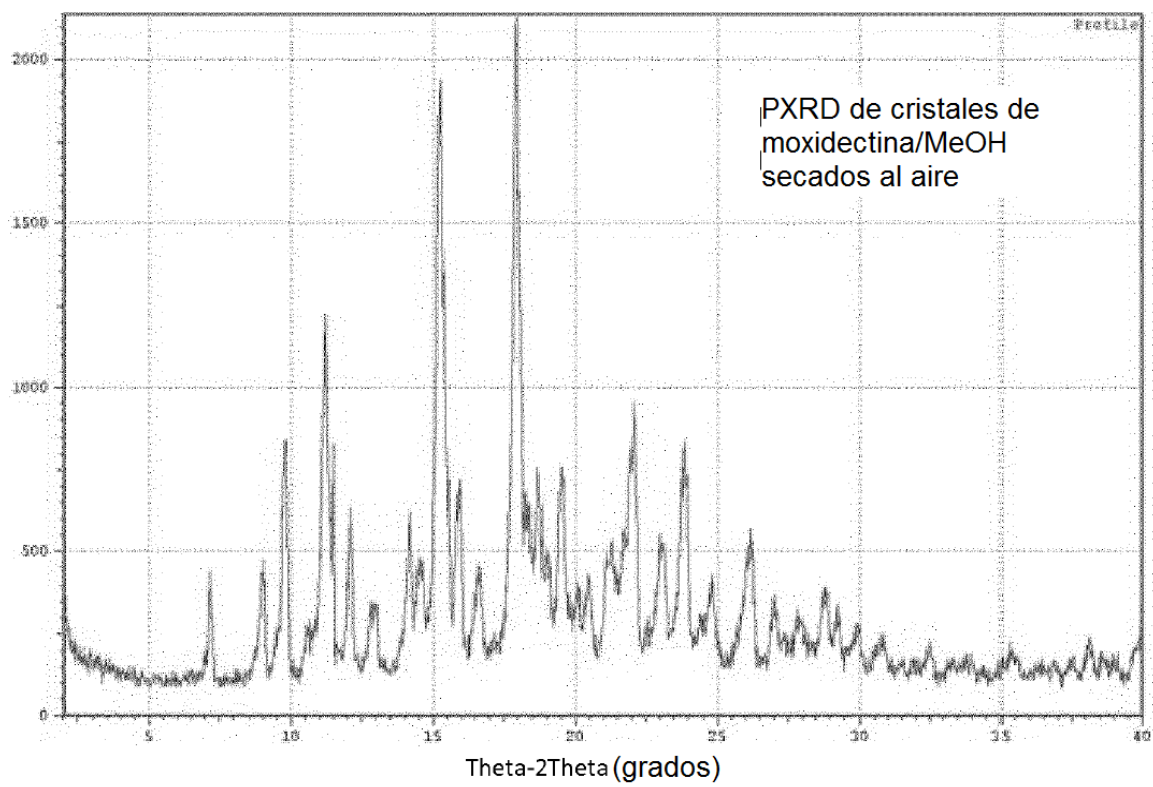
Figura 11(2/2)



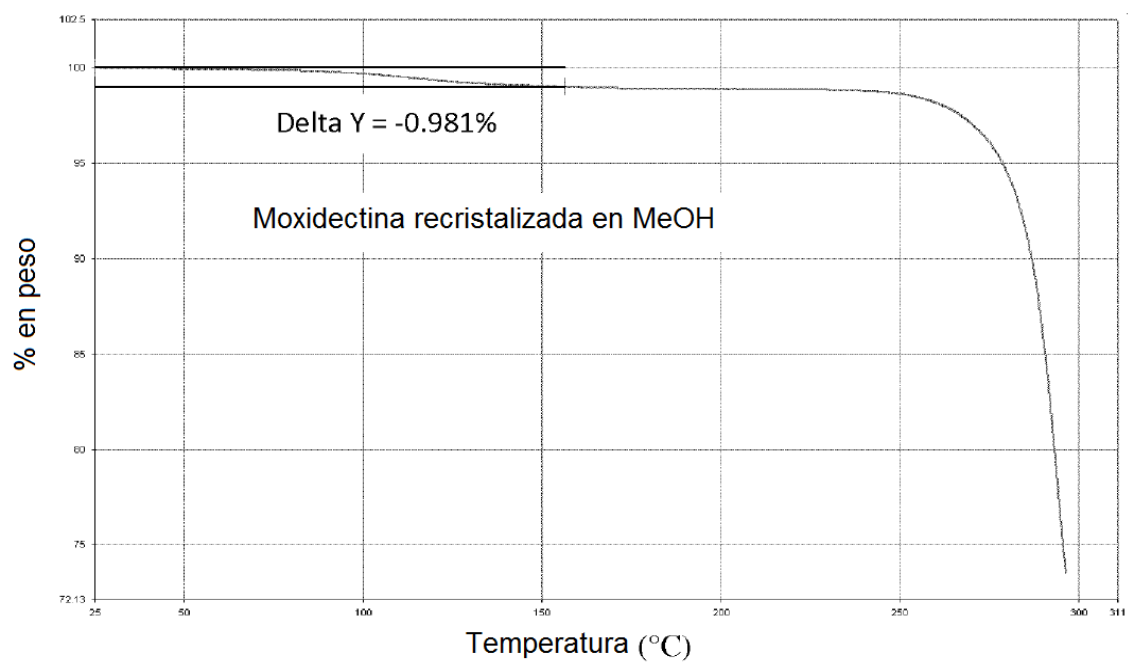
* Figura 12



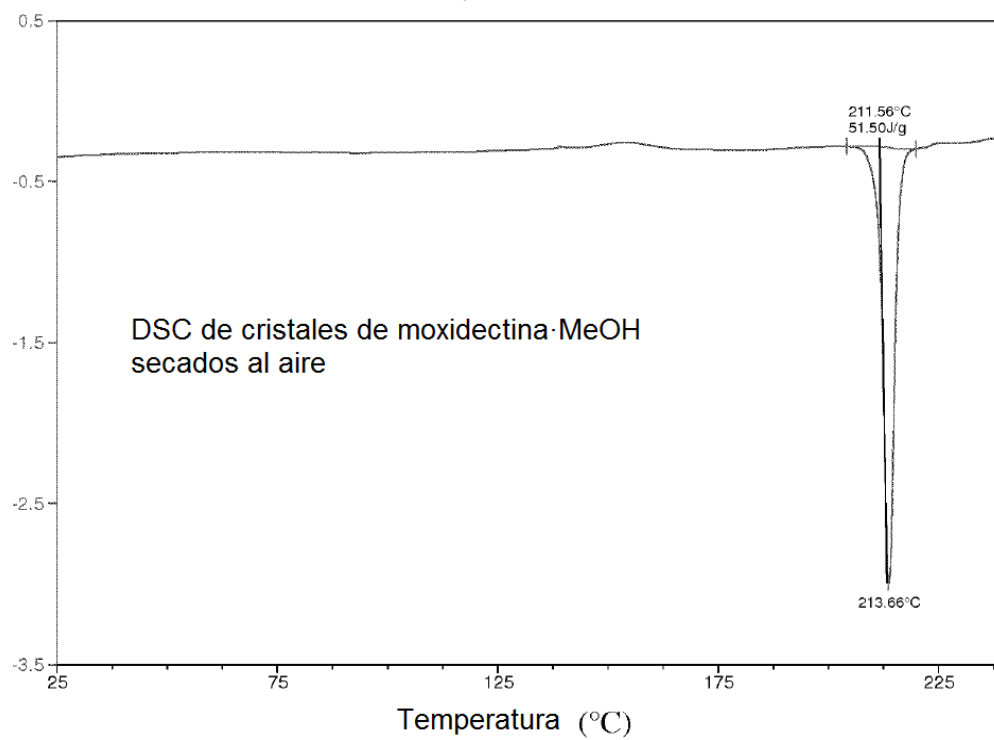
* Figura 13



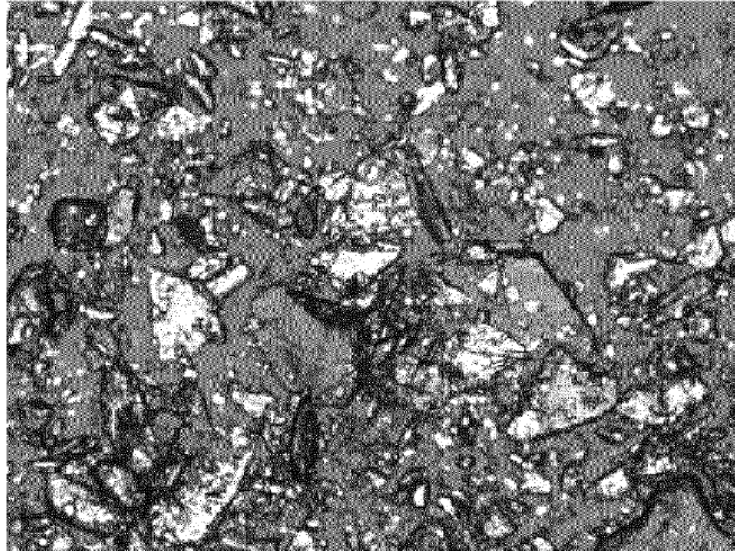
* Figura 14



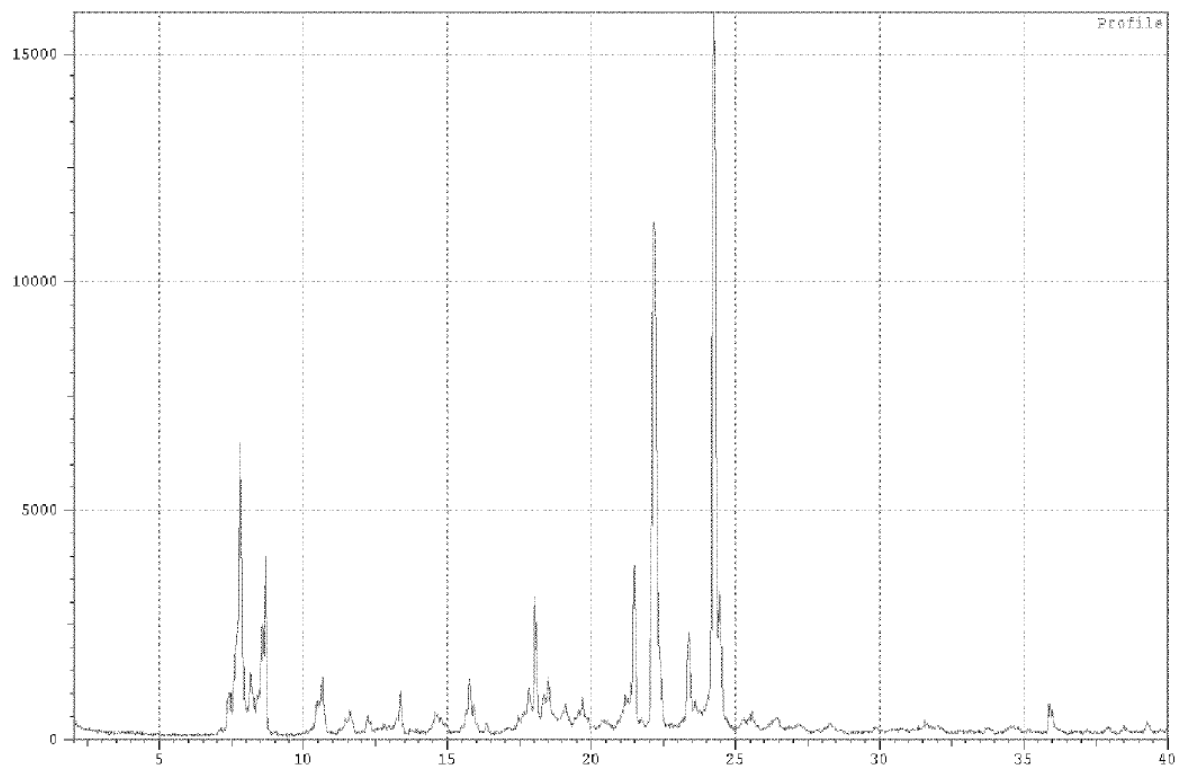
* Figura 15



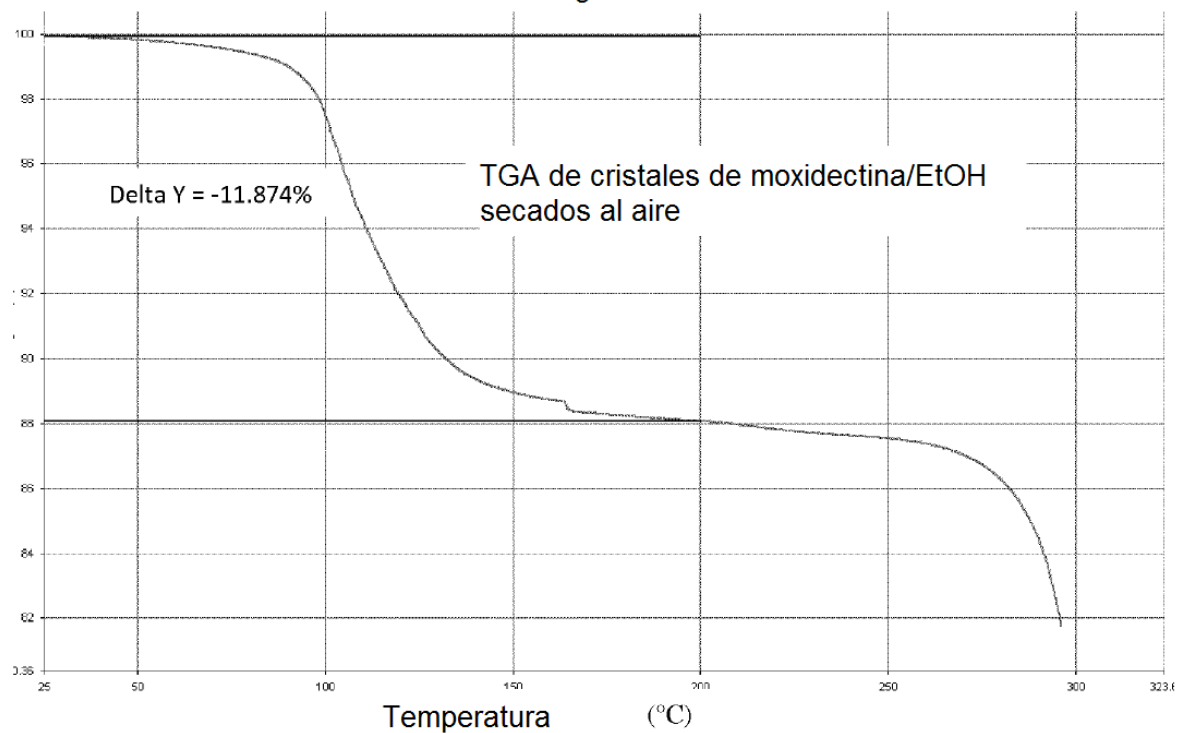
* Figura 16



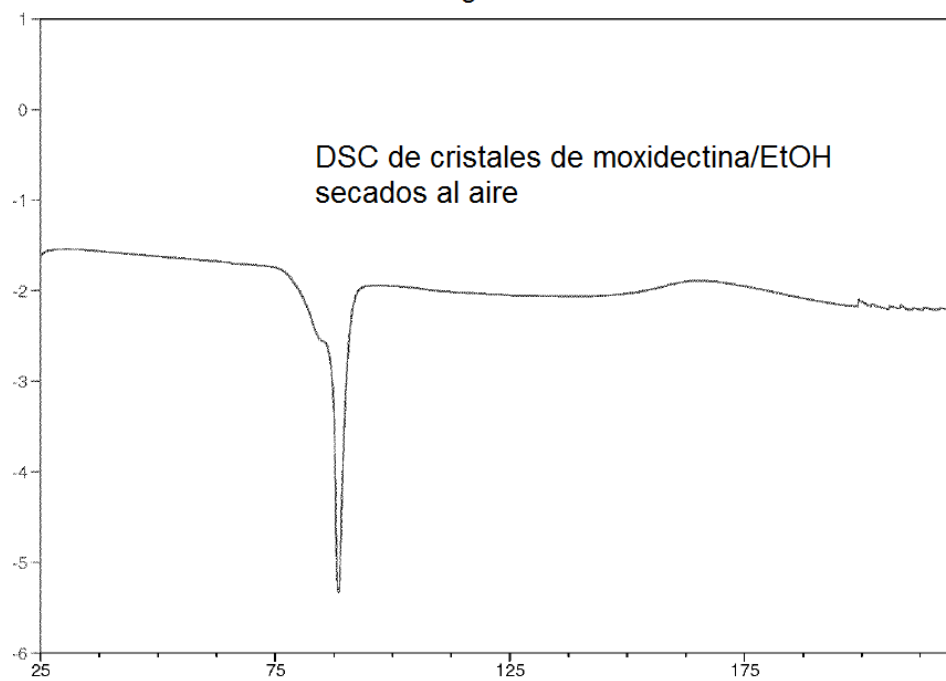
* Figura 17



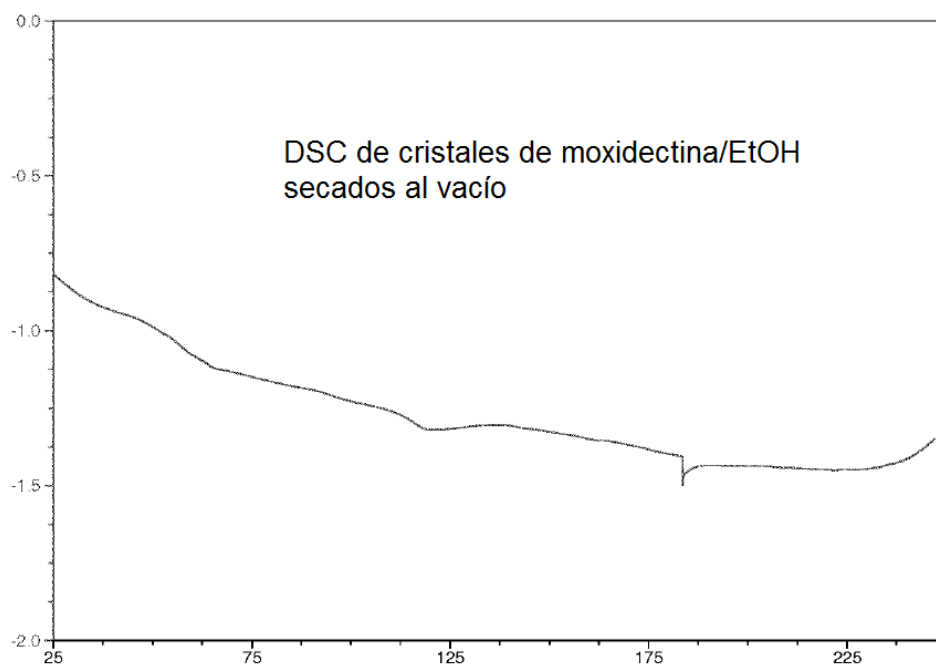
* Figura 18



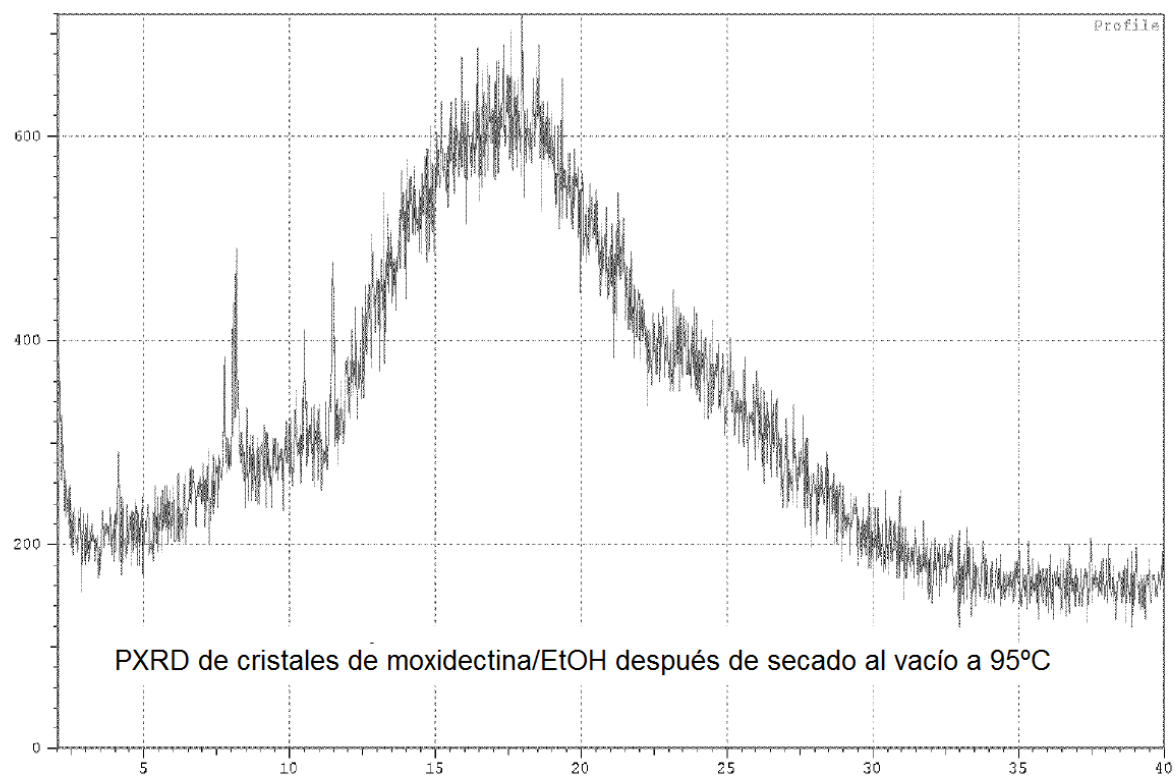
* Figura 19



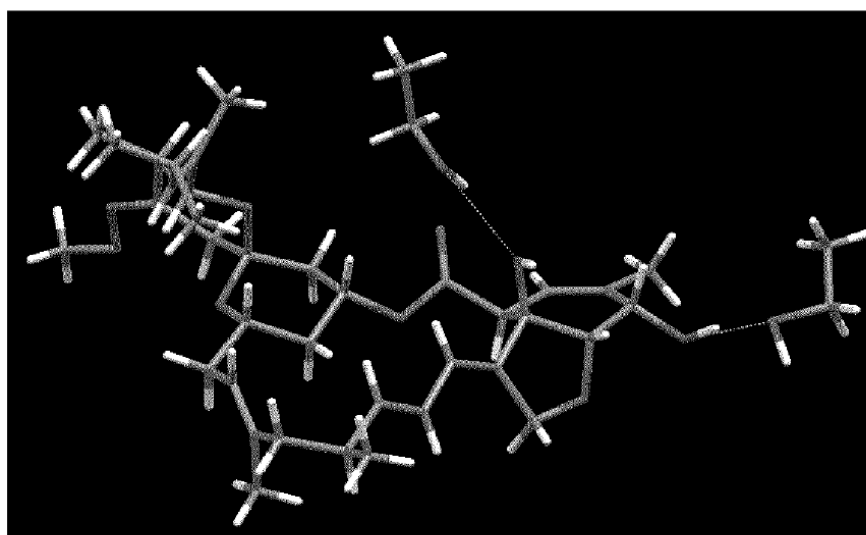
* Figura 20



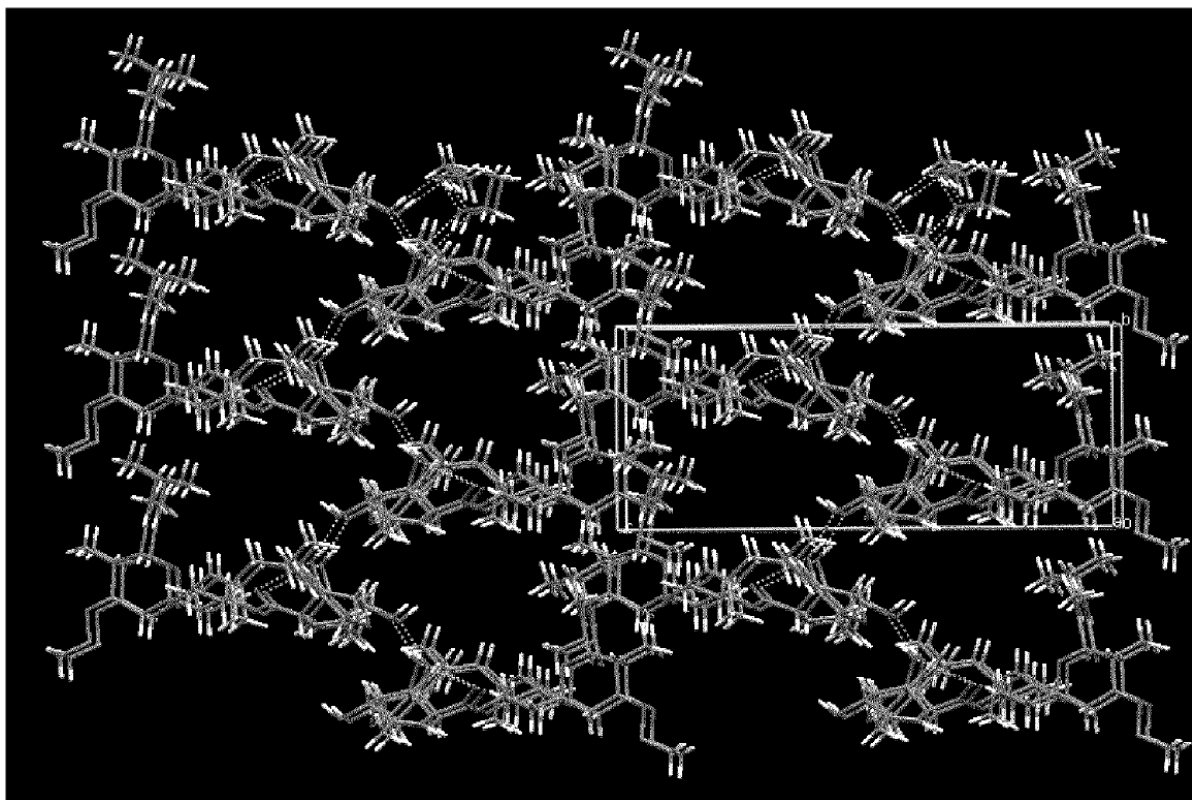
* Figura 21



* Figura 22



* Figura 23

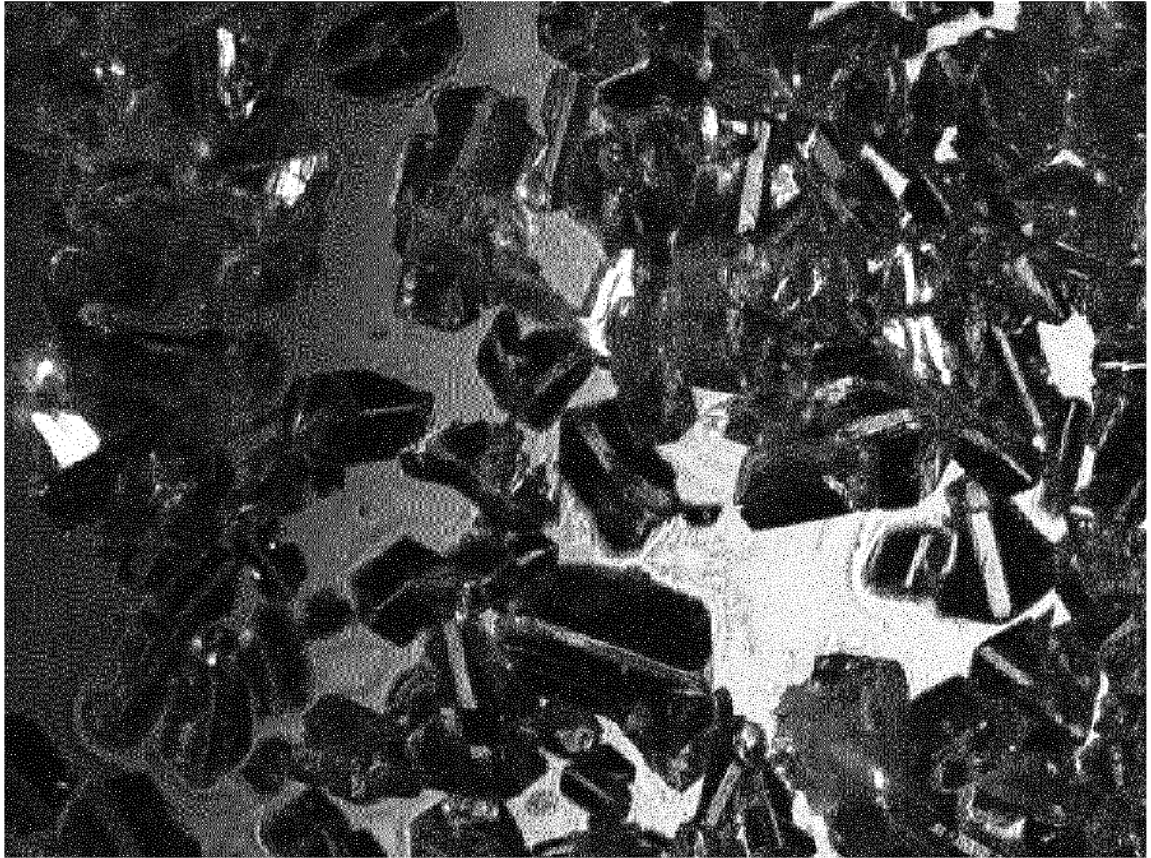


Longitud de onda: 1.54056

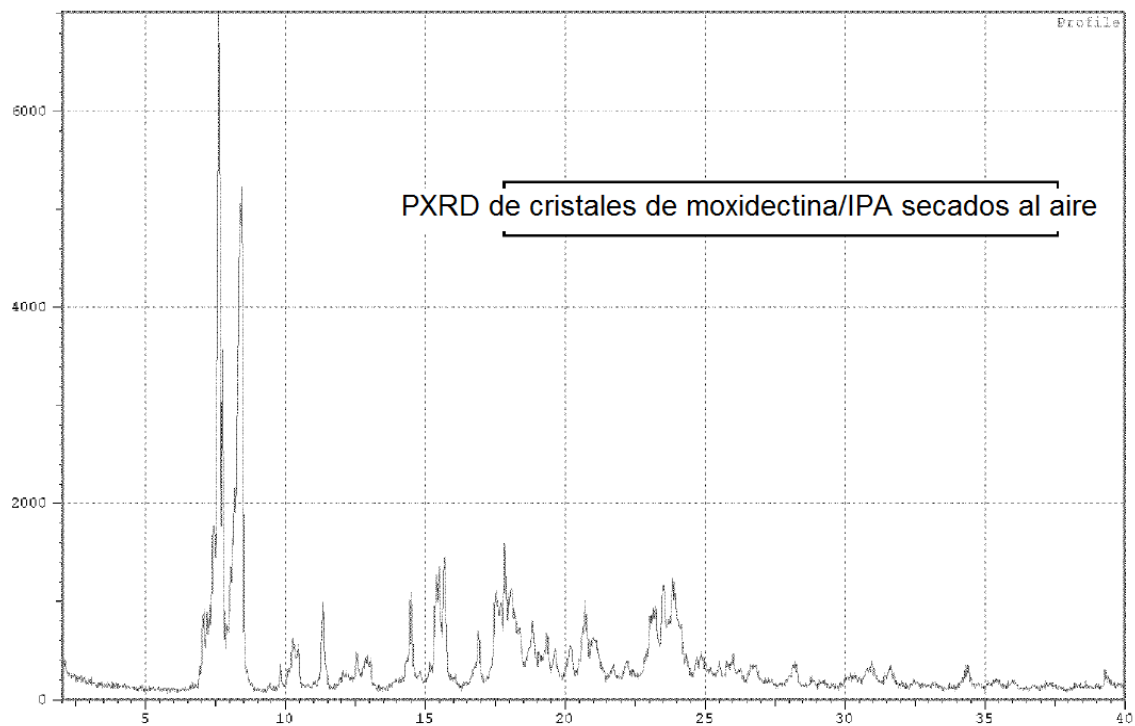
2 theta

32.928, 9793 h, k, l = 3, 2, -3

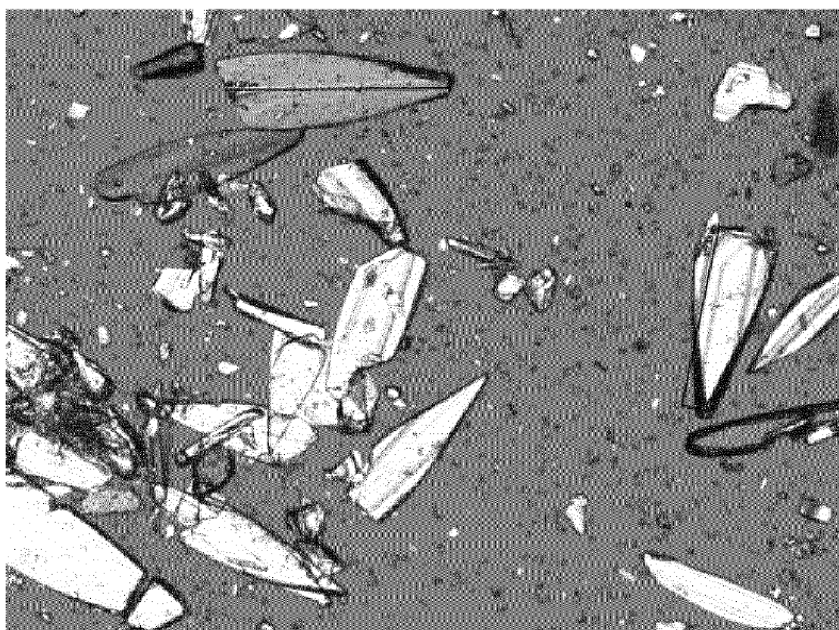
* Figura 24



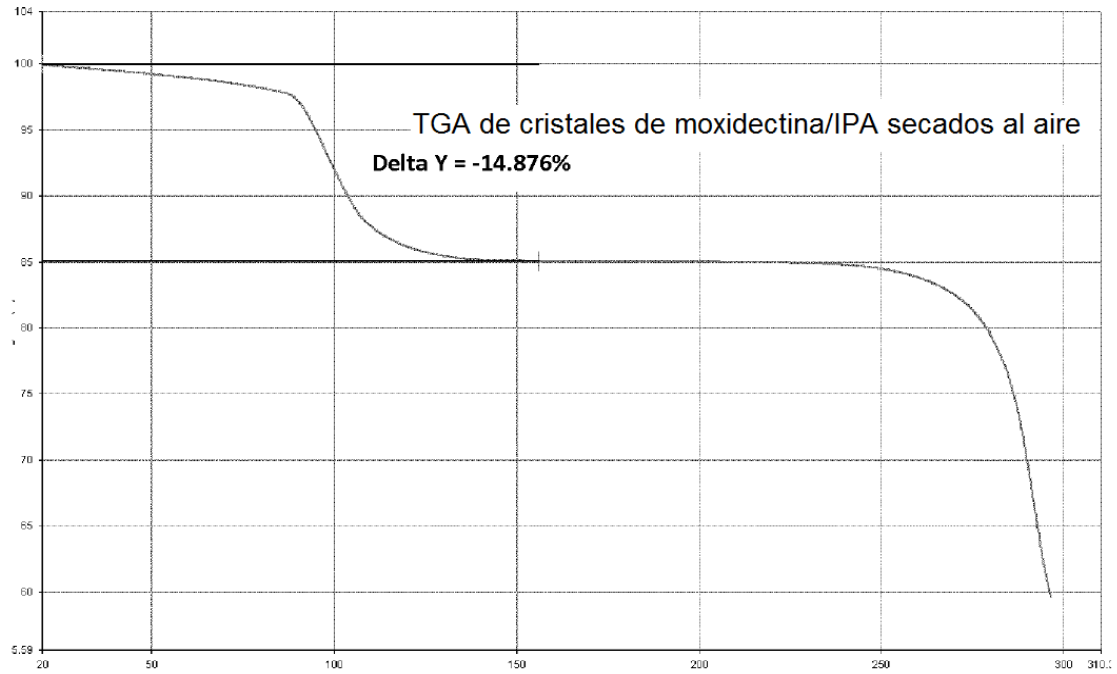
* Figura 25



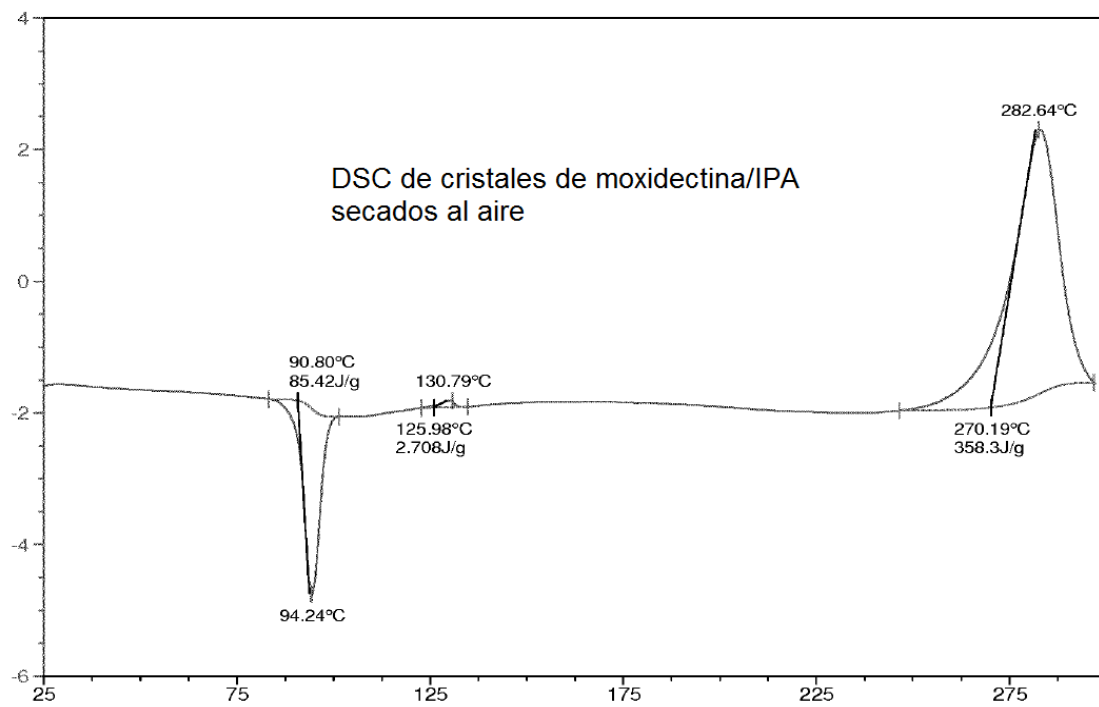
* Figura 26



* Figura 27



* Figura 28



* Figura 29

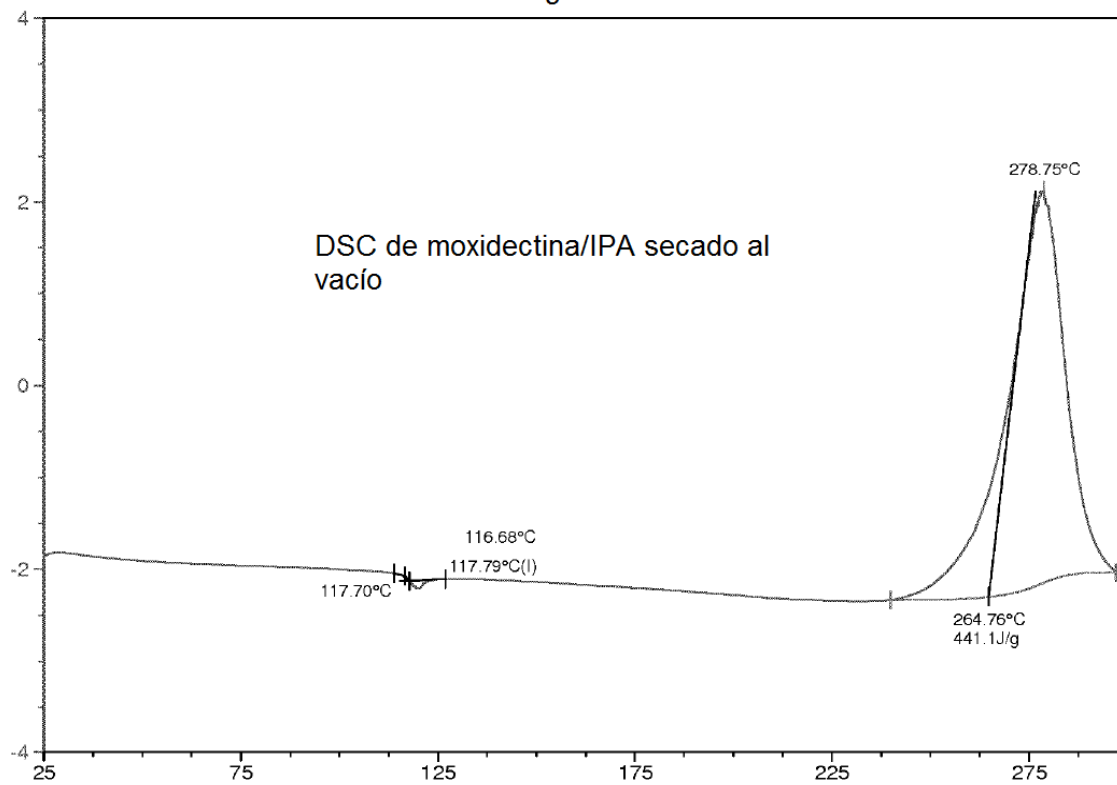


Figura 30

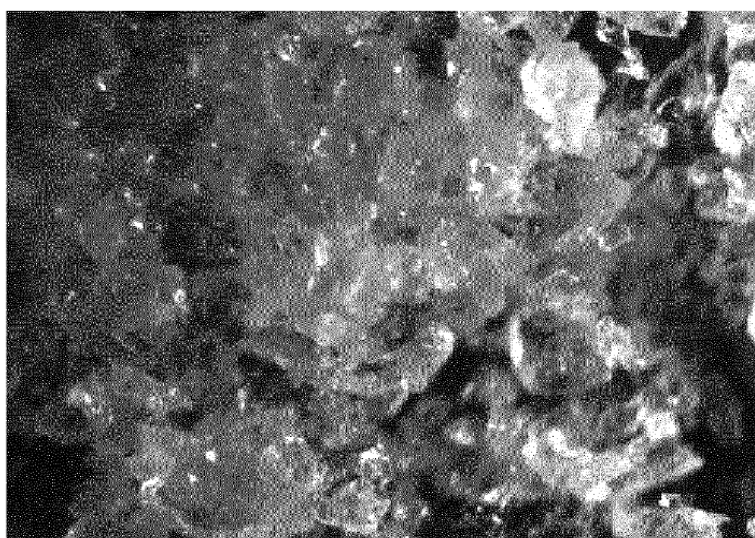


Figura 31

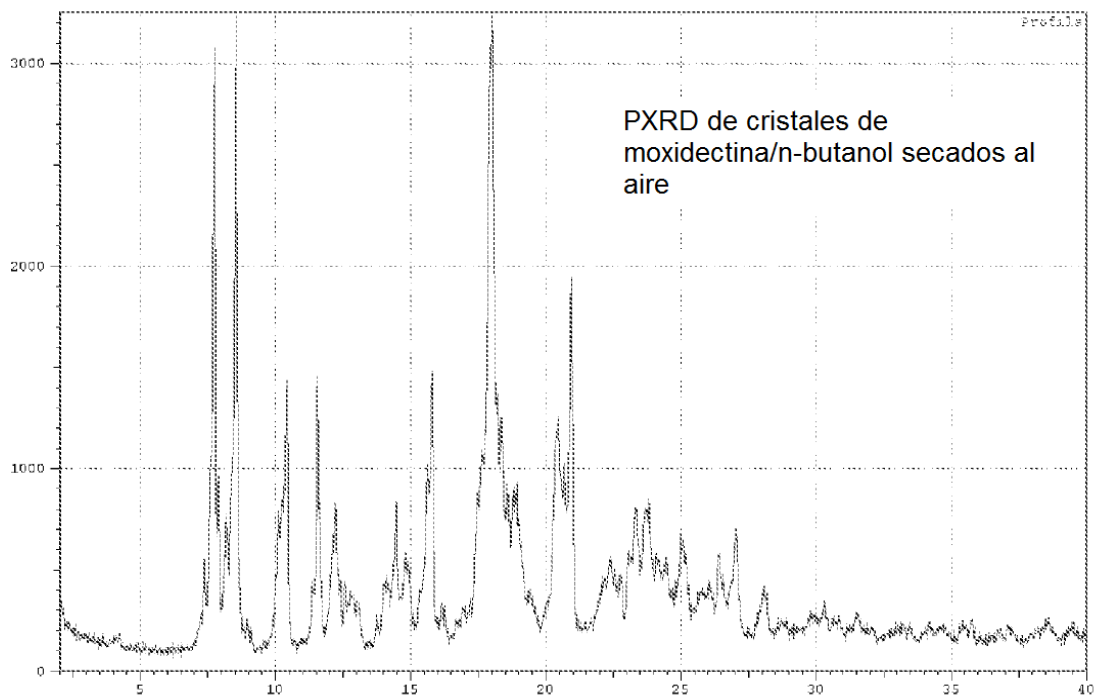


Figura 32

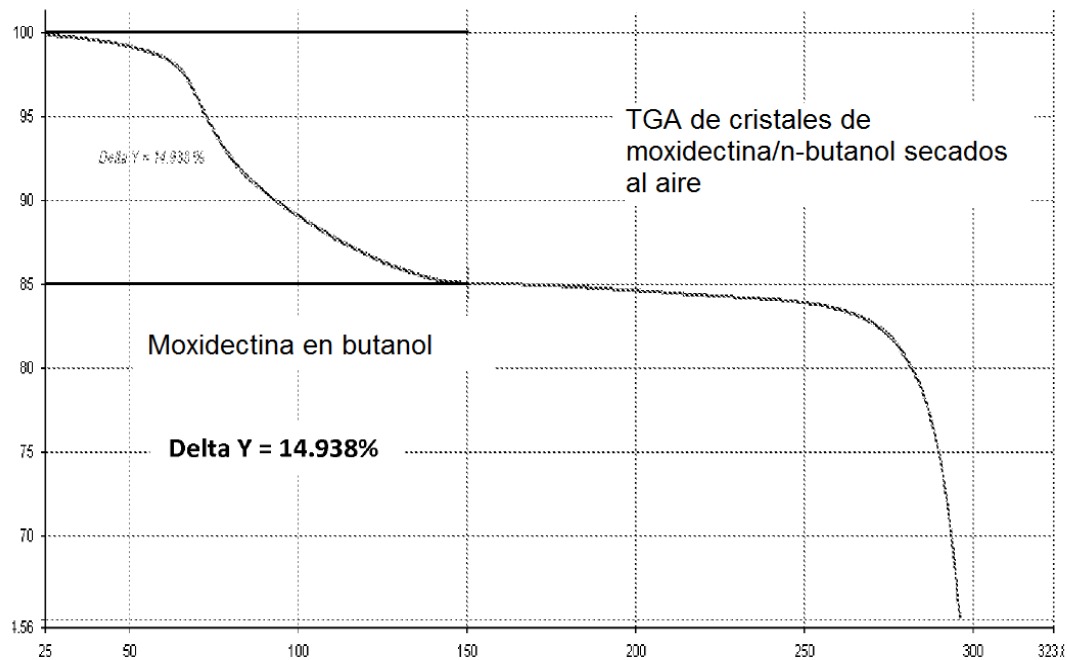


Figura 33

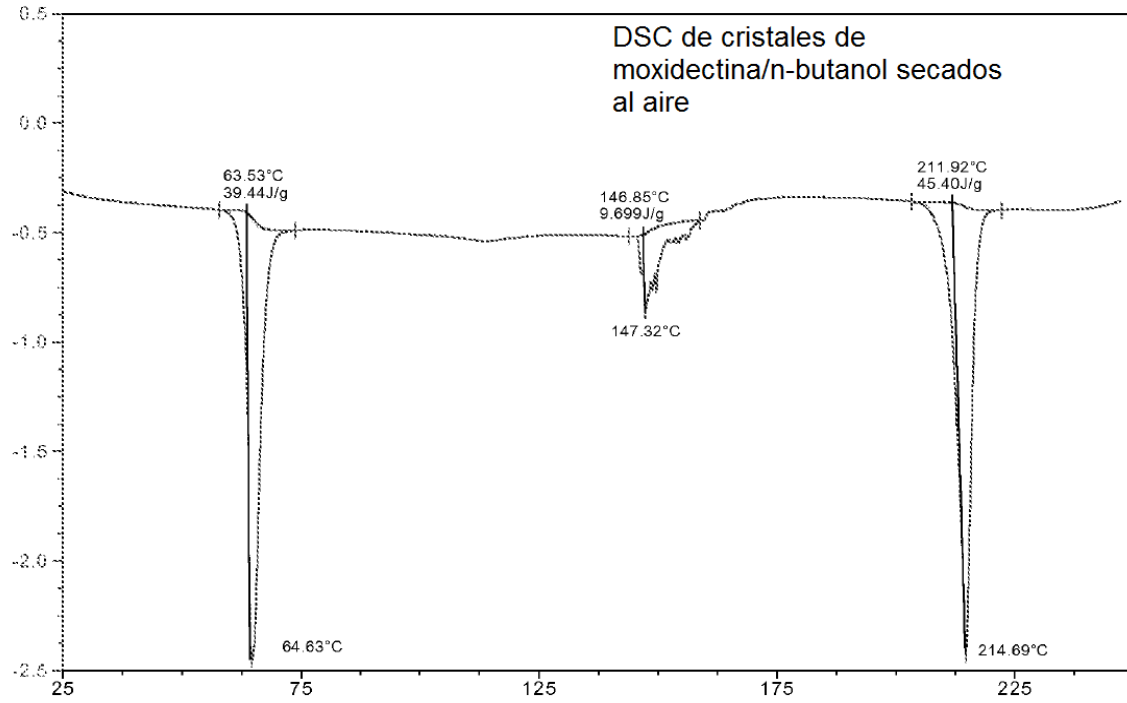


Figura 34

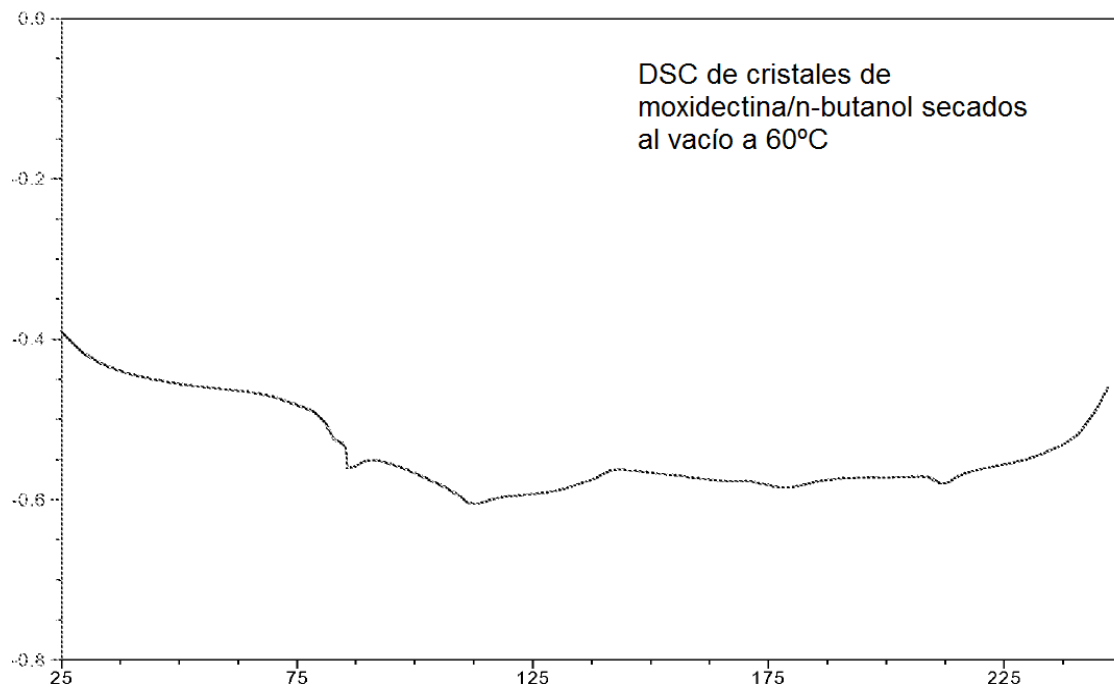


Figura 35

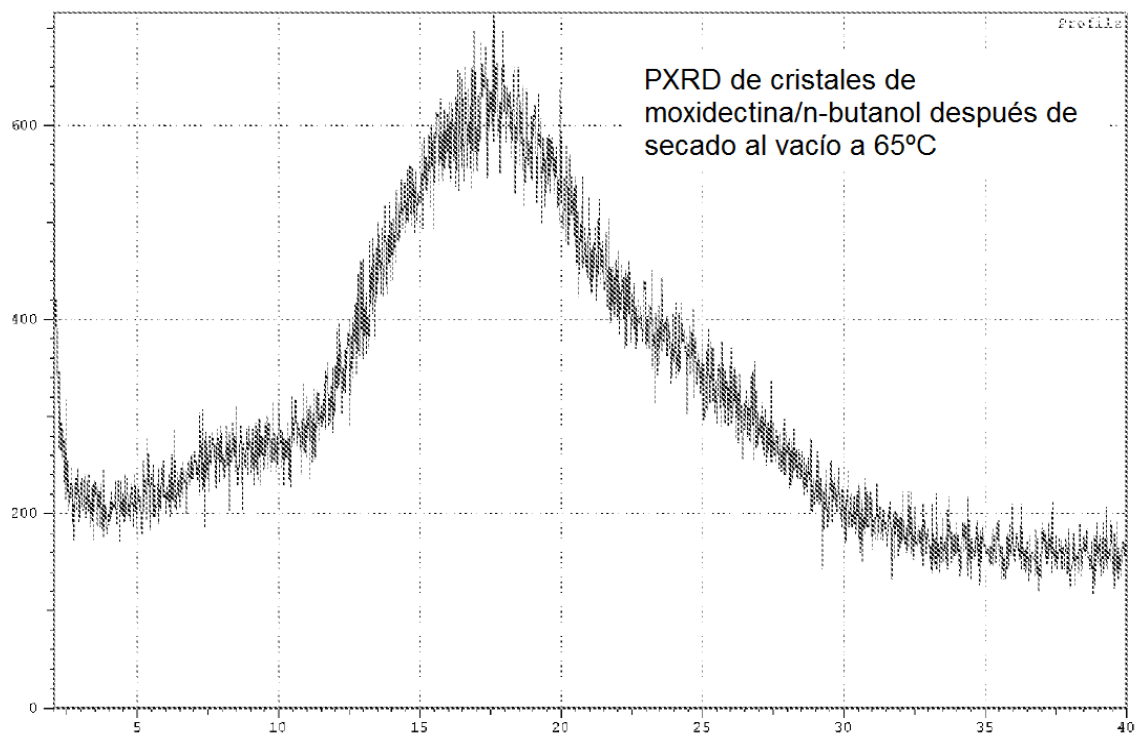
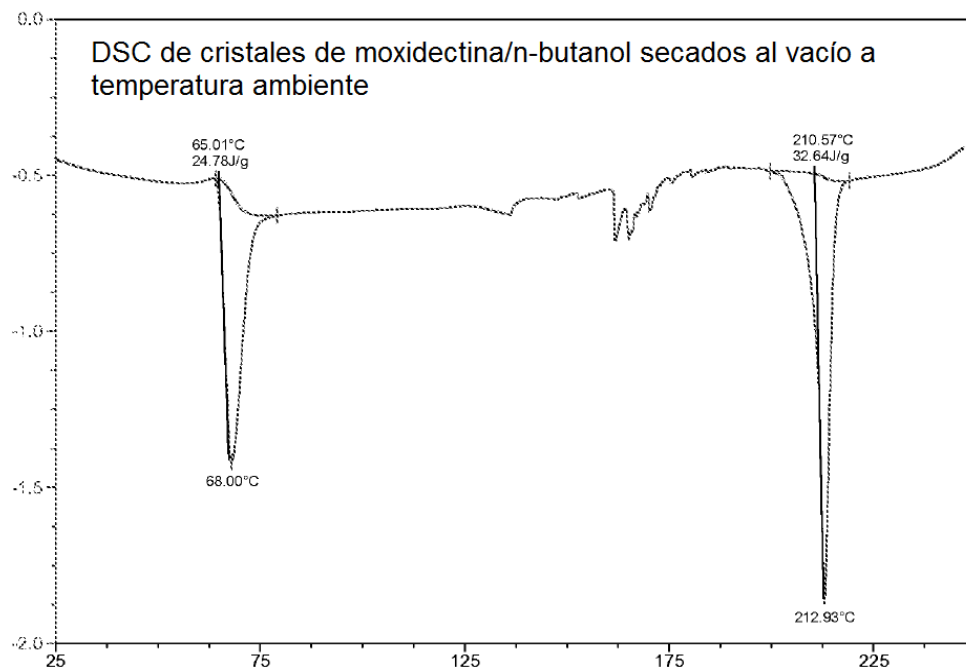
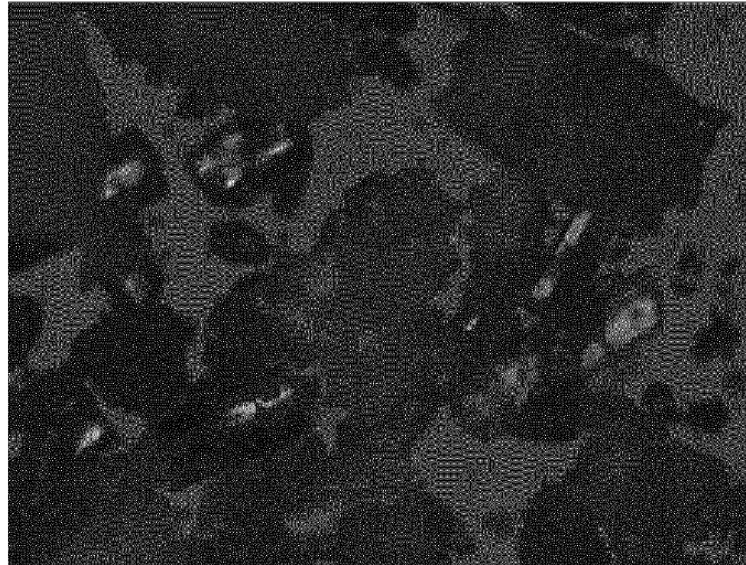


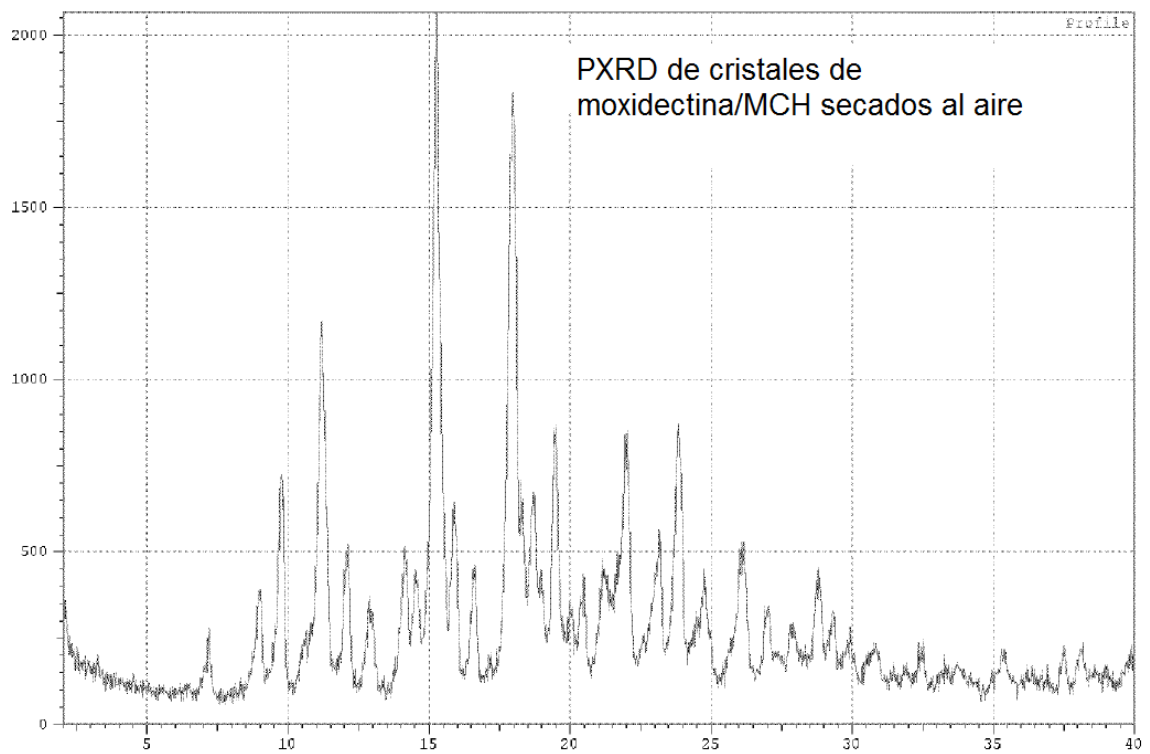
Figura 36



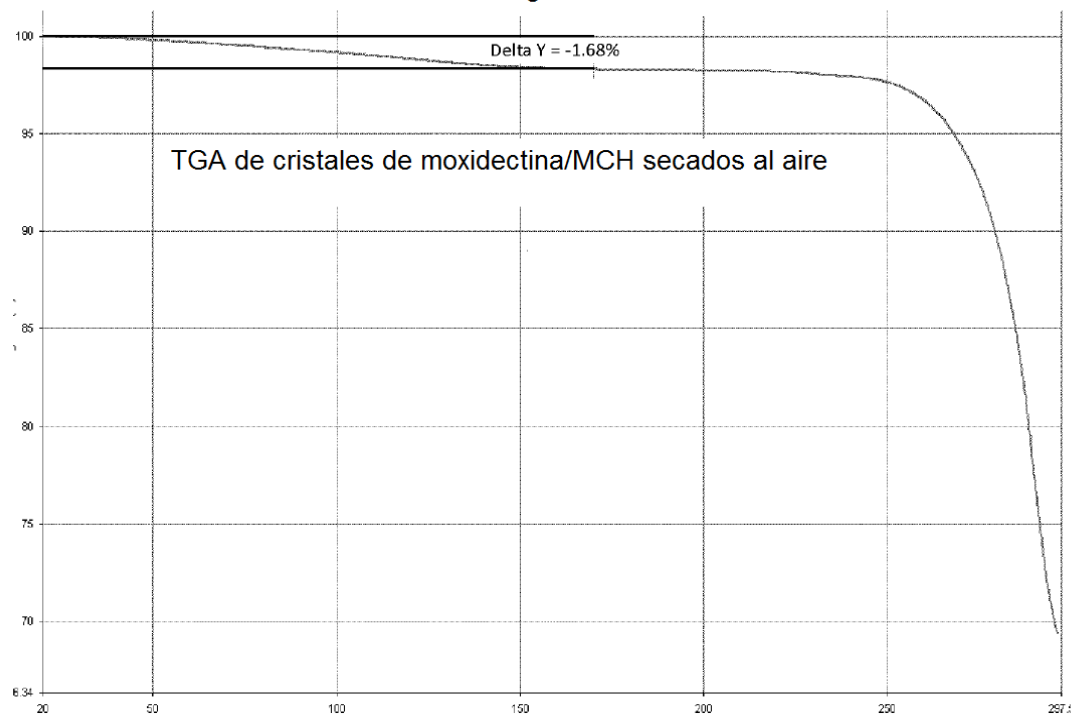
* Figura 37



* Figura 38



* Figura 39



* Figura 40

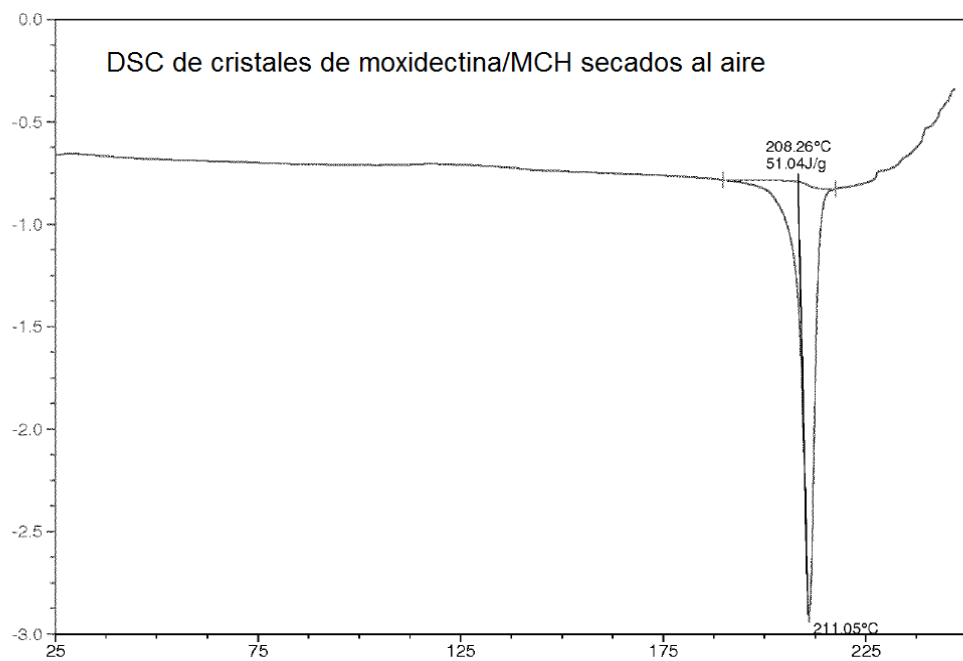
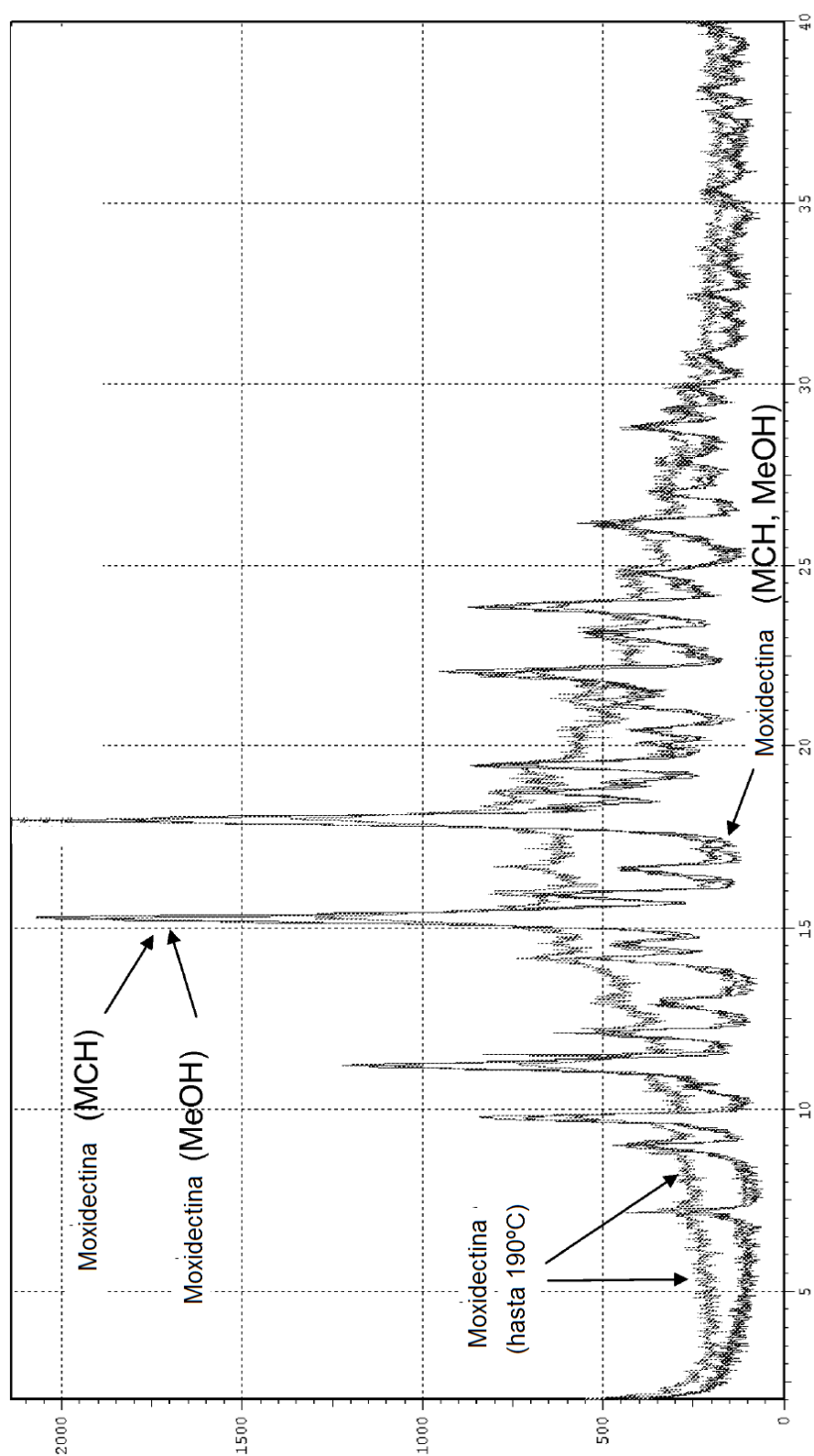
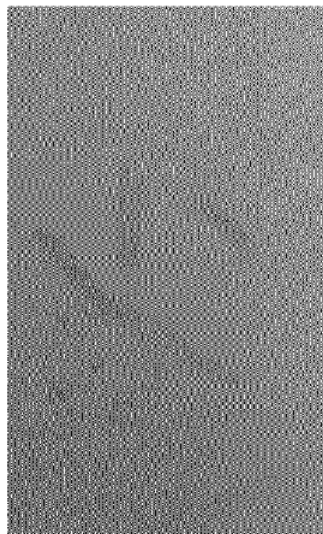
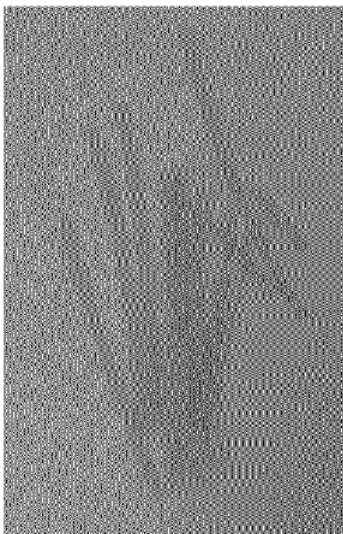
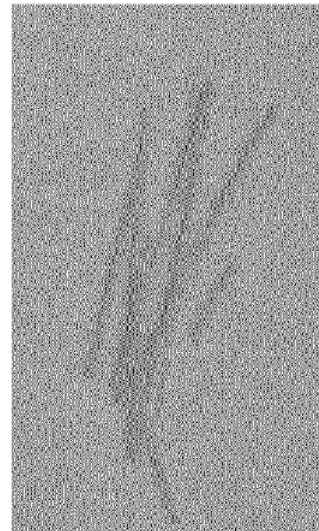
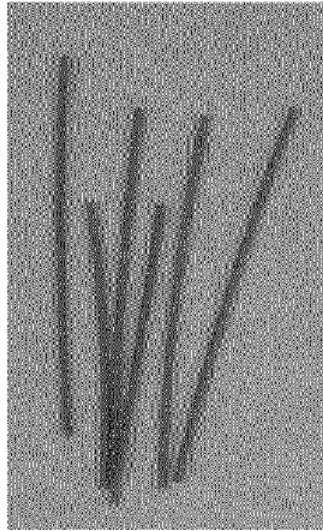


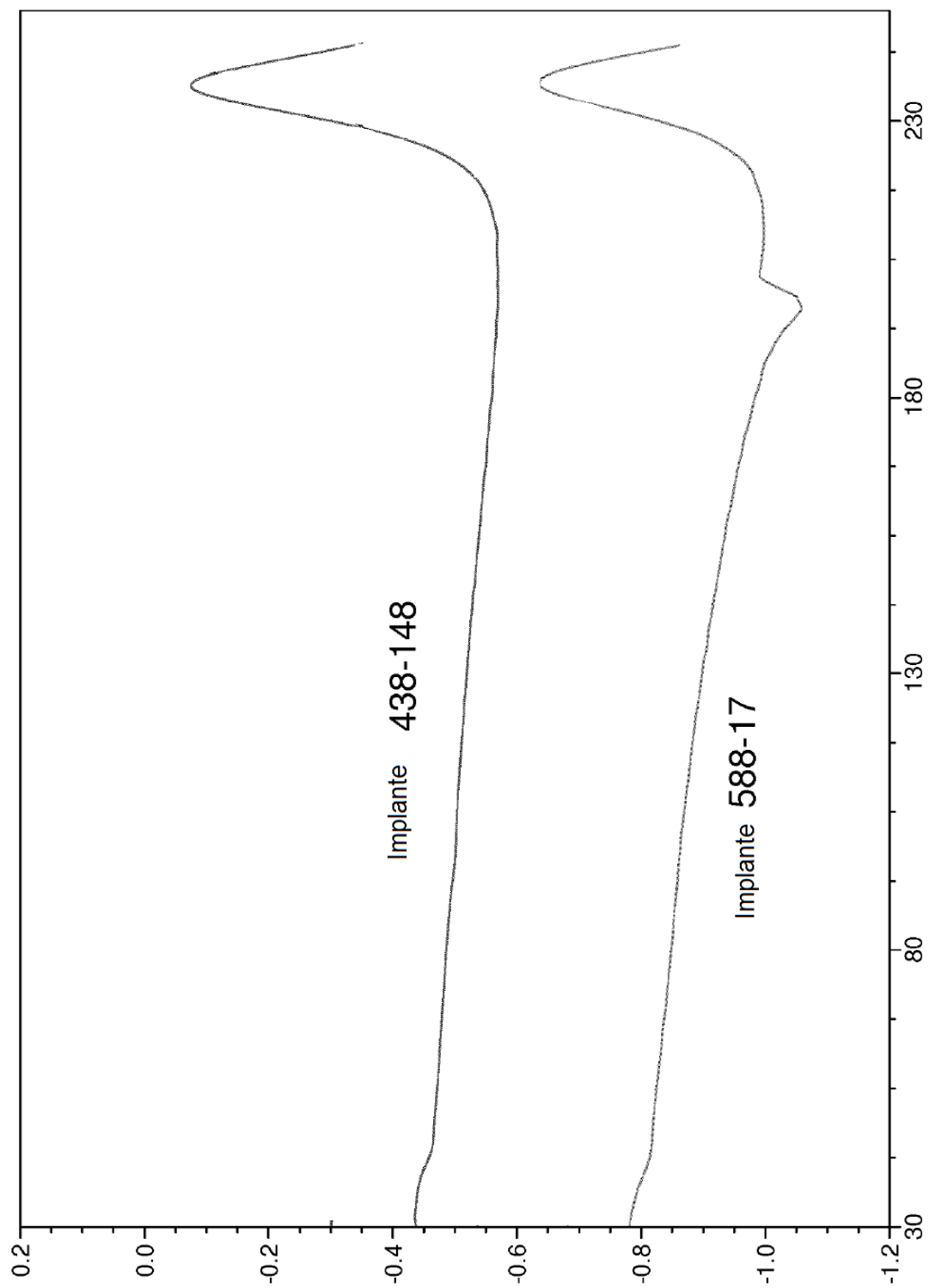
Figura 41



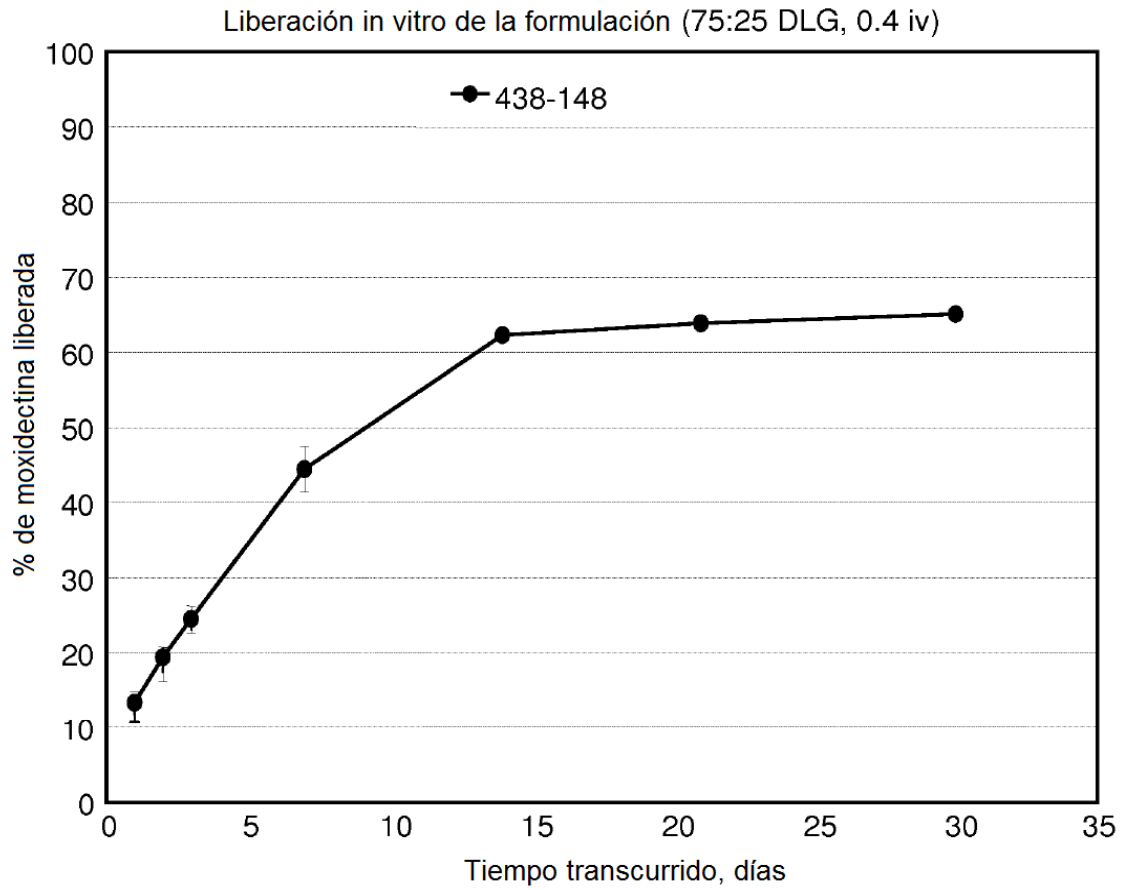
* Figura 42



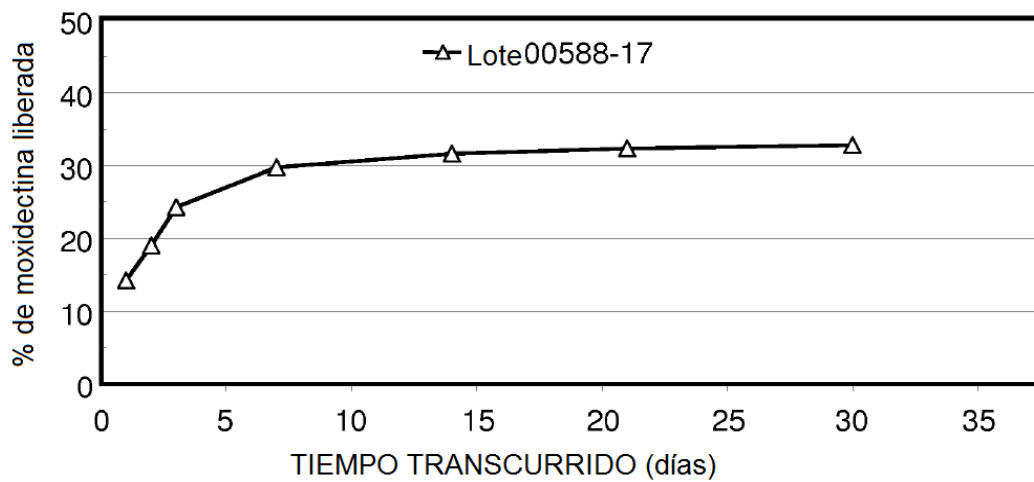
* Figura 43



* Figura 44



* Figura 45



* Figura 46

