

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 126**

51 Int. Cl.:

C07C 217/18 (2006.01)

C07C 59/265 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2015 PCT/EP2015/074746**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16066584**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2015 E 15787181 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.03.2018 EP 3083552**

54 Título: **Formas sólidas estables de enclomifeno y citrato de enclomifeno**

30 Prioridad:

28.10.2014 EP 14190738

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

05.06.2018

73 Titular/es:

**F.I.S.- FABBRICA ITALIANA SINTETICI S.P.A.
(100.0%)
Viale Milano 26
36075 Alte di Montecchio Maggiore (VI), IT**

72 Inventor/es:

**PADOVAN, PIERLUIGI;
CARUANA, LORENZO y
TESSON, NICOLAS**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 671 126 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

Formas sólidas estables de enclomifeno y citrato de enclomifeno

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a procedimientos para la preparación del principio farmacéutico activo denominado clomifeno y, en particular, trans-clomifeno, es decir enclomifeno.

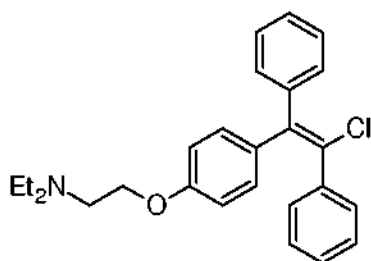
10 Además, la invención se refiere a nuevas formas sólidas de trans-clomifeno y citrato de trans-clomifeno y a procedimientos para preparar los mismos.

Antecedentes de la técnica

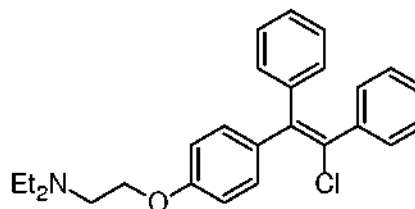
15 El clomifeno es un principio farmacéutico activo usado como estimulante ovulatorio para tratar la disfunción ovulatoria y el síndrome del ovario poliquístico.

El clomifeno tiene el nombre químico Etanamina, 2-[4-(2-cloro-1,2-difeniletetil)fenoxi]-N,N-dietilo y es una mezcla de los isómeros geométricos trans-clomifeno de fórmula química (I) y cis-clomifeno de fórmula química (II):

20



(I)



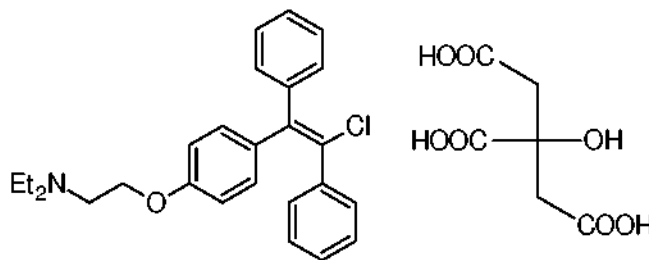
(II)

Los productos farmacéuticos que se encuentran en la actualidad en el mercado que contienen clomifeno, por lo general en forma de sal de monocitrato, comprenden clomifeno que tiene la siguiente composición: de un 50 % a un 70 % de trans-clomifeno y de un 30 % a un 50 % de cis-clomifeno.

25

El trans-clomifeno de fórmula química (I), también denominado enclomifeno o E-clomifeno, en forma de sal de monocitrato, es decir, monocitrato de trans-clomifeno o citrato de enclomifeno que es el citrato de enclomifeno (1:1), que tiene la fórmula (III):

30



(III)

En la actualidad está en evaluación en fase clínica III para el tratamiento de hipergonadismo secundario. Además, también se dice que el trans-clomifeno, es decir enclomifeno, se podría usar potencialmente para una terapia coadyuvante en hombres con hipogonadismo con diabetes de Tipo 2.

35

El documento de patente de Estados Unidos n.º 3.848.030, en los ejemplos 31 y 32, desvela un procedimiento para la resolución de los isómeros geométricos del clomifeno a través de la preparación de sales con ácido binaftilfosfórico racémico.

40

En la última publicación Acta Cryst. (1976), B32, pág. 291-293, la isomería geométrica se ha establecido

definitivamente mediante difracción de rayos X de cristal individual.

Por último, en la publicación "Analytical profiles of drug substances and excipients", vol. 25, (1998), pág. 85-121, en particular en la pág. 99, se expone que antes de 1976 la estereoquímica cis se asignaba de forma incorrecta al isómero trans del clomifeno (E-clomifeno o enclomifeno), y solamente después de la publicación mencionada anteriormente en Acta Cryst., la isomería geométrica correcta se ha asignado de forma definitiva.

Estas observaciones en la técnica anterior se han confirmado con la experimentación de los investigadores. En particular, repitiendo el experimento 31 del documento de patente de Estados Unidos n.º 3.848.030, la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico se aisló y no la sal con cis-clomifeno como se indica en dicha patente, tal como se confirmó mediante análisis de RMN H en 2D (experimento NOESY). Por lo tanto, el Ejemplo 31 del documento de patente de Estados Unidos n.º 3.848.030, proporciona, al final, el citrato de enclomifeno, cristalizado a partir de una mezcla de éter etílico y etanol, que tiene un p.f. de 133-135 °C. En su lugar, el Ejemplo 32, proporcionó citrato de Cis-clomifeno, cristalizado a partir de una mezcla de éter etílico y etanol, que tiene un p.f. de 120-126 °C.

Por lo tanto, con el objeto de preparar citrato de enclomifeno, todo el experimento 31 del documento de patente de Estados Unidos n.º 3.848.030 se ha vuelto a trabajar también realizando la cristalización del producto a partir de una mezcla de éter etílico y etanol, proporcionando por lo tanto un sólido no cristalino con dos picos de DSC respectivamente a 114 °C y 188 °C, aunque el material de partida usado para el ejemplo de nuevo trabajo del ejemplo era una sustancia bastante pura (véanse las notas que siguen a continuación relacionadas con la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico), y que tiene sustancialmente la misma pureza que la de la usada en el experimento de la técnica anterior.

El documento de Patente de Estados Unidos n.º 2.914.563, en el ejemplo 3, y la reciente solicitud de PCT WO2014/031177, en el ejemplo 1, desvelan un procedimiento para la preparación de citrato de trans-clomifeno, que contiene de un 30 % a un 50 % de cis-clomifeno, en forma de citrato, por reacción de clorhidrato de 1-p-(β-dietilaminoetoxi)fenil]-1,2-difeniletileno con N-clorosuccinimida en cloroformo seco a reflujo.

Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal (1984), 18 (11), 1318-24 traducción del inglés en la revista Pharmaceutical Chemistry Journal de noviembre de 1984, Volumen 18, Ejemplar 11, pág. 758-764 (Título: Synthesis and biological study of the cis-and trans-isomers of Clomiphene citrate and some intermediates of its synthesis) desvela el isómero trans del citrato de clomifeno, es decir citrato de enclomifeno, caracterizado por:

RMN ¹H (MeOD) δ 7,4-6,7 (m, 14H); 4,27 (t, 2H, -OCH₂); 3,51 (t, 2H, CH₂-N); 3,28 (c, 4H, 2xN-CH₂); 2,73 (2H); 2,78 (2H); 1,31 (t, 6H, 2xN-C-CH₃) Punto de fusión: 138-139 °C (pureza de un 98 % por GLC); Espectro de IR, ν cm⁻¹ (suspensión en aceite mineral): 3640, 3430, 1720, 1710 (citrato), 1600-1555 (banda ancha, sistema de estilbeno); 750. Espectro de UV: λ máx = 243 nm, ε 21.800 y λ máx 300 nm, ε 11.400.

De acuerdo con los estudios experimentales de los investigadores, estos métodos de la técnica anterior para la preparación de clomifeno y, en particular, de trans-clomifeno, sufren los inconvenientes relacionados con las impurezas desconocidas que pueden contaminar el producto final de clomifeno.

Además, el citrato de enclomifeno se describió en la bibliografía con diferentes puntos de fusión, en particular, 133-135 °C y 138-139 °C. Dichas formas sólidas de citrato de enclomifeno fracasan al cumplir los estudios de estabildades y además presentan una solubilidad relativamente baja en agua ya sea a pH neutro o ácido.

El ejemplo 31 del documento de Patente de Estados Unidos n.º 3.848.030 no desvela ninguna forma sólida De base de enclomifeno, como base libre, así como el ejemplo 32 no desvela ninguna forma de base de cis-clomifeno.

Parece que una forma cristalina de base de enclomifeno se describe solamente en un artículo: Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal (1984), 18 (11), 1318-24 traducción del inglés en la revista Pharmaceutical Chemistry Journal de noviembre de 1984, Volumen 18, Ejemplar 11, pág. 758-764 (Título: Synthesis and biological study of the cis- and trans-isomers of clomiphene citrate and some intermediates of its synthesis).

En este artículo, el isómero cis se aisló mediante cristalización fraccionada en éter de petróleo. La evaporación de las aguas madres proporcionó el isómero trans con una pureza de un 86 % (por GC). Las recristalizaciones repetidas a partir de hexano proporcionaron nuestras analíticas con una pureza de un 99 %. Este producto se caracterizaba por:

RMN ¹H (C₆D₆) δ 7,55-6,85 (m, 12H); 6,52 (m, 2H); 3,66 (t, 2H, -OCH₂); 2,61 (t, 2H, CH₂-N); 2,36 (c, 4H, 2xN-CH₂); 0,88 (t, 6H, 2xN-C-CH₃); Punto de fusión 73-75 °C, Espectro de UV: λ máx = 242 nm, ε 21.600 y λ máx 297 nm, ε 11.200.

Dicha forma sólida conocida de base de enclomifeno tiene el inconveniente de que muestra una mala capacidad de

flujo, mostrando de este modo dificultades para pasar a través de embudos (véase el ejemplo 22 + 19 + La Fig. 16). Dichas dificultades aumentan usando y procesando dicho material para la fabricación industrial de:

- Citrato de enclomifeno usando dicha base de enclomifeno como un compuesto de síntesis química y/o
- 5 - Productos farmacéuticos que comprenden dicho enclomifeno.

Además, las suspensiones de dicha forma sólida conocida de enclomifeno no se filtran muy bien, es decir, para grandes producciones, el tiempo de filtrado puede ser muy largo y el producto muestra en consecuencia una pureza química menor, especialmente para el contenido de la impureza de Cis-clomifeno.

10

Resumen de la invención

El problema abordado por la presente invención es por lo tanto el de proporcionar una forma sólida mejorada de citrato de enclomifeno que:

15

- es termodinámicamente más estable,
- satisface los estudios de estabildades en condiciones térmicas/humedad,
- es más soluble en agua neutra o a valores de pH ácido.

20 Este problema se resuelve con una forma sólida de citrato de enclomifeno como se resume en las reivindicaciones adjuntas, cuyas definiciones son parte integral de la presente descripción.

Como un aspecto adicional, el problema es que se proporciona una forma sólida mejorada de base de enclomifeno con una capacidad de flujo mayor, por lo tanto adecuada para la fabricación industrial de citrato de enclomifeno usando dicha base de enclomifeno como un compuesto intermedio de síntesis química y/o para la fabricación industrial de productos farmacéuticos que comprenden dicho enclomifeno. Además, otro problema a resolver es la provisión de una forma sólida mejor de base de enclomifeno, cuya suspensión se filtra más rápidamente, por lo tanto, en consecuencia, proporcionando enclomifeno (base) y a continuación citrato de enclomifeno o citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, los tres con una pureza química más elevada, especialmente para el contenido de impurezas de Cis-clomifeno.

30

Las características y ventajas adicionales de las formas sólidas y procedimientos de acuerdo con la invención resultarán de la descripción que se informa a continuación de ejemplos de realización de la invención, proporcionada como una indicación de la invención.

35

Descripción de las figuras

La Fig. 1 muestra el difractograma de XPRD de la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno, es decir citrato de enclomifeno, cristalizado a partir de acetona.

40 La Fig. 2 muestra la curva de DSC de la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno cristalizado a partir de acetona.

La Fig. 3 muestra la curva de TGA de la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno cristalizado a partir de acetona.

La Fig. 4 muestra el difractograma de XPRD de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI).

45 La Fig. 5 muestra la curva de DSC de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI).

La Fig. 6 muestra la curva de DSC de la forma sólida de citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja, cristalizado a partir de etanol.

La Fig. 7 muestra análisis de microscopía, es decir una fotografía con escala de 500 μm (tamaño de 500 μm en el lado inferior y derecho de la fotografía), de cristales de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja, cristalizado a partir de acetona.

La Fig. 8 muestra análisis de microscopía, es decir una fotografía con escala de 100 μm (tamaño de 100 μm en la parte inferior de la fotografía), de los cristales de citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja, cristalizado a partir de etanol. La fotografía en el lado izquierdo se realiza con luz reflejada (izquierda) mientras que la fotografía en el lado derecho se realiza con luz transmitida.

55 La Fig. 7 - BIS muestra análisis de microscopía, es decir una fotografía con escala de 50 μm (tamaño de 50 μm en el lado superior de la fotografía), de los cristales de citrato de enclomifeno cristalizado a partir de acetona, que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja.

La Fig. 8 - BIS muestra análisis de microscopía, es decir una fotografía con escala de 50 μm (tamaño de 50 μm en el lado superior de la fotografía), de los cristales de citrato de enclomifeno cristalizado a partir de etanol, que tiene un hábito cristalino en forma de aguja.

La Fig. 9 muestra el difractograma de XPRD de la forma sólida de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, cristalizado a partir de etanol (con o sin un tratamiento de molienda suave).

La Fig. 10 muestra una comparación de difractogramas de XRPD de muestras de citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja y que tiene cristales sin forma de aguja, tal como se cristaliza respectivamente a partir de

65

etanol o a partir de acetona.

La Fig. 11 muestra análisis de microscopía, es decir una fotografía con escala de 500 µm (tamaño de 500 µm en la parte inferior de la fotografía), de los cristales de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino con forma prismática, tal como se cristaliza a partir de etanol. La fotografía en el lado izquierdo se realiza con luz reflejada

5 (izquierda) mientras que la fotografía en el lado derecho se realiza con luz transmitida.

La Fig. 12 muestra análisis de microscopía, es decir una fotografía con escala de 100 µm (tamaño de 100 µm en el lado inferior y derecho de la fotografía), de los cristales de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino no prismático.

La Fig. 11 - BIS muestra análisis de microscopía, es decir una fotografía con escala de 50 µm (tamaño de 50 µm en el lado superior de la fotografía), de los cristales de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino con forma prismática.

La Fig. 12 - BIS muestra análisis de microscopía, es decir una fotografía con escala de 50 µm (tamaño de 50 µm en el lado superior de la fotografía), de los cristales de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino no prismático.

La Fig. 13 muestra el difractograma de XPRD de la forma sólida de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino con forma prismática.

La Fig. 14 muestra el difractograma de XPRD de la forma sólida de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino no prismático.

La Fig. 15 muestra una comparación de difractogramas de XPRD de muestras de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino con forma prismática y enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino no prismático.

20 La Fig. 16 muestra la curva de DSC de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino no prismático.

La Fig. 17 muestra la curva de DSC de enclomifeno (base), que tiene un hábito cristalino con forma prismática.

La Fig. 18 muestra la comparación de isoterma de absorción del lote 722, es decir citrato de enclomifeno que tiene cristales sin forma de aguja, tal como se cristaliza a partir de acetona, p.f. de 148 °C (DSC (inicio) pilote 723, es decir citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja, cristalizado a partir de etanol, p.f. de 153 °C (DSC

25 (inicio).

La Fig. 19 muestra el análisis de microscopía de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino con forma prismática después de 30 días respectivamente con una HR de un 60 % (A), una HR de un 75 % - 40 °C (B), y una HR de un 95 % (C), con luz reflejada (izquierda) y luz transmitida (derecha) (escala de 500 µm).

La Fig. 20 muestra el análisis de PSD de base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática.

30 La Fig. 21 muestra el análisis de PSD de base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino no prismático, no sonicada.

La Fig. 22 muestra el análisis de PSD de base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino no prismático, después de sonicación.

La Fig. 23 muestra el espectro de RMN ¹H del citrato de enclomifeno.

35 La Fig. 24 muestra el espectro de RMN ¹³C del citrato de enclomifeno.

La Fig. 25, muestra el hábito cristalino del citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, tal como se preparan el ejemplo 29. En particular, las fotografías se realizaron usando los siguientes argumentos y que tienen la escala:

Fig. 25 - A	aumento:	4x	escala:	50 µm
Fig. 25 - B1	"	10x	"	50 µm
Fig. 25 - B2	"	10x	"	50 µm
Fig. 25 - C	"	20x	"	50 µm
Fig. 25 - D	"	50x	"	20 µm.

40

La Fig. 26 muestra la solubilidad en agua de cristales sin forma de aguja (722) y en forma de aguja (723) de citrato de enclomifeno.

La Fig. 27 muestra la solubilidad a pH = 4,5 de los cristales en forma de aguja (723) y sin forma de aguja (722) de citrato de enclomifeno.

45 La Fig. 28 muestra la solubilidad del acetato de enclomifeno a pH = 4,5.

Descripción de realizaciones

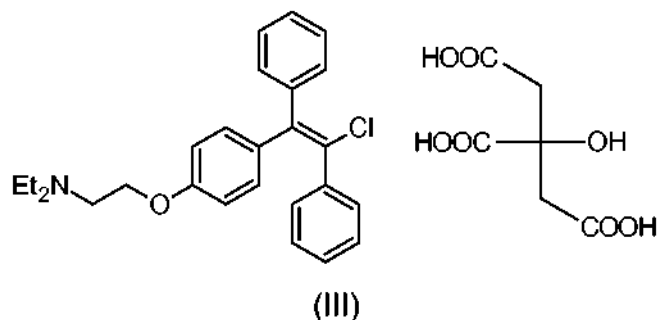
Durante el desarrollo del procedimiento para la preparación de trans-clomifeno se ha descubierto de forma

50 sorprendente una forma sólida estable de monocitrato de trans-clomifeno.

El término monocitrato se refiere a 1 mol de ácido cítrico por 1 mol de trans-clomifeno. Por lo tanto, el monocitrato de trans-clomifeno también se puede denominar citrato de trans-clomifeno o citrato de trans-clomifeno (1:1) o citrato de enclomifeno (1:1) que también se denomina simplemente citrato de enclomifeno.

55

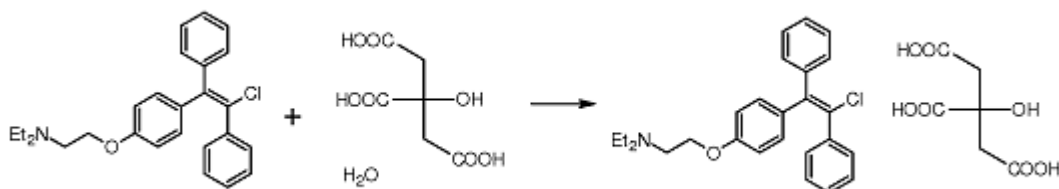
En particular, se ha encontrado un procedimiento para la preparación de una forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno de fórmula:



por tratamiento de trans-clomifeno en un disolvente orgánico con monohidrato de ácido cítrico.

5

El siguiente esquema muestra el procedimiento para la preparación de una forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno:



10

El disolvente orgánico para realizar un procedimiento de este tipo es un disolvente de cetona tal como por ejemplo acetona o metil-etilcetona o un disolvente de acetato tal como acetato de etilo o acetato de isopropilo, siendo preferente la acetona.

15

Además, la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno obtenida con un procedimiento de este tipo muestra un pico a aproximadamente 149 °C, medido por DSC (Véase la fig. 2).

20

La forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno obtenida con un procedimiento de este tipo presenta un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ): 5,69 (s), 9,64 (s), 10,86 (m), 11,45 (s), 12,64 (vs), 14,75 (m), 16,35 (m), 17,02 (m), 18,69 (m), 20,51 (m), 21,68 (m), 23,58 (m), 24,82 (m), 31,2 (w); en los que (vs) = intensidad muy fuerte; (m) = intensidad media; (w) = intensidad débil.

25

La forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno presenta un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos más fuertes expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 5,69 (s), 9,64 (s), 11,45 (s), 12,64 (vs).

30

La forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno obtenida con un procedimiento de este tipo tiene cristal sin forma de aguja.

35

40

45

hidrato que tiene una proporción de estequiometría de trans-clomifeno / ácido cítrico / agua de 3:3:2), se obtiene con un procedimiento de este tipo y parece que dicha forma es estable con respecto a la humedad.

La forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno obtenida con un procedimiento de este tipo muestra un valor de 5 Karl Fischer (K.F.) de aproximadamente un 2,0 %.

La forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno de la invención se puede preparar disolviendo trans-clomifeno en un disolvente orgánico y añadiendo monohidrato de ácido cítrico.

10 Cuando el trans-clomifeno se disuelve en un disolvente orgánico y se añade ácido cítrico anhidro, entonces se prepara el monocitrato de trans-clomifeno en forma anhidra (véase por ejemplo 7).

De acuerdo con una realización preferente, el disolvente orgánico para la preparación de la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno es acetona.

15

De acuerdo con una realización preferente, el procedimiento para la preparación de la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno se realiza a una temperatura comprendida entre 20 °C y 100 °C, preferentemente entre 40 °C y 60 °C, más preferentemente aproximadamente 50 °C.

20 De acuerdo con una realización preferente, el procedimiento para la preparación de la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno se realiza añadiendo monohidrato de ácido cítrico, como sólido o en solución de un disolvente orgánico, a una solución de trans-clomifeno en un disolvente orgánico.

De acuerdo con una realización preferente del procedimiento para la preparación de la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno, la cantidad de monohidrato de ácido cítrico usada está comprendida entre 1,1 y 1,3 equivalentes mol.

De acuerdo con una realización preferente del procedimiento para la preparación de la forma sólida de citrato de trans-clomifeno, el material de partida de trans-clomifeno comprende menos de un 5 % (% de A por HPLC) de cis-clomifeno, preferentemente menos de un 2 % de cis-clomifeno.

El procedimiento de la presente invención para la preparación de la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno Se puede realizar con una cualquiera de las combinaciones de realizaciones preferentes que se han descrito anteriormente.

35

Por lo tanto, el monohidrato de ácido cítrico se puede usar para la preparación de la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno de acuerdo con la presente invención se pueden preparar de acuerdo con las enseñanzas del ejemplo 3 el documento WO2014/031177A1.

Por lo tanto, la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno de la presente invención se puede usar en medicina, en particular, se puede usar para el tratamiento de disfunción ovulatoria o síndrome del ovario poliquístico.

45

Durante el trabajo experimental adicional para desarrollar un procedimiento eficaz para la preparación de citrato de enclomifeno, principalmente con el objeto de aumentar el rendimiento molar y la pureza de la etapa final de cristalización del producto, en lugar de cristalizar el producto citrato de enclomifeno a partir de un disolvente de acetato o de un disolvente de cetona, en particular a partir de acetona, de forma accidental se ha realizado la cristalización del citrato de enclomifeno a partir de etanol, es decir etanol sin otros disolventes. Un experimento de este tipo ha proporcionado de forma inesperada un sólido que tiene un aspecto diferente y mejores propiedades de estabilidad y solubilidad en comparación con el citrato de enclomifeno obtenido a partir de la cristalización usando acetona, que ya se ha descrito anteriormente, o con la forma sólida de citrato de enclomifeno que se desvela en la técnica anterior.

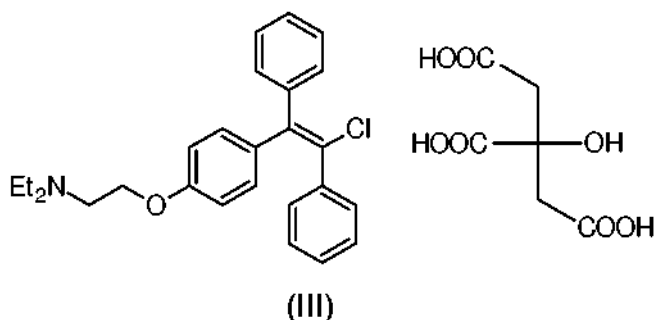
50

En particular, la cristalización o recristalización de citrato de enclomifeno a partir de etanol, sin otros disolventes, es posible para preparar citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja, mientras que el citrato de enclomifeno obtenido a partir de la cristalización usando acetona, como se ha mencionado anteriormente, tiene cristales sin forma de aguja.

55

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es el citrato de enclomifeno de fórmula (III):

60



que tiene un hábito cristalino en forma de aguja.

- 5 Un cristal que tiene forma de aguja es un cristal cilíndrico, fino, a menudo, pero no necesariamente, con una punta afilada en el extremo.

El hábito cristalino diferente de las dos formas sólidas, una obtenida cristalizando a partir de acetona (cristales sin forma de aguja) y la otra solamente a partir de etanol (cristales en forma de aguja) era muy evidente mediante análisis de microscopía.

De hecho, el análisis de microscopía, y en particular, la comparación de las fotografías en las figuras 7 y 8 y en las figuras 7-BIS y 8-BIS realizadas mediante análisis de microscopía proporciona una evidencia adicional mejor del hábito cristalino diferente de las dos formas (véase el ejemplo 13 y las figs. 7, 8, 7-BIS, 8-BIS).

- 15 Además, la Fig. 25 muestra claramente el hábito cristalino del citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja.

- 20 A partir del análisis de XPRD (véase el ejemplo 15 y las figuras 9 y 10) parece que la forma sólida de citrato de enclomifeno preparada a partir de etanol es o se parece a la misma forma sólida polimorfa del citrato de enclomifeno preparado a partir de acetona o es un polimorfo similar, dado que la posición de los picos de XPRD es sustancialmente la misma, aunque algunas intensidades de los picos son diferentes, pero las dos formas sólidas muestran dos formas de hábito cristalino muy diferentes, siendo una respectivamente de cristales en forma de aguja y la segunda siendo cristales sin forma de aguja.

- 25 Por lo tanto, aunque no queda claro si las dos formas sólidas son dos polimorfos diferentes o no, sin embargo es evidente que las dos formas sólidas son dos formas cristalinas diferentes grados que muestran un hábito cristalino muy diferente.

- 30 En particular, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ): 5,8 (vs), 11,5 (vs); en los que (vs) = intensidad muy fuerte.

- 35 Más en particular, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ): 5,8 (vs), 11,5 (vs), 12,7 (s), 14,9 (s) and 24,9 (s); en los que (vs) = intensidad muy fuerte; (s) = intensidad fuerte.

- 40 De nuevo más particularmente, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ): 5,8 (vs), 9,7 (m), 10,9 (m), 11,5 (vs), 12,7 (s), 14,9 (s), 17,1 (m), 20,6 (m), 21,8 (m), 23,6 (m), 23,7 (m) y 24,9 (s); en los que (vs) = intensidad muy fuerte, (s) = intensidad fuerte, (m) = intensidad media.

Los significados proporcionados anteriormente para (vs) = intensidad muy fuerte, (s) = intensidad fuerte, (m) = intensidad media se refieren a los siguientes porcentajes de intensidades relativas:

- 45 (vs) = intensidad muy fuerte se refiere a Int Rel. [%] en el intervalo de 81-100,
 (s) = intensidad fuerte se refiere a Int Rel. [%] en el intervalo de 80-40,
 (m) = intensidad media se refiere a Int Rel. [%] en el intervalo de 39-20.

- 50 El análisis de K.F. de citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja proporciona un valor de aproximadamente un 2 %.

La comparación de las curvas de DSC de la Fig. 2 y de la Fig. 6 proporciona una evidencia clara del comportamiento térmico diferente de las dos formas sólidas de citrato de enclomifeno que tienen dos hábitos cristalinos diferentes,

cristales sin forma de aguja y en forma de aguja respectivamente, quizá de la misma forma polimórfica.

La forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno, es decir citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, obtenida cristalizando el producto a partir de etanol, tiene un punto de fusión de 150 °C medido por DSC (inicio) (Véase la fig. 6).

Además, la forma sólida de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, obtenida cristalizando el producto a partir de etanol, muestra un pico a 154 °C medido por DSC (Véase la fig. 6).

10 Por lo tanto, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja tiene un punto de fusión de 150 °C medido por DSC (inicio).

Además, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja muestra un pico a 154 °C medido por DSC.

15 Por lo tanto, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja tiene un punto de fusión de 150 °C que es mayor que el del citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja, que es de 147 °C, ambos medidos por DSC (inicio) (Véase respectivamente la fig. 6 y la fig. 2).

20 Un comportamiento térmico diferente de este tipo también se confirma con el pico diferente en el análisis de DSC: el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja muestra un pico a 154 °C, una temperatura más elevada en comparación con el pico a 149 °C del citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja.

25 Por lo tanto el estudio comparativo del DSC mencionado anteriormente proporciona evidencias de que el hábito cristalino del citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja es termodinámicamente más estable que el hábito cristalino que no tiene cristales en forma de aguja, dado que el punto de fusión del primero es más elevado que el del último (150 °C con respecto a 147 °C), y ambas formas tienen puntos de fusión más elevados en comparación con los desvelados en la bibliografía de 133-135 °C y 138-139 °C para el citrato de enclomifeno.

30 Además se debería observar que, como se ha discutido anteriormente, el polimorfo que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja y p.f. de 147 °C, ya se identificó que era la forma polimórfica termodinámicamente más estable del citrato de enclomifeno. Por lo tanto, el citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja es la forma sólida que tiene una estabilidad térmica más elevada. Esto se confirma con el punto de fusión más elevado Mostrado por el
35 citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja.

La estabilidad térmica más elevada del citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja de hecho se confirmó mediante estudios de estabilidad comparativos, en efecto una forma cristalina de ese tipo permanece termodinámicamente estable aunque el sólido que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja y p.f. de 147 °C,
40 después de 17 días a temperatura ambiente y una HR de un 95 % falla en los estudios de estabilidad. En particular, después de 17 y 30 días a temperatura ambiente y una HR de un 95 % las intensidades de los picos de los difractogramas de XPRD tienen una caída muy significativa, respectivamente a aproximadamente un 50 % de la intensidad inicial y, después de 30 días, aproximadamente un 30 % de la intensidad inicial. Dicho análisis permite hacer la hipótesis de una conversión en amorfa de una parte del cristal. Un comportamiento de este tipo también
45 está de acuerdo con el estudio y comportamiento higroscopia usado a modo de ejemplo en la figura 18, en el que el enclomifeno que tiene cristales sin forma de aguja absorbe cantidades relevantes de agua cuando se expone a valores de humedad superiores a un 65 % de HR.

Teniendo en cuenta los requisitos regulatorios a cumplir, es evidente que el aumento de la estabilidad térmica del citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja es la forma sólida fundamental para proporcionar un
50 producto que cumpla los requisitos farmacéuticos relacionados con la estabilidad, incluyendo el comportamiento de higroscopia.

El citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, que es la forma sólida termodinámicamente más estable, presenta por lo tanto una estabilidad de almacenamiento más elevada y se puede
55 formular más fácilmente en composiciones farmacéuticas de medicamentos.

La estabilidad térmica más elevada del citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja no es la única propiedad ventajosa de un producto de este tipo.

60 De hecho, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, es decir los cristales en forma de aguja de citrato de enclomifeno, cristalizado a partir de etanol y que tiene un p.f. de 150 °C (por DSC (Inicio)), muestra una solubilidad mucho más elevada en agua, especialmente en agua a pH 4,5, en comparación con el hábito cristalino sin forma de aguja del citrato de enclomifeno, es decir el citrato de enclomifeno cristalizado a partir
65 de acetona.

En particular, el ejemplo 17 proporciona una evidencia clara de que el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja muestra una solubilidad en agua que es casi el doble en comparación con el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja, y la solubilidad para pH 4,5 es cuatro veces más elevada en comparación con el hábito cristalino sin forma de aguja.

Un estudio de solubilidad de este tipo proporciona la indicación de que el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja tiene una biodisponibilidad más elevada en comparación con el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja.

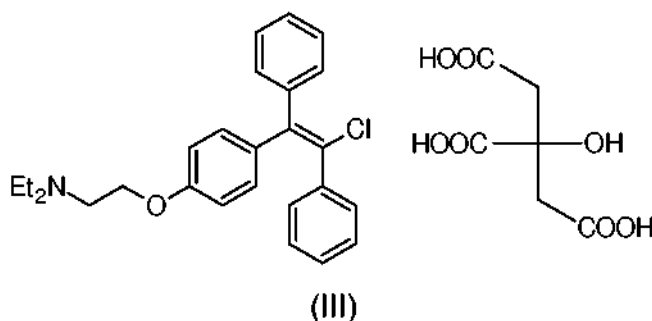
10

Por lo tanto, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja de la presente invención también es adecuado para una composición farmacéutica de citrato de enclomifeno de liberación rápida.

Además, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, es decir citrato de enclomifeno cristalizado a partir de etanol presenta un comportamiento de higroscopia mucho mejor, especialmente en comparación con el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja obtenido por cristalización a partir de acetona (véase el ejemplo 24 y la figura 18).

Otro objeto de la presente invención es por lo tanto un procedimiento para la preparación de citrato de enclomifeno de fórmula (III):

20



que tiene un hábito cristalino en forma de aguja como se ha descrito anteriormente, mediante la adición de ácido cítrico a una solución de enclomifeno en un disolvente orgánico, en el que dicho disolvente orgánico consiste solamente en etanol.

25

La adición de ácido cítrico se puede realizar mediante la adición de ácido cítrico sólido o, como alternativa y preferentemente, mediante la adición de una solución de ácido cítrico en etanol a una solución de enclomifeno en etanol.

30

La solución de ácido cítrico en etanol se puede preparar disolviendo dichos compuestos en un volumen de 5 a 20 volúmenes de etanol.

La solución de enclomifeno en un disolvente orgánico, consiste solamente en etanol y enclomifeno.

35

El etanol puede ser etanol puro o etanol absoluto, siendo preferente el etanol absoluto.

La solución de enclomifeno en etanol se puede realizar mediante solubilización de enclomifeno en un volumen de etanol comprendido entre 2 y 30 volúmenes, preferentemente entre 5 y 20 volúmenes, más preferentemente 10 volúmenes.

40

La adición de ácido cítrico se puede realizar preferentemente a una temperatura comprendida entre 0 °C y 25 °C.

De acuerdo con una realización preferente de dicho procedimiento para la preparación de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, el enclomifeno a convertir en citrato de enclomifeno se prepara partiendo de la sal de E-clomifeno con BPA, es decir a partir de sal de enclomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI). El Ejemplo 14 es un ejemplo de una realización de este tipo.

45

Otro objeto de la presente invención son composiciones farmacéuticas que comprenden citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja y uno o más excipientes farmacéuticos aceptables.

50

Los ejemplos de composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden citrato de enclomifeno que tiene un

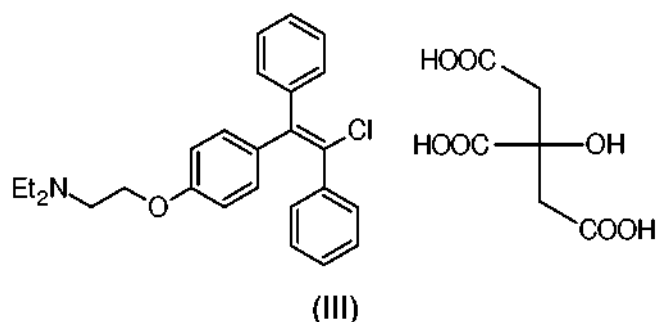
hábito cristalino en forma de aguja son los que se desvelan en los documentos WO2006102232A2, WO2010054248A1, WO2013020017A1, WO2013123218A1, WO2013130832A1, en el ejemplo 3 del documento WO2014031177A1 o del documento WO2014070523A1 con la diferencia de que se usa el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja en lugar del enclomifeno desvelado que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja.

Otro objeto de la presente invención son composiciones farmacéuticas de liberación rápida que comprenden citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja y uno o más excipientes farmacéuticos aceptables.

10 El citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja se puede usar en medicina.

En particular, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja se puede usar en el tratamiento disfunción ovulatoria o síndrome del ovario poliquístico.

15 Un procedimiento alternativo para la preparación de citrato de enclomifeno de fórmula (III):



que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, comprende las siguientes etapas:

20

a) preparación de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática y/o que tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm , mediante cristalización del enclomifeno a partir de etanol,

25

b) conversión del enclomifeno de la etapa a) en citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática de acuerdo con el procedimiento que se ha descrito anteriormente, es decir, mediante la adición de ácido cítrico a una solución de enclomifeno en un disolvente orgánico, en el que dicho disolvente orgánico consiste solamente en etanol.

Dicho procedimiento es un procedimiento muy preferente para la preparación de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja dado que proporciona un producto con una pureza química elevada, usando solamente un disolvente para ambas etapas, pasando a través de un compuesto intermedio con propiedades excelentes.

30

Los ejemplos de dicho procedimiento son los de los ejemplos 28 y 29, además de la Figura 25 que muestra el hábito cristalino en forma de aguja del producto citrato de enclomifeno obtenido con dicho procedimiento.

35

En la etapa b) la adición de ácido cítrico se puede realizar mediante la adición de ácido cítrico sólido o, como alternativa y preferentemente, mediante la adición de una solución de ácido cítrico en etanol.

En las etapas b), la solución de enclomifeno en etanol se puede realizar mediante solubilización de enclomifeno en un volumen de etanol comprendido entre 2 y 30 volúmenes, preferentemente entre 5 y 20 volúmenes, más preferentemente 10 volúmenes.

40

De acuerdo con una realización preferente de dicho procedimiento para la preparación de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, el enclomifeno a cristalizar de la etapa a) se prepara partiendo de la sal de E-clomifeno con BPA, es decir a partir de sal de enclomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI). El Ejemplo 28 es un ejemplo de una realización de este tipo.

45

Se puede observar como el procedimiento para la preparación de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja se puede realizar usando tanto en la etapa a) como en la etapa b) el mismo disolvente que es etanol, solamente.

50

Además, dicho procedimiento mejorado para la preparación de citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja permite la preparación de citrato de enclomifeno que tiene una pureza química elevada, es decir más de un

99,90 % en (% de A/A por HPLC con un contenido de impurezas de cis-clomifeno residual inferior a un 0,10 % por (% de A/A por HPLC (véase el ejemplo 29).

De hecho, durante el desarrollo del procedimiento para la preparación del citrato de enclomifeno mejorado que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, se intentó aislar y cristalizar la base libre de enclomifeno, también denominada enclomifeno (base) o base de enclomifeno o enclomifeno.

En particular, de forma sorprendente se ha encontrado que el enclomifeno (base) cristalizado a partir de etanol, es decir etanol puro o absoluto, y en ausencia de otros disolventes (etapa a) al igual que en la etapa a) del procedimiento mencionado anteriormente, presenta cristales prismáticos individuales grandes y bien definidos que tienen propiedades muy ventajosas, como se describe a continuación.

El aspecto visual y por lo tanto el hábito cristalino de los cristales de enclomifeno cristalizados a partir de etanol es de macrocristales transparentes que tienen forma prismática.

El enclomifeno cristalizado a partir de etanol tiene cristales que son prismas con una longitud comprendida en el intervalo de 0,08 a 2,0 milímetros. En particular, los cristales más largos tienen una longitud comprendida en el intervalo de 1,0 a 2,0 milímetros.

Además, tal enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática está formado por cristales con forma de prisma de diferentes tamaños.

De hecho, la forma cristalina general de las muestras de ensayo observadas en la figura 11 se denomina prisma, prisma que está definido por las cuatro caras laterales que son paralelas a la dirección de elongación. Como las caras más pequeñas que cierran los prismas paralelepípedos (base y parte superior), no son perpendiculares a la dirección de elongación, son prismas oblicuos (las caras no forman ángulos rectos entre ellas; las caras son paralelogramos oblicuos: son romboides, no rombos, no rectángulos, no cuadrados).

Por otro lado, como las caras tienen un crecimiento relativo diferente, algunos prismas son más largos que otros, teniendo un hábito columnar (si la relación de longitud/anchura se pudiera aumentar, tendrán un adicto acicular (agujas) y, al final, un hábito fibroso). Por el contrario, los prismas más cortos se pueden llamar prismas cortos (y, yendo al otro extremo de la relación, que tienen un hábito tabular (laminar) y lamelar).

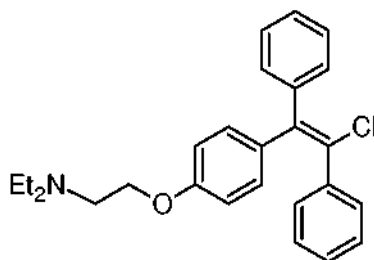
En el presente caso, los prismas más cortos observados en la fig. 11 o en la fig. 11-BIS o en la fig. 19, ya que son prismas oblicuos, recuerdan a la forma regular denominada romboedro, pero no se pueden denominar de forma apropiada con este nombre ya que las seis caras no son rombos (es decir, los ángulos formados por cada par de caras no son exactamente los mismos).

Por lo tanto, hablando estrictamente, el adjetivo romboédrico se debe reservar a prismas cuyas caras sean rombos (seis rombos iguales) como resultado de los elementos de simetría determinados por la estructura interna del cristal. Por supuesto, éste no es el caso de los cristales representados en la fig. 11 o en la 11-BIS o en la fig. 19 (la fotografía 19 se realizó después de 30 días del ensayo de estabilidad).

Por lo tanto, el nombre de los cristales en las Fig. 11, 11-BIS o 19 debe ser "prismas", "prismas cortos", "prismas largos" o "prismas oblicuos", "prismas oblicuos cortos", "prismas oblicuos largos" y así sucesivamente, dependiendo de su longitud. Se podría decir que cuando los prismas son cortos algunos de ellos parecen un romboedro o que tienen forma similar a la de un romboedro. Sin embargo, aunque los prismas más cortos mostrados en la imagen recuerdan a la forma regular denominada romboedro, dicho término no se puede usar para describir los cristales de la invención dado que dicho término implica una simetría cristalina que evidentemente no es la de esta estructura cristalina.

Por lo tanto, el enclomifeno cristalizado a partir de etanol se puede denominar enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática o enclomifeno que tiene cristales prismáticos o enclomifeno que tiene cristales con forma de prisma.

Esta forma sólida de enclomifeno de fórmula (I):



(I)

tiene un hábito cristalino conforma prismática y/o tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm .

5

En el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática, el hábito cristalino con forma prismática corresponde a cristales que tienen la forma de prismas y/o prismas cortos y/o prismas largos y/o prismas oblicuos y/o prismas oblicuos cortos y/o prismas oblicuos largos.

10 Por el contrario, el enclomifeno obtenido por ejemplo mediante cristalización en etanol desnaturalizado con tolueno presenta agregados policristalinos formados por agujas pequeñas. La diferente morfología de los cristales de enclomifeno preparados por cristalización en etanol puro o absoluto y por ejemplo el obtenido por cristalización en etanol desnaturalizado con tolueno es muy evidente también mediante observación visual.

15 El análisis de microscopía presentaba diferentes formas cristalinas para cada lote, en particular:

- El enclomifeno cristalizado a partir de etanol desnaturalizado con tolueno (véase el ejemplo 19) muestra agregados policristalinos de agujas pequeñas (véase la fig. 12).
- El enclomifeno cristalizado a partir de etanol puro (véase el ejemplo 18) muestra prismas monocristalinos

20 transparentes grandes (véase la fig. 11).

En el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática, los cristales son prismas que tienen una longitud comprendida en el intervalo de 0,08 a 2,0 milímetros.

25 En particular, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene una distribución de partículas con un tamaño relativamente grande: de 80 μm (D10) a 770 μm (D90), más particularmente, un 50 % de las partículas (expresado como % en volumen) tienen un diámetro comprendido entre 200 μm y 600 μm . véase la Fig. 20.

30 Además, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm , en particular, está comprendido en el intervalo de 200 μm a 400 μm , más particularmente está comprendido en el intervalo de 250 μm a 350 μm .

35 Además, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un valor medio de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm , en particular, está comprendido en el intervalo de 250 μm a 450 μm , más particularmente está comprendido en el intervalo de 350 μm a 400 μm .

40 Además, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm , en particular, está comprendido en el intervalo de 200 μm a 400 μm , más particularmente está comprendido en el intervalo de 250 μm a 350 μm y tiene un valor medio de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm , en particular, está comprendido en el intervalo de 250 μm a 450 μm , más particularmente está comprendido en el intervalo de 350 μm a 400 μm .

45

De acuerdo con una realización, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm y el valor medio de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm .

50 De acuerdo con una realización preferente, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tienen un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 200 μm a 400 μm y el valor medio de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 250 μm a 450 μm .

De acuerdo con una realización más preferente, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática

tiene un valor medio (D50) la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 250 µm a 350 µm y el valor medio de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 350 µm a 400 µm.

El enclomifeno que no tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene en su lugar un valor medio (D50) y ambos valores medios están comprendidos entre 10 µm y 50 µm (Véase la Fig. 21).

Por lo tanto, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática y/o tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 µm a 500 µm también se puede denominar Macro enclomifeno o enclomifeno que tiene un hábito macrocristalino.

10 Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es el enclomifeno que tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 µm a 500 µm o que tienen los otros valores de distribución del tamaño de partícula mencionados anteriormente para el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática.

15 El procedimiento de cristalización de la base de enclomifeno a partir de etanol, sin otros disolventes, proporciona de ese modo enclomifeno que tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 µm a 500 µm, también denominado Macro enclomifeno o enclomifeno que tiene un hábito macrocristalino.

20 El enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática no es higroscópico tal como se determina por DSV (Absorción de Vapor dinámica) con un instrumento Q5000 TA, a 25 °C con respecto a todo el intervalo de HR de un 0-95 %.

25 El enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática se prepara mediante un procedimiento de cristalización del enclomifeno a partir de etanol, sin otros disolventes.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención también es un procedimiento para la preparación de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática, mediante cristalización del enclomifeno a partir de etanol.

30 El etanol puede ser etanol puro o etanol absoluto.

El término cristalización usado en las diversas realizaciones de la presente invención, se refiere a la cristalización simple o precipitación o, como alternativa, también incluye la recristalización.

35 En particular, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática se prepara mediante un procedimiento de cristalización del enclomifeno en un volumen de 2 a 10 volúmenes de etanol a la unidad de peso de base de enclomifeno, en el que de 3 a 6 volúmenes de etanol proporcionaron los mejores resultados, siendo aproximadamente 5 volúmenes el mejor volumen de etanol.

40 En particular, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática se prepara mediante un procedimiento de cristalización del enclomifeno a partir de etanol a una temperatura comprendida entre 0 °C y 25 °C.

45 Los Ejemplos 18 y 28 proporcionan un procedimiento para realizar la preparación de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática.

Como se ha mencionado anteriormente, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática muestra muchas ventajas, especialmente para su uso como compuesto intermedio del procedimiento para la preparación de citrato de enclomifeno y citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja.

50 El enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática de hecho se puede filtrar muy bien, ya que, por ejemplo, la filtración (sobre papel en un embudo Buckner) de 40 ml de suspensiones que contienen dicho sólido en etanol solamente necesita 10 segundos.

55 Dado que el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tienen la capacidad de filtración más elevada (también en comparación con la capacidad de filtración del enclomifeno obtenido por cristalización en etanol desnaturalizado), tal enclomifeno muestra una pureza química más elevada, especialmente en términos de impurezas de cis-clomifeno residual.

60 El enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática es una forma sólida mejor de la base de enclomifeno, cuya suspensión se filtra más rápidamente, por lo tanto en consecuencia, permitiendo la mejora de la pureza química del enclomifeno (base) y a continuación citrato de enclomifeno y citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja.

65 Los Ejemplos 28 y 29 proporcionan de hecho evidencias del efecto proporcionado por la preparación y aislamiento

de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática y su conversión en citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, que muestra una pureza química de un 99,92 % (% de A/A por HPLC) con una impureza de Cis-clomifeno residual solamente de un 0,03 % (% de A/A por HPLC), en el que la retirada de la impureza de Cis-clomifeno de hecho solamente se produjo durante el aislamiento del enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática.

La preparación y aislamiento de base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática en los procedimientos para la preparación de citrato de enclomifeno o citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja de hecho también proporciona el efecto de proporcionar un producto con una pureza química elevada, especialmente con referencia al contenido de la impureza de cis-clomifeno, dado que el aislamiento de dicha forma sólida intermedia de enclomifeno permite la retirada de la mayor parte de la cantidad de dicha impureza.

Además, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática es una forma sólida mejorada de la base de enclomifeno ya que muestra una fluidez más elevada, por lo tanto adecuada para la fabricación industrial de citrato de enclomifeno, usando dicha base de enclomifeno como un compuesto intermedio de síntesis química y/o para la fabricación industrial de productos farmacéuticos que comprenden dicho enclomifeno.

El análisis de microscopía de la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática expuesta a tres condiciones de estabilidad durante 30 días presentaba el mismo prisma transparente incoloro que el producto de partida. Véase la Fig. 19. Por lo tanto, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática permanece estable al menos un mes en las tres condiciones de estabilidad.

Por lo tanto, teniendo en cuenta las propiedades que se han discutido anteriormente, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática es muy adecuado como un compuesto intermedio sintético para la preparación de citrato de enclomifeno (véase el procedimiento que se describe en lo sucesivo en el presente documento) y que citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja (véase el procedimiento que se ha descrito anteriormente), especialmente en la fabricación a gran escala.

Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es un procedimiento para la preparación de citrato de enclomifeno que comprende las siguientes etapas:

- a) preparación de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática y/o que tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm , mediante cristalización del enclomifeno a partir de etanol,
- b) conversión del enclomifeno de la etapa a) en citrato de enclomifeno mediante la adición de ácido cítrico o monohidrato de ácido cítrico a una solución de enclomifeno en un disolvente orgánico.

La etapa b) se puede realizar mediante la adición de ácido cítrico o monohidrato de ácido cítrico a una solución de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática solubilizado en etanol, metanol o acetona.

La etapa b) se puede realizar mediante la adición de ácido cítrico sólido o monohidrato de ácido cítrico sólido a una solución de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática solubilizado en etanol, metanol o acetona.

Como alternativa y preferentemente, la etapa b) se puede realizar mediante la adición de una solución de ácido cítrico o monohidrato de ácido cítrico sólido en metanol, etanol o acetona a una solución o suspensión de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática solubilizado respectivamente en etanol, metanol o acetona.

Más preferentemente, la etapa b) se puede realizar mediante la adición de una solución de ácido cítrico o monohidrato de ácido cítrico sólido en etanol a una solución de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática solubilizado en etanol. La etapa b) se puede realizar a una temperatura comprendida entre 0 °C y 78 °C, preferentemente a una temperatura comprendida entre 0 °C y 25 °C.

Por lo tanto se puede apreciar que el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática, un sólido cuya suspensión se puede filtrar muy bien y un sólido que tiene una fluidez excelente, densidad en volumen, densidad compactada, índice de compresibilidad (véase el ejemplo 23) y pureza química (véase por ejemplo el contenido bajo del cis-clomifeno en el ejemplo 28), es un compuesto intermedio del procedimiento excelente, que se puede usar de forma ventajosa para la preparación de citrato de enclomifeno o, preferentemente, para la preparación de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, de acuerdo con los dos procedimientos que se han descrito anteriormente.

De ese modo se puede apreciar cómo el enclomifeno de fórmula (I) que tiene un hábito cristalino con forma prismática se puede usar por lo tanto de forma ventajosa para la preparación de citrato de enclomifeno.

El enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un punto de fusión de 79 °C medido por DSC (pico) (véase la fig. 17), mientras que el enclomifeno cristalizado a partir de etanol desnaturalizado con tolueno tiene un punto de fusión de 75 °C medido por DSC (pico) (Véase la fig. 16). El último punto de fusión siendo el mismo que el que se escribe en la bibliografía para la base de enclomifeno.

5

Por lo tanto es evidente que el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática es una forma sólida termodinámicamente más estable en comparación con las formas sólidas de enclomifeno que tienen punto de fusión más bajo tal como, por ejemplo, la que se obtiene por cristalización con etanol desnaturalizado con tolueno.

10 Al tener una estabilidad térmica más elevada, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática proporciona mejor estabilidad de almacenamiento (útil para el almacenamiento de dicho compuesto intermedio en el almacén) y tiene una fabricación más fácil de la composición farmacéutica que comprende enclomifeno.

15 La comparación de los difractogramas de XPRD de las muestras de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática y de enclomifeno que tienen hábito cristalino sin forma prismática (véase la Fig. 15) muestra una intensidad de pico relativa muy diferente para algunos de los picos, tales como los que se encuentran en valores de 2-Theta (2θ): 8,1°, 12,3°, 13,4°, 21,3°, 25,2°. La intensidad de estos picos es mucho menor en el caso del enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma prismática, mientras que otros picos tienen intensidades similares (tal como 15,3°, 17,3°, 18,2° y 23,2° 2θ). El hábito cristalino diferente o forma cristalina diferente
20 observados para ambos lotes, es decir prismas grandes para el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática (cristalizado a partir de etanol) y agujas muy pequeñas para el enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma prismática cristalizado explicar estas diferencias en los difractogramas de XPRD.

Además, teniendo en cuenta las intensidades de XPRD que se describen en la tabla del ejemplo 21, el enclomifeno
25 que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con un pico característico expresado en valores de 2-Theta (2θ) a 25,3 (vs) en el que (vs) = intensidad muy fuerte.

Por lo tanto, teniendo en cuenta de nuevo las intensidades de XPRD, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos
30 expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 8,1 (s), 17,3 (vs), 25,2 (vs), 25,3 (vs); en los que (vs) = intensidad muy fuerte, (s) = intensidad fuerte.

El enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 8,1 (s), 12,3 (m), 13,4 (m), 17,3
35 (vs), 17,5 (m), 19,5 (m), 25,2 (vs), 25,3 (vs); en los que (vs) = intensidad muy fuerte; (s) = intensidad fuerte; (m) = intensidad media.

El enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 8,1 (s), 12,2 (w), 12,3 (m), 13,4 (m),
40 17,3 (vs), 17,5 (m), 18,5 (w), 18,7 (w), 19,2 (w), 19,5 (m), 21,3 (w), 24,6 (w), 25,2 (vs), 25,3 (vs); 25,4 (w), 26,7 (w), en los que (vs) = intensidad muy fuerte; (s) = intensidad fuerte; (m) = intensidad media, (w) = intensidad débil.

Además, teniendo en cuenta la comparación de las intensidades de XPRD que se describen en la tabla del ejemplo
45 21, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 12,3, 17,5, 25,3; en particular, también teniendo en cuenta las intensidades, con picos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 12,3 (m), 17,5 (m), 25,3 (vs); en los que (vs) = intensidad muy fuerte; (s) = intensidad fuerte; (m) = intensidad media, (w) = intensidad débil.

50 Además, de nuevo teniendo en cuenta la comparación de las intensidades de XPRD que se describen en la tabla del ejemplo 21, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 12,3, 17,5, 21,3, 25,3, 25,4; en particular, también teniendo en cuenta las intensidades, con picos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a:
55 12,3 (m), 17,5 (m), 21,3 (w), 25,3 (vs), 25,4 (w); en los que (vs) = intensidad muy fuerte; (s) = intensidad fuerte; (m) = intensidad media, (w) = intensidad débil. Parece que todos los picos mencionados son picos de la forma sólida o forma cristalina que es enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática dado que no están presentes en el difractograma de XPRD del enclomifeno con agregados policristalinos de agujas cortas, que tienen hábito cristalino sin forma prismática.

60 Los significados proporcionados anteriormente para (vs) = intensidad muy fuerte, (s) = intensidad fuerte, (m) = intensidad media hacen referencia a los siguientes porcentajes de intensidades relativas:

(vs) = intensidad muy fuerte se refiere a Int Rel. [%] en el intervalo de 81-100,

(s) = intensidad fuerte se refiere a Int Rel. [%] en el intervalo de 60-80,

65 (m) = intensidad media se refiere a Int Rel. [%] en el intervalo de 30-59.

(w) = intensidad débil se refiere a Int Rel. [%] en el intervalo de 15-29.

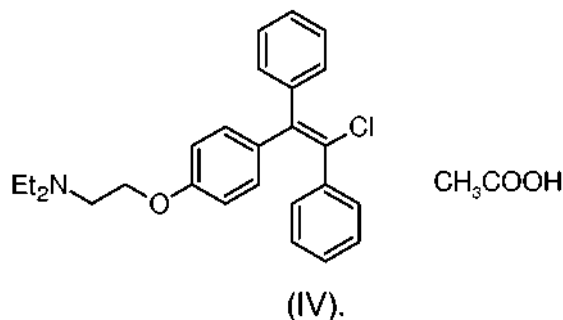
El enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática, es decir enclomifeno formado por cristales grandes individuales con forma de prisma, proporciona una fluidez mucho mejor, densidad en volumen y densidad compactada en comparación con el enclomifeno que son agregados policristalinos de agujas cortas tal como se prepara mediante cristalización en etanol desnaturalizado con tolueno, un ejemplo de cuya preparación se realiza en el ejemplo en 19 (véanse los ejemplos 22 y 23).

La forma sólida que es enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática permite de ese modo ahorrar espacio en el almacén y en los contenedores para transporte. Además, esta forma proporciona ventajas evidentes en el procesamiento para la preparación de la composición farmacéutica de enclomifeno debido a su aumento de fluidez.

En otras palabras, dado que la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática nuestra mejores propiedades de fluidez, dicha forma permite una fabricación más fácil de las composiciones farmacéuticas de enclomifeno ya que muestra mejores propiedades de procesamiento.

Se ha encontrado una nueva forma sólida de enclomifeno, que es una sal de enclomifeno con mayor solubilidad en medio acuoso.

En particular, se ha encontrado que el acetato de enclomifeno de fórmula (IV):



es mucho más soluble que el citrato de enclomifeno en medio acuoso.

Más en particular, el acetato de enclomifeno es mucho más soluble a pH 4,5 que el citrato de enclomifeno.

En particular, a pH 4,5, el acetato de enclomifeno es aproximadamente 15 veces más soluble que el citrato de enclomifeno que tiene cristales sin forma de aguja (que tiene un p.f. de 147 °C medido por DSC (inicio)).

En particular, a pH 4,5, el acetato de enclomifeno es aproximadamente 2,5 veces más soluble que los cristales en forma de aguja de citrato de enclomifeno (que tiene un p.f. de 150 °C medido por DSC (inicio)).

El acetato de enclomifeno se puede formular de forma conveniente para proporcionar composiciones farmacéuticas que comprenden acetato de enclomifeno y uno o más excipientes farmacéuticos aceptables.

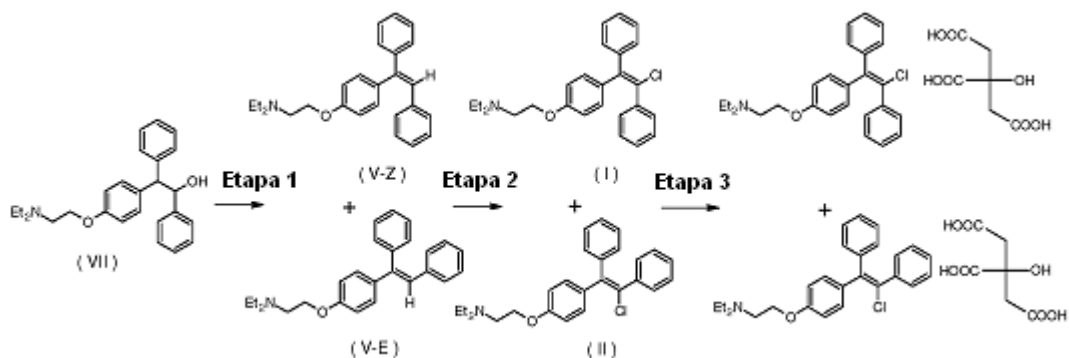
Los ejemplos de composiciones farmacéuticas adecuadas que comprenden acetato de enclomifeno son las que se desvelan en los documentos WO2006102232A2, WO2010054248A1, WO2013020017A1, WO2013123218A1, WO2013130832A1, en el ejemplo 3 del documento WO2014031177A1 o del documento WO2014070523A1 con la diferencia de que el acetato de enclomifeno se usa en lugar del citrato de enclomifeno desvelado.

Por lo tanto, el acetato de enclomifeno y las composiciones farmacéuticas del mismo se pueden usar como medicamento, en particular, se pueden usar para el tratamiento de disfunción ovulatoria o síndrome del ovario poliquístico.

Además, el acetato de enclomifeno es adecuado para la preparación de composiciones farmacéuticas de liberación muy rápida que comprenden acetato de enclomifeno y uno o más excipientes farmacéuticos aceptables.

50 SECCIÓN EXPERIMENTAL

El material de partida 1-{4-[2-(Diethylamino)etoxy]fenil}-1,2-difeniletanol se puede preparar de acuerdo con métodos de la técnica anterior bien conocidos o se puede adquirir en el mercado.

Ejemplo 1: Preparación de citrato de clomifeno a partir de 1-{4-[2-(Dietilamino)etoxi]fenil}-1,2-difeniletanol.**5 Etapa 1**

- Un matraz de fondo redondo equipado con un equipo de destilación se cargaron con 250 g de 1-{4-[2-(Dietilamino)etoxi]fenil}-1,2-difeniletanol y 1250 ml de tolueno. A esta mezcla se añadieron 85 ml de HCl al 32 % en p/p, la temperatura se elevó hasta el punto de ebullición y todo el agua se retiró por vía azeotrópica por medio de un aparato de Dean-Stark, obteniendo clorhidrato de 2-{4-[(E/Z)-1,2-difeniletetil]fenoxi}-N,N-dietiletanamina, como mezcla de isómeros geométricos de fórmulas (V-Z) y (V-E).

Etapa 2

- 15 La mezcla de reacción se llevó a 60 °C y, manteniendo esta temperatura, se añadieron 500 ml de ácido acético durante 30'. Se comprobó que el contenido de agua estuviera por debajo de 500 ppm (valoración de Karl Fischer).

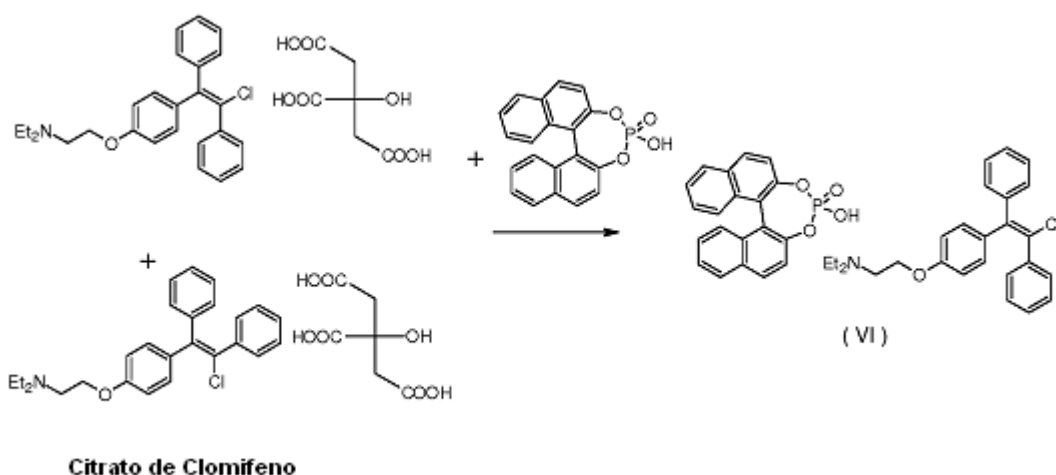
- Una solución caliente (50-60 °C), preparada con 60 g de dicloro dimetil hidantoína (1,3-dicloro-5,5-dimetil hidantoína; abreviado DCDMI) (0,474 equiv. mol.) en 600 ml de tolueno, se añadió lentamente a la mezcla de reacción durante 20 90' manteniendo la temperatura a aproximadamente 60 °C. Después de comprobar la conversión por HPLC, fue necesaria una pequeña adición de solución de DCDMI para tener el material de partida por debajo de un 0,5 %. La mezcla de reacción se enfrió a 15-20 °C y se trató lentamente con 750 ml de agua y, hasta un pH 12, aproximadamente 1000 ml de solución de hidróxido sódico acuoso al 30 % en p/p. Después de agitar durante 30', las fases se separaron y la fase orgánica se lavó con 3 x 250 ml de agua y se concentró por destilación al vacío 25 obteniendo de este modo 280 g de clomifeno, en forma de un aceite que contenía una cierta cantidad residual de tolueno de fórmulas (I) e (II).

Etapa 3

- 30 El aceite obtenido en la etapa anterior se recogió con 625 ml de acetona, la solución transparente se calentó hasta ebullición suave y se añadió una solución formada por 142,5 g de monohidrato de ácido cítrico y 1000 ml de acetona lentamente durante 30'. La mezcla de reacción se agitó mientras que se enfriaba lentamente a 0 °C y a continuación 4 horas a 0 °C. El producto se filtró, se lavó con acetona y se secó al vacío obteniendo 361 g de Citrato de clomifeno, cuyo rendimiento molar era de un 94,1 %. Pureza por HPLC > 98 % ((% de A/A).

35

Ejemplo 2a: Preparación de sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico, partiendo de citrato de clomifeno.



En un matraz de fondo redondo se cargaron 100 g de Citrato de clomifeno (análisis de HPLC (% de A/A): 65,21 % de E-clomifeno, 34,06 % de Z-clomifeno) y 1000 ml de Metanol. La suspensión se agitó a 30 °C hasta la disolución completa. A continuación se añadió una solución de ácido binaftil-fosfórico racémico (abreviado BPA) 30 g (0,515 equiv.) en 30 ml de DMF. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 1 h a 30 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Metanol.

Se obtuvieron 50,4 g de sal de E-clomifeno con BPA.

10 Análisis de HPLC ((% de A/A): 97,04 % de E-clomifeno, 2,5 % de Z-clomifeno.

Ejemplo 2b: Preparación de sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico, partiendo de citrato de clomifeno.

15 En un matraz de fondo redondo se cargaron 50 g de Citrato de clomifeno (el mismo que el usado en el ejemplo 2a) y 500 ml de Metanol. La suspensión se calentó a 40-45 °C y se agitó hasta la disolución completa. A continuación se añadió una solución de 15 g de BPA (0,515 equiv.) en 300 ml de metanol. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 1 h a 20 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Metanol.

20 Se obtuvieron 24,1 g de sal de E-clomifeno con BPA.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 98,96 % de E-clomifeno, 0,69 % de Z-clomifeno.

Ejemplo 2c: Preparación de sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico, partiendo de citrato de clomifeno.

25

En un matraz de fondo redondo se cargaron 100 g de Citrato de clomifeno (el mismo que el usado en el ejemplo 2a) y 1000 ml de Metanol. La suspensión se calentó a 40-45 °C y se agitó hasta la disolución completa. A continuación se añadió una solución de 30 g de BPA (0,515 equiv.) en 1000 ml de metanol. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 1 h a 20 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Metanol.

30

Se obtuvieron 47,9 g de sal de E-clomifeno con BPA.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 98,81 % de E-clomifeno, 0,79 % de Z-clomifeno.

Ejemplo 2d: Preparación de sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico, partiendo de citrato de clomifeno.

35

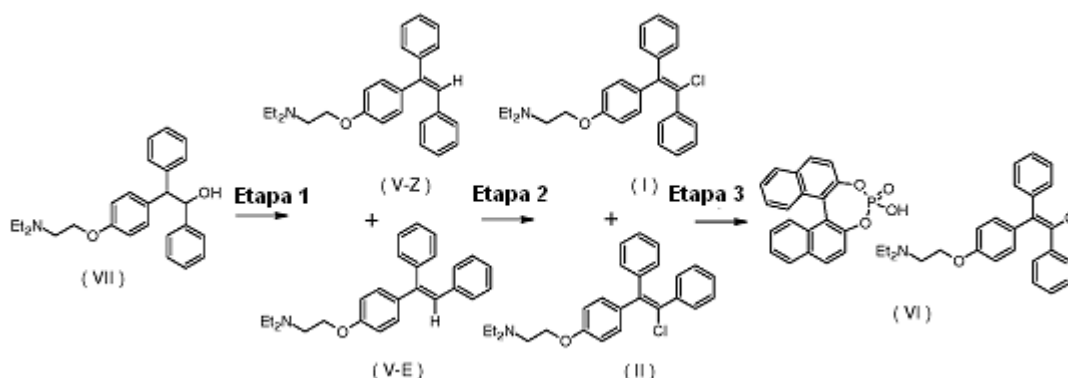
En un matraz de fondo redondo se cargaron 150 g de Citrato de clomifeno (el mismo que el usado en el ejemplo 2a) y 1500 ml de Metanol. La suspensión se calentó a 40-45 °C y se agitó hasta la disolución completa. A continuación se añadió una solución de 45 g de BPA (0,515 equiv.) en 900 ml de metanol. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 1 h a 20 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Metanol.

40

Se obtuvieron 76,4 g de sal de E-clomifeno con BPA.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 98,82 % de E-clomifeno, 0,80 % de Z-clomifeno.

45 Ejemplo 3a: Preparación de sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico, partiendo de 1-{4-[2-(Diethylamino)etoxi]fenil}-1,2-difeniletanol



- En un matraz de fondo redondo se cargaron 100 g de 1-{4-[2-(Dietilamino)etoxi]fenil}-1,2-difeniletanol de fórmula (VII), 300 ml de Tolueno y 62 ml de sol. de HCl al 32 %. La mezcla se agitó a T= 35-40 °C durante 30 min.. A continuación, la solución se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 300 ml de Tolueno. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 800 ml de Diclorometano (abreviado DCM). Se añadió ácido acético (200 ml) a la solución y se añadió una solución de 26 g de DCDMI en 250 ml de DCM en un periodo de 90 min.. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 2 h a t.a.. La solución obtenida se añadió en un segundo matraz de fondo redondo que contenía una solución de 400 ml de NaOH al 30 % y 300 ml de agua. La mezcla se agitó durante 1 h y a continuación las fases se separaron y la fase orgánica se lavó cinco veces con agua (5 x 100 ml). La fase orgánica obtenida se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 500 ml de Metanol. Una solución de ácido binaftil-fosfórico racémico de 45 g en 1000 ml se añadió a T = 30 °C. La solución obtenida se agitó a t.a. durante 1 h. La suspensión se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Metanol.
- 15 Se obtuvieron 79,7 g de sal de E-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico. Análisis de HPLC ((% de A/A): 97,70 % de E-clomifeno, 1,67 % de Z-clomifeno.

Ejemplo 3b: Preparación de sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico.

- 20 En un matraz de fondo redondo se cargaron 100 g de 1-{4-[2-(Dietilamino)etoxi]fenil}-1,2-difeniletanol de fórmula (VII), 300 ml de Tolueno y 62 ml de sol. de HCl al 32 %. La mezcla se agitó a T= 35-40 °C durante 30 min. A continuación, la solución se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 300 ml de Tolueno. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 800 ml de DCM. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 300 ml de Tolueno. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 800 ml de DCM. Se añadió ácido acético (200 ml) a la solución y se añadió una solución de 26 g de DCDMI en 250 ml de DCM en un periodo de 90 min.. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 2 h a t.a.. La solución obtenida se añadió en un segundo matraz de fondo redondo que contenía una solución de 400 ml de NaOH al 30 % y 300 ml de agua. La mezcla se agitó durante 1 h y a continuación las fases se separaron y la fase orgánica se lavó cinco veces con agua (5 x 100 ml). La solución orgánica obtenida se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 500 ml de Metanol. Una solución de ácido binaftil-fosfórico racémico (abreviado BPA) de 45 g en 700 ml se añadió a T= 30 °C. La solución obtenida se agitó a t.a. durante 1 h. La suspensión se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Metanol.
- Se obtuvieron 90 g de sal de E-clomifeno con BPA.
- 35 Análisis de HPLC ((% de A/A): 94,49 % de E-clomifeno, 4,15 % de Z-clomifeno.

Ejemplo 3c: Preparación de sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico.

- 40 En un matraz de fondo redondo se cargaron 100 g de 1-{4-[2-(Dietilamino)etoxi]fenil}-1,2-difeniletanol de fórmula (VII), 300 ml de Tolueno y 62 ml de sol. de HCl al 32 %. La mezcla se agitó a T= 35-40 °C durante 30'. A continuación, la solución se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 300 ml de Tolueno. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 300 ml de Tolueno. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 800 ml de DCM. Se añadió ácido acético (200 ml) a la solución y se añadió una solución de 26 g de DCDMI en 250 ml de DCM en un periodo de 90'. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 2 h a t.a.. La solución obtenida se añadió en un segundo matraz de fondo redondo que contenía una solución de 400 ml de NaOH al 30 % y 300 ml de agua. La mezcla se agitó durante 1 h y a continuación las fases se separaron y la fase orgánica se lavó cinco veces con agua (5 x 100 ml). La solución orgánica obtenida se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 500 ml de Metanol. Una solución de ácido binaftil-fosfórico racémico (abreviado BPA) de 45 g en 1000 ml se añadió a T= 30 °C. La solución obtenida se agitó a t.a. durante 1 h.
- 50 La suspensión se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Metanol.

Se obtuvieron 78,3 g de sal de E-clomifeno con BPA.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 96,53 % de E-clomifeno, 1,51 % de Z-clomifeno.

Ejemplo 3d: Preparación de sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico

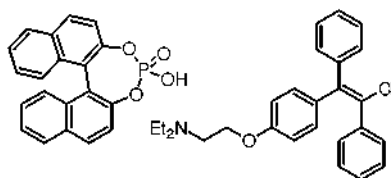
- 5 En un matraz de fondo redondo se cargaron 100 g de 1-{4-[2-(Diethylamino)etoxi]fenil}-1,2-difeniletanol de fórmula (VII), 300 ml de Tolueno y 62 ml de sol. de HCl al 32 %. La mezcla se agitó a T= 35-40 °C durante 30'. A continuación, la solución se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 300 ml de Tolueno. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 300 ml de Tolueno. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 800 ml de DCM. Se añadió ácido acético (200 ml) a la solución y se añadió una solución de 26 g de DCDMI en 250 ml de DCM en un periodo de 90'. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 2 h a t.a.. La solución obtenida se añadió en un segundo matraz de fondo redondo que contenía una solución de 400 ml de NaOH al 30 % y 300 ml de agua. La mezcla se agitó durante 1 h y a continuación las fases se separaron y la fase orgánica se lavó cinco veces con agua (5 x 100 ml). La solución orgánica obtenida se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 1000 ml de Metanol. Una solución de BPA de 72 g en 1000 ml se añadió a T= 30 °C. La solución obtenida se agitó a t.a. durante 1 h. La suspensión se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Metanol.

Se obtuvieron 119,1 g de sal de E-clomifeno con BPA.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 95,97 % de E-clomifeno, 3,39 % de Z-clomifeno.

20

Ejemplo 4a: Purificación de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI).



(VI)

- 25 En un matraz de fondo redondo se cargaron 100 g de sal de E-clomifeno con BPA de fórmula (VI) (% de A/A por HPLC: 99,31 % de E-clomifeno, 0,51 % de Z-clomifeno) y 600 ml de Tolueno. La suspensión se agitó a t.a. y a continuación se añadieron 24 ml de NaOH al 30 %. A continuación la suspensión obtenida se filtró y la solución obtenida se lavó con 250 ml de agua. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 800 ml de Metanol. Una solución de ácido binaftil-fosfórico racémico (abreviado BPA) de 32 g (0,515 equiv.) en 800 ml de Metanol se añadió. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 1 h a 30 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Metanol.

Se obtuvieron 57,1 g de sal de E-clomifeno con BPA de fórmula (VI).

Análisis de HPLC ((% de A/A): 99,11 % de E-clomifeno, 0,03 % de Z-clomifeno.

35

Ejemplo 4b: Purificación de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI).

- 40 En un matraz de fondo redondo se cargaron 114 g de sal de E-clomifeno con BPA (% de A/A por HPLC: 99,43 % de E-clomifeno, 0,35 % de Z-clomifeno) y 790 ml de Tolueno. La suspensión se agitó a t.a. y a continuación se añadieron 28 ml de NaOH al 30 %. A continuación la suspensión obtenida se agitó durante 2 h y a continuación se filtró y la solución obtenida se lavó con 290 ml de agua. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 920 ml de Metanol. Una solución de BPA de 37 g (0,515 equiv.) en 920 ml de Metanol se añadió. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 1 h a 30 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 115 ml de Metanol.

45

Se obtuvieron 58,1 g de sal de E-clomifeno con BPA.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 99,44 % de E-clomifeno, 0,00 % de Z-clomifeno.

Ejemplo 4c: Purificación de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI).

50

- 55 En un matraz de fondo redondo se cargaron 76 g de sal de E-clomifeno con BPA (% de A/A por HPLC: 98,82 % de E-clomifeno, 0,80 % de Z-clomifeno), 500 ml de Tolueno y 50 ml de agua. La suspensión se agitó a t.a. y a continuación se añadieron 20 ml de NaOH al 30 %. A continuación la suspensión obtenida se agitó durante 2 h y a continuación se filtró y la solución obtenida se lavó con 190 ml de agua. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 600 ml de Metanol. Se añadió una solución de BPA de 28 g (0,515 equiv.) en 600 ml de Metanol. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 1,5 h a 30 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 76 ml de Metanol.

Se obtuvieron 53,9 g de sal de E-clomifeno con BPA.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 98,95 % de E-clomifeno, 0,10 % de Z-clomifeno.

Ejemplo 5: Caracterización de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI).

5

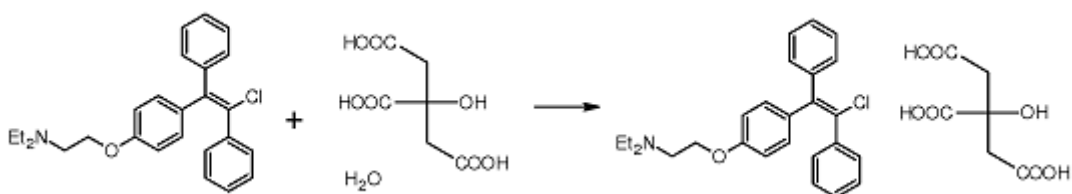
El difractograma de XPRD de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI) (preparado en el ejemplo 4c) se muestra en la Fig. 4. dicha forma cristalina se caracteriza por picos intensos a valores de 2-theta de 11,50 y 12,00.

10 El análisis de DSC muestra un punto de fusión de 218,09 °C (inicio) (véase la fig. 5).

La configuración trans se ha confirmado mediante análisis de RMN H en 2D.

Ejemplo 6a: Preparación de Citrato de E-clomifeno (1:1) a partir de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI)

15



En un matraz de fondo redondo se cargaron 82 g de sal de E-clomifeno con BPA (% de A/A por HPLC: 99,40 % de E-clomifeno, 0,34 % de Z-clomifeno) y 500 ml de Tolueno. La suspensión se agitó a t.a. y a continuación se añadieron 20 ml de NaOH al 30 % y 50 ml de agua con Metanol. A continuación la suspensión obtenida se agitó durante 2 h y a continuación se filtró y la solución obtenida se lavó con 200 ml de agua. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 105 ml de Acetona. La solución se calentó a 50 °C y se añadió una solución de monohidrato de ácido cítrico de 27 g en 166 ml de acetona. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 1 h a 0 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 50 ml de acetona.

Se obtuvieron 63,3 g de sal de citrato de E-clomifeno (1:1).

Análisis de HPLC ((% de A/A): 99,75 % de E-clomifeno, 0,25 % de Z-clomifeno.

Ejemplo 6b: Preparación de E-citrato de clomifeno (1:1) a partir de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI)

En un matraz de fondo redondo se cargaron 125 g de sal de E-clomifeno con BPA de fórmula (VI) y 1050 ml de Tolueno. La suspensión se agitó a t.a. y a continuación se añadieron 28 ml de NaOH al 30 % y 50 ml de agua. A continuación la suspensión obtenida se agitó durante 2 h y a continuación se filtró y la solución obtenida se lavó con 250 ml de agua. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 310 ml de Acetona. La solución se calentó a 50 °C y se añadió una solución de monohidrato de ácido cítrico de 41,5 g en 500 ml de Acetona. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 2 h a 0 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 125 ml de Acetona.

40

Se obtuvieron 97,07 g de sal de Citrato de E-clomifeno.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 99,88 % de E-clomifeno, 0,05 % de Z-clomifeno.

Ejemplo 6c: Preparación de Citrato de E-clomifeno (1:1) a partir de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI)

45

En un matraz de fondo redondo se cargaron 109 g de sal de E-clomifeno con BPA de fórmula (VI), 950 ml de Tolueno y 50 ml de agua. La suspensión se agitó a t.a. de continuación se añadieron 29 ml de NaOH al 30 %. A continuación la suspensión obtenida se agitó durante 2 h y a continuación se filtró y la solución obtenida se lavó con 220 ml de agua. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 270 ml de Acetona. La solución se calentó a 50 °C y se añadió una solución de monohidrato de ácido cítrico de 36 g en 430 ml de Acetona. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 2 h a 0 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 110 ml de acetona.

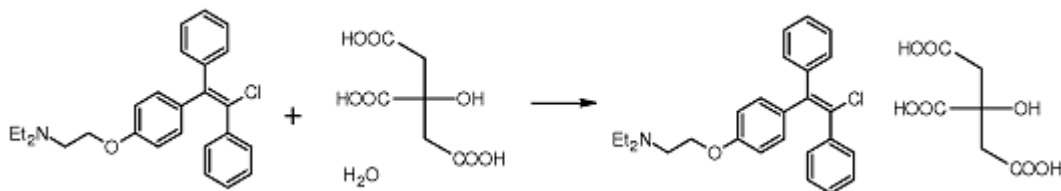
55 Se obtuvieron 82,7 g de sal de Citrato de E-clomifeno.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 99,90 % de E-clomifeno, 0,04 % de Z-clomifeno.

K.F. = 2,0 %.

Este producto sólido se caracteriza en el Ejemplo 12.

Ejemplo 7: Síntesis del monocitrato de trans-clomifeno a partir de base de trans-clomifeno.



5

En un matraz de fondo redondo se cargaron 21,2 g de base libre de E-clomifeno (% de A/A por HPLC: 99,38 % de E-clomifeno, 0,26 % de Z-clomifeno) y 50 ml de acetona. La solución se calentó a 50 °C y se añadió una solución de monohidrato de ácido cítrico de 13,2 g en 80 ml de Acetona. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 4-5 h a 0 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 20 ml de Acetona.

Se obtuvieron 29,6 g de sal de monocitrato de E-clomifeno.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 99,62 % de E-clomifeno, 0,38 % de Z-clomifeno.

15 Ejemplo 8: Preparación y caracterización de la sal de monocitrato de trans-clomifeno anhidro a partir de la sal de trans-clomifeno con ácido binaftil-fosfórico racémico de fórmula (VI)

En un matraz de fondo redondo se cargaron 155 g de sal de E-clomifeno con BPA de fórmula (VI), 1000 ml de Tolueno y 150 ml de agua. La suspensión se agitó a t.a. y a continuación se añadieron 41 ml de NaOH al 30 % y 75 ml de MeOH. A continuación la suspensión obtenida se agitó y a continuación se filtró y la solución obtenida se lavó con 390 ml de agua. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 500 ml de Acetona. La solución se calentó a 50 °C y se añadió una solución de ácido cítrico anhidro de 40 g en 500 ml de Acetona. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 2 h a 0 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 155 ml de Acetona. El sólido se secó en vacío a T = 60 °C durante 12 h.

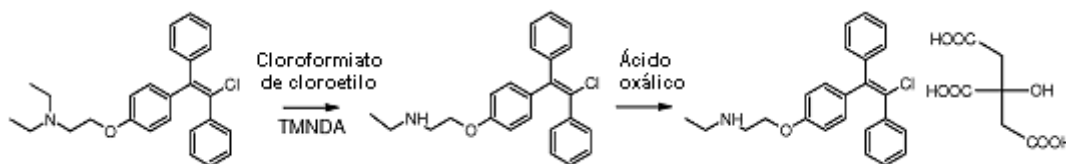
25

Se obtuvieron 104,8 g de sal de Citrato de E-clomifeno.

Análisis de HPLC ((% de A/A): 99,86 % de E-clomifeno, 0,07 % de Z-clomifeno.

K.F. = 0,9 %.

30 Ejemplo 9 (Referencia): Síntesis del compuesto oxalato de des-etil clomifeno a partir de citrato de clomifeno como mezcla de isómeros cis y trans.



35 Etapa 1

Un matraz de fondo redondo con equipo convencional se cargó con 14,7 g de citrato de clomifeno, 50 ml de clorobenceno y 50 ml de agua. En el matraz, se dejaron gotear 8 ml de hidróxido sódico acuoso al 30 % en p/p, hasta un pH de 12. La mezcla de reacción se agitó, las fases se separaron, la fase orgánica se lavó con 3 x 20 ml de agua y se trató con sulfato sódico, obteniendo una solución transparente de clomifeno en clorobenceno.

Etapa 2

La solución transparente de la etapa previa se trató con 8 g de tetrametilnaftalendiamina y 5 ml de cloroformiato de cloroetilo, a continuación se calentó a 80 °C. La conversión fue seguida de HPLC. Cuando el clomifeno residual era inferior a un 1 %, la mezcla de reacción se enfrió, se trató lentamente con 40 ml de metanol y se calentó a reflujo durante 2 horas. A continuación el metanol se retiró por destilación y la mezcla de reacción se trató con 20 ml de clorobenceno, 30 ml de agua y 8 ml de hidróxido sódico acuoso al 30 % en p/p, hasta un pH de 12. Las fases se separaron y la fase orgánica se secó con sulfato sódico y se concentró al vacío hasta un residuo, de aprox. 17 g. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna usando gel de sílice y el eluyente formado por 50 de acetato de isopropilo, 40 heptano, 5 dimetiletilamina. El orden de elución es: Rf 0,9 para tetrametilnaftalendiamina; Rf 0,8 para clomifeno; Rf 0,2 para producto.

Las fracciones puras se concentraron, obteniendo 4,9 g de des-etil clomifeno en forma de un aceite.

Etapa 3

- 5 Un matraz de fondo redondo con equipo convencional se cargó con 4,6 g de aceite obtenido en la etapa previa, con la adición de 13,8 ml de acetona y 0,46 g de carbón vegetal decolorante. Después de la filtración, la solución transparente se dejó gotear lentamente en otra solución formada por 1,1 g de ácido oxálico disuelto en 50,6 ml de acetona. La mezcla se agitó 2 horas, se filtró lavando con 9,2 ml de acetona, el producto en bruto se recogió con 50,6 ml de acetona, se agitó, se filtró lavando con 9,2 ml de acetona y se secó a 50 °C al vacío. El rendimiento fue de 4,9 g de oxalato de des-etil clomifeno.

Ejemplo 10: Método analítico para identificar y cuantificar la impureza de des-etil clomifeno en clomifeno o enclomifeno

Condiciones cromatográficas:

Columna:	Vydac 214TP C-4 250 mm / 4,6 mm / 5 µm		
Temp. Columna:	35 °C		
Fase Móvil A:	TFA al 0,1 % en agua		
Fase Móvil B:	TFA al 0,03 % en ACN		
Gradiente:	Tiempo (min)	% de A	% de B
	0	80	20
	24	40	60
	30	10	90
	31	80	20
Realización posterior:	10 min.		
Flujo:	1,0 ml/min		
Detector	UV a 233 nm, bw 4 bn y 290 nm, bw 4 nm		
Volumen de Inyección:	5 µl (con lavado de aguja en ACN)		
Tiempo de Realización:	31 min		
Diluyente de muestra:	H ₂ O/ACN (1:1)		

15

Aplicando las condiciones que se han descrito anteriormente, los tiempos de retención esperados son como se indica a continuación:

Compuesto	RRT
Des-etil-clomifeno - Isómero 1	0,93
Des-etil-clomifeno - Isómero 2	0,94
clomifeno o enclomifeno	1,00

- 20 **Ejemplo 11: Método analítico para identificar y cuantificar cis-clomifeno y trans-clomifeno y para determinar la pureza y la proporción de los mismos.**

Condiciones cromatográficas:

Dim. Columna:	250 mm x 4,6 mm, 5 µm
Fase estacionaria	Butil silano (L26 de fase de USP, se sugiere Vydac 4C)
Temp. Columna:	temperatura ambiente
Fase Móvil:	Metanol / agua / trietilamina a 55 : 45 : 0,3 en v/v Ajustar a pH 2,5 con ácido fosfórico
Flujo:	1,0 ml/min
Detector	UV a 233 nm
Volumen de Inyección:	10 µl
Diluyente de muestra:	fase móvil

Aplicando las condiciones que se han descrito anteriormente, los tiempos de retención esperados son como se

indica a continuación:

Compuesto	RRT
cis-clomifeno	1,00
trans-clomifeno	1,09

Ejemplo 12: Caracterización de la forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno, es decir citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja, que son aglomerados policristalinos blandos, preparado de acuerdo con el ejemplo 6c.

Análisis de XPRD

10 El análisis de XRPD se realizó usando un difractómetro X'Pert de PANalytical con radiación de Cu K α en geometría de Bragg-Brentano. El sistema está equipado con un detector de múltiples tiras en tiempo real, monodimensional. El difractograma se registró de 3° a 40° (2 θ) a una tasa de barrido de 17,6° por minuto (véase la Figura 1).

15 La forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno presenta un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2 θ): 5,69 (s), 9,64 (s), 10,86 (m), 11,45 (s), 12,64 (vs), 14,75 (m), 16,35 (m), 17,02 (m), 18,69 (m), 20,51 (m), 21,68 (m), 23,58 (m), 24,82 (m), 31,2 (w); en los que (vs) = intensidad muy fuerte; (m) = intensidad media; (w) = intensidad débil.

20 La forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno presenta un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos más intensos característicos expresados en valores de 2-Theta (2 θ): 5,69 (s), 9,64 (s), 11,45 (s), 12,64 (vs).

Hábito cristalino

25 La forma sólida de monocitrato de trans-clomifeno tiene un hábito cristalino sin forma de aguja. Además, el monocitrato de trans-clomifeno muestra un hábito cristalino en forma de aglomerados policristalinos blandos.

Karl Fischer

30 Los análisis de Karl Fischer se registraron con un equipo de valoración 787 KF Trinito de Metrohm. El producto se disolvió en MeOH. Se analizaron dos muestras usando los siguientes reactivos: Compuesto 5 de Hydranal (Riedel de Haën Ref. 34805), Metanol Rápido de Hydranal (Riedel de Haën Ref. 37817) y Patrón Acuoso 1.0 de Hydranal (Riedel de Haën Ref. 34828 Usado para calcular el factor).
K.F. = 2,0 %.

35

DSC

40 El análisis de DSC se registró con un DSC822e de Mettler. Una muestra de 3,5000 mg se pesó en un crisol de aluminio de 40 μ l con una tapa con agujeros y se calentó, en atmósfera de nitrógeno (50 ml/min), a 10 °C/min de 30 °C a 300 °C.

45 La forma sólida de trans-citrato de clomifeno se caracteriza por un pico pronunciado endotérmico que corresponde al punto de fusión con un inicio a 146,83 °C (entalpía de fusión -54,56 J/g), medido por análisis de DSC (10 °C/min). A 169,4 °C (inicio) comienza un pico endotérmico ancho.

45

Por lo tanto, el monocitrato de trans-clomifeno presenta un punto de fusión de aproximadamente 147 °C medido por DSC (véase la Fig. 2).

TGA

50

El análisis termogravimétrico se registró en un analizador termogravimétrico TGA/SDTA851e de Mettler. Una muestra de 16,9805 mg se pensó en un crisol de aluminio de 70 μ l con una tapa con agujeros y se calentó a 10 °C/min de 30 °C a 280 °C, en atmósfera de nitrógeno (50 ml/min).

55 El análisis de TG de monocitrato de trans-clomifeno muestra una pérdida de peso de un 1,58 % antes del punto de fusión mucho antes que el punto de fusión y el punto de ebullición del agua. Esta pérdida de peso podría provenir de la eliminación de trazas de acetona (véase la Fig. 3).

Ejemplo 13: Análisis de microscopía de hábitos cristalinos de citrato de enclomifeno

Los productos se observaron en un microscopio estereoscópico MZ16F de Leica y las fotografías se obtuvieron usando una cámara DCF 300 FX de Leica. Se usó luz reflejada y transmitida, y si no se especifica las imágenes se obtuvieron con luz reflejada. Para cada imagen, la escala se especifica en la propia fotografía.

1. Análisis de microscopía de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja, que tiene un p.f. de 147 °C (por DSC) (como se prepara en el ejemplo 6c).
El citrato de enclomifeno cristalizado a partir de acetona con un p.f. de 147 °C (por DSC) (como se prepara en el ejemplo 6c) presenta un hábito cristalino que forma aglomerados policristalinos no blandos (véase la Fig. 7). Los fragmentos son placas o copos. El sólido no es transparente y no presenta lados lisos. No es posible observar la forma individual de los cristales debido a su pequeño tamaño.
2. Análisis de microscopía de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, que tiene un p.f. de 150 °C (por DSC) (como se prepara en el ejemplo 14).
El citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, cristalizado a partir de etanol con un p.f. de 150 °C (por DSC) (como se prepara en el ejemplo 14) presenta un hábito cristalino de cristales de agujas cortas (véase la Fig. 8). Los fragmentos individuales son agujas de tipo corto, alargadas, en cierto modo aplastadas (como pajas). Las agujas son pequeñas pero algunas de ellas son transparentes, de modo que son monocristalinas.
3. Comparación de morfología y tamaño de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja y sin forma de aguja.

Los dos productos de citrato de enclomifeno presentan una estructura policristalina cuando se observan al microscopio, en un caso los cristales pequeños eran agujas (cristales a partir de etanol) y en el otro caso (cristales de acetona) la forma del cristal no se determinó pero la forma cristalina de las dos formas es diferente. Además, parece que los cristales de acetona están formados por cristales más pequeños que los cristales a partir de etanol.

En conclusión, el análisis de microscopía presentaba diferentes formas cristalinas para cada hábito cristalino de citrato de enclomifeno:

- los cristales a partir de etanol presentan una estructura policristalina formada por agujas pequeñas,
- los cristales a partir de acetona presentan una estructura policristalina similar, pero en este caso la agregación forma placas.

Ejemplo 14: Preparación de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, mediante cristalización en etanol

En un matraz de fondo redondo se cargaron 100 g de sal de E-clomifeno con BPA (preparado de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 4a pero a mayor escala), 600 ml de Tolueno, 77 ml de Metanol y 77 ml de agua. La suspensión se agitó a t.a. y a continuación se añadieron 28 ml de NaOH al 30 %. A continuación la suspensión obtenida se agitó durante 1 h la continuación se filtró. La solución obtenida se retiró con golpecitos y se lavó con 250 ml de agua. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 250 ml de Etanol. La solución se calentó a 40-45 °C y se añadió una solución de 28,6 g de Ácido Cítrico en 400 ml de Etanol. Al final de la adición la mezcla se agitó durante 1 h a 0 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Etanol. El producto se secó al vacío a 60 °C durante una noche. Se obtuvieron 71,9 g de sal de Citrato de E-clomifeno, en forma de una sal de color blanco cristalina.

Ejemplo 15: Caracterización de hábitos cristalinos de citrato de enclomifeno mediante análisis de XRPD

El análisis de XRPD se realizó usando un difractómetro X'Pert de PANalytical con radiación de Cu K α en geometría de Bragg-Brentano. El sistema está equipado con un detector de múltiples tiras en tiempo real, monodimensional. El difractograma se registró de 3° a 40° (2 θ) a una tasa de barrido de 0,0205° por segundo.

1. El citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja (tal como se prepara en el ejemplo 6c) es un polvo de color blanco homogéneo de color blanco cuyo difractograma de XRPD se muestra en la Fig. 1
2. El citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja (tal como se prepara en el ejemplo 14) se analizó y el difractograma de XRPD, adquirido antes y después de un tratamiento de molienda suave (para confirmar que la morfología cristalina no se vería influida por un tratamiento de molienda suave, que es el caso), se muestra en la Fig. 9.
3. Comparación de difractogramas de XRPD de muestras de citrato de enclomifeno que tienen cristales sin forma de aguja (obtenidos por cristalización en acetona) y citrato de enclomifeno molido que tiene cristales en forma de aguja (obtenidos por cristalización en etanol) que indicaba algunas diferencias solamente en la intensidad del pico, ya que la posición de los picos es la misma para ambas muestras, como se muestra en la Fig. comparativa 10 y en la siguiente tabla:

ES 2 671 126 T3

Posición del Pico [°2Th.]	Citrato de Encl. con crist. sin forma de aguja (prep. exp. 6c) Int. Rel. [%]	Citrato de Encl. con crist. en forma de aguja (prep. exp. 14) Int. Rel. [%]
5,8	61	100
9,7	61	39
10,9	22	25
11,5	44	86
12,7	100	61
13,5	11	3
13,8	7	7
14,9	26	47
15,3	8	10
16,4	26	14
16,7	< 1	9
17,1	40	25
18,7	23	18
19,3	13	11
19,6	6	8
20,3	< 1	15
20,6	40	25
21,0	20	9
21,6	< 1	9
21,8	26	22
22,1	< 1	11
23,3	< 1	11
23,6	45	38
23,7	32	36
24,1	16	22
24,9	33	44
25,7	< 1	3
26,2	5	9
26,6	7	9
27,1	4	5
27,7	< 1	4
28,8	< 1	3
29,1	4	6
29,5	< 1	3
30,6	< 1	2
31,3	11	16
32,4	< 1	3
32,9	4	6

Posición del Pico [$^{\circ}2\theta$.]	Citrato de Encl. con crist. sin forma de aguja (prep. exp. 6c) Int. Rel. [%]	Citrato de Encl. con crist. en forma de aguja (prep. exp. 14) Int. Rel. [%]
33,6	< 1	2
34,5	7	6
34,9	< 1	4
36,8	< 1	2
38,1	3	4

Algunas intensidades de los picos se resaltan en letra negrita dado que son notablemente diferentes en comparación con la otra forma sólida de citrato de enclomifeno.

- 5 Se observaron diferentes intensidades relativas para las dos formas cristalinas de citrato de enclomifeno debido a la orientación preferente causada por la morfología del cristal.

En particular, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 5,8 (vs), 11,5 (vs); en los que (vs) = intensidad muy fuerte.

Más en particular, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 5,8 (vs), 11,5 (vs), 12,7 (s), 14,9 (s) y 24,9 (s); en los que (vs) = intensidad muy fuerte; (s) = intensidad fuerte.

De nuevo más particularmente, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 5,8 (vs), 9,7 (m), 10,9 (m), 11,5 (vs), 12,7 (s), 14,9 (s), 17,1 (m), 20,6 (m), 21,8 (m), 23,6 (m), 23,7 (m) y 24,9 (s); en los que (vs) = intensidad muy fuerte, (s) = intensidad fuerte, (m) = intensidad media.

El significado proporcionado anteriormente para (vs) = intensidad muy fuerte, (s) = intensidad fuerte, (m) = intensidad media se refiere a los siguientes porcentajes de intensidades relativas:

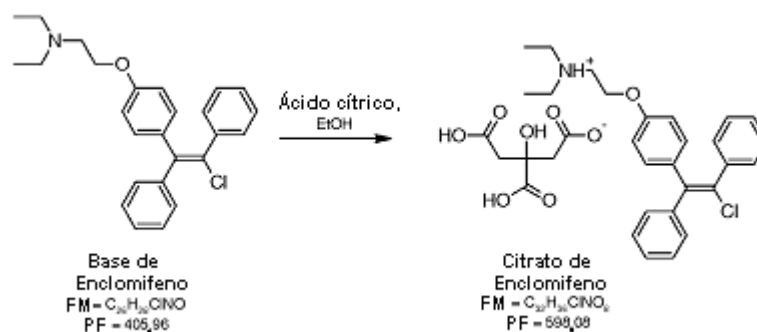
- (vs) = intensidad muy fuerte se refiere a Int Rel. [%] en el intervalo de 81-100,
 (s) = intensidad fuerte se refiere a Int Rel. [%] en el intervalo de 80-40,
 (m) = intensidad media se refiere a Int Rel. [%] en el intervalo de 39-20.

En particular, usando el pico a un valor de 2-Theta (2θ) de 12,7 $^{\circ}$ como pico de referencia de intensidad, es evidente que los picos a 5,8 $^{\circ}$ y 11,5 $^{\circ}$ (2θ) de la muestra de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja tienen intensidades relativas mucho más elevadas que la muestra de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja, mientras que los otros picos tienen intensidad similar.

En el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja (cristalizado a partir de etanol), usando el pico en el valor de 2-Theta (2θ) de 12,7 $^{\circ}$ como pico de referencia de intensidad, un pico de este tipo tiene una intensidad relativa de un 61 %, los picos a 5,8 y 11,5 $^{\circ}$ (2θ) tienen intensidades relativas mas elevadas, en particular, tienen una intensidad relativa respectivamente de un 100 % y un 86 %.

En el caso del citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, esta diferencia de intensidad proviene de la orientación preferente de los cristales producida por la forma de aguja.

Ejemplo 16: Preparación de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, mediante cristalización en etanol.



Un matraz de fondo redondo, equipado con termómetro, condensador de reflujo, impulsor y embudo de goteo se cargó con nitrógeno y se cargó con: 2,0 g (1 equiv.) de base de enclomifeno que tenía un hábito cristalino con forma prismática (preparado en el ejemplo 27) [perfil de HPLC del material de partida base de enclomifeno: enclomifeno al 99,83 %, % de A/A, Cis-clomifeno al 0,03 %, % de A/A, otras impurezas al 0,14 % % de A/A] y 2,0 ml de etanol absoluto. La mezcla se calentó hasta 50 °C para disolver el producto bruto, y una solución formada por 1,04 g (1,1 equiv.) de ácido cítrico anhidro en 8,0 ml (8V) de etanol absoluto se añadió lentamente y a la misma temperatura. La mezcla se enfrió lentamente hasta 0 °C, y se permitió su agitación durante 2 h. La suspensión se filtró por filtración por succión y la torta se lavó con 2 ml (1V) de etanol absoluto frío. El producto obtenido de este modo se secó al vacío a 50 °C durante 8 h. Este procedimiento proporcionó 2,80 g (rendimiento de un 95,0 %) de citrato de enclomifeno en forma de agujas finas de color blanco, es decir citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja.

15 Perfil de HPLC de citrato de enclomifeno: enclomifeno 99,92 % de A/A; Cis-clomifeno al 0,03 % (% de A/A, otras impurezas al 0,04 %, % de A/A.

Ejemplo 17: Estudios de solubilidad de formas de hábitos cristalinos de citrato de enclomifeno

20 Para determinar el efecto del tamaño y la morfología del cristal con respecto a la solubilidad de las diferentes formas sólidas de citrato de enclomifeno, se realizaron estudios de solubilidad cinética en agua y soluciones acuosas tamponadas. La solubilidad se determinó mediante análisis de HPLC, mediante comparación del área correspondiente al pico por HPLC de enclomifeno.

25 Para cada estudio de solubilidad, se controlaron los siguientes parámetros:

- Intensidad del pico de enclomifeno para cada replicado del ensayo
- valor promedio
- desviación estándar.

30

Procedimiento experimental

Para realizar los estudios de solubilidad, se agitaron 400 mg de cada producto (no triturado) en agua (24 ml, 60v) en las mismas condiciones de velocidad de agitación (agitación magnética a 1000 rpm con una barra de agitación con "forma de pelota de rugby" de 2 cm), matraz usado (matraz de fondo redondo de 50 ml de capacidad con una boca de 29/32), etc. Las alícuotas de aproximadamente 6 ml de suspensión se filtraron en diferentes momentos: 15, 45, 90 y 180 min. Después de la filtración, las aguas madre se analizaron directamente por HPLC (haciendo 2 replicados para cada análisis) y su pH se determinó. El sólido filtrado se analizó por XRPD. El análisis de solubilidad se repitió para cada producto y la comparación de la solubilidad se determinó mediante diferencias del área de HPLC.

40

A continuación se presenta un método de HPLC que permite tener una determinación rápida de la solubilidad de enclomifeno:

Columna	C18 Zorbax Eclipse (XDB) 150 x 4,6 mm, 5µm
Fase móvil	(H ₂ O-H ₃ PO ₄ al 0,1 %: ACN a 95:5) / ACN (60:40) ---- 6 min ---- (30:70)---3 min - (30:70); Realización posterior 3 min
Temperatura	25 °C
Flujo	1,5 ml/min
Longitud de onda	240 nm

Volumen de inyección	25 μ l de aguas madre
Tiempo de parada	9 min (+ 3 min de tiempo posterior)
Tiempo de retención	Tr (enclomifeno) = 3,1 min Tr (ácido cítrico) = 0,9 min

Estas condiciones de HPLC se usaron para realizar análisis de solubilidad.

Estudios de solubilidad en agua

5

Inicialmente la solubilidad del citrato de enclomifeno en agua se realizó por duplicado. Sin embargo como los inventores observaron una variación estándar elevada para algunos análisis de HPLC entre ambos duplicados, estos ensayos se realizaron por triplicado. Para cada muestra de citrato de enclomifeno, los resultados se muestran en las siguientes tablas: Tabla 1 para citrato de enclomifeno que tiene cristales sin forma de aguja (p.f. de 147 °C), lote 722, 10 y Tabla 2 para citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja (p.f. de 150 °C), lote 723.

Tabla 1. Resultados de estudios de solubilidad en agua de citrato de enclomifeno que tiene cristales sin forma de aguja:

Tiempo min	HPLC a/a	HPLC a/a	HPLC a/a	HPLC a/a promedio	DT
0	0	0	0	0	0
15	1819	3483	3273	2858	906
45	3083	3370	3225	3226	144
90	3229	2099	2988	2772	595
180	2991	3597	3208	3265	307

15 Tabla 2. Resultados de estudios de solubilidad en agua de citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja:

Tiempo min	HPLC a/a	HPLC a/a	HPLC a/a	HPLC a/a promedio	DT
0	0	0	0	0	0
15	4099	6104	3273	5152	1006
45	5206	5457	3225	4962	652
90	5085	5426	2988	5334	218
180	4120	5327	3208	4126	1198

Los valores de HPLC a/a promedio de solubilidad de las dos formas sólidas de citrato de enclomifeno se representaron con respecto al tiempo:

20

Véase la Fig. 26.

La solubilidad del citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja es más elevada que la del citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja durante tres horas, aunque parece que esta 25 diferencia de solubilidad disminuye con el tiempo. De hecho parece que la solubilidad de los cristales en forma de aguja disminuye con el tiempo y podría ser similar a la solubilidad de los cristales sin forma de aguja después de 3 horas teniendo en cuenta el error experimental de los diferentes replicados (DT). Por lo tanto parece que el tamaño del cristal y el hábito del citrato de enclomifeno con cristales en forma de aguja producen una solubilidad cinética más elevada que disminuye con el tiempo proporcionando, después de tres horas, una solubilidad similar a la del 30 citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja. Sin embargo, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja es más soluble (casi dos veces) que el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja.

Estudios de solubilidad a pH 4,5

35

La solubilidad en un medio ligeramente ácido se determinó a pH 4,5, el tampón usado era una mezcla de ácido

acético/acetato sódico preparada de acuerdo con las especificaciones de USP.

La solubilidad del citrato de enclomifeno que tiene cristales sin forma de aguja y en forma de aguja en tampón a 4,5 pH se realizó por duplicado. En este caso la reproducibilidad era mejor que en el análisis de citratos con agua.

5

Los resultados se muestran en las tablas que siguen a continuación (Tabla 3 para el citrato de enclomifeno que tiene cristales sin forma de aguja, lote 722, y Tabla 4 para el citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja, lote 723).

10

Tabla 3. Resultados de estudio de solubilidad de citrato de enclomifeno que tiene cristales sin forma de aguja a pH = 4,5

Tiempo min	HPLC a/a	HPLC a/a	a/a promedio	DT
0	0	0	0	0
15	1294	1077	1185	154
45	907	941	924	24
90	1279	912	1095	260
180	1008	1096	1052	62

Tabla 4. Resultados de estudio de solubilidad de citrato de enclomifeno que tiene cristales con forma de aguja a pH = 4,5

Tiempo min	HPLC a/a	HPLC a/a	a/a promedio	DT
0	0	0	0	0
15	3941	4330	4135	275
45	3978	4070	4024	65
90	4889	5329	5109	311
180	5098	5060	5079	27

15

Los valores de HPLC A/A promedio de solubilidad de las dos formas sólidas de citrato de enclomifeno se representaron con respecto al tiempo:

Véase la Fig. 27.

20

A partir de la representación mencionada anteriormente, se pueden observar curvas de disolución muy diferentes entre las dos formas de hábito cristalino de citrato de enclomifeno. La solubilidad del citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja (lote 723) era de aproximadamente 4 a 5 veces más elevada que la solubilidad del citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja (lote 722) y parece que esta diferencia de solubilidad aumenta o se mantiene con el tiempo. Por lo tanto en este caso, las diferencias en el tamaño y el hábito cristalino desempeñan un papel fundamental en la determinación de la solubilidad del citrato de enclomifeno.

25

Por lo tanto, el citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja de la presente invención es mucho más soluble a pH 4,5 que el citrato de enclomifeno que tiene cristales sin forma de aguja, en particular de aproximadamente 4 a 5 veces más soluble.

30

Por lo tanto, en agua y a pH 4,5 el citrato de enclomifeno que tiene cristales en forma de aguja de la presente invención es más soluble que el citrato de enclomifeno que tiene cristales sin forma de aguja. Sin embargo, el alcance de este efecto es mucho más evidente en una solución tamponada a pH 4,5 que en agua pura.

35

Ejemplo 18: Preparación de base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática, mediante cristalización en etanol.

En un matraz de fondo redondo se cargaron 100 g de clomifeno con Sal de BPA (preparada de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 4a pero a mayor escala), 600 ml de Tolueno, 77 ml de Metanol y 77 ml de agua. La suspensión se agitó a t.a. y a continuación se añadieron 28 ml de NaOH al 30 %. A continuación la suspensión obtenida se agitó durante 1 h y a continuación se filtró. La solución obtenida se retiró con golpecitos y se

40

lavó con 250 ml de agua. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 250 ml de Etanol. La mezcla se agitó durante 1 h a 0 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 100 ml de Etanol.

- 5 El sólido muy cristalino, que tenía el aspecto de cristales grandes y transparentes, macrocristales, se secó al vacío a 60 °C durante una noche.

Se obtuvieron 36,4 g de base de E-clomifeno, que eran muy cristalina. Análisis de DSC en la Fig. 17.

10 **Ejemplo 19: Preparación de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino sin forma prismática.**

En un matraz de fondo redondo se cargaron 60 g de clomifeno con Sal de BPA (preparada de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 4a pero a mayor escala), 360 ml de Tolueno, 46 ml de Metanol y 46 ml de agua. La suspensión se agitó a t.a. y a continuación se añadieron 17 ml de NaOH al 30 %. A continuación la suspensión obtenida se agitó durante 1 h y a continuación se filtró. La solución obtenida se retiró con golpecitos y se lavó con 150 ml de agua. La solución orgánica se concentró hasta residual y el residuo se diluyó con 90 ml de Etanol desnaturalizado con tolueno. La mezcla se agitó durante 1 h a -10 °C. La suspensión obtenida se filtró y el sólido se lavó con 30 ml de Etanol desnaturalizado con tolueno.

- 20 El sólido se secó al vacío a 60 °C durante una noche.

Se obtuvieron 25,4 g de E-clomifeno (base). Análisis de DSC en la Fig. 16.

Ejemplo 20: Análisis de microscopía de hábitos cristalinos de enclomifeno (base)

- 25 Los productos de los ejemplos 18 y 19 se observaron en un microscopio estereoscópico MZ16F de Leica y las fotografías se obtuvieron usando una cámara DCF 300 FX de Leica. Se usó luz reflejada y transmitida, si no se especificaba las imágenes se realizaron con luz reflejada. Para cada imagen, la escala se especifica en la propia fotografía.

- 30 El enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino con forma prismática (preparado de acuerdo con el ejemplo 18) (véase la Fig. 11 o 11-BIS) presenta prismas transparentes incoloros, algunos de los cuales son muy cortos y otros son más alargados. Son cristales individuales relativamente grandes con lados y bordes bien definidos.

- 35 El nombre de los cristales en la imagen debe ser "prismas" o "prismas cortos", "prismas largos" o "prismas oblicuos" y "prismas oblicuos cortos", "prismas oblicuos largos" y así sucesivamente., dependiendo de su longitud. Como máximo se puede indicar que cuando los prismas son cortos algunos de ellos se parecen a un romboedro o son similares a un romboedro. Sin embargo; aunque los prismas más cortos mostrados en la imagen recuerdan a la forma regular denominada romboedro, dicho término no se puede usar para describir los cristales de la invención Ya que dicho término implica una simetría cristalina que evidentemente no es la de esta estructura cristalina.

El enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino sin forma prismática (preparado de acuerdo con el ejemplo 19) (véase la Fig. 12 o 12-BIS) presenta un hábito cristalino que forma aglomerados policristalinos blandos. Los fragmentos individuales son agujas cortas, muy pequeñas.

- 45 El análisis de microscopía tanto de la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática Como el que tiene un hábito cristalino sin forma prismática indicaba diferencias significativas en el hábito cristalino: El enclomifeno cristalizado a partir de etanol (solo) del ejemplo 18 presenta cristales individuales más grandes y bien definidos mientras que el enclomifeno del ejemplo 19 presenta agregados policristalinos formados por agujas pequeñas. La diferente morfología de los cristales de enclomifeno también es muy evidente mediante observación visual.

El análisis de microscopía mostraba diferentes formas cristalinas para cada lote, en particular:

- 55
- el enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma prismática (véase el ejemplo 19) muestra agregados policristalinos de agujas pequeñas (véase la fig. 12 y 12-BIS).
 - el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática (véase el ejemplo 18) muestra prismas monocristalinos transparentes grandes (véase la fig. 11 y 11-BIS).

60 **Ejemplo 21: Caracterización de hábitos cristalinos de enclomifeno (base) mediante análisis de XRPD**

El análisis de XRPD se realizó usando un difractómetro X'Pert de PANalytical con radiación de Cu K α en geometría de Bragg-Brentano. El sistema está equipado con un detector de múltiples tiras en tiempo real, monodimensional. El difractograma se registró de 3° a 40° (2 θ) a una tasa de barrido de 0,0205° por segundo.

- 65

1. El enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino con forma prismática (cristalizado a partir de etanol, tal como se prepara en el ejemplo 18) muestra el difractograma de XRPD de la Fig. 13.
2. El enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino sin forma prismática (cristalizado a partir de etanol desnaturalizado con tolueno, tal como se prepara en el ejemplo 19) muestra el difractograma de XRPD de la Fig. 14.
3. La comparación de difractogramas de muestras de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática o sin forma prismática (véase la Fig. 15) indicaba la misma forma cristalina con una intensidad de pico relativa para algunos de los picos (tal como a valores de 2-theta (2θ) de 8,15°, 12,33°, 13,41°, 21,38°, 25,23°, 35,17°, 38,10°). La intensidad de estos picos es mucho menor en el caso del enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma prismática, mientras que los otros picos tienen una intensidad similar (a valores de 2-theta (2θ) de 15,34°, 17,34°, 18,21° y 23,28°). El diferente hábito cristalino observado para ambos lotes, prismas grandes para el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática y agujas muy pequeñas para el enclomifeno que tiene cristales no prismáticos explica estas diferencias.
- 15 La siguiente tabla muestra la comparación de las intensidades relativas del espectro de XRPD entre el enclomifeno que tiene cristales prismáticos, tal como se prepara mediante cristalización a partir de etanol, y el enclomifeno tal como se prepara en el ejemplo 19, que no tiene un hábito cristalino con forma de prisma.

Posición del pico (del enclomifeno del ejemplo 18)	enclomifeno del ejemplo 18, es decir, cristales de enclomifeno PRISMÁTICOS Int. Rel. [%]	enclomifeno del ejemplo 19, es decir, cristales de enclomifeno no PRISMÁTICOS Int. Rel. [%]
8,1	80	19
10,6	9	4
10,9	< 1	3
12,2	27	19
12,3	45	< 1
12,4	< 1	3
13,4	42	7
15,4	4	7
16,2	4	6
17,3	100	100
17,5	44	< 1
18,2	4	2
18,5	23	8
18,7	15	4
19,2	15	6
19,5	30	8
19,9	6	2
21,2	< 1	11
21,3	18	< 1
22,0	3	4
22,2	5	4
22,6	13	11
22,7	< 1	3
23,2	12	9
24,3	< 1	3
24,6	21	7

Posición del pico (del enclomifeno del ejemplo 18)	enclomifeno del ejemplo 18, es decir, cristales de enclomifeno PRISMÁTICOS Int. Rel. [%]	enclomifeno del ejemplo 19, es decir, cristales de enclomifeno no PRISMÁTICOS Int. Rel. [%]
25,0	< 1	3
25,2	89	17
25,3	93	< 1
25,4	17	< 1
26,7	17	17
27,9	1	< 1
28,2	< 1	1
28,3	1	< 1
28,6	1	2
29,5	1	1
30,0	1	< 1
31,0	1	< 1
31,5	3	1
32,8	3	< 1
33,0	3	2
34,2	< 1	1
34,4	4	< 1

El pico más intenso en el valor de 2-Theta de 17,3 se ha usado como referencia para calcular las intensidades relativas para ambas estructuras cristalinas.

5 Ejemplo 22: Estudio de fluidez de hábitos cristalinos de enclomifeno (base) mediante análisis de XRPD

La fluidez se determinó mediante un método en las instalaciones usando un embudo de vidrio (diámetro de 80 mm – diámetro del tubo de 10 mm – longitud del tubo 75 de) con aproximadamente 5 g de productor repitiendo el procedimiento tres veces (en los casos en los que se observaba fluidez). Se observaron diferentes parámetros:

10

- Flujo o no
- Necesidad de golpeteo
- Tiempo para pasar a través del embudo

15 Entre ambos lotes de base de enclomifeno se observaron comportamientos muy diferentes:

- enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática (tal como se prepara en el ejemplo 18): aunque fueron necesarias algunas percusiones, el producto fluía a través del embudo en un breve periodo de tiempo de 10 s.

20

- enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma prismática (tal como se prepara en el ejemplo 19): el sólido no fluía. Sin embargo con un golpeteo constante pasaba a través del embudo muy lentamente después de 130 s.

Número del lote	¿Flujo? ¿Necesario Golpeteo? tiempo	¿Flujo? ¿Necesario Golpeteo? tiempo	¿Flujo? ¿Necesario Golpeteo? tiempo
Base de enclomifeno (ejemplo 18)	Si Si 15 s	Si Si 12 s	Si Si 14 s
Base de enclomifeno (ejemplo 19)	No (electricidad estática) Si (si fuera constante) 130 s*		

*: Tiempo necesario para hacer que el sólido pase a través del embudo con golpeteo constante.

Como resultados de los estudios de fluidez se observaron comportamientos muy diferentes entre ambos lotes de base de enclomifeno.

Los productos que no fluían correspondían al sólido que cristaliza formando agregados policristalinos de agujas
5
afiladas (enclomifeno preparado en el ejemplo 19). Estas agujas cristalinas producen un mal flujo en comparación con el prisma mono cristalino más grande (enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática, tal como se prepara en el ejemplo 18) que fluye en breves periodos de tiempo.

Ejemplo 23: Estudio de densidad de hábitos cristalinos de enclomifeno (base)

10

La densidad se determinó mediante un método en las instalaciones midiendo el espacio llenado con una muestra de 500 mg en un tubo de ensayo antes y después de golpear el tubo (densidad aparente y del polvo asentado, respectivamente):

Número del lote	densidad aparente	densidad del polvo asentado	Espacio reducido (aparente con respecto a polvo asentado)
enclomifeno (ejemplo 18)	8 mm	8 mm	0 %
enclomifeno (ejemplo 19)	17 mm	13 mm	24 %

15

La Tabla resume la determinación de la densidad para los diferentes lotes de base de enclomifeno.

Para la densidad aparente se observaron diferentes comportamientos entre ambos lotes de base enclomifeno:

20

La base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática, preparada por cristalización en etanol (del ejemplo 18) presenta una densidad aparente más elevada que el enclomifeno que tiene un hábito cristalino no prismático (del ejemplo 19) (respectivamente 8 y 24 mm). Después de golpear el tubo, la densidad del polvo asentado es más elevada que la densidad aparente para la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino no prismático, mientras que permanece sin cambiar para la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática. Sin embargo, la densidad del polvo asentado de la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática sigue siendo más elevada que para la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino no prismático (respectivamente 8 mm y 13 mm).

25

La base de enclomifeno obtenida por cristalización a partir de etanol, es decir enclomifeno que tiene un hábito
30
cristalino con forma prismática, proporcionará mejor densidad aparente. Este no es el caso de la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin formar prismática (del ejemplo 19) en la que las agujas afiladas producen un peor empaquetamiento con un número de espacios vacíos más elevado, incluso si se permitía un golpeo para reducir este vacío.

35

Por lo tanto el hábito cristalino también desempeña un papel importante en la densidad del enclomifeno.

El índice de compresibilidad calculado a partir de las densidades aparente y del polvo asentado se puede usar para calcular las características de flujo del polvo. Siguiendo la regla que se describe en el artículo Chem Eng 1965; 72:163-168, se puede considerar que el carácter del flujo debería ser:

40

- Excelente para la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática,
- Pasable para la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma prismática (del ejemplo 19).

En conclusión, el enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática, es decir el enclomifeno formado
45
por cristales individuales grandes con forma de prisma, proporciona una fluidez, densidad aparente, densidad del polvo asentado e índice de compresibilidad excelente, mucho mejores en comparación con el enclomifeno que tiene agregados policristalinos de agujas cortas, es decir el enclomifeno que tiene hábito cristalino sin forma prismática tal como se prepara en el ejemplo 19.

50

Por lo tanto, la forma sólida que es enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática permite ganar espacio en el almacén y en los contenedores para su transporte. Además, esta forma proporciona ventajas evidentes en el procedimiento para preparar el citrato de enclomifeno (por ejemplo, carga en los reactores) o para preparar composiciones farmacéuticas de enclomifeno debido a su aumento de fluidez.

55

Por último, también se ha encontrado que la solubilidad de la base de enclomifeno es mucho más elevada que la Del citrato de enclomifeno en una solución tamponada a pH 4,5 de ácido acético/acetato sódico, debido a la formación de la sal de acetato de enclomifeno en solución.

Ejemplo 24: Estudio de higroscopia de hábitos cristalinos de citrato de enclomifeno

- La higroscopia de los diferentes lotes de citrato de enclomifeno se determinó por DVS (Absorción de Vapor Dinámica) con un instrumento Q5000 TA. Se trata de una técnica asimétrica que mide cuánta agua se absorbe o se desorbe por una muestra a una humedad relativa diferente (HR). A cada HR, se debe permitir que la masa de la muestra alcance el equilibrio gravimétrico (o sobrepase el límite de tiempo) antes de avanzar al siguiente nivel de humedad. Las isothermas de absorción y desorción se realizarán a 25 °C en un intervalo de HR de un 0 - 95 %. El tipo de isoterma de absorción se determina mediante el tamaño de poro y el carácter de superficial del material.
- 10 El análisis de DVS se realizó con 12,2509 mg de citrato de enclomifeno del lote 722 y con 13,5772 mg de citrato de enclomifeno del lote 723 con las siguientes condiciones:
- Equilibrio gravimétrico a 25 °C - HR de un 0 %
 - Aumento al siguiente nivel de % de HR cuando la variación gravimétrica es inferior a un 0,01 % después de
- 15 20 min o cuando el tiempo de equilibrio sobrepasa el límite de tiempo de 300 min.

Lote 722 - citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja.

- El análisis de DVS del lote 722 indica una absorción de humedad significativa a una HR entre un 0 % y un 65 % (+ 2 % en peso). A continuación la absorción de agua aumenta de forma más radical para alcanzar un 6 % En eso a una HR de un 95 %. Los perfiles de adsorción y desorción están esencialmente superpuestos lo que indica que la "absorción" de humedad a humedades más elevadas se debería adsorber sobre la superficie del material y no afecta a su superficie interna.

- 25 La absorción tiene una forma sigmoidea característica de isothermas de Tipo II. La cantidad de vapor adsorbido aumenta rápidamente a presiones relativas más bajas, mostrando un perfil cóncavo con respecto al eje x. A presiones relativas mas elevadas, la curva asume una forma convexa con respecto al eje x. El punto de curvatura de la curva normalmente se considera como la finalización de la capa monomolecular y el comienzo de la formación de las capas multimoleculares de adsorbato sobre la superficie.

- 30 Lote 723 - citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja.
El análisis de DVS del lote 723 indica una absorción de humedad significativa a una HR entre un 0 % y un 95 % (+ 2,33 % en peso). Los perfiles de adsorción y desorción están superpuestos lo que indica que la "absorción" de humedad a humedades más elevadas se debería adsorber sobre la superficie del material y no afecta a su superficie
- 35 interna.

Al igual que para el lote 722 de citrato de enclomifeno, la absorción tiene una forma sigmoidea característica de isothermas de Tipo II.

- 40 Comparación de los lotes 722 y 723.

- La higroscopia de los lotes 722 y 723 de citrato de enclomifeno es idéntica a una HR entre un 0 % y un 65 %. A continuación la higroscopia aumenta fuertemente en el caso del lote 722, es decir para el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja, hasta un 6 % con una HR de un 95 %, mientras que aumenta de forma
- 45 moderada en el caso del lote 723, es decir para el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja que consigue un 2,3 % con una HR de un 95 % (Véase la fig. 18).

- Por lo tanto, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, muestra un comportamiento de higroscopia mucho mejor en comparación con el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de
- 50 aguja, especialmente a una humedad relativa superior a un 65 %.

Ejemplo 25: Análisis de morfología

- Las siguientes fotografías se realizaron usando un Microscopio Óptico AXIOSCOPE de Zeiss, equipado con lentes
- 55 con un aumento de 4x, 10x, 50x y placa de tono de polarización:

- Fig. 7-BIS: citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma de aguja.
 - Fig. 8-BIS: citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja.
 - Fig. 11-BIS: base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática.
- 60 - Fig. 12-BIS: base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma prismática.

Ejemplo 26: Estudio de estabilidad de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino con forma prismática

- El análisis de microscopia de la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática expuesta a
- 65 tres condiciones de estabilidad durante 30 días indicaba el mismo prisma transparente incoloro que el producto de

partida. Véase la Fig. 19. Por lo tanto el hábito cristalino del enclomifeno que tiene cristales con forma prismática permanece estable al menos un mes en las tres condiciones de estabilidad.

Ejemplo 27: Estudio de distribución del tamaño de partícula (PSD) de enclomifeno (base) que tiene un hábito cristalino con forma prismática

Se analizó el tamaño de partícula de muestras de los lotes 724 y 725 de base de enclomifeno. Estas dos muestras de base de enclomifeno presentan morfología es muy diferentes:

10 El lote 724 es enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática que está formado por prismas cristalinos que no se agregan.

El lote 725 es enclomifeno que tiene un hábito cristalino sin forma prismática que está formado por agregados policristalinos blandos cuyos fragmentos son agujas cortas.

15 Para determinar la distribución del tamaño de la población se pueden usar diferentes técnicas (análisis de imágenes por microscopía, tamizado, sedimentación, ...). Sin embargo el analizador de tamaño de partícula mediante difracción por láser usando dispersión de luz es uno de las usadas más ampliamente. Merece la pena observar que cada técnica es posible para generar un diámetro medio diferente así como para medir diferentes propiedades de la partícula. Por lo tanto es muy importante indicar la técnica usada cuando se proporciona resultado de tamaño medio. 20 El análisis de tamaño de partícula con analizador de difracción láser se puede realizar en dispersión húmeda o seca. Sin embargo la dispersión húmeda se seleccionó porque:

- permite usar solamente una pequeña cantidad de muestra,
- 25 - se recomienda para partículas frágiles tales como cristales orgánicos.

1.1 Método experimental

La distribución del tamaño de partícula se analizó en un aparato LS13320 de Beckman Coulter equipado con un 30 Módulo Líquido Universal. Las partículas tienen que ser insoluble en el líquido usado para la dispersión húmeda Para evitar la disolución durante la medición. Por lo tanto como dispersante líquido se seleccionó el agua porque en el último estudio se observó que la base de enclomifeno es altamente insoluble en agua.

40 40 mg de la muestra se agitaron en 25 ml de agua y 3 gotas de Triton X100 (para mejorar la capacidad de humectación de los cristales y para evitar la aglomeración durante el análisis). Si fuera necesario, se usaba la 35 irradiación con ultrasonidos (baño de 30 kHz y 200 W) durante un breve periodo de tiempo para dispersar cualquier aglomerado o agregado.

1.2 Análisis de lote 724

40 En el caso del lote 724, una dispersión satisfactoria se observó en tensioactivo que contenía agua (Triton X100) y la sonicación no fue necesaria.

45 La distribución del tamaño de partícula del lote 724, es decir enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática muestra una distribución gaussiana con el valor medio a 374,3 µm y la mediana a 306,54 µm (véase la fig. 20 y la siguiente tabla a continuación). En este caso los inventores observan una distribución de partículas con un tamaño relativamente grande (80 - 770 µm) que coincide con las observaciones al microscopio.

PSD	Muestra 724
Media	374,3 µm
Mediana (D50)	306,4 µm
Modo	356,1 µm
D10	81,89 µm
D90	770 µm
Valores de PSD del lote 724	

50 1.3 Análisis del lote 725

En el caso del lote 725, es decir enclomifeno que tienen un hábito cristalino sin forma prismática, se observaron agregados después de la dispersión de la muestra en agua en presencia de tensioactivos. Otros disolventes se

sometieron a ensayo para mejorar la dispersión sin éxito debido a que se observó disolución de las partículas.

Por lo tanto se realizaron dos análisis, el primero sin sonicación y el segundo con una breve sonicación para romper los agregados. Sin embargo la sonicación también pudo romper los cristales, de modo que las mediciones después de sonicación pudieron proporcionar valores menores de tamaño de partícula.

Sin sonicación:

La distribución del tamaño de partícula sigue una distribución bimodal (con un máximo a aproximadamente 30 μm y una curva a aproximadamente 100 μm), con valores diferentes para la media (36,79 μm) y la mediana (24,96 μm) (véase la Fig. 21 y la tabla que sigue a continuación). Sin embargo como durante el análisis se observaron agregados, el tamaño de partícula medido es mayor que el tamaño de partícula real.

PSD	Muestra 725 (sin sonicación)
Media	36,79 μm
Mediana (D50)	24,96 μm
Modo	26,14 μm
D10	5,819 μm
D90	90,47 μm
Valores de PSD del lote 725 sin sonicación	

15 Con sonicación:

Para romper los agregados observados en este primer análisis, se realizó una breve sonicación (10 s). En este caso, también se obtuvo una distribución bimodal que el tamaño de partícula disminuyó de forma radical: los valores de la media y la mediana después de sonicación son inferiores a 1 μm , 0,715 μm y 0,284 μm respectivamente (véase la fig. 22 y la tabla que sigue a continuación). Sin embargo parece que un análisis de microscopía del sólido en suspensión indica que la sonicación rompe los cristales en cristales más pequeños. Por lo tanto el tamaño de partícula obtenido a partir de este análisis tampoco es real.

PSD	Muestra 725 (10 s de sonicación)
Media	0,715 μm
Mediana (D50)	0,284 μm
Modo	1,748 μm
D10	0,100 μm
D90	1,942 μm
Valores de PSD del lote 725 con sonicación.	

25 Por lo tanto de acuerdo con dichos resultados en términos de PSD, un procedimiento para preparar base de enclomifeno micronizada comprende el tratamiento de base de enclomifeno con sonicación. La base de enclomifeno micronizada preparada de este modo muestra un PSD tal como se describe en la tabla mencionada anteriormente y en la Fig. 22.

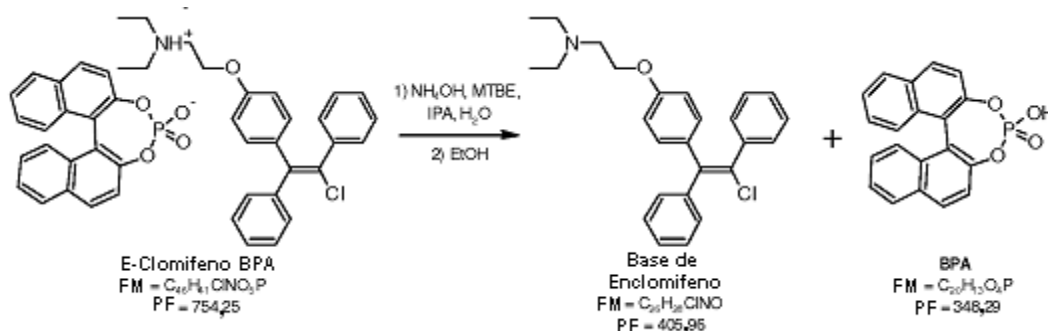
30 En particular, el enclomifeno micronizado muestra un valor medio de la distribución del tamaño de partícula (PSD) comprendido en el intervalo de 0,2 μm a 1,5 μm , preferentemente entre 0,5 y 1,0 μm .

En particular, el enclomifeno micronizado muestra valores de mediana (D50) de la distribución del tamaño de partícula (PSD) comprendidos en el intervalo de 0,1 μm a 0,5 μm , preferentemente entre 0,2 y 0,4 μm .

35

Ejemplo 28: Preparación de enclomifeno que tiene hábito cristalino con forma prismática

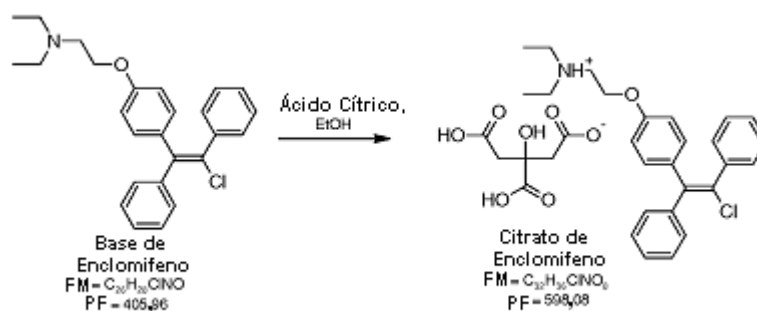
Esquema de síntesis:



- Un matraz de fondo redondo, equipado con termómetro, condensador de reflujo, impulsor y embudo de goteo se cargó con nitrógeno y se cargó con: 10 g (1 equiv.) de sal de enclomifeno-BPA [perfil de HPLC el material de partida
- 5 de sal de enclomifeno-BPA: enclomifeno al 99,39 % de A/A, Cis-clomifeno al 0,14 %, % de A/A; otras impurezas al 0,47 %, % de A/A], 50 ml (5 V) de Metil Terc-butil éter (MTBE); 5 ml (0,5 V) de Isopropanol; 50 ml (5 V) de Agua Purificada. La suspensión se agitó y a continuación se añadieron 12 ml (1,2 V) de solución de amoniaco al 30 % en p/p. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos. En esta etapa el pH es > 10. (Si no lo fuera, el pH se podría corregir con goteo de solución de Amoniaco al 30 % en p/p). La fase orgánica se separó y se lavó con una solución
- 10 de 3 ml (0,3 V) de solución de amoniaco al 30 % en p/p y 15 ml de agua purificada. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos, a continuación la fase orgánica se recogió y se evaporó al vacío, con un rotavapor funcionando a T_{máx} = 50 °C. El producto en bruto se disolvió con 10 ml (1V) de tolueno y a continuación se evaporó al vacío, con un rotavapor funcionando a T_{máx} = 50 °C. Posteriormente, el producto en bruto se volvió a disolver con 25 ml (2,5V) de etanol absoluto y la mezcla se calentó hasta 50 °C para disolver mejor el producto en bruto. Por último, la mezcla
- 15 se enfrió lentamente hasta 0 °C y se permitió su agitación durante 2 h. La suspensión se filtró por filtración por succión y la torta se lavó con 5 ml (0,5V) de etanol absoluto frío. El producto obtenido de este modo se secó al vacío a 50 °C durante 8 h. Este procedimiento proporcionó 3,90 g (rendimiento de un 72,4 %) de base de enclomifeno en forma de un sólido cristalino prismáticos de color blanco, es decir enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática.
- 20 Perfil de HPLC de base de enclomifeno producida: enclomifeno al 99,83 % (% de A/A, Cis-clomifeno al 0,03 %, % de A/A, otras impurezas 0,14 %, % de A/A.

Ejemplo 29: Preparación de citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, mediante La base de enclomifeno intermedia que tiene un hábito cristalino con forma prismática

25



- Un matraz de fondo redondo, equipado con termómetro, condensador de reflujo, impulsor y embudo de goteo se cargó con nitrógeno y se cargó con: 2,0 g (1 equiv.) de base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma
- 30 prismática (preparado en el ejemplo 28) y 2,0 ml de etanol absoluto. La mezcla se calentó hasta 50 °C para disolver el producto en bruto, y a continuación una solución formada por 1,04 g (1,1 equiv.) de ácido cítrico anhidro en 8,0 ml (8V) de etanol absoluto se añadió lentamente y a la misma temperatura. La mezcla se enfrió lentamente hasta 0 °C, y se permitió su agitación durante 2 h. La suspensión se filtró por filtración por succión y la torta se lavó con 2 ml (1V) de etanol absoluto frío. El producto obtenido de este modo se secó al vacío a 50 °C durante 8 h. Este
- 35 procedimiento proporcionó 2,80 g (rendimiento de un 95,0 %) de citrato de enclomifeno en forma de agujas finas de color blanco, es decir citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja.

La Fig. 25, en particular las fotografías identificadas desde la Fig. 25-A a la Fig. 25-D muestran claramente el hábito cristalino en forma de aguja de este citrato de enclomifeno.

40

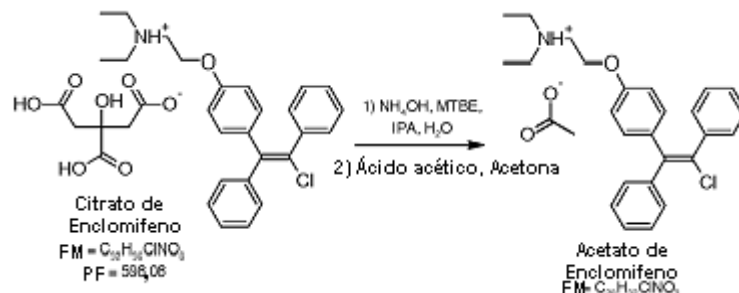
Perfil de HPLC de citrato de enclomifeno: enclomifeno al 99,92 % de A/A; Cis-clomifeno al 0,03 %, % de A/A, otras

impurezas al 0,04 %, % de A/A.

Se puede observar cómo, pasando a través de la preparación de base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática, es posible preparar citrato de enclomifeno con una pureza química muy elevada (con el experimento 28 más el experimento 29). De hecho, como se muestra en el experimento 28, el aislamiento de la base de enclomifeno que tiene un hábito cristalino con forma prismática permite una reducción notable de la cantidad de las impurezas, en particular impurezas de cis-enclomifeno, que en su lugar no se retiran o disminuyen en la preparación posterior de citrato de enclomifeno, en particular, el citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja.

10

Ejemplo 30 (Referencia): Preparación de acetato de enclomifeno



15 Un matraz de fondo redondo, equipado con termómetro, condensador de reflujo, impulsor y embudo de goteo se cargó con nitrógeno y se cargó con: 9 g (1 equiv.) de citrato de enclomifeno, 45 ml (5 V) de metil terc-butil éter (MTBE); 4,5 ml (0,5 V) de Isopropanol; 45 ml (5 V) de agua purificada. La suspensión se agitó y a continuación se añadieron 11 ml (1,2 V) de solución de amoniaco al 30 % en p/p. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos. En esta etapa el pH es > 10. (Si no lo fuera, el pH se podría corregir con goteo de solución de Amoniaco al 30 % en p/p). La fase orgánica se separó y se lavó con una solución de 2,7 ml (0,3 V) de solución de amoniaco al 30 % en p/p y 13,5 ml (1,5V) de agua purificada. La mezcla resultante se agitó durante 15 minutos, a continuación la fase orgánica se recogió y se evaporó al vacío, con un rotavapor funcionando a $T_{máx} = 50\text{ °C}$. El producto en bruto se disolvió con 9 ml (1V) de tolueno y a continuación se evaporó al vacío, con un rotavapor funcionando a $T_{máx} = 50\text{ °C}$. Posteriormente, el producto en bruto se volvió a disolver con 9 ml (1V) de acetona y la mezcla se calentó hasta 40 °C para disolver mejor el producto en bruto, por último se añadieron 3,44 ml (4 equiv.) de ácido acético. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas, a continuación los disolventes se evaporaron con un rotavapor funcionando a $T_{máx} = 60\text{ °C}$. Este procedimiento proporcionó 6,73 g (rendimiento de un 96 %) de Acetato de enclomifeno en forma de un aceite incoloro.

25 Perfil de HPLC de acetato de enclomifeno: enclomifeno: 99,83 % de A/A, Cis-clomifeno al 0,08 %, % de A/A; otras impurezas al 0,09 %, % de A/A.

30 RMN 1H (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 7,45\text{-}7,37$ (m, 2H), 7,36-7,29 (m, 5H), 7,28-7,21 (m, 3H), 6,86 (dt, J = 9,1; 3 Hz, 2H), 6,71 (dt, J = 9,1; 3 Hz, 2H), 3,95 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 2,79 (t, J = 5,8 Hz, 2H), 2,59 (c, J = 7,5 Hz, 4H), 1,92 (s, 3H), 0,97 (t, J = 7,5 Hz, 6H) (Véase la Fig. 23).

35 RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6): 172,6, 157,9, 142,2, 140,4, 139,3, 133,1, 131,7, 130,1, 129,7, 128,7, 128,69, 128,61, 127,9, 114,5, 66,1, 51,4, 47,3, 21,6, 11,8 (Véase la Fig. 24).

El aceite se secó adicionalmente al vacío a 50 °C durante una noche, a continuación se suspendió en heptano y se concentró varias veces. Para desencadenar la precipitación del acetato de enclomifeno, el aceite se rasco con una varilla de vidrio. Por último el producto se mantuvo en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente y se convirtió en un sólido (ligeramente céreo) después de dos días. Dicho sólido muestra un pico grande en el análisis de DSC con inicio a 60 °C y máximo a 68 °C (adquirido con el mismo método que se ha descrito anteriormente).

40

Ejemplo 31: Estudio de solubilidad del citrato de enclomifeno

45 La solubilidad del citrato de enclomifeno se realizó por duplicado a pH 4,5 tamponado. Para cada muestra de citrato de enclomifeno, los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tiempo	Citr. de Encl. 1	Citr. de Encl. 2	Promedio de Citr. de Encl.	DT de Citr. de Encl.
0 min	0	0	0	0
15 min	14226	13911	14069	223
45 min	13689	13852	13771	115

ES 2 671 126 T3

Tiempo	Citr. de Encl. 1	Citr. de Encl. 2	Promedio de Citr. de Encl.	DT de Citr. de Encl.
90 min	12557	14860	13708	1628
180 min	13058	13333	13196	195

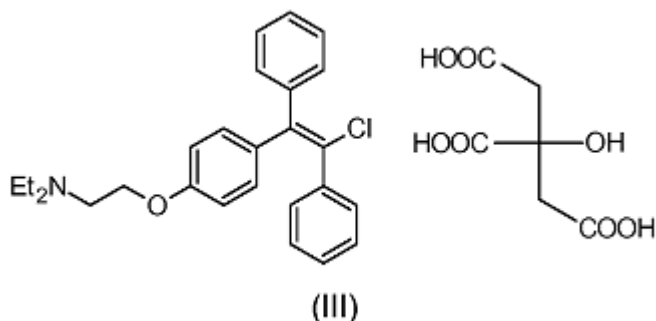
Los valores promedio del área de HPLC de los lotes de citrato de enclomifeno se representaron con respecto al tiempo:

5 Véase la fig. 28.

De acuerdo con la representación mencionada anteriormente, se puede observar que la solubilidad del citrato de enclomifeno es mucho más elevada que la solubilidad del citrato de enclomifeno en la solución tamponada a pH de 4,5, siempre y cuando sea la forma sólida de citrato de enclomifeno (área de HPLC respectivamente de 12000-10 14000 con respecto al área de HPLC de 1000-5000, solo).

REIVINDICACIONES

1. Citrato de enclomifeno de fórmula (III):



5

que tiene un hábito cristalino en forma de aguja, y que tiene

- un punto de fusión de 150 °C medido por DSC (inicio), o
- un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 5,8, 11,5.

2. Citrato de enclomifeno de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene un punto de fusión de 150 °C medido por DSC (inicio) y que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 5,8 (vs), 11,5 (vs); en los que (vs) = intensidad muy fuerte.

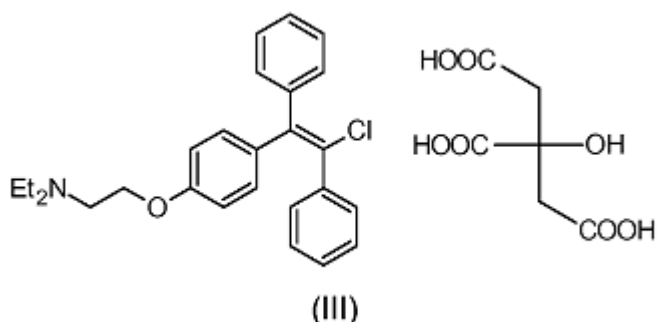
3. Citrato de enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 2, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 5,8 (vs), 11,5 (vs); en los que (vs) = intensidad muy fuerte.

20

4. Citrato de enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 5,8 (vs), 11,5 (vs), 12,7 (s), 14,9 (s) y 24,9 (s); en los que (vs) = intensidad muy fuerte; (s) = intensidad fuerte.

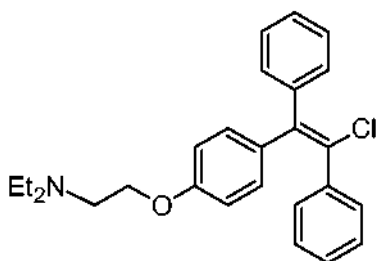
25 5. Citrato de enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 4, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 5,8 (vs), 9,7 (m), 10,9 (m), 11,5 (vs), 12,7 (s), 14,9 (s), 17,1 (m), 20,6 (m), 21,8 (m), 23,6 (m), 23,7 (m) y 24,9 (s); en los que (vs) = intensidad muy fuerte; (s) = intensidad fuerte, (m) = intensidad media.

30 6. Procedimiento para la preparación de citrato de enclomifeno de fórmula (III):



que tiene un hábito cristalino en forma de aguja de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, mediante la adición de ácido cítrico a una solución de enclomifeno de fórmula (I):

35



(I)

en un disolvente orgánico, en el que dicho disolvente orgánico consiste solamente en etanol.

5 7. Composiciones farmacéuticas que comprenden citrato de enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5 y uno o más excipientes farmacéuticos aceptables.

8. Composiciones farmacéuticas de acuerdo con la reivindicación 7 que son composiciones farmacéuticas de liberación rápida.

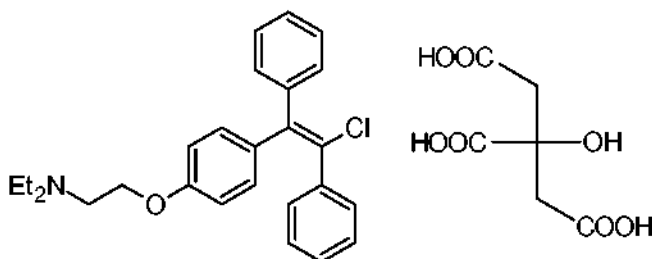
10

9. Citrato de enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5 o composiciones farmacéuticas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 7 a 8 para uso en medicina.

10. Citrato de enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5 o composiciones farmacéuticas de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 7 a 8 para uso en el tratamiento disfunción ovulatoria o síndrome del ovario poliquístico.

15

11. Procedimiento para la preparación de citrato de enclomifeno de fórmula (III):

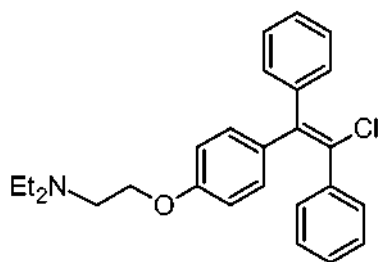


(III)

20

que tiene un hábito cristalino en forma de aguja de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5, que comprende las siguientes etapas:

25 a) preparación de enclomifeno de fórmula (I):



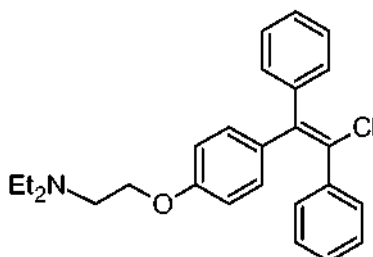
(I)

que tiene un hábito cristalino con forma prismática y/o que tiene un valor medio (D50) de la distribución del

tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm , mediante cristalización del enclomifeno de fórmula (I) a partir de etanol,
 b) conversión del enclomifeno de la etapa a) en citrato de enclomifeno que tiene un hábito cristalino en forma de aguja de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 6.

5

12. Enclomifeno de fórmula (I):



(I)

10 que tiene un hábito cristalino con forma prismática y/o que tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm , y que tiene

- un punto de fusión de 78 $^{\circ}\text{C}$ medido por DSC (inicio), o
- un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con un pico característico expresado en valores de 2-Theta (2θ) a 25,3 (vs); en el que (vs) = intensidad muy fuerte.

15

13. Enclomifeno de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el hábito cristalino con forma prismática corresponde a cristales que tienen la forma de prismas y/o prismas cortos y/o prismas largos y/o prismas oblicuos y/o prismas oblicuos cortos y/o prismas oblicuos largos.

20

14. Enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 13, en el que el valor medio de la distribución del tamaño de partícula está comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm .

15. Enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 14, que tiene un punto de fusión de 78 $^{\circ}\text{C}$ medido por DSC (inicio), y que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con un pico característico expresado en valores de 2-Theta (2θ) a 25,3 (vs); en el que (vs) = intensidad muy fuerte.

25

16. Enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 14, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 12,3, 17,5, 25,3, 25,4.

30

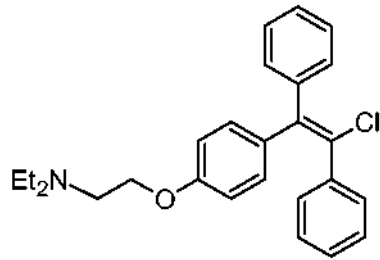
17. Enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 16, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 8,1 (s), 17,3 (vs), 25,2 (vs), 25,3 (vs); en los que (vs) = intensidad muy fuerte, (s) = intensidad fuerte.

35

18. Enclomifeno de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 17, que tiene un patrón de difracción de rayos X de polvo característico con picos característicos expresados en valores de 2-Theta (2θ) a: 12,3, 17,5 y 25,3.

40

19. Procedimiento para la preparación de enclomifeno de fórmula (I):

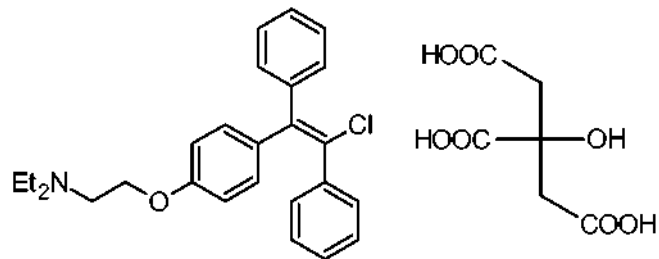


(I)

de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 18, mediante cristalización del enclomifeno a partir de etanol.

5

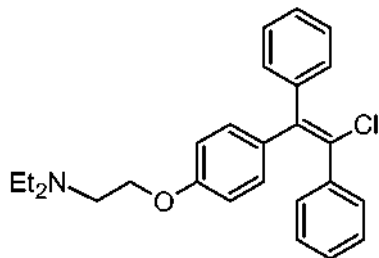
20. Procedimiento para la preparación de citrato de enclomifeno de fórmula (III):



(III)

10 que comprende las siguientes etapas:

a) preparación de enclomifeno de fórmula (I):



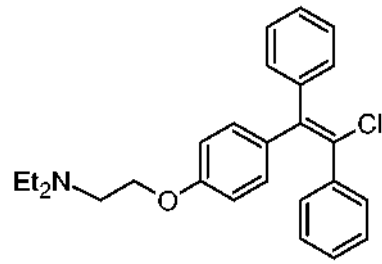
(I)

15

que tiene un hábito cristalino con forma prismática y/o que tiene un valor medio (D50) de la distribución del tamaño de partícula comprendido en el intervalo de 100 μm a 500 μm , de acuerdo con el procedimiento de la reivindicación 19.

20 b) conversión del enclomifeno de la etapa a) en citrato de enclomifeno mediante la adición de ácido cítrico o monohidrato de ácido cítrico a una solución de enclomifeno de fórmula (I) en un disolvente orgánico.

21. Uso de enclomifeno de fórmula (I):

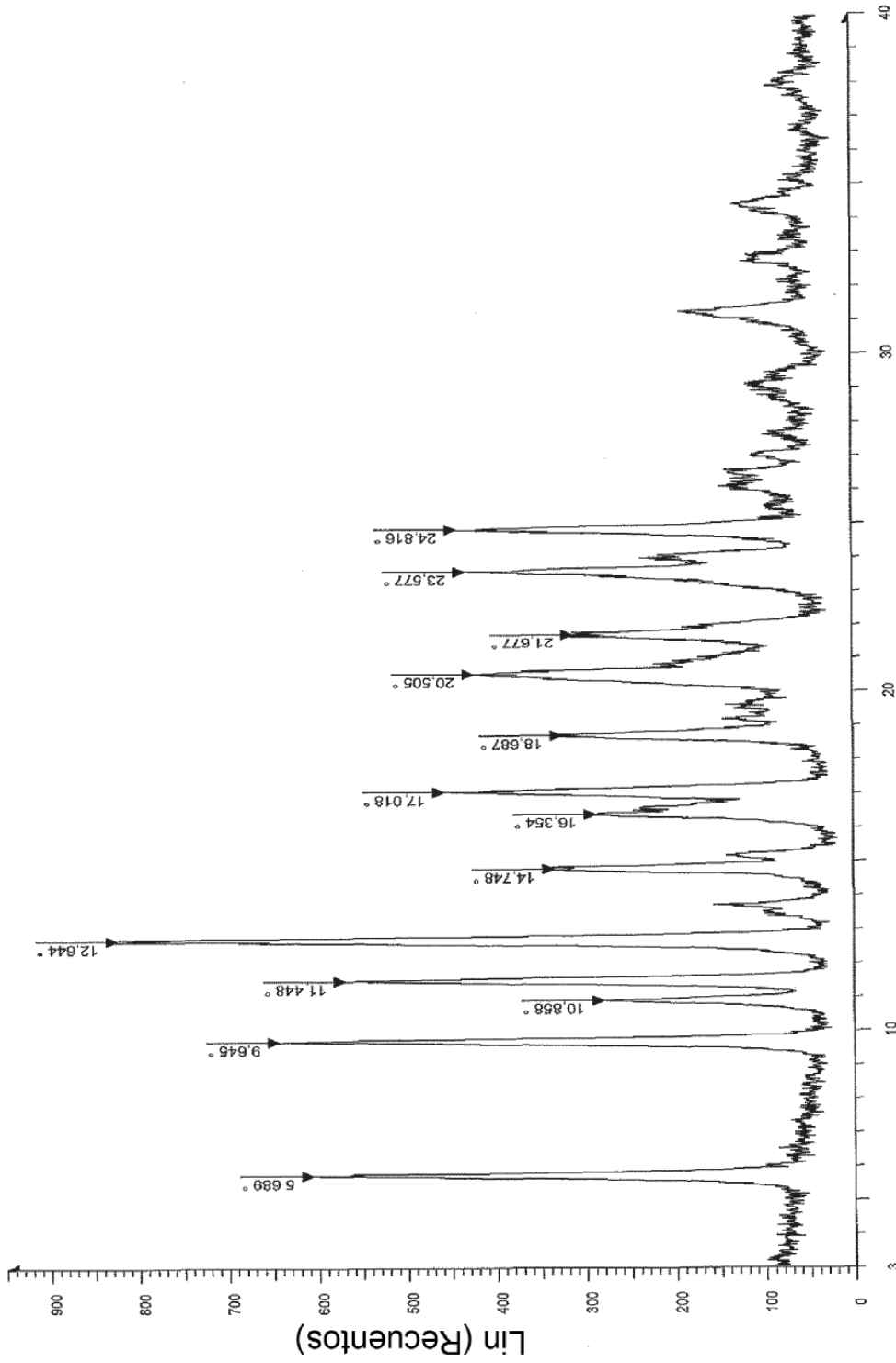


(I)

de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 18 para la preparación de citrato de enclomifeno.

Fig. 1

Página 1/1
Sin revision disponible
RD132 1114 0129



RD132 1114 0129 - Archivo: RD132 1114 0129 sin procesar - Etapa: 0.020° - Tiempo de etapa: 3 s - Áncdo: Cu - Generador kV: 40 kV - Generador mA: 40 mA - Creación: 7/4/2014 1:18:31 PM - Operador: ABaltislin

Fig. 2

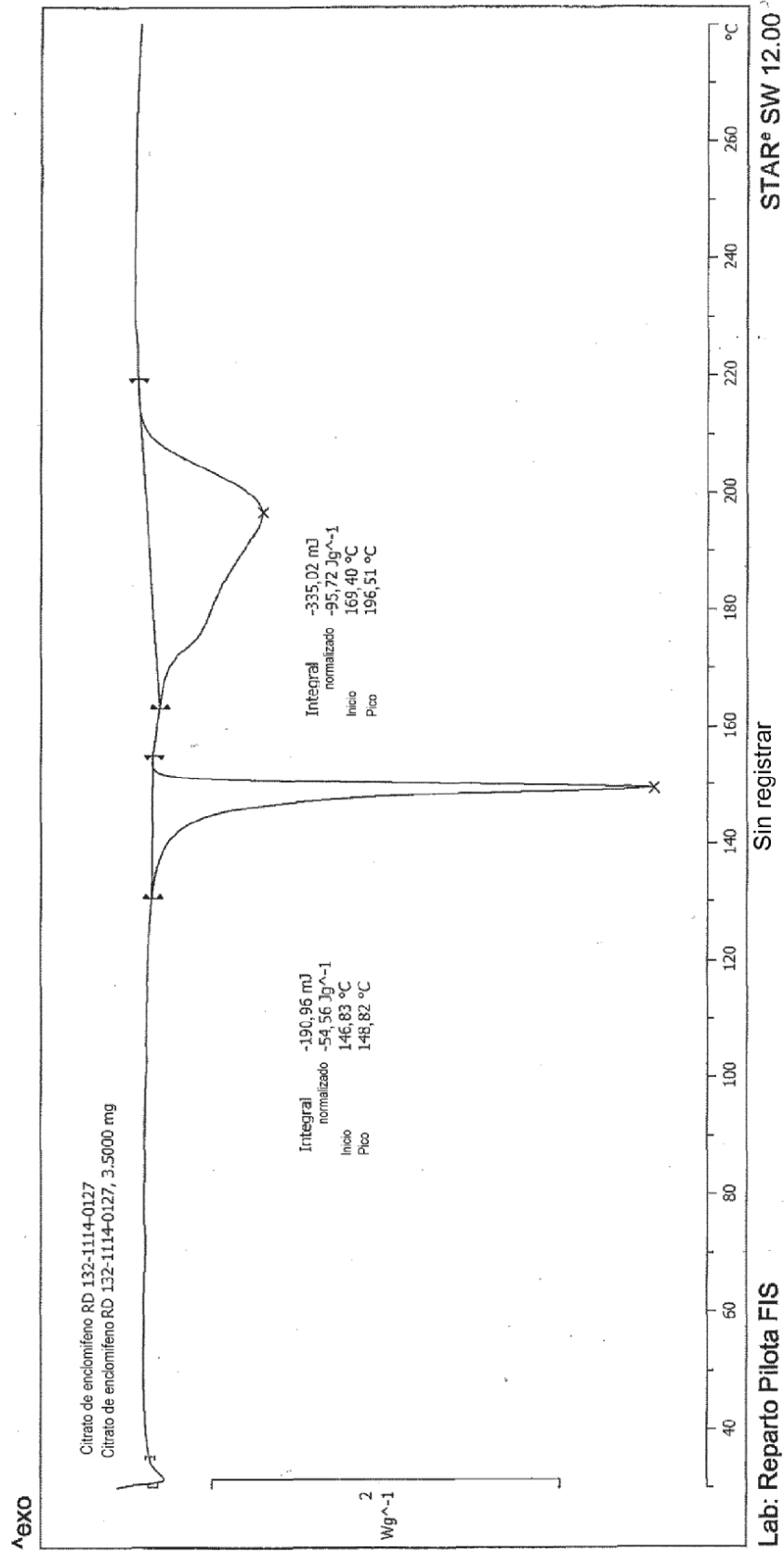


Fig.3

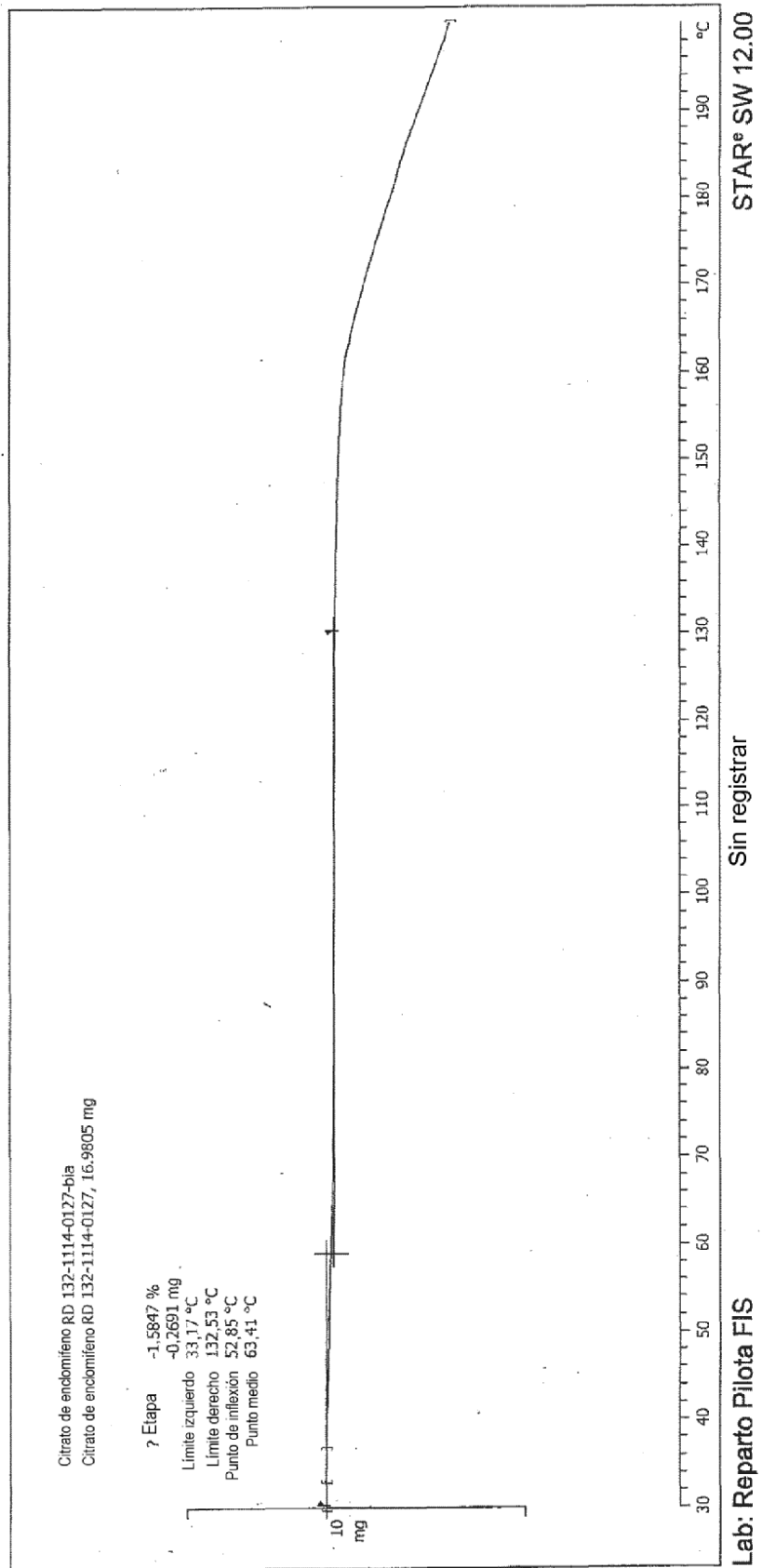
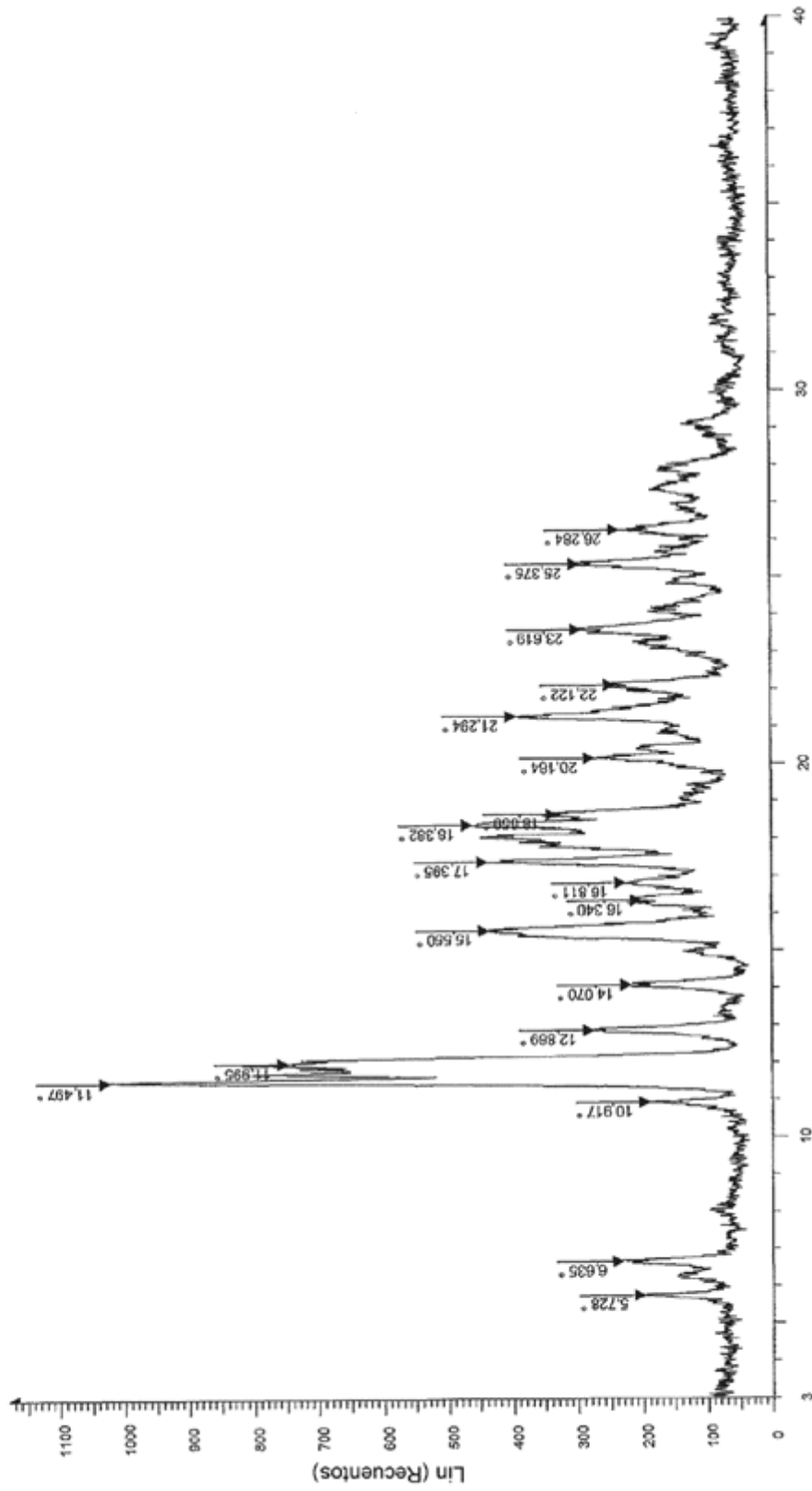


Fig. 4

Página 1/1
Sin revisión disponible
RD132 1114 0081



132 1114 0081 - Archivo: RD132 1114 0081.sin procesar - Etapa: 0.020° - Tiempo de etapa: 3.s - Anodo: Cu - Generador kV: 40KV - Generador mA: 40mA - Creación: 6/13/2014 11:43:07 AM - Operador: ABattistin

Fig. 5

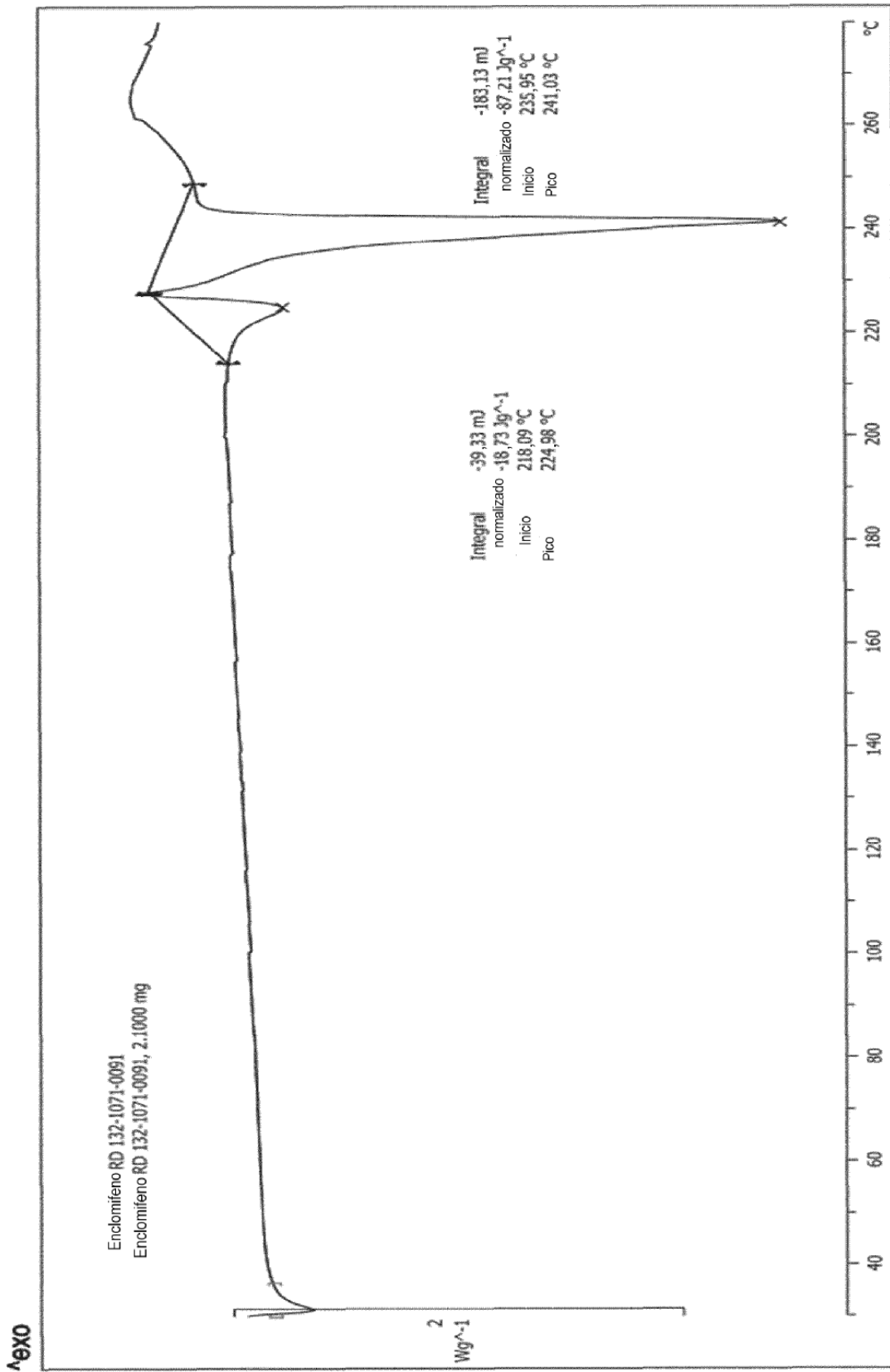


Fig. 6

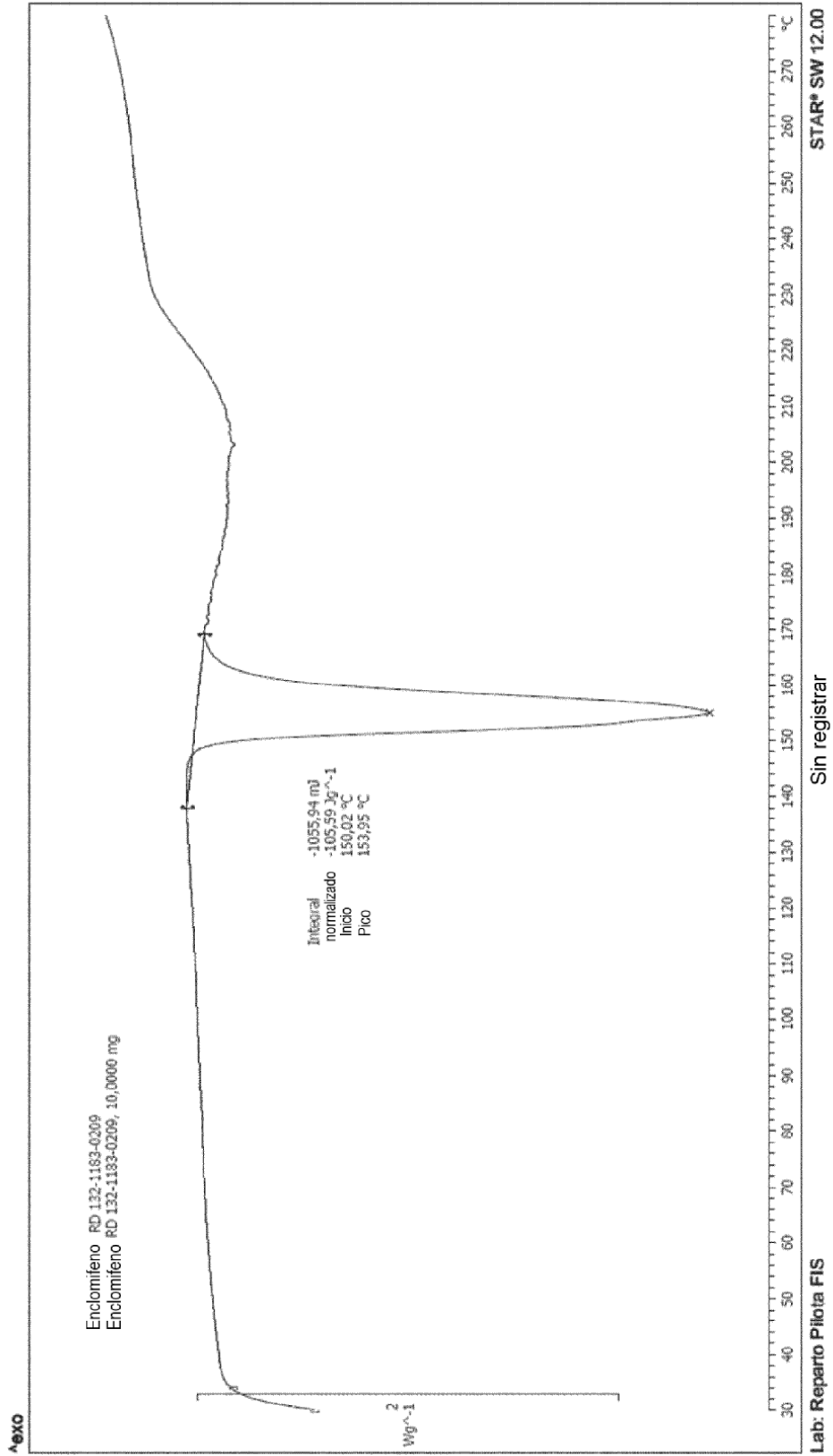


Fig. 7

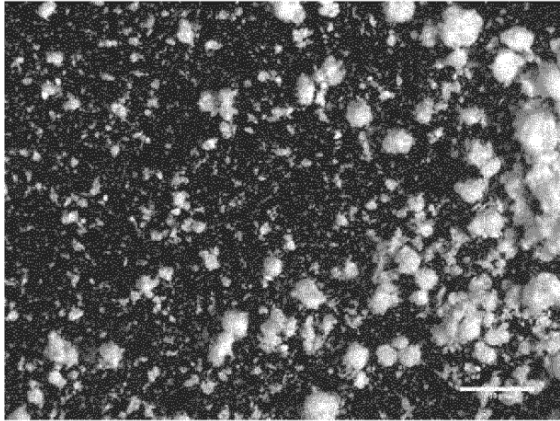


Fig. 8

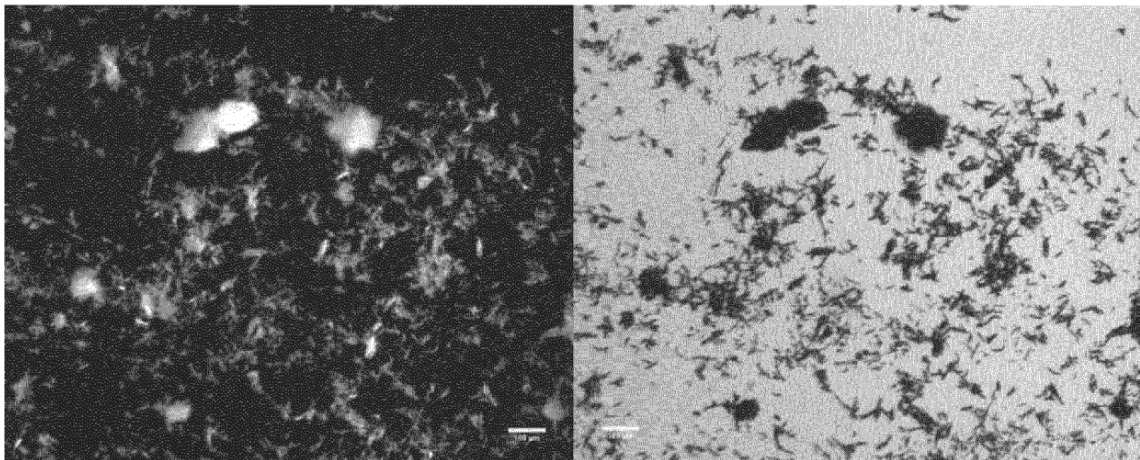


Fig. 7 – BIS

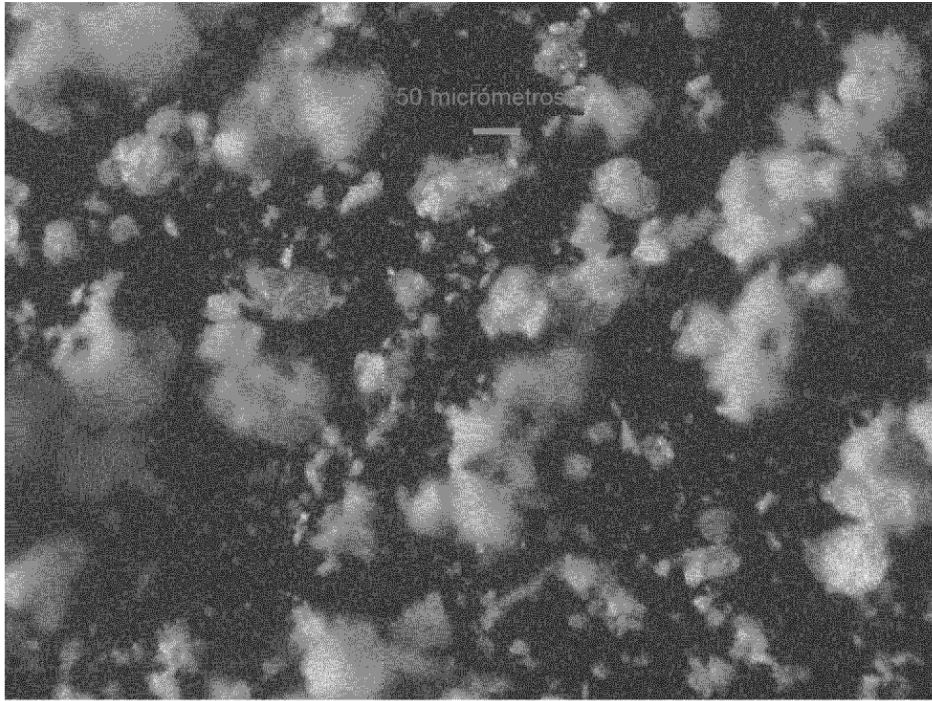


Fig. 8 – BIS

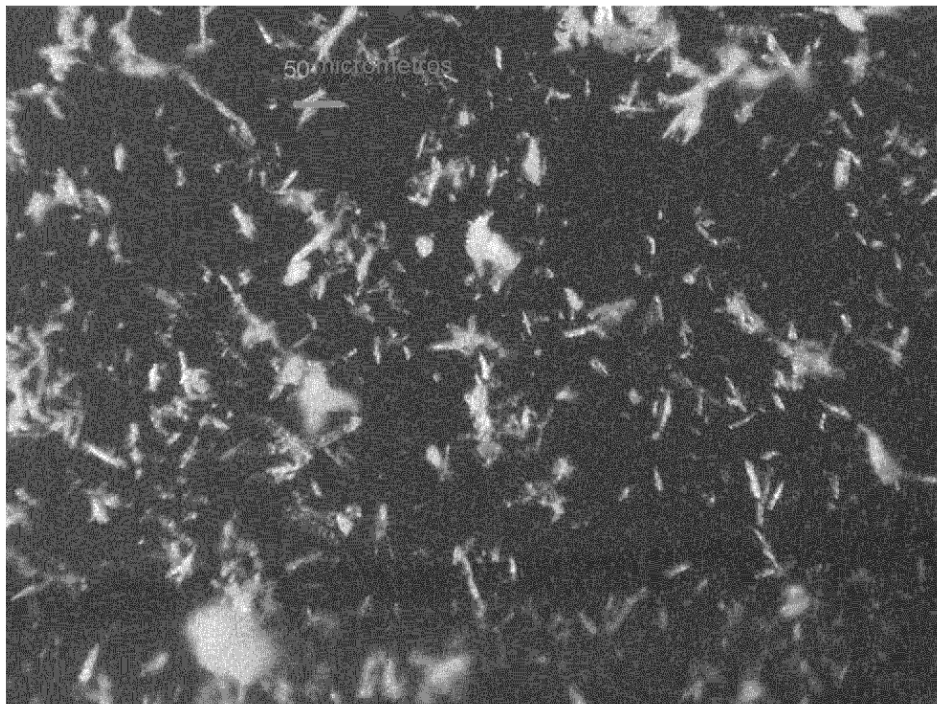


Fig. 9

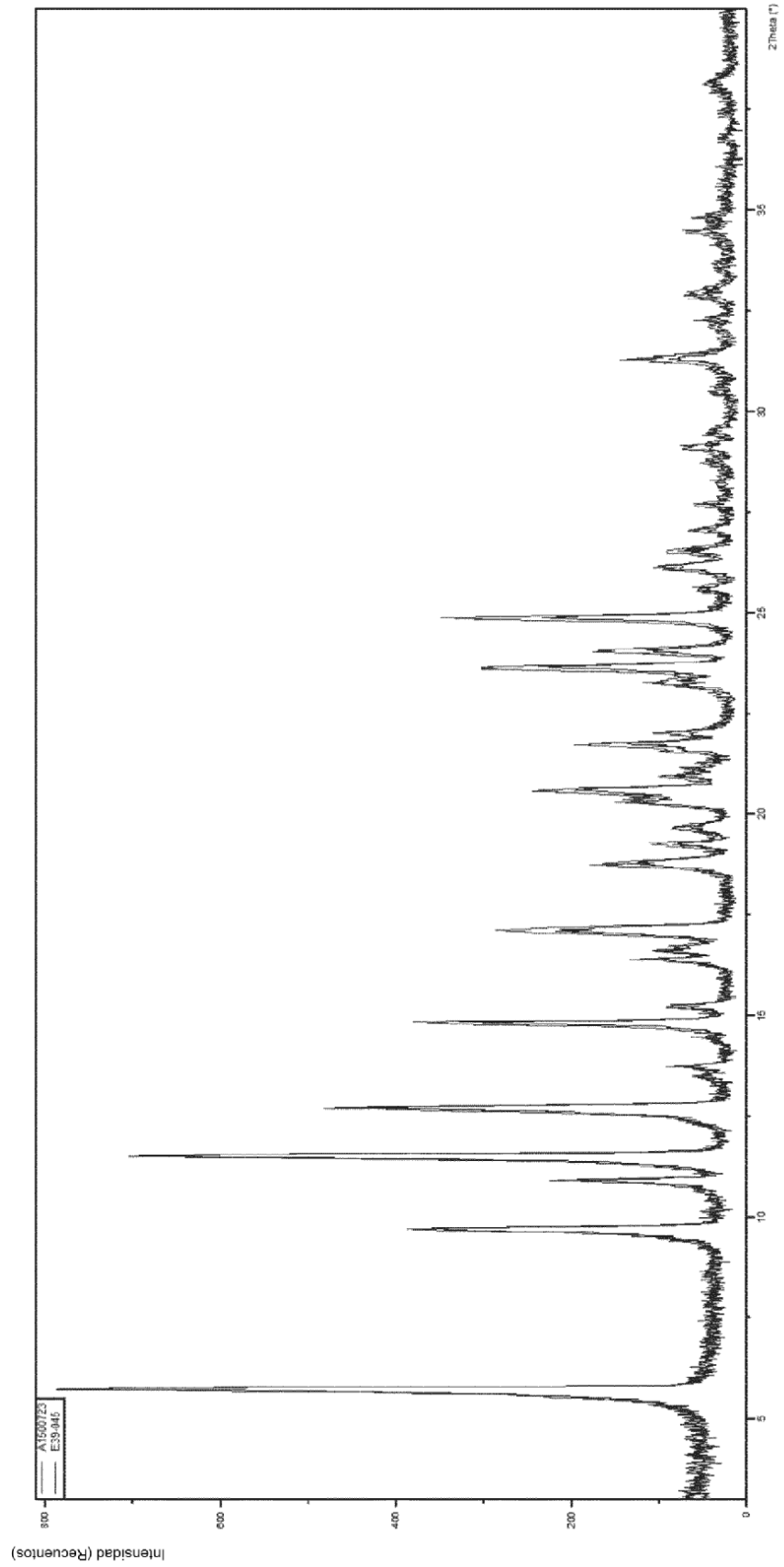


Fig. 10

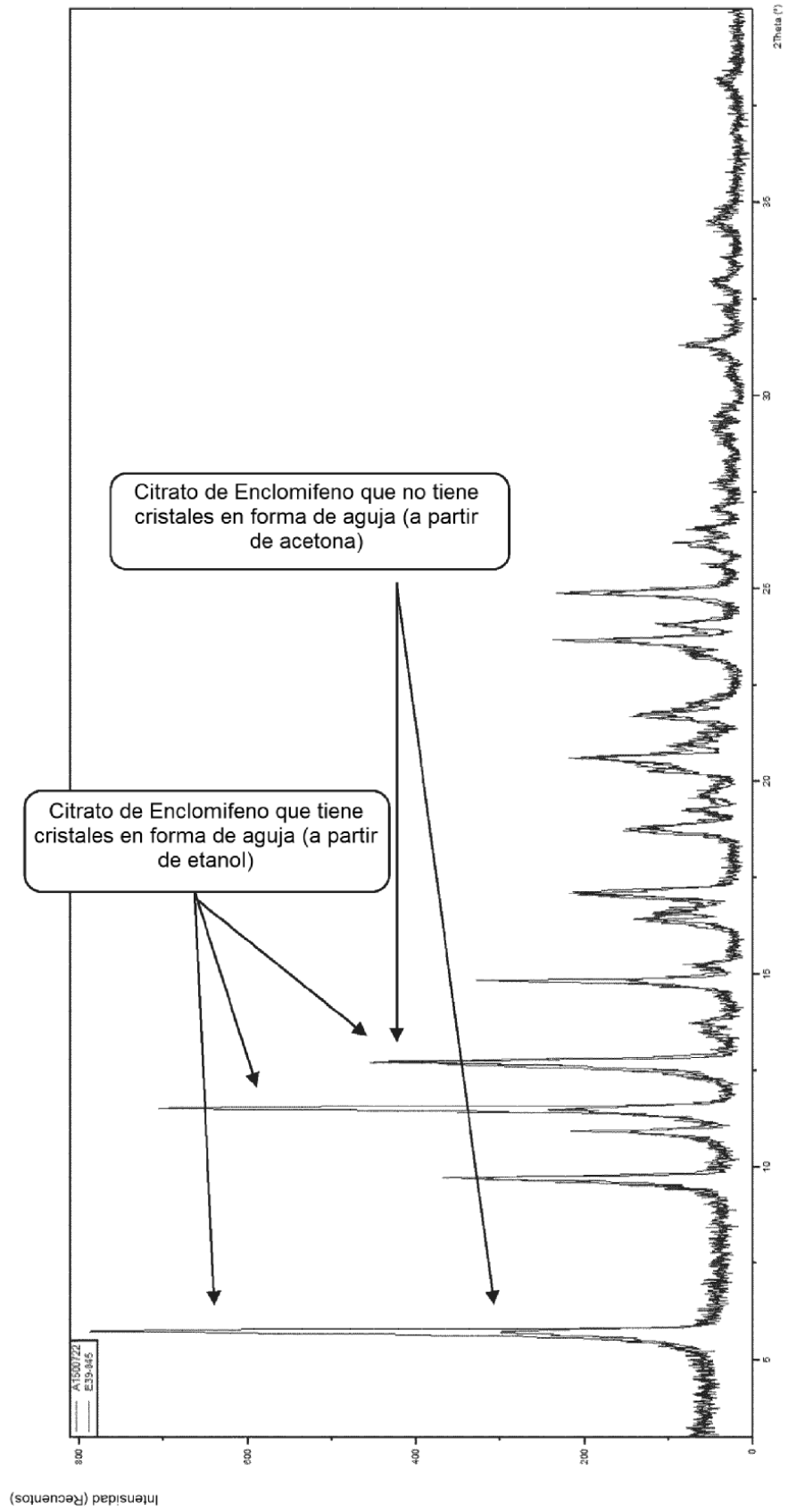


Fig. 11

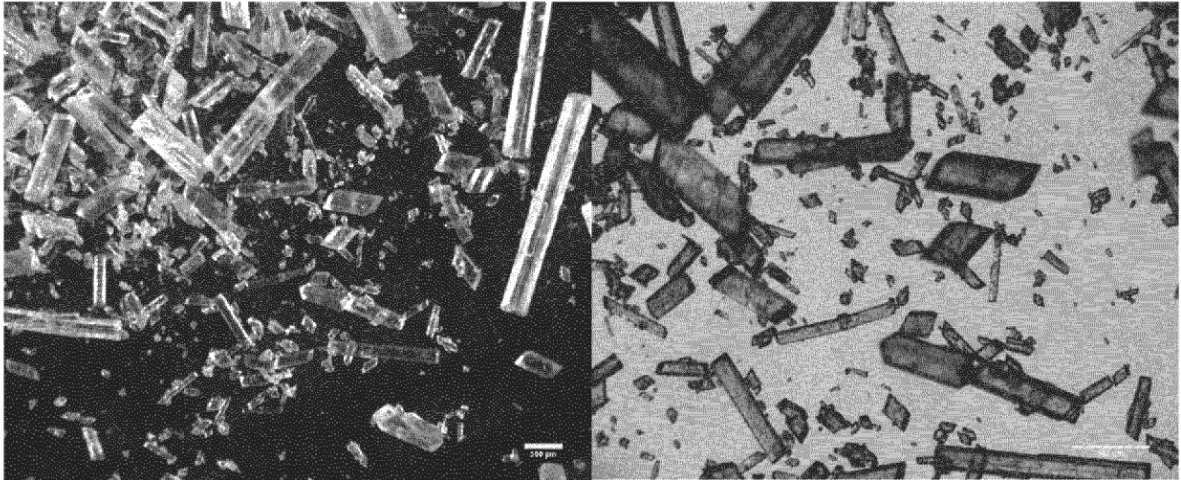


Fig. 12

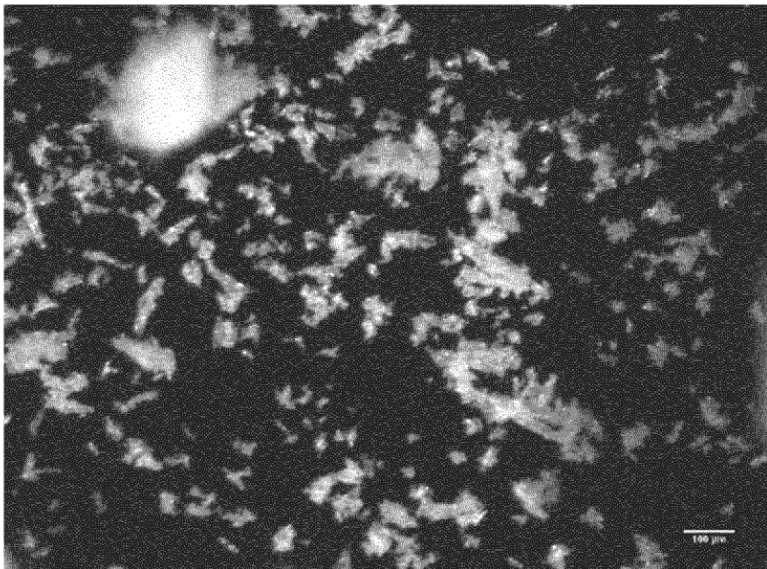


Fig. 11 - BIS

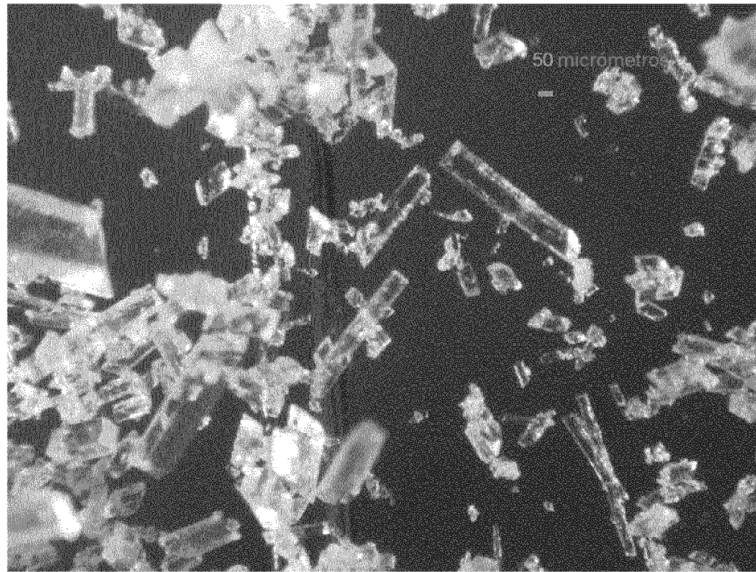


Fig. 12 - BIS

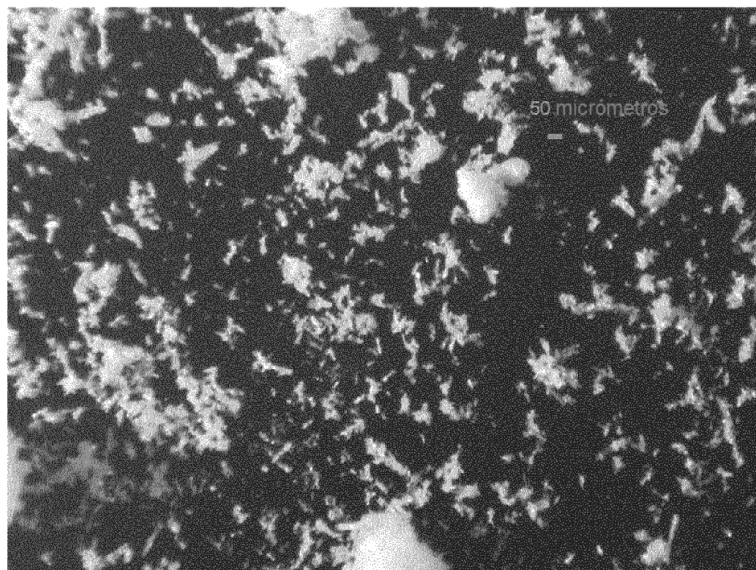


Fig. 13

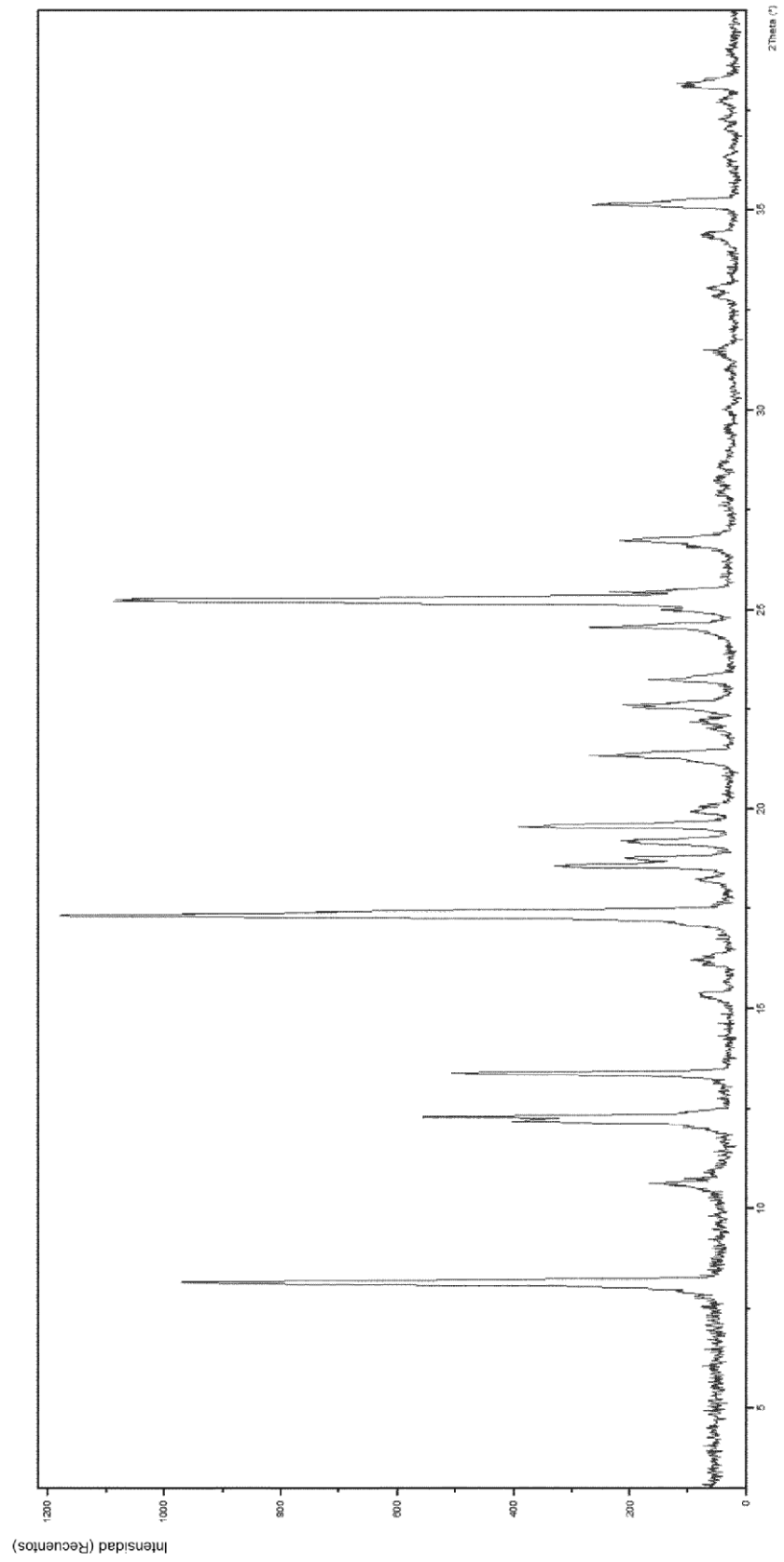


Fig. 14

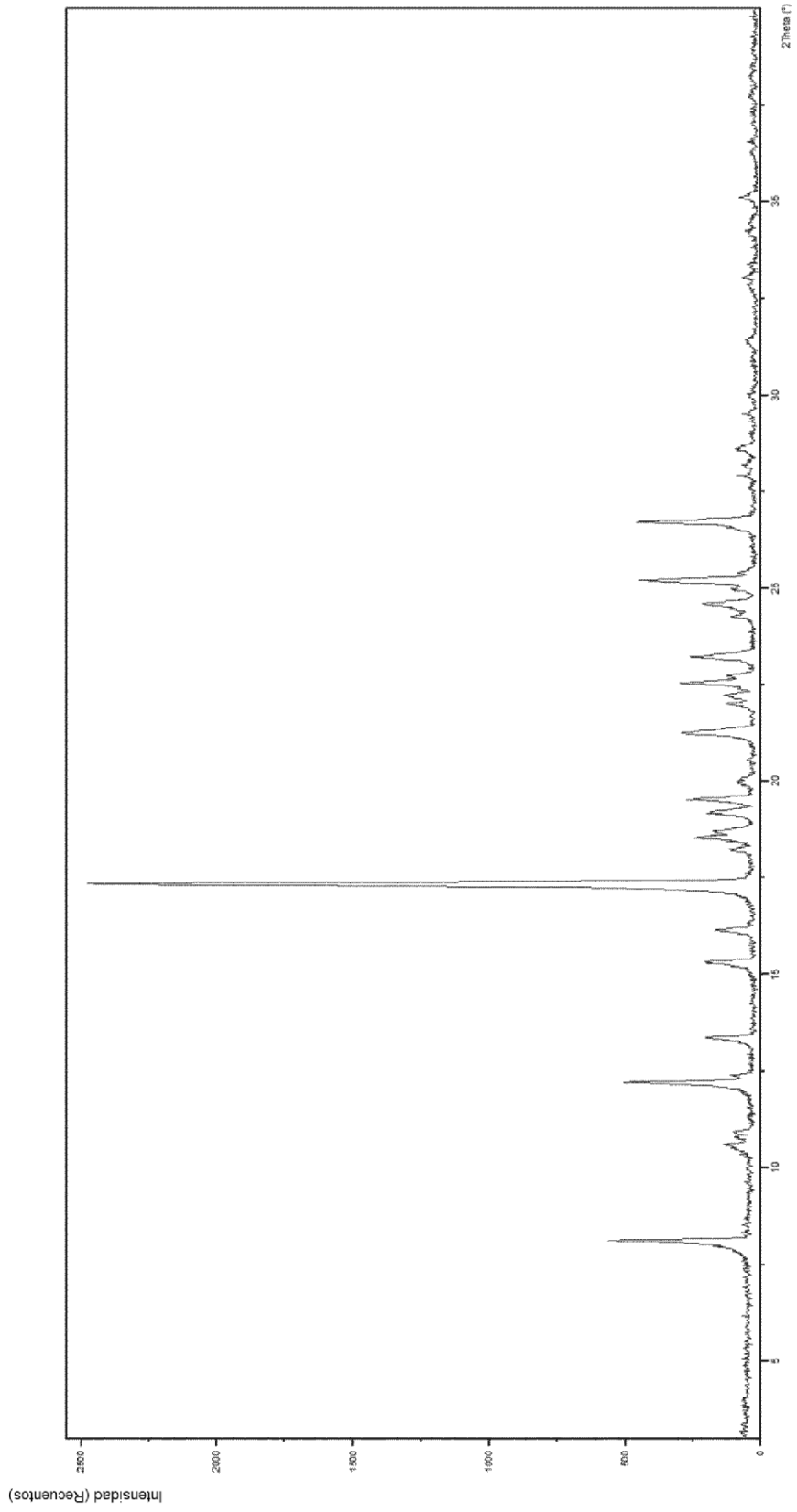


Fig. 15

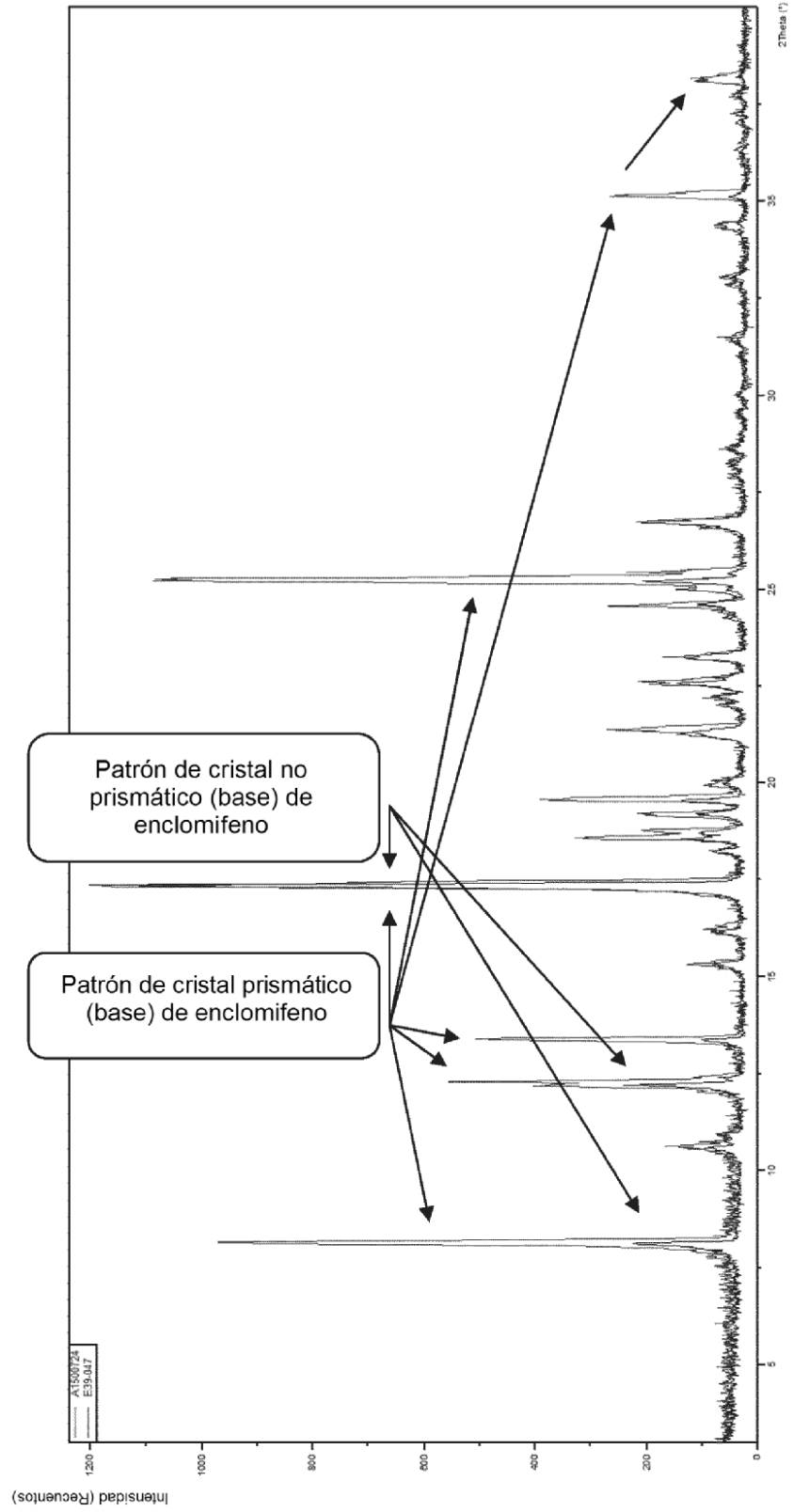


Fig. 16

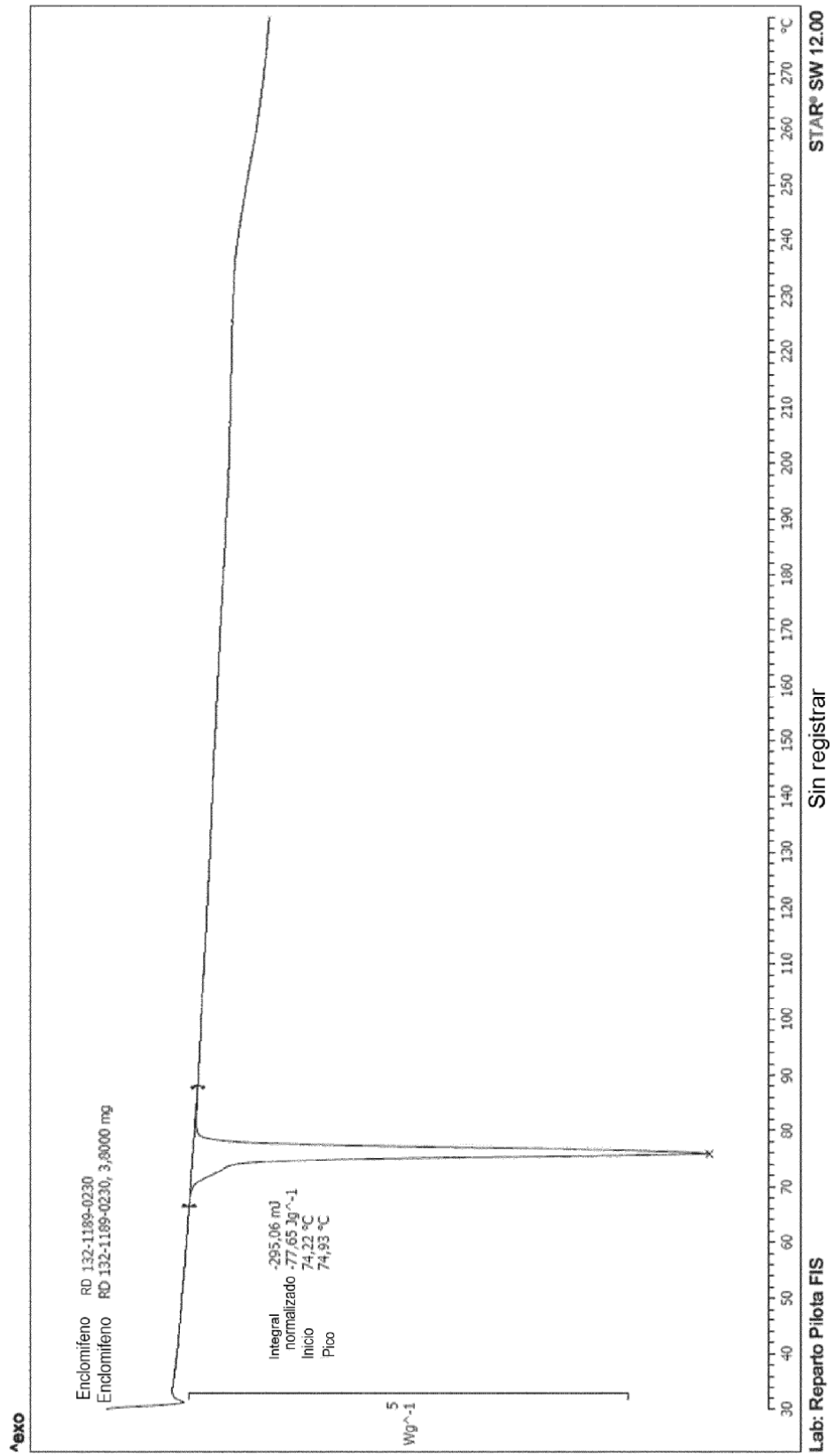


Fig. 17

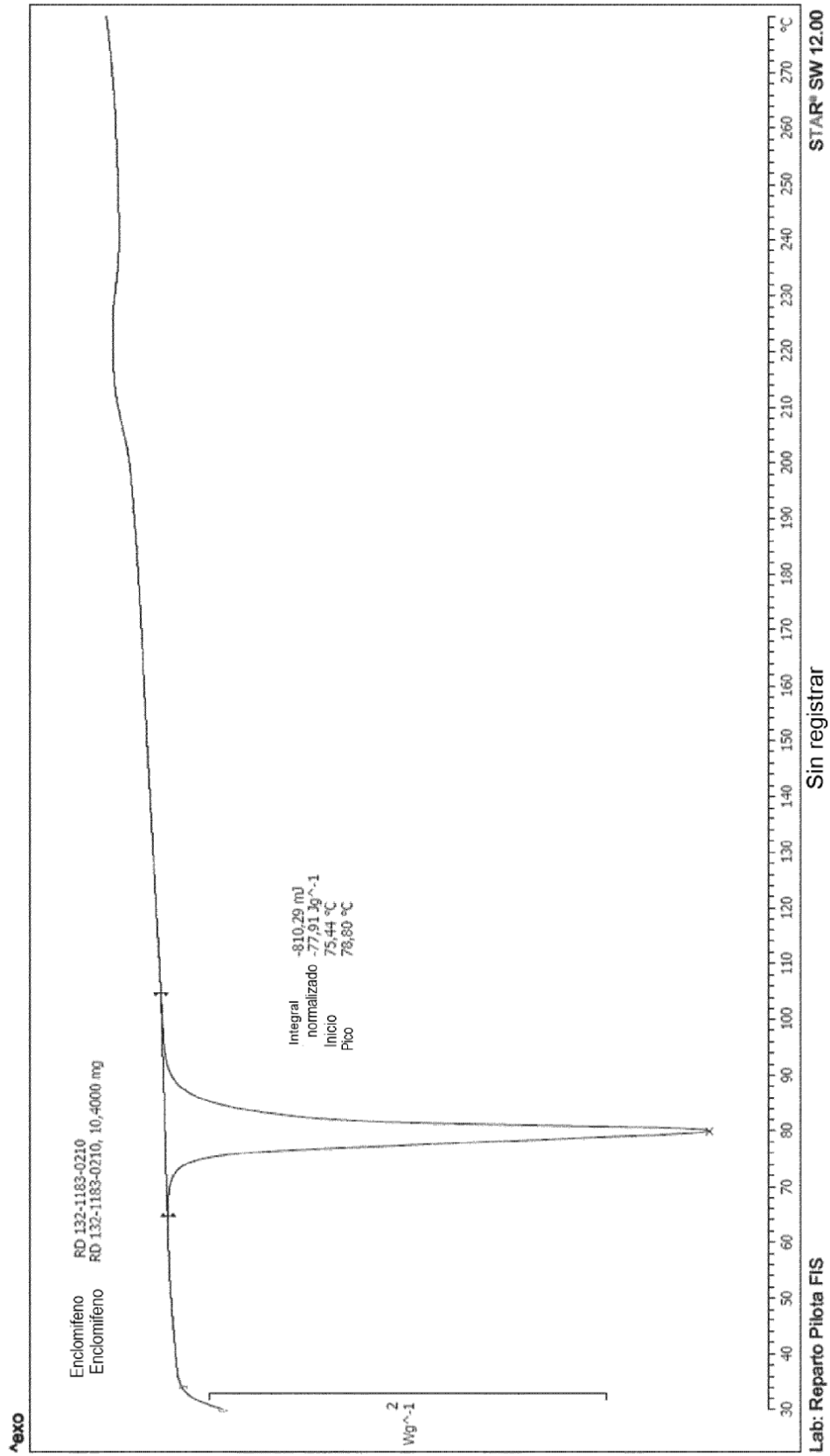


Fig. 18

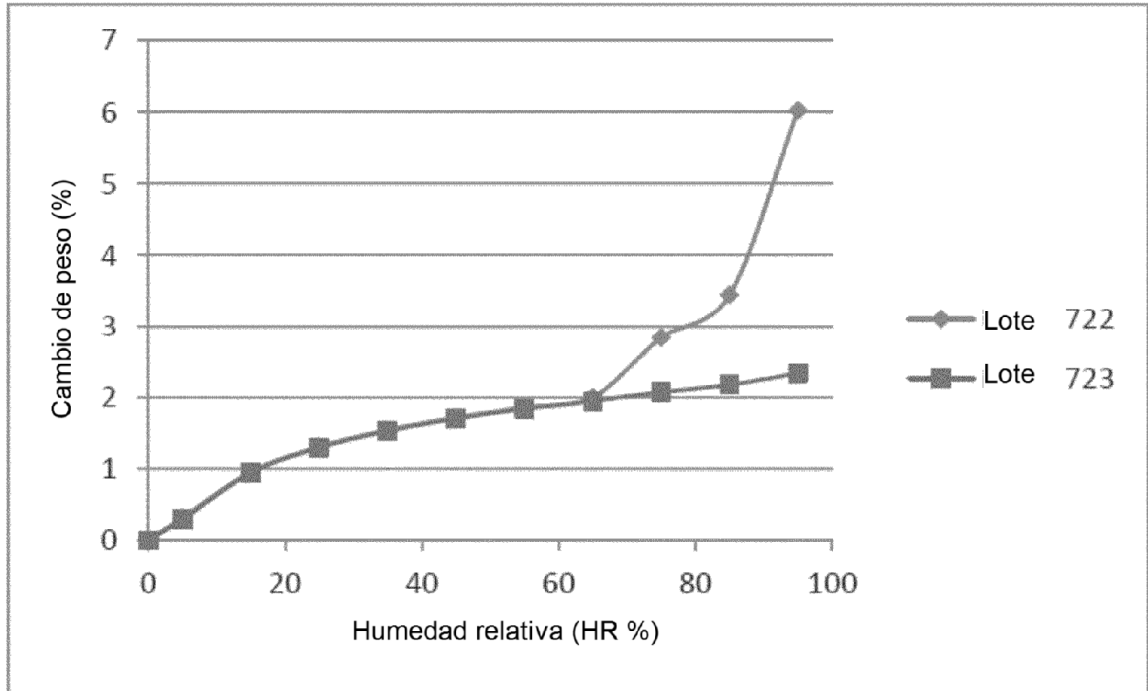


Fig. 19

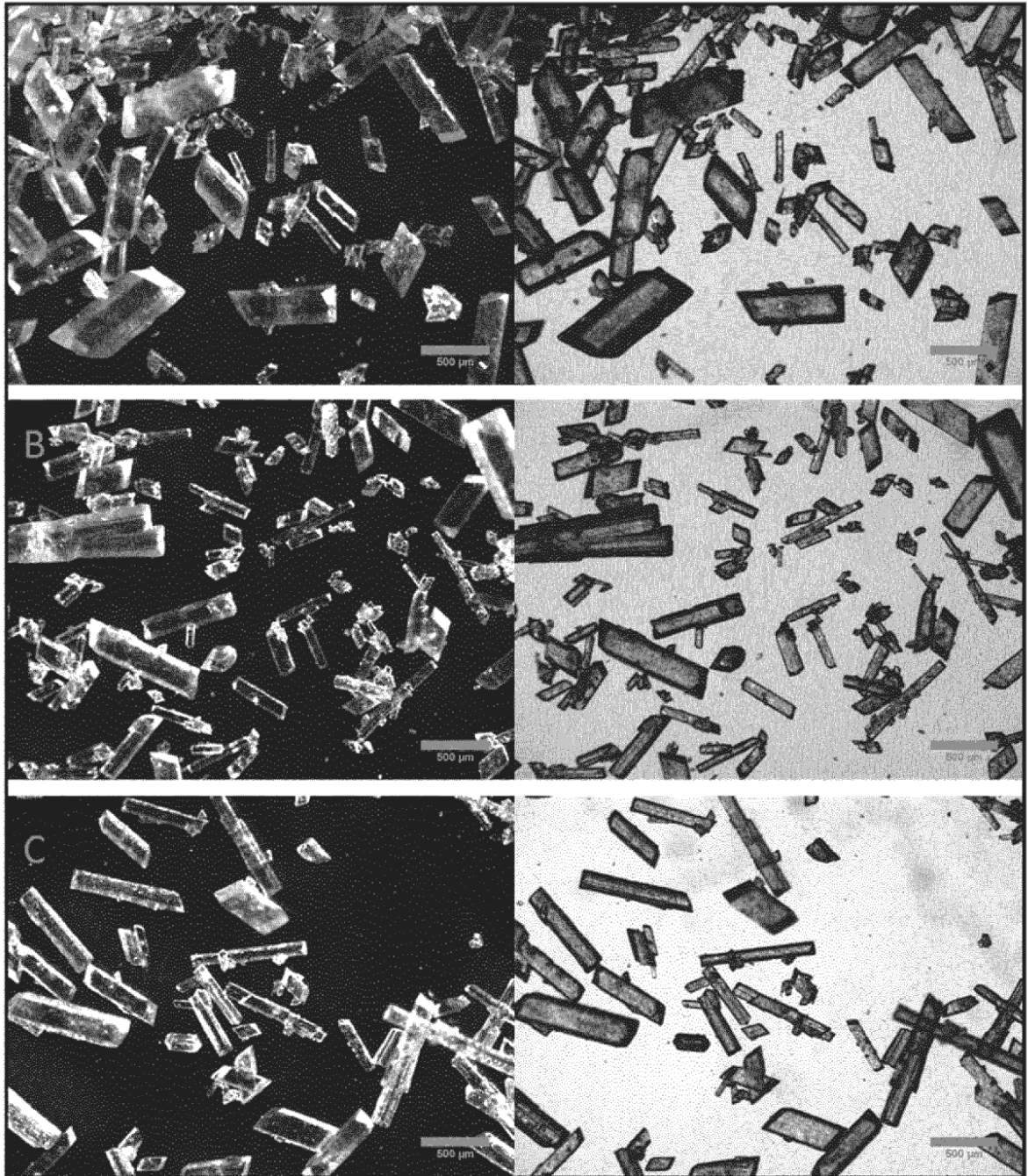


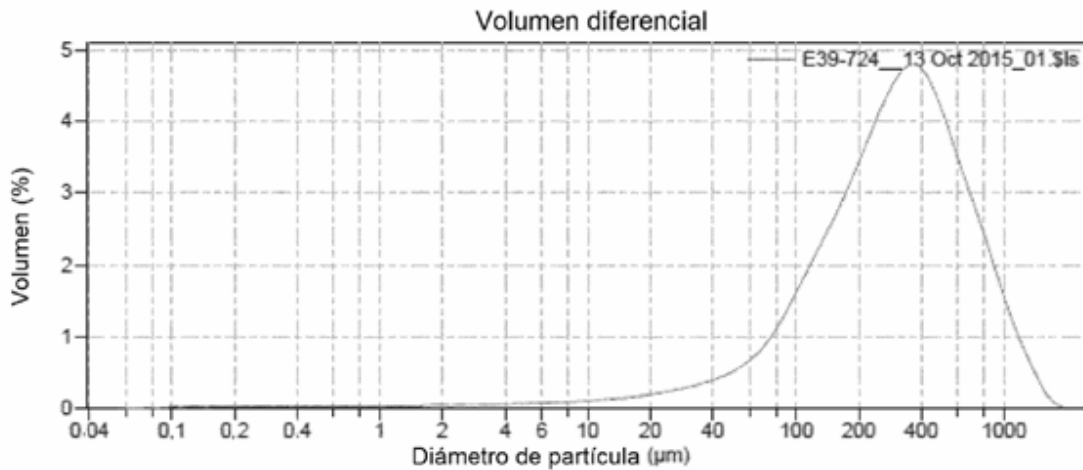
Fig. 20

Analizador De Tamaño de Partícula LS de Beckman Coulter



Unidad de Citometría – Centros Científicos y Tecnológicos – UB

Nombre del archivo: D:\Resultados2015\VP269\VP269_04316\E39-724__13 Oct 2015_01.\$ls
 E39-724__13 Oct 2015_01.\$ls
 ID del archivo: E39-724
 Operador: Ricard Alvarez Arpal
 Reg CCiT: 043162015
 Número de realización: 1
 Comentario 1: Trito x100
 Comentario 2: 0s ultrasonidos
 Modelo óptico: Fraunhofer.rfd PIDS incluido
 Residual: 0.57%
 LS 13 320 Universal Liquid Module
 Tiempo de inicio: 16:26 13 Oct 2015 Duración de la realización: 64 segundos
 Velocidad de bomba: 70% PIDS Oscuro: 42%
 Oscurecimiento: 10%
 Fluido: Agua Firmware: 2.02
 Software: 6.01



Estadísticas de volumen (aritmética) E39-724__13 Oct 2015_01.\$ls

Cálculos de 0,040 µm a 2000 µm

Volumen: 100%	D.T.: 285,7 µm
Media: 374,3 µm	C.V.: 76,3%
Mediana: 306,4 µm	Asimetría: 1,331 Asimetría derecha
D(3,2): 31,54 µm	Kurtosis: 2,000 Leptokúrtico
Modo: 356,1 µm	
d_{10} : 81,89 µm	d_{50} : 306,4 µm
	d_{90} : 770,1 µm
<100% <98%	
2000 µm 1179 µm	
<15 µm <5 µm	
2,34% 1,25%	

Fig. 20 – continuación

Analizador De Tamaño de Partícula LS de Beckman Coulter



Unidad de Citometría – Centros Científicos y Tecnológicos – UB

E30-724_13 Oct 2015_01.xls					
Diámetro del canal (inferior) µm	Volumen Dif. %	Volumen < Acum %	Diámetro del canal (inferior) µm	Volumen Dif. %	Volumen < Acum %
0,03999	0,000206557	0	18,861	0,182538	2,7178
0,0438906	0,000266436	0,000206557	20,706	0,202123	2,90034
0,0481915	0,000417753	0,000472982	22,7292	0,224118	3,10248
0,0528029	0,000838572	0,000890745	24,9513	0,248060	3,32058
0,0580749	0,00176369	0,00172932	27,3906	0,273917	3,57486
0,0637526	0,00327323	0,003493	30,0885	0,301748	3,84857
0,0699954	0,00494351	0,00678624	33,0081	0,332298	4,15031
0,0768275	0,00846364	0,0117087	36,2352	0,366779	4,48261
0,0843385	0,00791046	0,0181734	39,7777	0,406817	4,84939
0,0925838	0,00942588	0,0280838	43,6665	0,45452	5,2562
0,101635	0,0109328	0,0356097	47,9350	0,512450	5,71072
0,111572	0,0123247	0,0404425	52,822	0,584035	6,22318
0,122479	0,0137232	0,0587672	57,7666	0,673708	6,80721
0,134454	0,0150257	0,0724905	63,4141	0,780597	7,48092
0,147598	0,0161694	0,0875161	69,6138	0,927508	8,26752
0,162028	0,0172107	0,103686	76,4196	1,09892	9,19503
0,177899	0,018331	0,120896	83,8907	1,29885	10,2939
0,195258	0,0194549	0,139227	92,0923	1,52033	11,5928
0,214348	0,0205007	0,158682	101,096	1,75285	13,1131
0,235303	0,0214654	0,179183	110,979	1,99673	14,968
0,258308	0,0224304	0,200648	121,829	2,21726	16,8527
0,283661	0,0233172	0,223085	133,74	2,44661	19,07
0,311293	0,0240723	0,246402	146,815	2,68187	21,5166
0,341716	0,0247081	0,270474	161,168	2,93055	24,1984
0,375124	0,0253055	0,295182	176,925	3,1967	27,129
0,411798	0,0258666	0,320488	194,222	3,47873	30,3257
0,452057	0,0263364	0,346354	213,21	3,76993	33,8044
0,496252	0,0267195	0,372691	234,054	4,05888	37,5742
0,544768	0,027019	0,39941	256,936	4,33025	41,6331
0,598027	0,0273354	0,426429	282,056	4,5836	45,9634
0,656493	0,0275974	0,453765	309,631	4,73388	50,527
0,720675	0,0278181	0,481362	339,902	4,81478	55,2608
0,791132	0,0279554	0,50918	373,132	4,78537	60,0758
0,868477	0,028171	0,537135	409,611	4,53777	64,561
0,953383	0,0284214	0,565306	449,657	4,38482	69,4988
1,04659	0,0287358	0,593728	493,617	4,05782	73,8838
1,14891	0,0290676	0,622464	541,876	3,68772	77,9414
1,26123	0,0295656	0,651531	594,852	3,33047	81,6391
1,38454	0,0302284	0,681097	653,008	2,89714	84,9788
1,5199	0,0310748	0,711325	716,849	2,36277	87,8757
1,66849	0,0320804	0,7424	786,832	2,31389	90,6385
1,83161	0,0332875	0,774469	863,866	1,94811	92,9524
2,01068	0,0347853	0,807757	948,322	1,57364	94,9985
2,20725	0,0365033	0,842522	1041,03	1,22999	96,4721
2,42304	0,0384911	0,879025	1142,81	0,930893	97,6991
2,65993	0,0407161	0,917516	1254,54	0,689326	98,6298
2,91998	0,0432233	0,958232	1377,19	0,422686	99,2992
3,20545	0,0460012	1,00146	1511,83	0,189601	99,7218
3,51883	0,0490633	1,04746	1659,63	0,0899723	99,9214
3,86294	0,052353	1,09652	1821,88	0,00858294	99,9914
4,24949	0,0558902	1,14887	2000		100
4,65508	0,0596735	1,20476			
5,11017	0,0637309	1,26444			
5,60976	0,0680472	1,32817			
6,1582	0,0725967	1,39621			
6,76025	0,0774261	1,46881			
7,42117	0,0825722	1,54624			
8,14689	0,0881813	1,62881			
8,94315	0,0942401	1,71699			
9,81748	0,10098	1,81124			
10,7773	0,108405	1,9122			
11,8309	0,11662	2,0206			
12,9876	0,126607	2,13752			
14,2573	0,137753	2,26413			
15,6512	0,150555	2,40188			
17,1813	0,165365	2,55244			

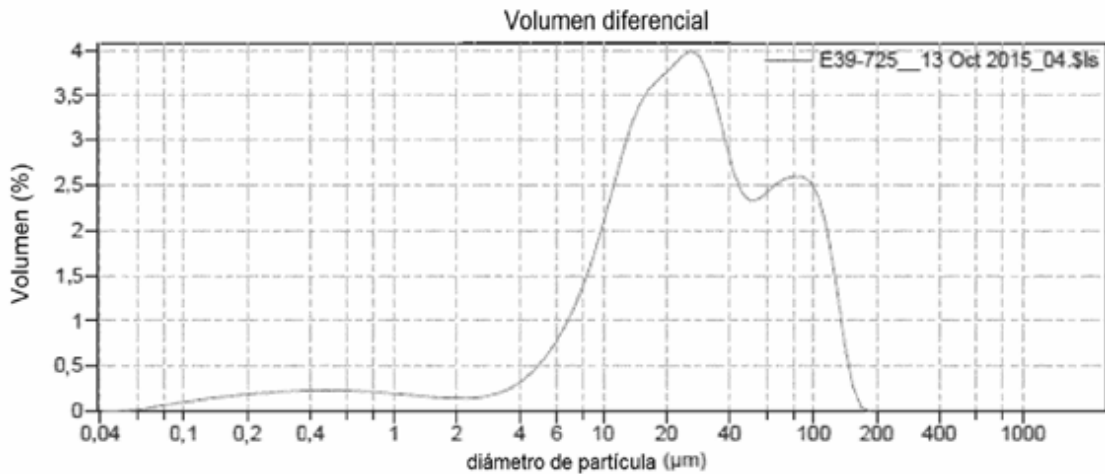
Fig. 21

Analizador De Tamaño de Partícula LS de Beckman Coulter



Unidad de Citometría – Centros Científicos y Tecnológicos – UB

Nombre del archivo: D:\Resultado 2015\IP269\IP269_04316\E39-725__13 Oct 2015_04.\$ls
E39-725__13 Oct 2015_04.\$ls
ID del archivo: E39-725
Operador: Ricard Alvarez Arpal
Reg CCIT: 043162015
Número de realización: 4
Comentario 2: 0s ultrasonidos
Modelo óptico: Fraunhofer.rfd PIDS incluido
Residual: 1,14%
LS 13 320 Universal Liquid Module Duración de la realización: 65 segundos
Tiempo de inicio: 15:35 13 Oct 2015 PIDS Oscur: 9%
Velocidad de bomba: 70% Firmware: 2,02
Oscurecimiento: 1%
Fluido: Agua
Software: 6,01



Estadísticas de volumen (aritmética) E39-725__13 Oct 2015_04.\$ls

Cálculos de 0,040 µm a 2000 µm

Volumen:	100%	D.T.:	33,29 µm
Media:	36,79 µm	C.V.:	90,5%
Mediana:	24,96 µm	Asimetría:	1,287 Asimetría derecha
D(3,2):	3,597 µm	Kurtosis:	0,944 Leptokúrtico
Modo:	26,14 µm		
d_{50} :	5,819 µm	d_{50} :	24,96 µm
		d_{50} :	90,47 µm
<100%	<98%		
194,2 µm	126,4 µm		
<15 µm	<5 µm		
29,7%	8,99%		

Fig. 21 – continuación

Analizador De Tamaño de Partícula LS de Beckman Coulter



Unidad de Citometría – Centros Científicos y Tecnológicos – UB

E30-725 _13 Oct 2015_01.Sls					
Diámetro del canal (inferior) μm	Volumen Dif. %	Volumen < Acum %	Diámetro del canal (inferior) μm	Volumen Dif. %	Volumen < Acum %
0,03999	0,00213468	0	18,881	3,74117	38,4687
0,0438986	0,00291671	0,00213468	20,705	3,8352	42,2088
0,0481915	0,0048542	0,00505139	22,7282	3,93451	46,045
0,0528029	0,0102357	0,00990658	24,9513	3,98992	49,9795
0,0580749	0,0213082	0,0201413	27,3906	3,93762	53,8695
0,0637528	0,0379933	0,0414495	30,0685	3,73725	57,8071
0,0698854	0,054388	0,0794428	33,0081	3,40367	61,8443
0,0768275	0,0692586	0,133829	36,2352	3,0111	65,048
0,0843385	0,0837296	0,203087	39,7777	2,65709	68,0591
0,0925838	0,0991553	0,286817	43,6865	2,41955	70,7188
0,101635	0,113862	0,385972	47,9356	2,32466	73,1363
0,111572	0,127069	0,499834	52,622	2,34745	75,481
0,122479	0,140593	0,626904	57,7666	2,43078	77,8085
0,134454	0,152443	0,767497	63,4141	2,5159	80,2392
0,147598	0,163164	0,919939	69,8138	2,5691	82,7551
0,162028	0,172754	1,0831	76,4186	2,58275	85,3242
0,177899	0,183147	1,25586	83,8907	2,58546	87,917
0,195258	0,192718	1,439	92,0923	2,54572	90,5124
0,214348	0,201237	1,63172	101,096	2,37512	93,0582
0,235303	0,209653	1,83296	110,979	2,01067	95,4333
0,258308	0,215594	2,04161	121,829	1,44467	97,444
0,283561	0,221963	2,25721	133,74	0,781136	98,8896
0,311293	0,227091	2,47917	146,815	0,277904	99,8698
0,341716	0,230996	2,70626	161,168	0,0491309	99,9477
0,375124	0,23342	2,93725	176,925	0,00321025	99,9988
0,411798	0,235523	3,17067	194,222	0	100
0,452057	0,236427	3,40819	213,21	0	100
0,496252	0,236136	3,64262	234,064	0	100
0,544768	0,233871	3,87875	256,936	0	100
0,598027	0,231186	4,11262	282,056	0	100
0,656493	0,227419	4,34381	309,631	0	100
0,720675	0,222608	4,57123	339,902	0	100
0,791132	0,215998	4,79384	373,132	0	100
0,869477	0,209802	5,00983	409,611	0	100
0,953383	0,200916	5,21864	449,657	0	100
1,04659	0,1925	5,41955	493,617	0	100
1,14891	0,183421	5,61205	541,876	0	100
1,26123	0,174263	5,79547	594,852	0	100
1,38454	0,165607	5,96976	653,008	0	100
1,5199	0,15779	6,13536	716,849	0	100
1,66849	0,151451	6,29315	786,932	0	100
1,83181	0,146953	6,4446	863,866	0	100
2,01068	0,145198	6,59156	948,322	0	100
2,20725	0,147165	6,73875	1041,03	0	100
2,42304	0,154418	6,88392	1142,81	0	100
2,65993	0,168355	7,03834	1254,54	0	100
2,91998	0,190566	7,20669	1377,19	0	100
3,20545	0,222908	7,39728	1511,83	0	100
3,51883	0,267301	7,62019	1659,63	0	100
3,86294	0,326039	7,88749	1821,88	0	100
4,24049	0,401104	8,21353	2000	0	100
4,65506	0,494373	8,61463			
5,11017	0,607348	9,109			
5,60976	0,74207	9,71635			
6,1582	0,901443	10,4584			
6,76025	1,08842	11,3599			
7,42117	1,30568	12,4483			
8,14689	1,55663	13,7543			
8,94315	1,84278	15,3109			
9,81748	2,16355	17,1537			
10,7773	2,5092	19,3172			
11,8309	2,85548	21,8264			
12,9876	3,18464	24,6819			
14,2573	3,40311	27,8485			
15,6512	3,58003	31,2497			
17,1813	3,65897	34,8097			

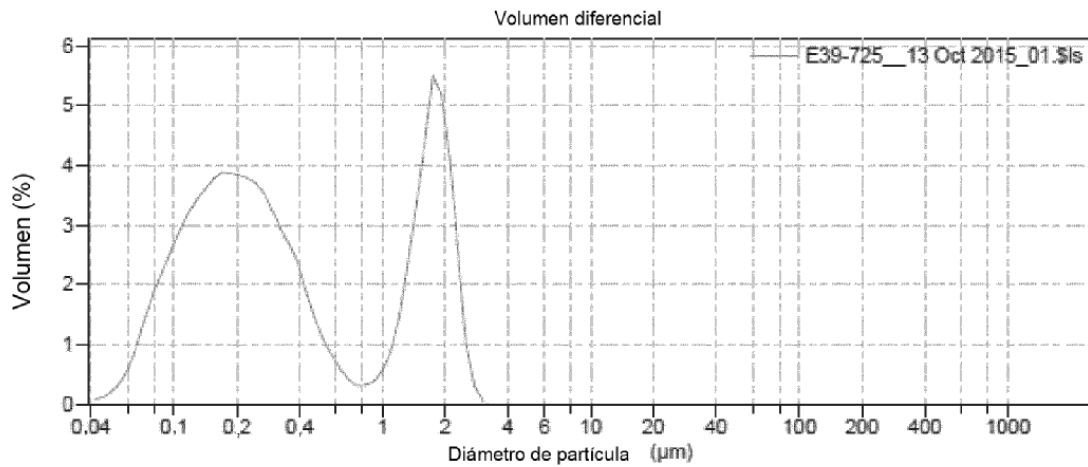
Fig. 22

Analizador De Tamaño de Partícula LS de Beckman Coulter



Unidad de Citometría – Centros Científicos y Tecnológicos –

Nombre de archivo: D:\Resultados2015\IP269\IP269_04316\E39-725__13 Oct 2015_01.\$ls
 E39-725__13 Oct 2015_01.\$ls
 ID del archivo: E39-725
 Operador: Ricard Alvarez Arpal
 Reg CCiT: 043162015
 Número de realización: 1
 Comentario 1: Tritó X100
 Comentario 2: 10s ultrasonidos
 Modelo óptico: Fraunhofer.rfd PIDS incluido
 Residual: 0,97%
 LS 13 320 Universal Liquid Module Duración de la realización: 65 segundos
 Tiempo de inicio: 15:16 13 Oct 2015
 Velocidad de bomba: 70%
 Oscurecimiento: 6% PIDS Oscur: 35%
 Fluido: Agua
 Software: 6,01 Firmware: 2,02



Estadísticas de volumen (aritmética)

E39-725__13 Oct 2015_01.\$ls

Cálculos de 0,040 µm a 2000 µm

Volumen:	100%	S.D.:	0,754 µm
Media:	0,715 µm	C.V.:	105%
Mediana:	0,284 µm	Asimetría:	0,966 Asimetría derecha
D(3,2):	0,228 µm	Kurtosis:	-0,627 Leptokúrtico
Modo:	1,748 µm		

d ₁₀ :	0,100 µm	d ₅₀ :	0,284 µm	d ₉₀ :	1,942 µm
<100%:	<98%				
3,205 µm:	2,370 µm				
<15 µm:	<5 µm				
100%:	100%				

Fig. 22 - continuación

Analizador De Tamaño de Partícula LS de Beckman Coulter



Unidad de Citometría – Centros Científicos y Tecnológicos – UB

E39-725_13 Oct 2015_01.xls

Diámetro del canal (inferior) μm	Volumen Dif. %	Volumen < Acum %	Diámetro del canal (inferior) μm	Volumen Dif. %	Volumen < Acum %
0,03999	0,0874823	0	18,861	0	100
0,0438996	0,115644	0,0874823	20,705	0	100
0,0481915	0,205171	0,203106	22,7292	0	100
0,0529029	0,365433	0,408278	24,9513	0	100
0,0580749	0,620976	0,773711	27,3906	0	100
0,0637526	1,00308	1,39469	30,0685	0	100
0,0699854	1,45868	2,39776	33,0081	0	100
0,0768275	1,99048	3,85444	36,2352	0	100
0,0843385	2,24167	5,74492	39,7777	0	100
0,0925838	2,55932	7,98659	43,6865	0	100
0,101635	2,87152	10,5459	47,9356	0	100
0,111572	3,1761	13,4174	52,622	0	100
0,122479	3,41299	16,5935	57,7666	0	100
0,134454	3,58782	20,0065	63,4141	0	100
0,147598	3,74866	23,5943	69,6138	0	100
0,162028	3,87766	27,341	76,4196	0	100
0,177889	3,88267	31,2186	83,8907	0	100
0,195258	3,82718	35,0813	92,0923	0	100
0,214348	3,77871	38,9085	101,096	0	100
0,235303	3,70445	42,6872	110,979	0	100
0,258308	3,52945	46,3917	121,829	0	100
0,283581	3,22481	49,9211	133,74	0	100
0,311283	2,83478	53,1457	146,815	0	100
0,341716	2,67117	56,0805	161,168	0	100
0,375124	2,37497	58,7517	176,925	0	100
0,411798	1,87332	61,1286	194,222	0	100
0,452057	1,44336	62,9999	213,21	0	100
0,496252	1,09973	64,4432	234,054	0	100
0,544768	0,835318	65,543	256,936	0	100
0,598027	0,59488	66,3783	282,056	0	100
0,656493	0,412149	66,9732	309,631	0	100
0,720675	0,318412	67,3853	339,902	0	100
0,791132	0,329049	67,7037	373,132	0	100
0,868477	0,381511	68,0328	409,611	0	100
0,953383	0,563529	68,4143	449,657	0	100
1,04659	0,870082	68,9778	493,617	0	100
1,14891	1,42078	69,9479	541,876	0	100
1,26123	2,35292	71,2747	594,852	0	100
1,38454	3,32766	73,6276	653,008	0	100
1,5199	4,35425	76,9553	716,849	0	100
1,66849	5,50375	81,3095	786,932	0	100
1,83161	5,17728	86,8133	863,866	0	100
2,01068	4,07267	91,9905	948,322	0	100
2,20725	2,5717	96,0632	1041,03	0	100
2,42304	1,01916	98,8349	1142,61	0	100
2,65993	0,300152	99,6541	1254,54	0	100
2,91998	0,0457806	99,9542	1377,19	0	100
3,20545	0	100	1511,83	0	100
3,51883	0	100	1658,63	0	100
3,86294	0	100	1821,88	0	100
4,24049	0	100	2000	0	100
4,65506	0	100			
5,11017	0	100			
5,60976	0	100			
6,1582	0	100			
6,76025	0	100			
7,42117	0	100			
8,14689	0	100			
8,94315	0	100			
9,81748	0	100			
10,7773	0	100			
11,8309	0	100			
12,9676	0	100			
14,2673	0	100			
15,6512	0	100			
17,1613	0	100			

Fig. 23

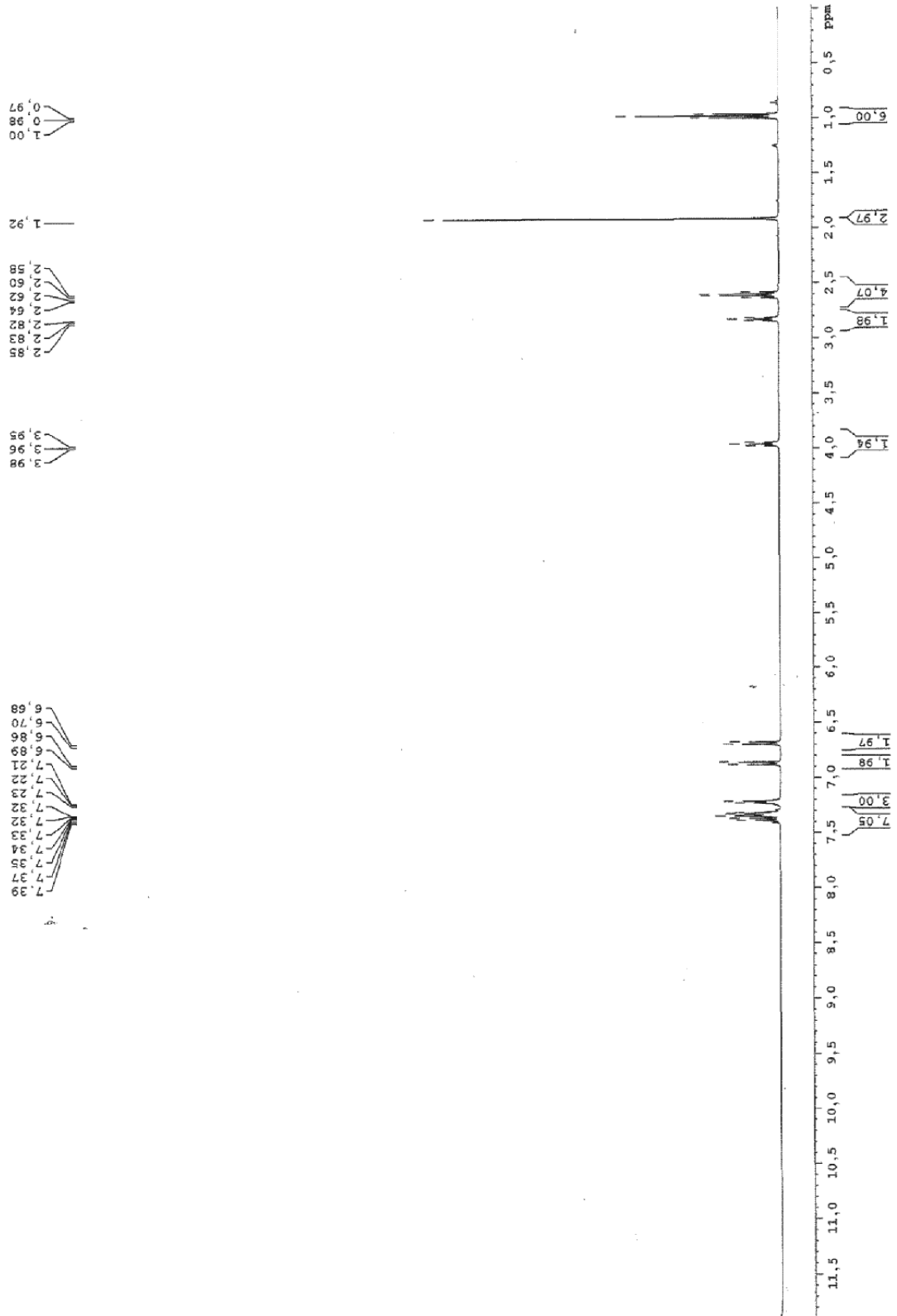


Fig. 24

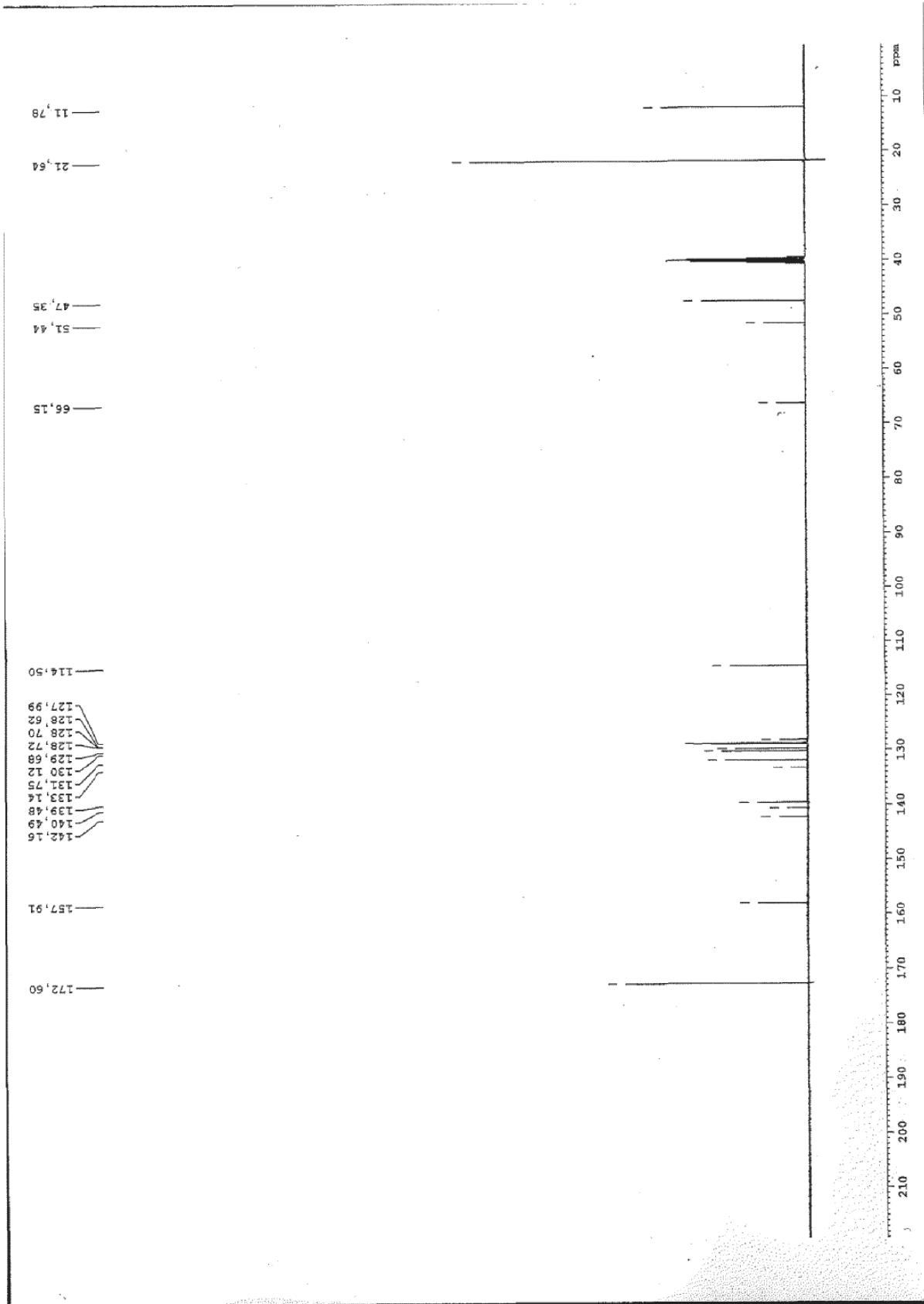


Fig. 25

Fig. 25 - A

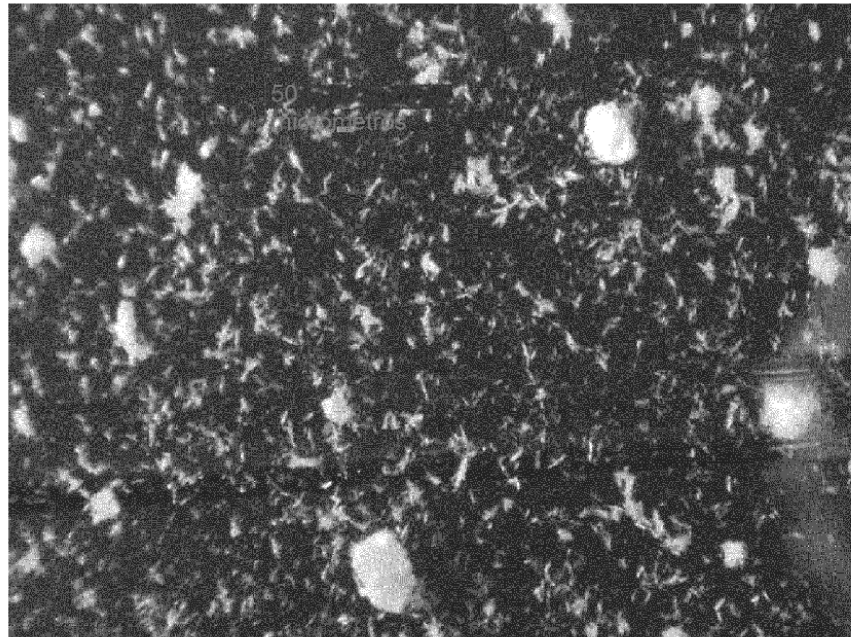


Fig. 25 - B1

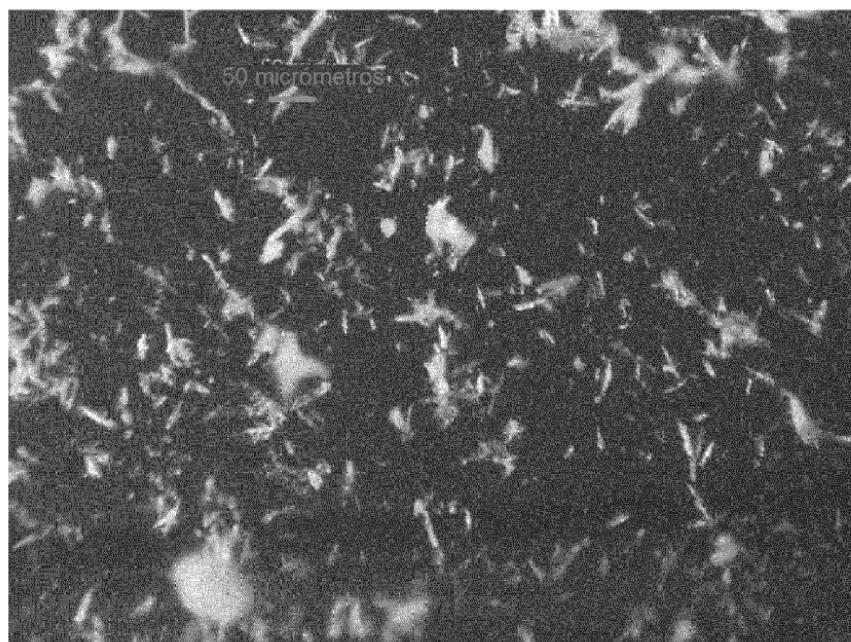


Fig. 25 – B2

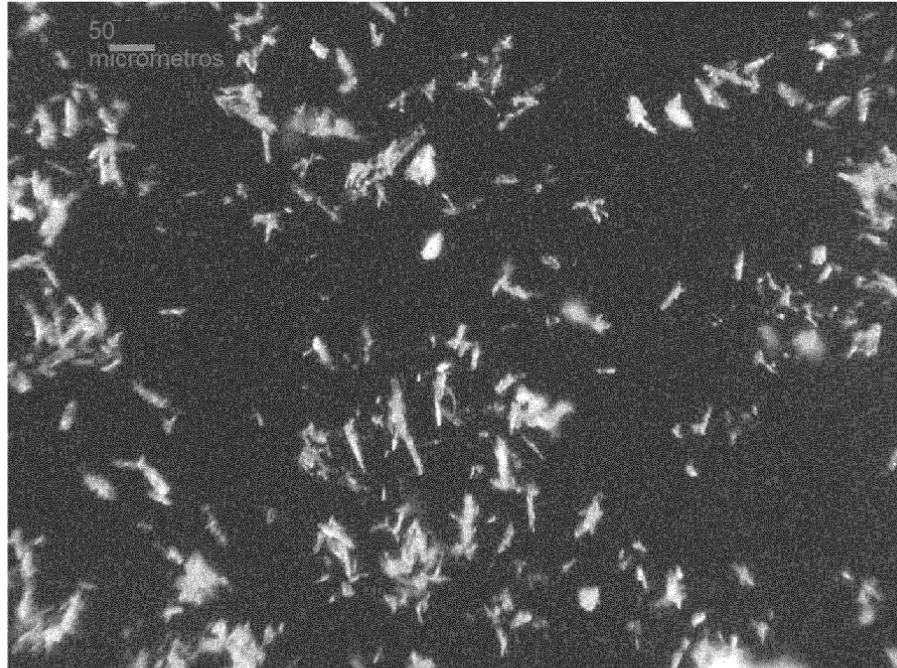


Fig. 25 – C

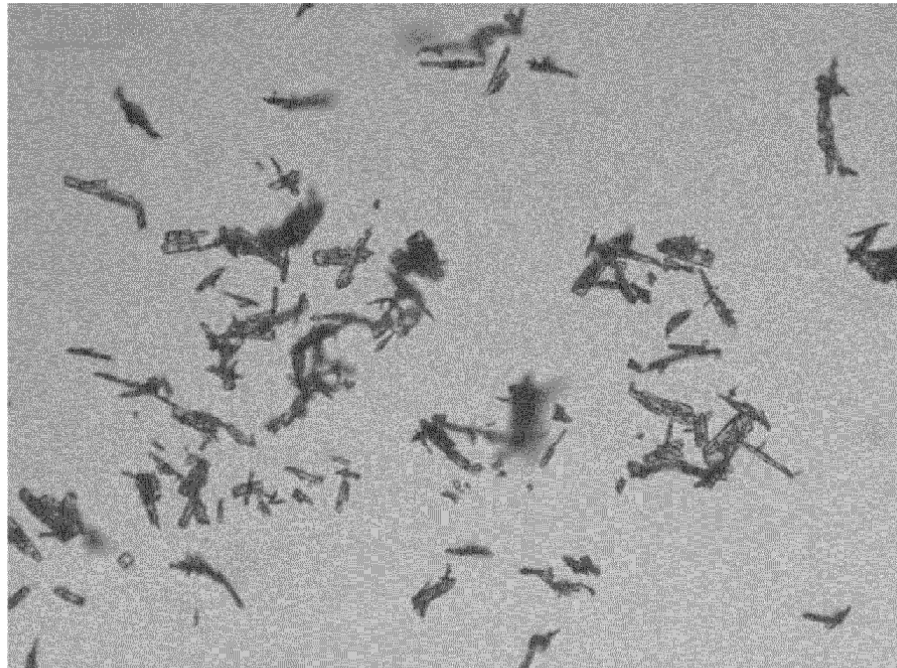


Fig. 25 – D

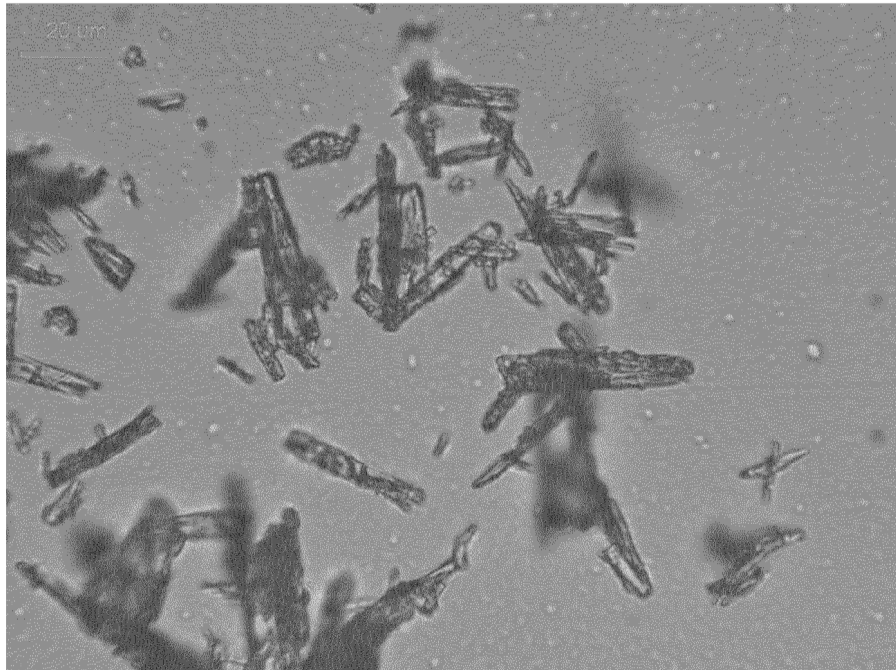


Fig. 26

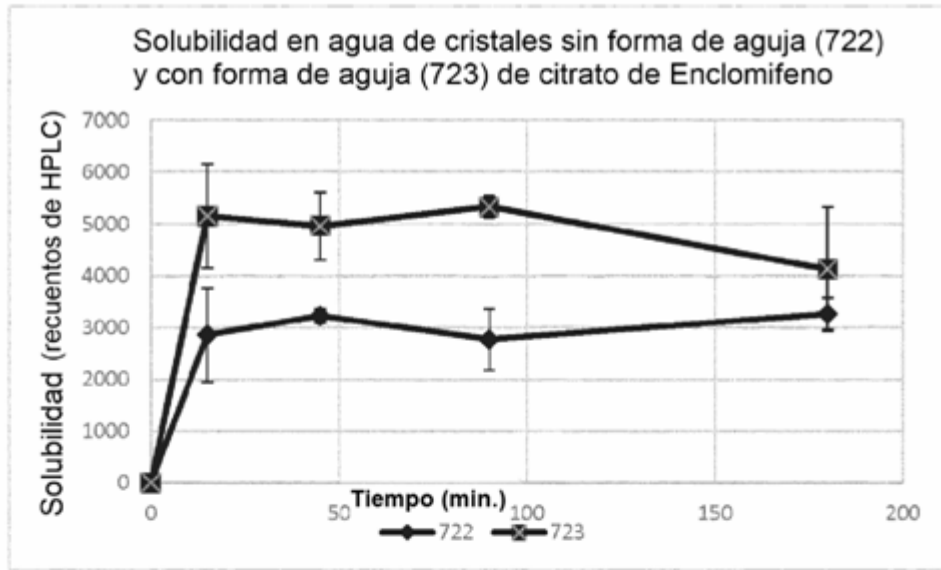


Fig. 27

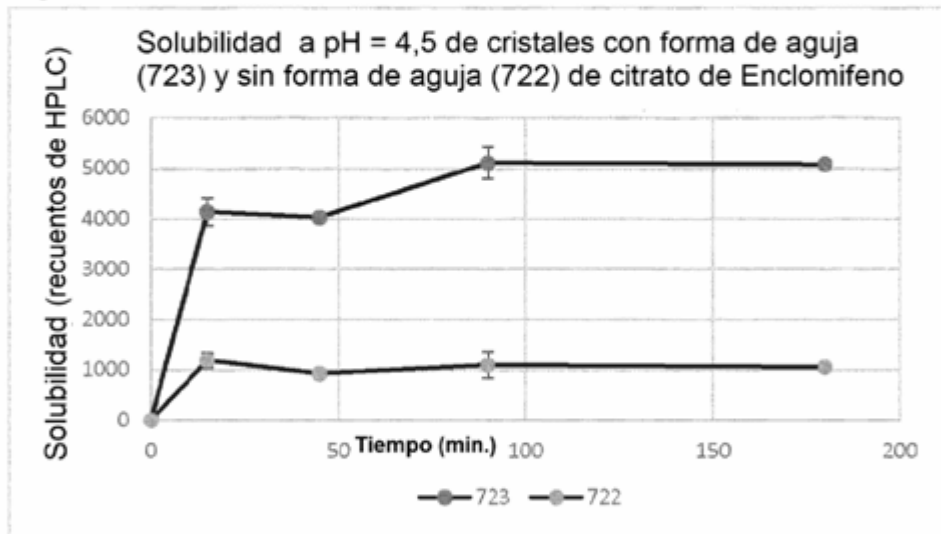
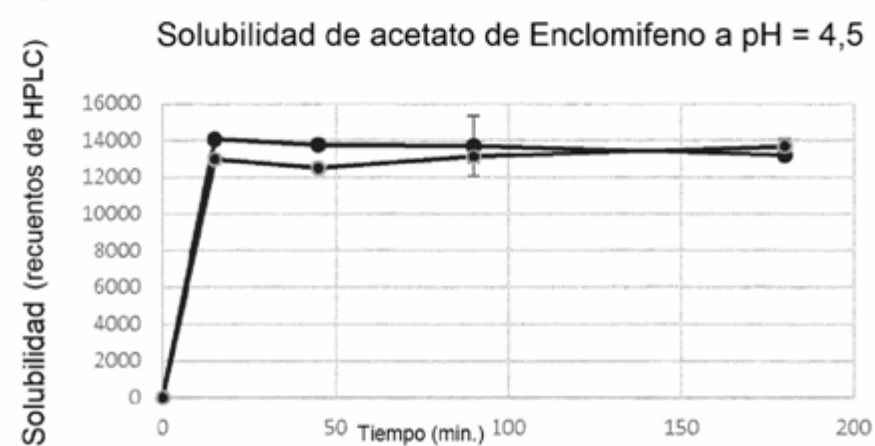


Fig. 28



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- | | | |
|----|---|----------------------------------|
| 10 | • US 3848030 A [0007] [0010] [0011] [0016] [0037] | • WO 2010054248 A1 [0093] [0176] |
| | • US 2914563 A [0012] | • WO 2013020017 A1 [0093] [0176] |
| | • WO 2014031177 A [0012] | • WO 2013123218 A1 [0093] [0176] |
| | • WO 2014031177 A1 [0050] [0093] [0176] | • WO 2013130832 A1 [0093] [0176] |
| 15 | • WO 2006102232 A2 [0093] [0176] | • WO 2014070523 A1 [0093] [0176] |

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- *Acta Cryst*, 1976, vol. B32, 291-293 [0008]
- 20 • *Analytical profiles of drug substances and excipients*, 1998, vol. 25, 85-121 [0009]
- *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 1984, vol. 18 (11), 1318-24 [0013] [0017]
- *Pharmaceutical Chemistry Journal*, noviembre de 1984, vol. 18 (11), 758-764 [0013]
- *Pharmaceutical Chemistry Journal*, noviembre de 1984, vol. 18 (11), 758-764 [0017]
- *Chem Eng*, 1965, vol. 72, 163-168 [0302]