

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 679 370**

51 Int. Cl.:

C07C 237/22 (2006.01)

A61K 31/166 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2013 PCT/GB2013/051781**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14006414**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2013 E 13737357 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2870137**

54 Título: **Polimorfismos de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoi)]-2-fenil-etilcarbamoi]-2-(4-etoxi-fhenil)-etil]-benzamida**

30 Prioridad:

06.07.2012 US 201261668543 P
06.07.2012 GB 201212081

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.08.2018

73 Titular/es:

KALVISTA PHARMACEUTICALS LIMITED
(100.0%)
Porton Science Park Incubator Centre Bybrook
Road
Porton Down Wiltshire SP4 0BF, GB

72 Inventor/es:

NORTHEN, JULIAN SCOTT y
MYKYTIUK, JOHN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 679 370 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

Polimorfismos de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fhenil)-etil]-benzamida

5 La presente invención se refiere a nuevos polimorfos de un inhibidor de calicreína plasmática, una composición farmacéutica que los contiene y su uso en terapia.

10 Antecedentes de la invención

Los inhibidores de la calicreína plasmática tienen una serie de aplicaciones terapéuticas, particularmente en el tratamiento de la permeabilidad vascular retiniana asociada con la retinopatía diabética y el edema macular diabético. Otras complicaciones de la diabetes, como la hemorragia cerebral, la nepropatía, la cardiomiopatía y la neuropatía, todas las cuales tienen asociaciones con la calicreína plasmática también pueden considerarse como objetivos de un inhibidor de la calicreína plasmática.

La calicreína plasmática es una serina proteasa de tipo tripsina que puede liberar cininas de cininógenos (ver K. D. Bhoola et al., "Kallikrein-Kinin Cascade", Encyclopedia of Respiratory Medicine, p483-493; J. W. Bryant et al., "Human plasma kallikrein-kinin system: physiological and biochemical parameters" Cardiovascular and haematological agents in medicinal chemistry, 7, p234-250, 2009; K. D. Bhoola et al., Pharmacological Rev., 1992, 44, 1; y D. J. Campbell, "Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from the measurement of kinin peptides", Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2000, 33, 665-677). Es un miembro esencial de la cascada de la coagulación sanguínea intrínseca, aunque su papel en esta cascada no implica la liberación de bradisinina o la escisión enzimática. La precalicreína plasmática está codificada por un único gen y se sintetiza en el hígado. Es secretada por hepatocitos como una precalicreína plasmática inactiva que circula en el plasma como un complejo heterodímero unido a un cininógeno de alto peso molecular que se activa para dar la calicreína plasmática activa. Las cininas son mediadores potentes de la inflamación que actúan a través de los receptores acoplados a proteína G y los antagonistas de las cininas (como los antagonistas de la bradisinina) se han investigado anteriormente como potenciales agentes terapéuticos para el tratamiento de una serie de trastornos (F. Marceau and D. Regoli, Nature Rev., Drug Discovery, 2004, 3, 845-852).

Las cininas desempeñan un papel fundamental en la patogénesis de la pancreatitis y también pueden ser importantes en la progresión de formas edematosas a necrosantes de la enfermedad. En modelos animales de pretratamiento de pancreatitis con antagonistas de bradisinina se ha demostrado que previene la formación de edema y secuelas como hipotensión, hipovalemia, hemoconcentración y acumulación de enzimas digestivas activadas dentro del tejido pancreático (T. Griesbacher and F. Lembeck F. Br. J. Pharmacol., 1992 107, 356-360; T. Griesbacher et al., Br. J. Pharmacol., 1993, 108, 405-411). Sin embargo, el desarrollo adicional de antagonistas de bradisinina está limitado por su falta de especificidad y eficacia. Además, (T. T. Griesbacher et al., Br. J. Pharmacol., 2003, 139, 299-308) se ha demostrado que los antagonistas de bradisinina aumentan los niveles de hK1 en el páncreas, lo que indica que el tratamiento con inhibidores de hK1 podría ser significativamente más eficaz que los antagonistas de bradisinina. La prevención de la formación de cinina a través de la inhibición de hK1 representa por tanto una alternativa viable a los antagonistas de cinina para el tratamiento de estos trastornos.

Se cree que la calicreína plasmática desempeña un papel en una serie de trastornos inflamatorios. El inhibidor principal de la calicreína plasmática es el inhibidor de la esterasa serpina C1. Los pacientes que presentan una deficiencia genética en el inhibidor de la esterasa C1 padecen de angioedema hereditario (HAE) que da como resultado una hinchazón intermitente de la cara, las manos, la garganta, el tracto gastrointestinal y los genitales. Las ampollas formadas durante los episodios agudos contienen altos niveles de calicreína plasmática que escinde el cininógeno de alto peso molecular liberando bradisinina lo que lleva a una permeabilidad vascular aumentada. Se ha demostrado que el tratamiento con un inhibidor de calicreína plasmática de proteína grande trata eficazmente el HAE evitando la liberación de bradisinina que provoca una mayor permeabilidad vascular (A. Lehmann "Ecallantide (DX-88), a plasma kallikrein inhibitor for the treatment of hereditary angioedema and the prevention of blood loss in on-pump cardiothoracic surgery" Expert Opin. Biol. Ther. 8, p1187-99).

El sistema de calicreína-cinina plasmático es anormalmente abundante en pacientes con edema macular diabético avanzado. Se ha publicado recientemente que la calicreína plasmática contribuye a disfunciones vasculares retinianas en ratas diabéticas (A. Clermont et al. "Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats" Diabetes, 2011, 60, p1590-98). Además, la administración del inhibidor de calicreína plasmática ASP-440 mejoró tanto la permeabilidad vascular retiniana como las anomalías del flujo sanguíneo retiniano en ratas diabéticas. Por lo tanto, un inhibidor de la calicreína plasmática debería ser útil como un tratamiento para reducir la permeabilidad vascular retiniana asociada con la retinopatía diabética y el edema macular diabético.

Se han descrito anteriormente inhibidores de calicreína plasmática sintéticos y de molécula pequeña por ejemplo, por Garrett et al. ("Peptide aldehyde...." J. Peptide Res. 52, p62-71 (1998)), T. Griesbacher et al.

5 ("Involvement of tissue kallikrein but not plasma kallikrein in the development of symptoms mediated by endogenous kinins in acute pancreatitis in rats" British Journal of Pharmacology 137, p692-700 (2002)), Evans ("Selective dipeptide inhibitors of kallikrein" WO03/076458), Szelke *et al.* ("Kininogenase inhibitors" WO92/04371), D. M. Evans *et al.* (Immunopharmacology, 32, p1 15-116 (1996)), Szelke *et al.* ("Kininogen inhibitors" WO95/07921), Antonsson *et al.* ("New peptides derivatives" WO94/29335), J. Sturzbecher *et al.* (Brazilian J. Med. Biol. Res 27, p1929-34 (1994)), Kettner *et al.* (US 5,187,157), N. Teno *et al.* (Chem. Pharm. Bull. 41, p1079-1090 (1993)), W. B. Young *et al.* ("Small molecule inhibitors of plasma kallikrein" Bioorg. Med. Chem. Letts. 16, p2034-2036 (2006)), Okada *et al.* ("Development of potent and selective plasmin and plasma kallikrein inhibitors and studies on the structure-activity relationship" Chem. Pharm. Bull. 48, p1964-72 (2000)), Steinmetzer *et al.* ("Trypsin-like serine protease inhibitors and their preparation and use" WO08/049595), Zhang *et al.* ("Discovery of highly potent small molecule kallikrein inhibitors" Medicinal Chemistry 2, p545-553 (2006)), Sinha *et al.* ("Inhibitors of plasma kallikrein" WO08/016883), Brandl *et al.* ("N-((6-amino-pyridin-3-yl)methyl)-heteroaryl-carboxamides as inhibitors of plasma kallikrein" WO2012/017020), y Okada *et al.* ("Development of plasmin and plasma kallikrein selective inhibitors and their effect on M1 (melanoma) and ht29 cell lines" Bioorg. Med. Chem. Lett. 10, p2217-2221 (2000)).

15 Hasta la fecha, no se ha aprobado para uso médico ningún inhibidor de la calicreína plasmática sintético de molécula pequeña. Las moléculas descritas en la técnica conocida adolecen de limitaciones como una selectividad pobre sobre enzimas relacionadas como KLK1, trombina y otras serina proteasas, y una disponibilidad oral pobre. Los inhibidores de calicreína plasmática de proteína grande presentan riesgos de reacciones anafilácticas, como se ha informado por Ecallantide. Por tanto, sigue habiendo una necesidad de compuestos que inhiban selectivamente la calicreína plasmática, que no induzcan la anafilaxia y que estén disponibles oralmente. Además, la mayoría de las moléculas en la técnica conocida presentan una funcionalidad de guanidina o amidina altamente polar e ionizable. Es bien sabido que tales funcionalidades pueden ser limitativas de la permeabilidad del intestino y por lo tanto de la disponibilidad oral.

20 En la fabricación de formulaciones farmacéuticas, es importante que el compuesto activo esté en una forma en la que pueda manipularse y procesarse convenientemente para obtener un proceso de fabricación comercialmente viable. Por consiguiente, la estabilidad química y la estabilidad física del compuesto activo son factores importantes. El compuesto activo, y las formulaciones que lo contienen, deben poder almacenarse eficazmente durante períodos de tiempo apreciables sin mostrar ningún cambio significativo en las características físico-químicas (por ejemplo, composición química, densidad, higroscopicidad y solubilidad) del compuesto activo.

25 Se sabe que la fabricación de una forma en estado sólido particular de un ingrediente farmacéutico puede afectar a muchos aspectos de sus propiedades en estado sólido y ofrecer ventajas en aspectos de solubilidad, velocidad de disolución, estabilidad química, propiedades mecánicas, viabilidad técnica, procesabilidad, farmacocinéticas y biodisponibilidad. Algunos de estos se describen en "Handbook of Pharmaceutical Salts; Properties, Selection and Use", P. Heinrich Stahl, Camille G. Wermuth (Eds.) (Verlag Helvetica Chimica Acta, Zurich). Los métodos para la fabricación de formas en estado sólido también se describen en "Practical Process Research and Development", Neal G. Anderson (Academic Press, San Diego) y "Polymorphism: In the Pharmaceutical Industry", Rolf Hilfiker (Ed) (Wiley VCH). Los polimorfismos en cristales farmacéuticos se describen en Byrn (Byrn, S.R., Pfeiffer, R.R., Stowell, J.G., "Solid-State Chemistry of Drugs", SSCI Inc., West Lafayette, Indiana, 1999), Brittain, H.G., "Polymorphism in Pharmaceutical Solids", Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, 1999) or Bernstein (Bernstein, J., "Polymorphism in Molecular Crystals", Oxford University Press, 2002).

35 El solicitante ha desarrollado una nueva serie de derivados de bencilamina que son inhibidores de la calicreína plasmática, que se divulgan en la WO2013/005045 (PCT/GB2012/051588). Estos compuestos demuestran buena selectividad para la calicreína plasmática y son potencialmente útiles en el tratamiento de agudeza visual deteriorada, retinopatía diabética, edema macular, angioedema hereditario, diabetes, pancreatitis, hemorragia cerebral, nepropatía, cardiomiopatía, neuropatía, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis, inflamación, choque séptico, hipotensión, cáncer, síndrome de dificultad respiratoria de adultos, coagulación intravascular diseminada, cirugía de bypass cardiopulmonar y hemorragia de cirugía postoperatoria. Uno de tales derivados de bencilamina es N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida. Los intentos iniciales de preparar N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida produjeron un sólido amorfo. Sin embargo, el solicitante ha desarrollado ahora nuevas formas cristalinas estables de la sal de ácido clorhídrico de este compuesto, que en este documento son referidas como 'Forma 1' y 'Forma 2'. Las nuevas formas sólidas tienen propiedades físico-químicas ventajosas que las hacen adecuadas para el desarrollo.

40 Por ejemplo, los datos de Sorción de Vapor Gravimétrico (GVS) de la "Forma 1" de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida, Figura 4, muestran que la hidratación es reversible (es decir, sin histéresis significativa). Además, estos datos muestran que bajo condiciones normales (20% a 80% de humedad relativa) solo hay un aumento relativamente gradual en el contenido de agua. Esto puede deberse a la humectación de la muestra y es consistente con la ausencia de higroscopicidad significativa.

Se proporcionan más evidencias de la idoneidad de las formas cristalinas para el desarrollo farmacéutico mediante los siguientes datos de estabilidad. La Forma 1 de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida se envasó en bolsas dobles de polietileno dentro de un recipiente de polipropileno y se almacenó a 40° C y 75% de humedad relativa durante 6 meses:

- No hubo cambios en el difractograma de XRPD
- El contenido de agua (usando el método de prueba de Karl Fischer) aumentó inicialmente inmediatamente después de la preparación, que incluyó una operación de secado, pero se estabilizó a un intervalo de aproximadamente 2,5%-2,8% p/p después de un mes y permaneció dentro de este intervalo a partir de ahí. Estos datos son consistentes con los datos de GVS y además demuestran la ausencia de higroscopicidad significativa
- No hubo una degradación química significativa. La pureza (HPLC) se mantuvo en el área del 99,8%

Descripción de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Por tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un polimorfo cristalino de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida. En la presente solicitud, este polimorfo puede ser referido 'Forma 1'.

El nombre N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida denota la estructura representada en la Figura A.

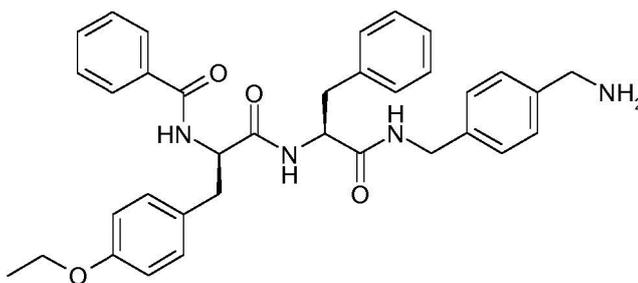


Figura A

La presente invención abarca hidratos de la forma cristalina del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida.

Hasta la fecha se han aislado y caracterizado dos polimorfos cristalinos de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida, que son referidos en la presente como 'Forma 1' y 'Forma 2'.

La forma cristalina de la presente invención es la Forma 1. En un aspecto de la invención, la forma cristalina del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida es un hidrato, particularmente un monohidrato o hemi-hidrato.

En la presente especificación, los picos de difracción en polvo de rayos X (expresados en grados 2θ) se miden usando radiación Cu Kα.

La presente invención proporciona una forma cristalina (Forma 1) de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida, que muestra por lo menos los siguientes picos de difracción en polvo de rayos X característicos (radiación de Cu Kα, expresada en grados 2θ) a aproximadamente:

- (1) 5.1, 10.3, 10.7, 18.1 y 18.6; o
- (2) 5.1, 10.3, 10.7, 14.9, 17.9, 18.1 y 18.6; o
- (3) 5.1, 7.8, 10.3, 10.7, 14.9, 16.6, 17.9, 18.1 y 18.6.

El término "aproximadamente" significa en este contexto que hay una incertidumbre en las mediciones de los grados 2θ de ± 0.2 (expresado en grados 2θ).

La presente invención también proporciona una forma cristalina (Forma 1) del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida, que tiene un patrón de

difracción en polvo de rayos X que comprende los picos característicos (expresados en grados 2 θ) a aproximadamente 5.1, 7.8, 10.3, 10.7, 13.0, 14.9, 16.6, 17.9, 18.1 y 18.6.

La presente invención también proporciona una forma cristalina (Forma 1) del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi)-fenil]-etil]-benzamida, que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X que muestra por lo menos los siguientes valores de espacio d (Å) característicos de aproximadamente:

- (1) 17.32, 8.61, 8.23, 4.89 y 4.76; o
- (2) 17.32, 8.61, 8.23, 5.96, 4.97, 4.89 y 4.76; o
- (3) 17.32, 11.28, 8.61, 8.23, 5.96, 5.34, 4.97, 4.89 y 4.76.

El término "aproximadamente" significa en este contexto que hay una incertidumbre en las mediciones de los valores del espacio d (Å) de ± 0.2 (expresado en Å).

La Figura 1 muestra un patrón de difracción en polvo de rayos X de la Forma 1 del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi)-fenil]-etil]-benzamida. La presente invención también proporciona una forma cristalina (Forma 1) de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi)-fenil]-etil]-benzamida que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X sustancialmente igual al mostrado en la Figura 1.

La Figura 2 muestra un espectro IR de la Forma 1 del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi)-fenil]-etil]-benzamida. La presente invención también proporciona una forma cristalina (Forma 1) del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi)-fenil]-etil]-benzamida que se caracteriza por un espectro IR que tiene picos característicos expresados en cm^{-1} en aproximadamente 3274, 3027, 2976, 2928, 1651, 1636, 1536, 1512, 1243 y 703.

El término "aproximadamente" significa en este contexto que los valores de cm^{-1} pueden variar, por ejemplo, hasta $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$. Adicionalmente, la presente invención proporciona una forma cristalina (Forma 1) del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi)-fenil]-etil]-benzamida que tiene un espectro de IR sustancialmente igual al que se muestra en la Figura 2.

La Figura 5 muestra un patrón de difracción en polvo de rayos X de la Forma 2 del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi)-fenil]-etil]-benzamida.

La forma cristalina de la presente invención puede existir tanto en formas solvatadas como no solvatadas. El término "solvato" se usa en la presente para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una cantidad de uno o más solventes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol. El término "hidrato" se emplea cuando el solvente es agua.

La presente invención también abarca un proceso para la preparación de la Forma 1 de la presente invención, dicho proceso comprendiendo la cristalización de dicha forma cristalina a partir de una solución de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi)-fenil]-etil]-benzamida en un solvente o una mezcla de solventes. En un aspecto de la invención, la mezcla de solventes es acetonitrilo y agua. En otro aspecto, la mezcla de solventes es acetonitrilo y dimetilsulfóxido. En otro aspecto, se añade clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi)-fenil]-etil]-benzamida a un solvente o una mezcla de solventes (por ejemplo, acetonitrilo y agua o acetonitrilo y dimetilsulfóxido) y la mezcla combinada (compuesto más solvente(s)) se calienta a una temperatura de aproximadamente 70-85° C antes de dejarla enfriar a temperatura ambiente. Alternativamente, en este aspecto, la mezcla combinada se calienta a una temperatura de aproximadamente 75-80° C antes de dejarla enfriar a temperatura ambiente. Alternativamente, en este aspecto, la mezcla combinada se calienta a una temperatura de aproximadamente 75, 76, 77, 78, 79 u 80° C antes de dejarla enfriar a temperatura ambiente. Alternativamente, en este aspecto, la mezcla combinada se calienta a una temperatura de aproximadamente 77° C antes de dejarla enfriar a temperatura ambiente.

Alternativamente, la forma cristalina mencionada puede obtenerse mediante ciclado térmico de la forma amorfa sólida (por ejemplo, ciclando calor/frío la muestra mediante calorimetría de barrido diferencial hasta 245°).

Los procesos de la presente invención también pueden comprender la adición de semillas cristalinas de la forma cristalina de la invención.

En un aspecto, la presente invención proporciona la forma cristalina de la invención cuando se fabrica por un proceso de acuerdo con la invención.

Como se ha mencionado anteriormente, la forma cristalina de la presente invención tiene una serie de aplicaciones terapéuticas, particularmente en el tratamiento de enfermedades o afecciones mediadas por la

calicreína plasmática.

Por consiguiente, la presente invención proporciona la Forma 1 del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida, como se ha definido anteriormente, para su uso en terapia. También se divulga el uso de una forma cristalina de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida, como se ha definido anteriormente en la presente, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por calicreína plasmática. En un aspecto preferido de la divulgación, la forma cristalina es la Forma 1.

La presente invención también proporciona la Forma 1 del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida, como se ha definido anteriormente en la presente, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o afección mediada por calicreína plasmática.

También se divulga un método de tratamiento de una enfermedad o afección mediada por calicreína plasmática, dicho método comprendiendo administrar a un mamífero con necesidad de dicho tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de una forma cristalina de clorhidrato N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida, como se ha definido anteriormente en la presente. En un aspecto preferido de la divulgación, la forma cristalina es la Forma 1.

En un aspecto, la enfermedad o afección mediada por calicreína plasmática se selecciona entre agudeza visual deteriorada, retinopatía diabética, edema macular diabético, angioedema hereditario, diabetes, pancreatitis, hemorragia cerebral, nepropatía, cardiomiopatía, neuropatía, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis, inflamación, choque séptico, hipotensión, cáncer, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, coagulación intravascular diseminada, cirugía de bypass cardiopulmonar y hemorragia de cirugía postoperatoria.

En un aspecto, la enfermedad o afección mediada por la calicreína plasmática es la permeabilidad vascular retiniana asociada con la retinopatía diabética o el edema macular diabético.

En el contexto de la presente invención, las referencias en la presente a "tratamiento" incluyen referencias a tratamiento curativo, paliativo y profiláctico, a menos que haya indicaciones específicas de lo contrario. Los términos "terapia", "terapéutico" y "terapéuticamente" deben interpretarse de la misma manera.

La forma cristalina de la presente invención puede administrarse sola o en combinación con uno o más de otros fármacos. Generalmente, se administrará como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "excipiente" se usa en la presente para describir cualquier ingrediente distinto del compuesto(s) de la invención que puede impartir una característica o funcional (es decir, control de la velocidad de liberación del fármaco) y/o una no funcional (es decir, auxiliar de procesamiento o diluyente) característico para las formulaciones. La elección del excipiente dependerá en gran medida de factores como el modo particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y estabilidad, y la naturaleza de la forma de dosificación.

En otro aspecto, los compuestos de la presente invención pueden administrarse en combinación con tratamiento láser de la retina. La combinación de la terapia láser con inyección intravítrea de un inhibidor de VEGF para el tratamiento del edema macular diabético es conocida (Elman M, Aiello L, Beck R, et al. " Elman M, Aiello L, Beck R, et al. "Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema" .Ophthalmology. 27 de abril de 2010).

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración de la forma cristalina de la presente invención y los métodos para su preparación serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Tales composiciones y métodos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19ª Edición (Mack Publishing Company, 1995).

Para la administración a pacientes humanos, la dosis diaria total de la forma cristalina de la invención está típicamente en el intervalo de 0,01 mg y 1000 mg, o entre 0,1 mg y 250 mg, o entre 1 mg y 50 mg, dependiendo, por supuesto, del modo de administración. Si se administra mediante inyección intravítrea, se prevé una dosis inferior de entre 0,0001 mg (0,1 µg) y 0,2 mg (200 µg) por ojo, o entre 0,0005 mg (0,5 µg) y 0,05 mg (50 µg) por ojo.

La dosis diaria total puede administrarse en dosis individuales o divididas y, a discreción del médico, puede quedar fuera del intervalo típico proporcionado en la presente. Estas dosificaciones se basan en un sujeto humano promedio que tiene un peso de aproximadamente 60 kg a 70 kg. El médico será capaz de determinar fácilmente las dosis para los sujetos cuyo peso está fuera de este intervalo, como los bebés y los ancianos.

Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende la Forma 1 del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida, como se ha definido anteriormente en la presente, y un portador, diluyente o excipiente

farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse tópicamente (por ejemplo, al ojo, la piel o el pulmón y/o a las vías respiratorias) en forma de, por ejemplo, cremas, suspensiones, aerosoles de heptafluoroalcano (HFA) y formulaciones de polvo seco; o sistémicamente, por ejemplo, mediante administración oral en forma de comprimidos, cápsulas, polvos o gránulos; o mediante administración parenteral en forma de suspensiones; o mediante administración subcutánea; o mediante administración rectal en forma de supositorios; o transdérmicamente

En una realización de la invención, el ingrediente activo se administra oralmente. La administración oral puede implicar la deglución, de tal manera que el compuesto se introduzca en el tracto gastrointestinal, y/o la administración bucal, lingual o sublingual por la cual el compuesto se introduce en el torrente sanguíneo directamente desde la boca.

Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen tapones sólidos, micropartículas sólidas, semisólidos y líquidos (que incluyen fases múltiples o sistemas dispersos) como comprimidos; cápsulas blandas o duras que contienen multi-o nanopartículas, líquidos, emulsiones o polvos; grajeas (incluyendo las rellenas de líquido); gomas; geles; formas de dosificación de dispersión rápida; películas; óvulos; espráis; y parches bucales/mucoadhesivos.

Las formulaciones adecuadas para administración oral también pueden diseñarse para administrar la forma cristalina de una manera de liberación inmediata o de una manera de velocidad sostenida, en donde el perfil de liberación puede retrasarse, pulsarse, controlarse, mantenerse o retrasarse y mantenerse o modificarse de tal manera que optimice la eficacia terapéutica de la forma cristalina mencionada. Los medios para administrar compuestos de una manera de velocidad sostenida son conocidos en la técnica e incluyen polímeros de liberación lenta que pueden formularse con los compuestos mencionados para controlar su liberación.

Los ejemplos de polímeros que mantienen la velocidad incluyen polímeros degradables y no degradables que pueden usarse para liberar los compuestos mencionados por difusión o una combinación de difusión y erosión del polímero. Ejemplos de polímeros de velocidad sostenida incluyen hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, alcohol polivinílico, polivinil pirrolidona, goma xantana, polimetacrilatos, óxido de polietileno y polietilenglicol.

Las formulaciones líquidas (incluyendo fases múltiples y sistemas dispersos) incluyen suspensiones. Tales formulaciones pueden presentarse como rellenos en cápsulas blandas o duras (hechas, por ejemplo, de gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa) y comprenden típicamente un portador, por ejemplo, agua, etanol, polietilenglicol, propilenglicol, metilcelulosa o un aceite adecuado, y uno o más agentes emulsionantes y/o agentes de suspensión. Las formulaciones líquidas también pueden prepararse mediante la reconstitución de un sólido, por ejemplo, de una bolsita.

La forma cristalina de la invención también puede usarse en formas de dosificación de disolución rápida y disgregación rápida como las descritas en Liang and Chen, Expert Opinion in Therapeutic Patents, 2001, 11 (6), 981-986.

La formulación de comprimidos se trata en Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 1, por H. Lieberman y L. Lachman (Marcel Dekker, Nueva York, 1980).

La invención se ilustrará ahora a través de los siguientes ejemplos no limitativos. Cualquier ejemplo que caiga fuera del alcance de las reivindicaciones adjuntas se proporciona solo con propósitos de referencia. En los ejemplos se presentan las siguientes figuras:

Figura 1: Patrón de difracción en polvo de rayos X de la Forma 1 de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida.

Figura 2: Espectro IR de la Forma 1 de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida.

Figura 3: Termógrafo DSC de la Forma 1 clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida.

Figura 4: Isotermas de sorción de vapor gravimétrico (sorción, desorción y sorción) de la Forma 1 de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida.

Figura 5: Patrón de difracción en polvo de rayos X de la Forma 2 de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida.

Figura 6: Termógrafo DSC de la Forma 2 de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida.

Figura 7: Muestra el efecto inhibitor del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida (etiquetado como "Compuesto de Prueba") y CH-3457 (control positivo, inhibidor de calcireína plasmática) sobre RVP estimulado por CA-I en ratas

Sprague Dawley.

Figura 8: Muestra las concentraciones de tejido ocular de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida (etiquetado como "Compuesto de Prueba") después de la administración IVT de 4,2 µg/ml (210 ng/ojo).

5

Detalles Experimentales Generales

Se registraron los espectros de ¹H NMR en un espectrómetro Brucker Avance III (400 MHz) con referencia al solvente deuterio y a temperatura ambiente.

10

Los iones moleculares se obtuvieron usando LCMS que se llevó a cabo usando una columna Chromolith Speedrod RP-18e, 50 x 4,6 mm, con un gradiente lineal del 10% al 90% de HCO₂H/MeCN al 0,1% en HCO₂H/H₂O al 0,1% durante 11 minutos, caudal de 1,5 ml/min. Los datos se recogieron usando un espectrómetro de masas Thermofinnigan Surveyor MSQ con ionización por electropulverización junto con un sistema Thermofinnigan Surveyor LC.

15

Los nombres químicos se generaron usando el software Autonom proporcionado como parte del paquete de dibujo ISIS de MDL Information Systems.

20

Todos los solventes y reactivos comerciales se usaron tal como se recibieron.

Los espectros de infrarrojos se midieron usando un sistema ajustado a una configuración de absorbancia estándar, con muestras preparadas con bromuro de potasio, y escaneadas de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹.

25

Los patrones de difracción de polvo de rayos X se recogieron en un difractor PANalytical usando radiación Cu K α (45 kV, 40 mA), goniómetro, θ - θ , espejo de enfoque, rendija de divergencia (1/2"), rendijas soller tanto en el haz incidente como en el divergente (4 mm) y un detector PIXcel. El software usado para la recogida de datos fue X'Pert Data Collector, versión 2.2f y los datos se presentaron usando X'Pert Data Viewer, versión 1.2d.

30

Los patrones de XRPD se adquirieron bajo condiciones ambientales a través de una etapa de muestra de lámina de transmisión (poliimida - Kapton, película de 12,7 µm de grosor) bajo condiciones ambientales usando un PANalytical X'Pert PRO. El intervalo de recogida de datos fue 2.994 - 35° θ con una velocidad de escaneo continuo de 0.202004°s⁻¹.

35

Los datos de DSC se recogieron en un PerkinElmer Pyris 4000 DSC equipado con un soporte de muestras de 45 posiciones. El instrumento fue verificado para calibración de energía y temperatura usando indio certificado. Se colocó una cantidad predefinida de la muestra, 0,5-3,0 mg, en una bandeja de aluminio perforado con alfileres y se calentó a 20° C.min⁻¹ de 30 a 350° C, o se varió según lo dictara la experimentación. Se mantuvo una purga de nitrógeno seco a 60 ml.min⁻¹ sobre la muestra. El control del instrumento, adquisición de datos y análisis se realizaron con Pyris Software v9.0.1.0203.

40

Clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-ohenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-oenil)-etil]-benzamida (Forma 1)

45 Método

A. Éster bencilico de ácido {(S)-1-[4-(terc-butoxicarbonilamino-metil)-bencilcarbamoil]-2-feniletíl}-carbámico

50

Se disolvió éster 2,5-dioxo-pirrolidin-1-ilo de ácido (S)-2-benciloxicarbonilamino-3-fenil-propiónico (4,25 g, 10,72mmol) en CH₂Cl₂ (100 ml). Esta solución se enfrió a 0° C. Se añadió 1-(N-Boc-Aminometil)-4-(aminometil) benceno (2,79 g, 11,79 mmol) seguido por trietilamina (3,25 g, 32,16 mmoles). Después de 18 horas a 0° C a temperatura ambiente la mezcla de la reacción se diluyó con cloroformo (100 ml) y se lavó con NaHCO₃ (1x30 ml), agua (1x30 ml), salmuera (1x30 ml), se secó (Na₂SO₄) se evaporó al vacío dando un aceite amarillo. El residuo se trituró con éter de petróleo (60-80° C) y EtOAc para dar un sólido blanco identificado como éster bencilico del ácido {(S)-1-[4-(terc-butoxicarbonilamino-metil)-bencilcarbamoil]-2-fenil-etil}-carbámico (3,88 g, 7,49 mmol, 70%). [M+H]⁺ = 518.28, 540.32 (M+Na).

55

B. Éster terc-butílico de ácido {4-[(S)-2-amino-3-fenil-propionilamino]-metil}-bencil-carbámico

60

Se disolvió éster bencilico de ácido {(S)-1-[4-(terc-butoxicarbonilamino-metil)-bencilcarbamoil]-2-fenil-etil}-carbámico (3,66 g, 7,08 mmol) en metanol (200 ml). Esta solución se hidrogenó sobre Pd/C al 10% (500 mg) a presión atmosférica y temperatura ambiente durante una hora, después de lo cual se filtró el catalizador a través de celite y se lavó el residuo con metanol (30 ml), los filtrados combinados se evaporaron al vacío para dar un sólido blanco identificado como terc-butil éster de ácido {4-[(S)-2-amino-3-fenil-propionilamino]-metil}-bencil-carbámico (2,627 g, 6,85 mmol, 97%).

65

[M+H]⁺ = 384.37

C. Ácido (R)-2-amino-3-(4-etoxi-fenil)-propiónico

5 Se disolvió ácido (R)-2-butoxicarbonilamino-3-(4-etoxi-fenil)-propiónico (4,0 g, 12,93 mmol) en HCl 4 M en dioxano (150 ml). Después de una hora a temperatura ambiente, el solvente se eliminó al vacío para dar un sólido blanco identificado como clorhidrato de ácido (R)-2-amino-3-(4-etoxi-fenil)-propiónico (3,18 g, 12,9 mmol, 100%) .
[M+H]⁺ = 210.18

10 **D. Ácido (R)-2-benciloxycarbonilamino-3-(4-etoxi-fenil)-propiónico**

15 Se disolvió clorhidrato de ácido (R)-2-amino-3-(4-etoxi-fenil)-propiónico (3,17 g, 12,9 mmol) en una solución de hidróxido de sodio (1,14 g, 28,38 mmol) en agua (100 ml). Se añadió cloroformiato de bencilo (2,64 g, 15,48 mmol) en dioxano (100 ml). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas, después de lo cual el dioxano se eliminó al vacío. El residuo acuoso se lavó con éter dietílico (1x 100 ml), se acidificó a pH 2 con HCl 1M y se extrajo con cloroformo (2x200 ml). Los extractos combinados se lavaron con agua (1x50 ml), salmuera (1x50 ml), se secaron (Na₂SO₄) y se evaporaron al vacío para dar un sólido blanco identificado como ácido (R)-2-benciloxycarbonilamino-3-(4-etoxi-fenil)-propiónico (4,0 g, 11,65 mmol, 90%).
[M+H]⁺ = 344.20.

20 **E. Éster bencilico de ácido [(R)-1-((S)-1-[4-(terc-butoxicarbonilamino-metil)-bencilcarbamoil]-2-fenil-etilcarbamoil)-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-carbámico**

25 Se disolvió éster terc-butílico de ácido [4-(((S)-2-amino-3-fenil-propionilamino)-metil)-bencil]-carbámico (2,63 g, 6,86mmol) en CH₂Cl₂ (100 ml) y DMF (5 ml). Esta solución se enfrió a 0° C. Se añadió ácido (R)-2-benciloxycarbonilamino-3-(4-etoxi-fenil)-propiónico (2,59 g, 7,54 mmol) seguido por HOBt (1,11 g, 8,23 mmol) y trietilamina (2,08 g, 20,57 mmol). Luego se añadió carbodiimida soluble en agua (1,45 g, 7,54 mmol). Después de 18 horas a 0° C a temperatura ambiente la mezcla de la reacción se diluyó con cloroformo (200 ml) y se lavó con NaHCO₃ (1x50 ml), agua (1x50 ml), salmuera (1x50 ml), se secó (Na₂SO₄) y se evaporó al vacío dando un aceite amarillo. El residuo se trituró con acetato de etilo y éter de petróleo (60-80° C) para dar un sólido blanco identificado como éster bencilico de ácido [(R)-1-((S)-1-[4-(terc-butoxicarbonilamino-metil)-bencilcarbamoil]-2-fenil-etilcarbamoil)-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-carbámico (3,55 g, 5,01 mmol, 73%).
[M+H]⁺ = 70934.

35 **F. Éster terc-butílico de ácido [4-(((S)-2-[(R)-2-amino-3-(4-etoxi-fenil)-propionilamino]-3-fenil-propionilamino)-metil)-bencil]-carbámico**

40 Se disolvió éster bencilico de ácido [(R)-1-((S)-1-[4-(terc-butoxicarbonilamino-metil)-bencilcarbamoil]-2-fenil-etilcarbamoil)-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-carbámico (3,55 g, 5,00 mmol) en metanol (200 ml). Esta solución se hidrogenó sobre Pd al 10%/C (500 mg) a presión atmosférica y temperatura ambiente durante una hora, después de lo cual se filtró el catalizador a través de Celite y se lavó el residuo con metanol (30 ml), los filtrados combinados se evaporaron a vacío para dar un sólido blanco identificado como éster terc-butílico de ácido [4-(((S)-2-[(R)-2-amino-3-(4-etoxi-fenil)-propionilamino]-3-fenil-propionilamino)-metil)-bencil]-carbámico (2,8 g, 4,87 mmol, 97%).
[M+H]⁺ = 575.37.

45 **G. Éster terc-butílico de ácido [4-(((S)-2-[(R)-2-benzoilamino-3-(4-etoxi-fenil)-propionilamino]-3-fenil-propionilamino)-metil)-bencil]-carbámico**

50 Se disolvió éster terc-butílico de ácidos [4-(((S)-2-[(R)-2-amino-3-(4-etoxi-fenil)-propionilamino]-3-fenil-propionilamino)-metil)-bencil]-carbámico (3,45 g, 5,99 mmol) en diclorometano (150 ml). Se añadió cloruro de benzoilo (1,01 g, 7,19 mmol) seguido de trietilamina (1,82 g, 17,98 mmol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas y se diluyó con CHCl₃ (150 ml), esta solución se lavó con KHSO₄ 0,3M (1x50 ml), NaHCO₃ saturado (1x50 ml), agua (1x50 ml), salmuera (1x50 ml), se secó (Na₂SO₄) y se evaporó al vacío. El residuo se trituró con éter de petróleo (60-80° C) y EtOAc para dar un sólido blanco identificado como éster terc-butílico de ácido [4-(((S)-2-[(R)-2-benzoilamino-3-(4-etoxi-fenil)-propionilamino]-3-fenil-propionilamino)-metil)-bencil]-carbámico (3,06 g, 4,51 mmol, 75%).
[M+H]⁺ = 679.34.

60 **H. Clorhidrato de N-[(R)-1-((S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil)-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida (Forma 1)**

65 Se agitó éster terc-butílico de ácido [4-(((S)-2-[(R)-2-benzoilamino-3-(4-etoxi-fenil)-propionilamino]-3-fenil-propionilamino)-metil)-bencil]-carbámico (10,0 g, 14,7 mmol) en cloruro de hidrógeno/acetato de etilo (3,7 M, 250 ml) a temperatura ambiente. Después de dos horas, la mezcla se filtró, se lavó con acetato de etilo (2 x 50 ml) y se secó para proporcionar un sólido (7,9 g). Una porción del sólido (0,106 g) se suspendió en una mezcla de acetonitrilo (2,1 ml) y agua (0,32 ml), se agitó y se calentó a 77° C. Se añadieron alícuotas adicionales de agua (0,05 ml)

sucesivamente a la mezcla hasta que se observó la disolución. La mezcla agitada se enfrió luego a temperatura ambiente durante la noche. El sólido resultante se aisló por filtración y se secó al vacío a 40° C para proporcionar clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxifenil)-etil]-benzamida (Forma 1) (0,067 g, 3,41 mmol, 81%).

5 $[M+H]^+ = 579.34$

1H NMR: (CD₃OD), 1.40 (3H, t, J= 6.9 Hz), 2.91-2.99 (3H, m), 3.14-3.19 (1H, m), 4.02 (2H, q, J= 6.9 Hz), 4.08 (2H, s), 4.41 (1H, d, J= 15.5 Hz), 4.51 (1H, d, J= 15.5 Hz), 4.66-4.69 (2H, m), 6.82 (2H, d, J= 8.4 Hz), 7.10 (2H, d, J= 8.2 Hz), 7.18-7.20 (2H, m), 7.25-7.38 (7H, m), 7.44-7.59 (3H, m), 7.72 (2H, d, J= 7.8 Hz).

10 En la Figura 1 se muestra un difractograma XRPD de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida (Forma 1).

Tabla de posición de picos:

Pos. [°2Th.]	Altura [cts]	FWHM [°2Th.]	espaciado d [Å]	Rel. Int. [%]
5.1017	1329.67	0.1023	17.32212	100.00
5.9073	268.87	0.1023	14.96140	20.22
7.8360	212.97	0.1279	11.28276	16.02
10.2760	325.77	0.1279	8.60856	24.50
10.6870	227.90	0.1023	8.27835	17.14
11.8572	67.00	0.1535	7.46389	5.04
12.9566	230.78	0.1535	6.83291	17.36
14.8739	293.35	0.1279	5.95615	22.06
15.4578	148.51	0.1023	5.73245	11.17
15.7597	243.28	0.1535	5.62332	18.30
16.5908	488.41	0.1535	5.34347	36.73
17.8537	439.46	0.1279	4.96822	33.05
18.1443	1305.68	0.1535	4.88931	98.20
18.6294	1316.97	0.1535	4.76308	99.05
19.5704	643.93	0.1279	4.53612	48.43
20.0346	491.15	0.1791	4.43206	36.94
20.6761	789.56	0.1535	4.29598	59.38
20.9345	644.58	0.1279	4.24353	48.48
21.5959	208.07	0.2047	4.11503	15.65
22.1545	308.04	0.1791	4.01253	23.17
22.5745	392.23	0.1791	3.93883	29.50
23.3449	238.25	0.1279	3.81055	17.92
23.7157	786.12	0.1791	3.75181	59.12
23.9647	892.17	0.1535	3.71338	67.10
24.5150	156.93	0.2047	3.63125	11.80
25.5989	359.73	0.1791	3.47991	27.05
26.6668	341.96	0.2303	3.34294	25.72
27.6988	394.43	0.2047	3.22068	29.66
28.1867	71.81	0.1535	3.16604	5.40
28.9888	296.12	0.1279	3.08023	22.27
29.5799	56.04	0.2047	3.02001	4.21
30.5389	38.86	0.1535	2.92733	2.92
31.4200	71.21	0.1535	2.84722	5.36
31.8195	63.64	0.1535	2.81237	4.79
33.0388	37.25	0.1535	2.71132	2.80
34.1843	48.19	0.3070	2.62305	3.62
34.8271	94.43	0.2047	2.57609	7.10

65 Espectroscopia infrarroja

El espectro IR de la Forma 1 comprende picos en longitudes de onda de aproximadamente 3274, 3027, 2976, 2928, 1651, 1636, 1536, 1512, 1243 y 703 cm^{-1} . El espectro se presenta en la Figura 2.

5 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los datos de DSC para la Forma 1 se muestran en la Figura 3.

10 Sorción Gravimétrica de Vapor

Las isotermas de sorción se obtuvieron usando un analizador de sorción de humedad Hiden Isochema (modelo IGAsorp), controlado por IGAsorp Systems Software V6.50.48. La muestra se mantuvo a una temperatura constante (25° C) por los controles del instrumento. La humedad se controló mezclando corrientes de nitrógeno seco y húmedo, con un flujo total de 250 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Se verificó el instrumento para determinar el contenido de humedad relativa midiendo tres soluciones de sal de Rotronic calibradas (10-50-88%). Se monitorizó el cambio de peso de la muestra como una función de la humedad mediante una microbalanza (precisión +/- 0,005 mg). Se colocó una cantidad definida de muestra en una cesta de acero inoxidable con malla tarada en condiciones ambientales. Un ciclo experimental completo consistió en tres escaneos (sorción, desorción y sorción) a una temperatura constante (25° C) y 10% de intervalos de RH durante un intervalo del 0-90% (60 minutos para cada nivel de humedad).

Los datos de GVS para la Forma 1 se muestran en Figura 4.

25 Clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida (Forma 2)

25 Método

Se suspendió éster terc-butílico de ácido [4-((S)-2-[(R)-2-benzoilamino-3-(4-etoxi-fenil)-propionilamino]-3-fenil-propionilamino)-metil]-bencil]-carbámico (5,0 g) en acetato de etilo (15 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno. Se cargó una solución de cloruro de hidrógeno seco en acetato de etilo (3,7 M, 60 ml) a la suspensión y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de agitar durante un total de 2 horas, la suspensión resultante se filtró y se lavó con acetato de etilo (2 x 25 ml). El sólido se secó al vacío durante 60 horas a 40° C para dar clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida como un sólido blanquecino (4,14 g, 91% de rendimiento). Se selló una alícuota (6 mg) en una bandeja de aluminio perforada con alfileres. La bandeja se calentó usando un ciclo térmico de 30° C a 256° C a 20° C por minuto y luego se enfrió de nuevo a 30° C (50° C por minuto). Se mantuvo un caudal de nitrógeno de 60 ml/min sobre la muestra durante el ciclo. El aislamiento del sólido blanco (6 mg) de la bandeja de DSC produjo clorhidrato de [(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida (Forma 2).

En la Figura 5 se muestra un difractograma XRPD de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida (Forma 2).

Tabla de posición de picos:

Pos. [° 2Th.]	Altura [cts]	FWHM [° 2Th.]	espaciado d [Å]	Rel. Int. [%]
3.3070	1075.86	0.0768	26.71753	39.80
4.6799	950.11	0.1023	18.88250	35.15
5.6951	1856.24	0.0768	15.51845	68.67
5.9805	1039.95	0.1023	14.77853	38.47
6.6686	1014.97	0.0768	13.25511	37.55
7.3582	369.02	0.1279	12.01428	13.65
7.8208	487.46	0.1023	11.30472	18.03
8.2936	899.00	0.1791	10.66123	33.26
8.4475	806.49	0.0768	10.46733	29.83
8.9889	330.16	0.1023	9.83805	12.21
9.4038	486.45	0.1023	9.40489	18.00
10.0299	729.01	0.1023	8.81923	26.97
10.4931	624.51	0.1791	8.43091	23.10
10.9988	975.24	0.1023	8.04442	36.08
11.7536	245.09	0.1023	7.52941	9.07
13.1421	877.95	0.1279	6.73688	32.48

(continuación)

	Pos. [° 2Th.]	Altura [cts]	FWHM [° 2Th.]	espaciado d [Å]	Rel. Int. [%]
5	14.1298	189.58	0.2047	6.26812	7.01
	15.3505	210.21	0.1535	5.77229	7.78
	15.7802	310.59	0.2047	5.61607	11.49
	16.7562	812.56	0.1023	5.29108	30.06
10	16.9866	1130.90	0.1279	5.21984	41.83
	17.3077	810.26	0.1279	5.12370	29.97
	18.0388	1199.00	0.3070	4.91767	44.35
	18.3860	1333.07	0.0768	4.82559	49.31
15	18.5848	1711.69	0.1279	4.77440	63.32
	18.9114	1053.68	0.1023	4.69267	38.98
	19.7135	945.69	0.1791	4.50353	34.98
	20.2996	767.87	0.2558	4.37480	28.41
20	21.1161	602.32	0.1535	4.20744	22.28
	21.4678	764.85	0.1279	4.13931	28.29
	22.1871	1028.96	0.1279	4.00671	38.06
	22.7211	815.23	0.2558	3.91373	30.16
25	23.4683	678.22	0.2047	3.79080	25.09
	24.3820	1401.49	0.1279	3.65077	51.84
	25.5221	2703.25	0.2047	3.49021	100.00
	26.4725	476.72	0.2047	3.36702	17.63
30	27.4387	294.02	0.4093	3.25062	10.88
	28.1127	1047.80	0.1791	3.17420	38.76
	28.9034	464.66	0.1279	3.08914	17.19
	29.3333	255.04	0.1535	3.04484	9.43
35	30.4339	165.30	0.1535	2.93719	6.12
	31.0871	342.59	0.1248	2.87456	12.67
	31.8915	61.28	0.4992	2.81084	2.27

40 Los datos de DSC para la Forma 2 se muestran en la Figura 6.

Actividad Biológica

45 La capacidad de las formas cristalinas de la invención para inhibir la caliceína plasmática puede determinarse usando el siguiente ensayo biológico:

Determinación del Ki para la caliceína plasmática

50 La actividad inhibidora de la caliceína plasmática *in vitro* se determinó usando métodos publicados estándar (ver, por ejemplo, Johansen et al., Int. J. Tiss. Reac. 1986, 8, 185; Shori et al., Biochem. Pharmacol., 1992, 43, 1209; Stürzebecher et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1992, 373, 1025). Se incubó caliceína plasmática humana (Protogen) a 37° C con el sustrato fluorogénico H-DPro-Phe-Arg-AFC y varias concentraciones del compuesto de prueba. La actividad enzimática residual (velocidad de reacción inicial) se determinó midiendo el cambio en la absorbancia óptica a 410 nm y se determinó el valor Ki para el compuesto de ensayo.

55 Cuando se probó en este ensayo, la Forma 1 mostró una Ki (Pkal humana) de 0,010 µM.

Las formas cristalinas también pueden examinarse para detectar actividad inhibidora contra el enzima relacionado KLK1 usando el siguiente ensayo biológico:

60 Determinación del IC₅₀ para KLK1

65 Se determinó la actividad inhibidora de KLK1 *in vitro* usando métodos publicados estándar (ver, por ejemplo, Johansen et al., Int. J. Tiss. Reac. 1986, 8, 185; Shori et al., Biochem. Pharmacol., 1992, 43, 1209; Stürzebecher et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1992, 373, 1025). Se incubó KLK1 humano (Callbiochem) a 37° C

con el sustrato fluorogénico H-DVal-Leu-Arg-AFC y varias concentraciones del compuesto de prueba. La actividad enzimática residual (velocidad de reacción inicial) se determinó midiendo el cambio en la absorbancia óptica a 410 nm y se determinó el valor de IC₅₀ para el compuesto del ensayo.

5 Cuando se probó en este ensayo, la Forma 1 mostró un IC₅₀ (KLK1 humano) de > 10 µM.

Las formas cristalinas también pueden examinarse para determinar su actividad inhibitora frente a los enzimas relacionados plasmina, trombina, tripsina, Factor Xa y Factor XIIa usando los siguientes ensayos biológicos:

10 **Determinación de la selectividad de la enzima**

Las enzimas serina proteasas humanas plasmina, trombina, tripsina, Factor Xa y Factor XIIa se ensayaron para actividad enzimática usando un sustrato fluorogénico apropiado. La actividad de proteasa se midió monitorizando la acumulación de fluorescencia liberada del sustrato durante 5 minutos. La velocidad lineal del aumento de fluorescencia por minuto se expresó como porcentaje (%) de actividad. El Km para la escisión de cada sustrato se determinó mediante transformación estándar de la ecuación de Michaelis-Menten. Los ensayos de compuestos inhibidores se realizaron a concentración de sustrato Km y las actividades se calcularon como la concentración de inhibidor dando un 50% de inhibición (IC₅₀) de la actividad enzimática no inhibida (100%).

20 Cuando se analizó el clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida en estos ensayos, se obtuvieron los siguientes datos:

IC ₅₀ (nM)				
Trombina	Tripsina	Plasmina	Factor Xa	Factor XIIa
> 40000	10800	3500	> 10000	> 10000

Modelo de Permeabilidad Vascular Retiniana Inducido por Anhidrasa Carbónica I

30 La actividad del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida se ha establecido usando este modelo *in vivo* en rata. Las ratas recibieron una inyección intravítrea (5 µl) de solución salina tamponada con fosfato (PBS), CH-3457 (un control positivo del inhibidor de caliceína plasmática) (10 µM) o clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida ("Compuesto de prueba") (1 µM) en el momento 0. Después de 30 minutos, se dio una segunda inyección intravítrea (5µE) de PBS o CA-I (200 ng/ojo). Después de 15 minutos, se infundió fluoresceína sódica al 10% y se midió la permeabilidad vascular retiniana (RVP) mediante fluorofotometría vítrea 75 minutos después de las inyecciones IVT iniciales. Los datos para el clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxifenil)-etil]-benzamida ("Compuesto de prueba") se presentan en la Figura 7, en la que la línea discontinua inferior indica RVP de referencia después de PBS/PBS y la línea discontinua superior indica la estimulación máxima. La inyección intravítrea de 1 µM de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida sola no tuvo efecto sobre la RVP de referencia en comparación con PBS solo (3,29±0,21 frente a 3,64±0,48). La inyección intravítrea de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida redujo la RVP (estimulado por inyección de CA-I) en un 53±21%.

Farmacocinética

Se realizó un estudio farmacocinético del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida para evaluar la farmacocinética ocular y sistémica después de una dosis de IVT individual en conejos pigmentados (cinturón Holandés). Seis conejos por nivel de dosis recibieron una inyección IVT individual bilateral de 50 µl de un clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etil-carbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida de 4,2 µg/ml (210 ng por ojo) formulado en solución salina tamponada con fosfato. Se sacrificó un conejo en cada punto temporal (4, 8, 24, 48, 96 y 168 horas después de la administración IVT) y se midieron las concentraciones en el tejido ocular de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida en el vítreo, retina/coroides y humor acuoso. Se recogieron muestras de sangre en serie en los conejos supervivientes.

Los datos de concentración en tejido ocular se presentan en la Figura 8, en el que la línea continua para cada concentración de tejido ocular es la media del ojo izquierdo y el derecho de cada conejo. La disminución en las concentraciones en el tejido ocular de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida ("Compuesto de prueba") fue mínimo durante 7 días. Las concentraciones en plasma del clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida tras la administración de IVT fueron inferiores a 1 ng/ml en todos los puntos temporales.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una forma sólida de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida , que presenta por lo menos los siguientes picos de difracción en polvo de rayos X característicos (radiación Cu K α , expresada en grados 2 θ) a 5.1 ± 0.2 , 10.3 ± 0.2 , 10.7 ± 0.2 , 18.1 ± 0.2 y 18.6 ± 0.2 .
- 2.** La forma sólida de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene un patrón de difracción en polvo de rayos X sustancialmente igual al mostrado en la Figura 1.
- 10 **3.** La forma sólida de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 **caracterizada por** un espectro IR que tiene picos expresados en cm^{-1} a 3274 ± 1 , 3027 ± 1 , 2976 ± 1 , 2928 ± 1 , 1651 ± 1 , 1636 ± 1 , 1536 ± 1 , 1512 ± 1 , 1243 ± 1 y 703 ± 1 .
- 15 **4.** La forma sólida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que tiene un espectro IR sustancialmente igual al mostrado en la Figura 2.
- 5.** La forma sólida de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que es un hidrato.
- 20 **6.** La forma sólida de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el hidrato es un monohidrato.
- 7.** Una composición farmacéutica que comprende una forma sólida como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en asociación con un adyuvante, diluyente o portador farmacéuticamente aceptable; en el que dicha composición farmacéutica está en forma de suspensión, comprimido, cápsula, polvo, gránulo o supositorio.
- 25 **8.** Una forma sólida como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en terapia.
- 9.** Una forma sólida como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por la calicreína plasmática; en donde la enfermedad o afección mediada por la calicreína plasmática se selecciona de agudeza visual deteriorada, retinopatía diabética, edema macular diabético, angioedema hereditario, diabetes, pancreatitis, hemorragia cerebral, nepropatía, cardiomiopatía, neuropatía, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis, inflamación, choque séptico, hipotensión, cáncer, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, coagulación intravascular diseminada, y hemorragia de cirugía postoperatoria.
- 30 **10.** La forma sólida de acuerdo con la reivindicación 9 en la que la enfermedad o afección mediada por la calicreína plasmática es retinopatía diabética o edema macular diabético.
- 35 **11.** Una forma sólida como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección mediada por la calicreína plasmática; en donde la enfermedad o afección mediada por calicreína plasmática es permeabilidad vascular retiniana asociada con retinopatía diabética y edema macular diabético y en donde dicha forma sólida se administra en una forma adecuada para inyección en la región ocular de un paciente, en particular, en una forma adecuada para inyección intravítrea.
- 40 **12.** Un proceso para la preparación de una forma sólida como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende cristalizar dicha forma sólida a partir de una mezcla de clorhidrato de N-[(R)-1-[(S)-1-(4-aminometil-bencilcarbamoil)-2-fenil-etilcarbamoil]-2-(4-etoxi-fenil)-etil]-benzamida y un solvente o una mezcla de solventes, en donde la mezcla de solventes es acetonitrilo y agua o acetonitrilo y dimetilsulfóxido, y dicha mezcla se calienta a una temperatura de aproximadamente 75-80° C antes de que se permita que enfíe a temperatura ambiente.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

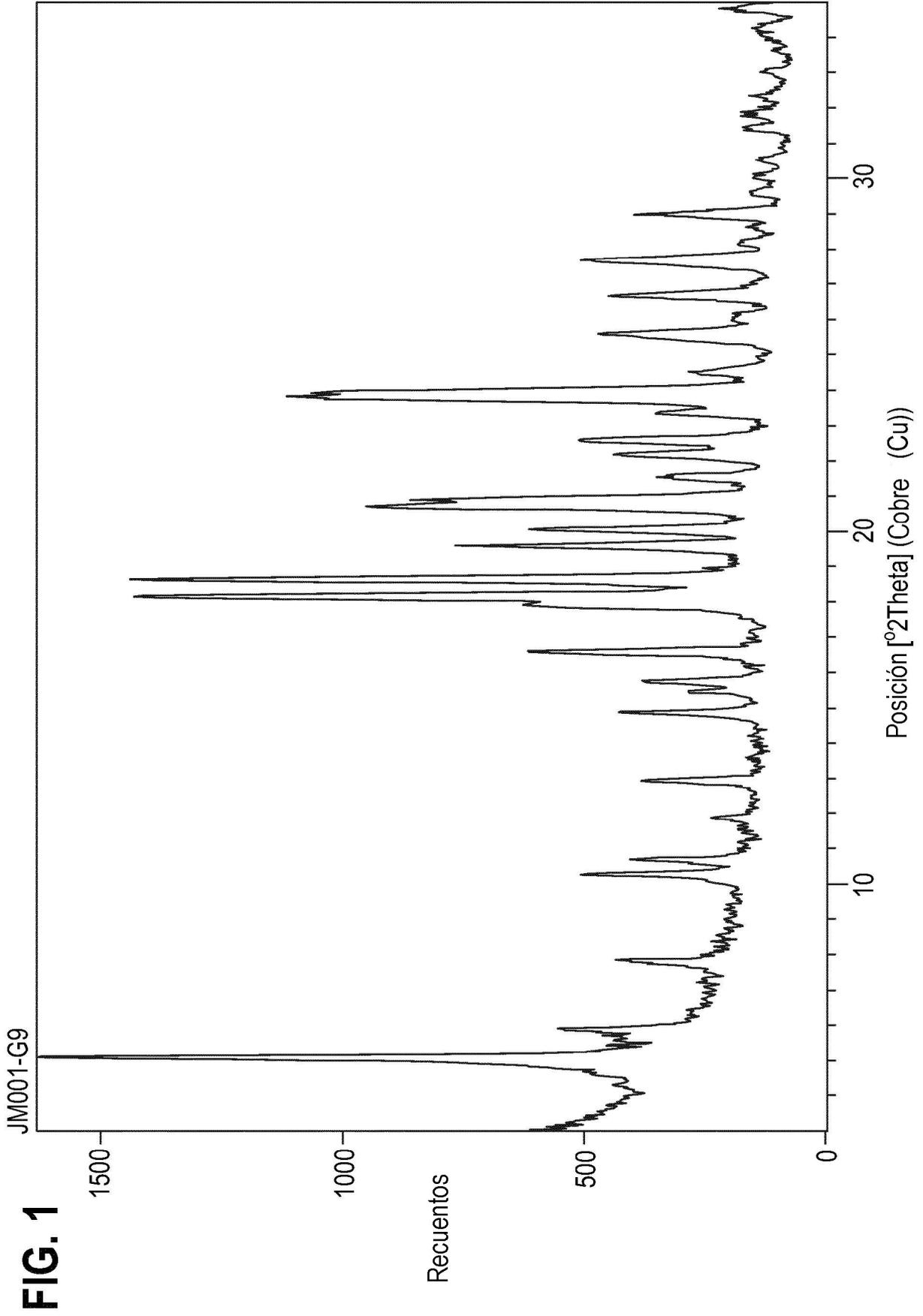
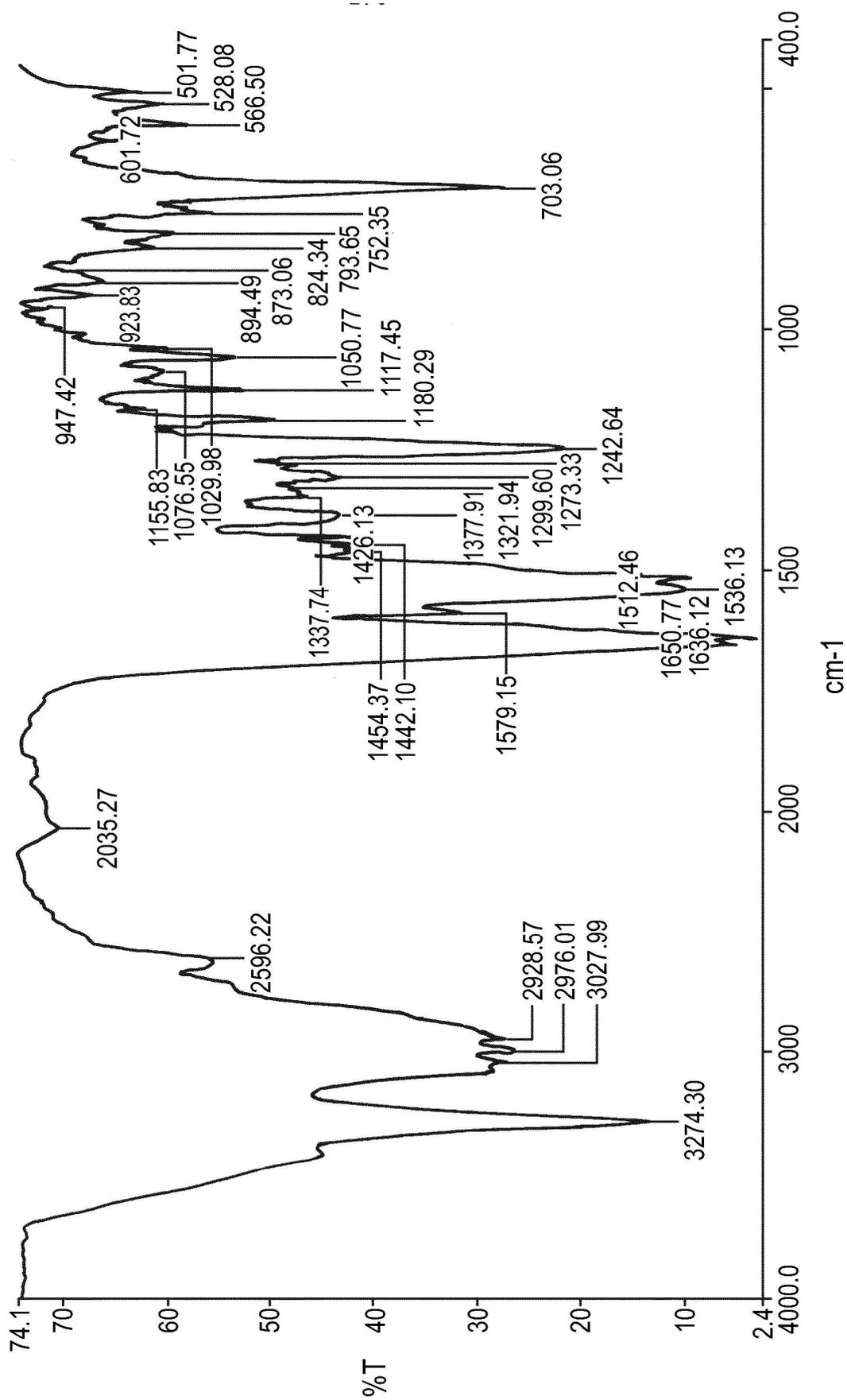


FIG. 2



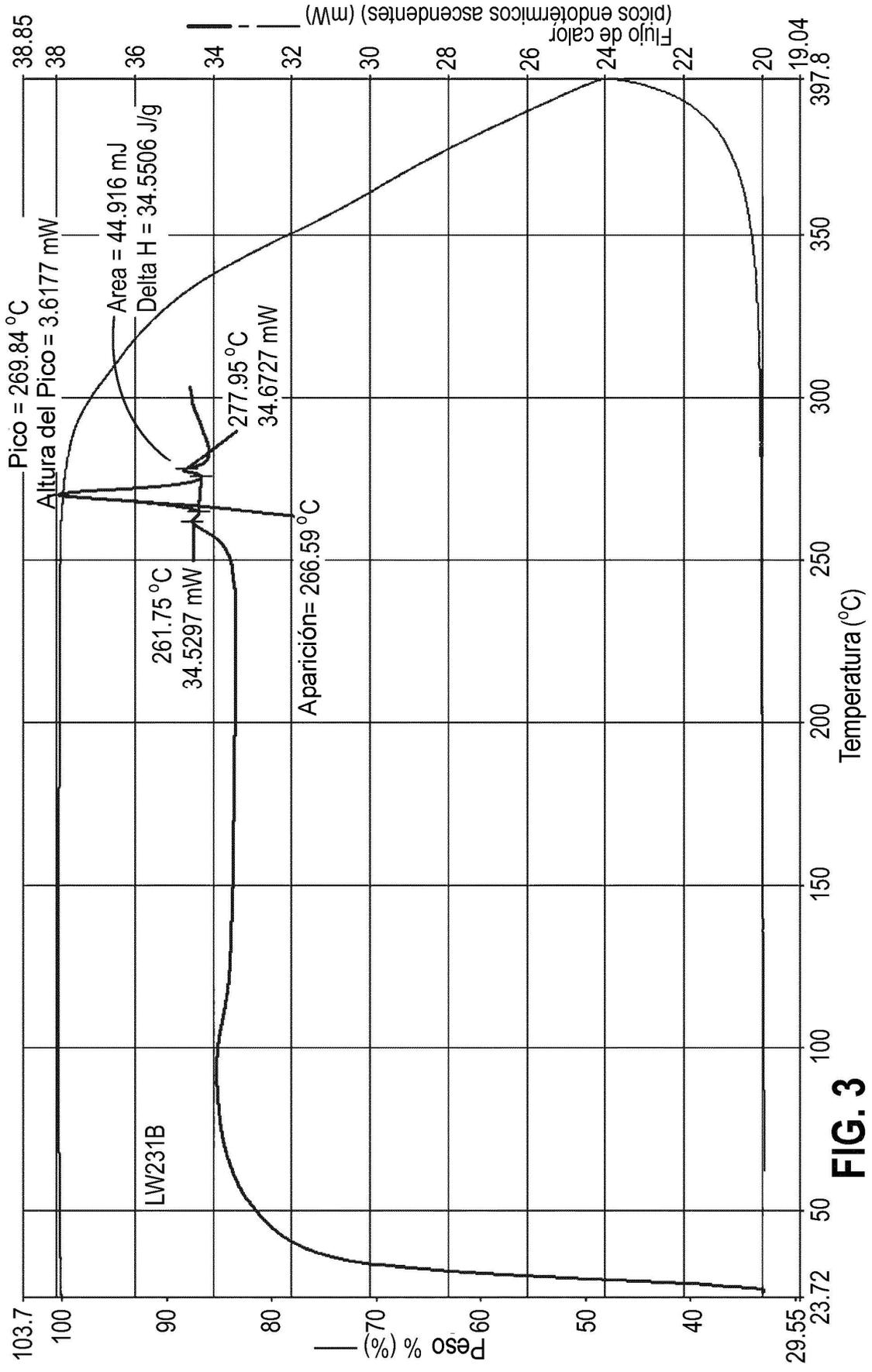


FIG. 3

FIG. 4

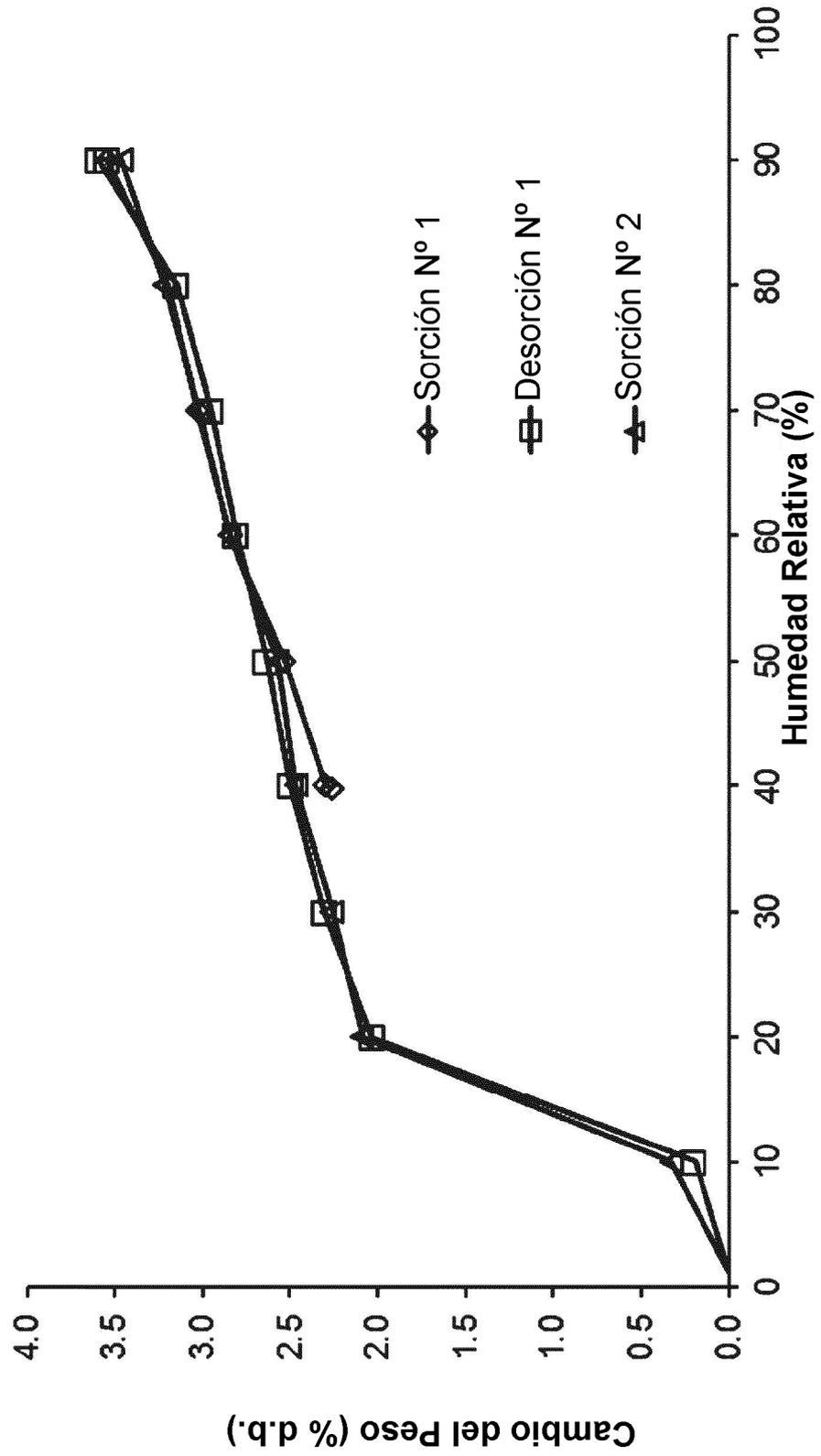
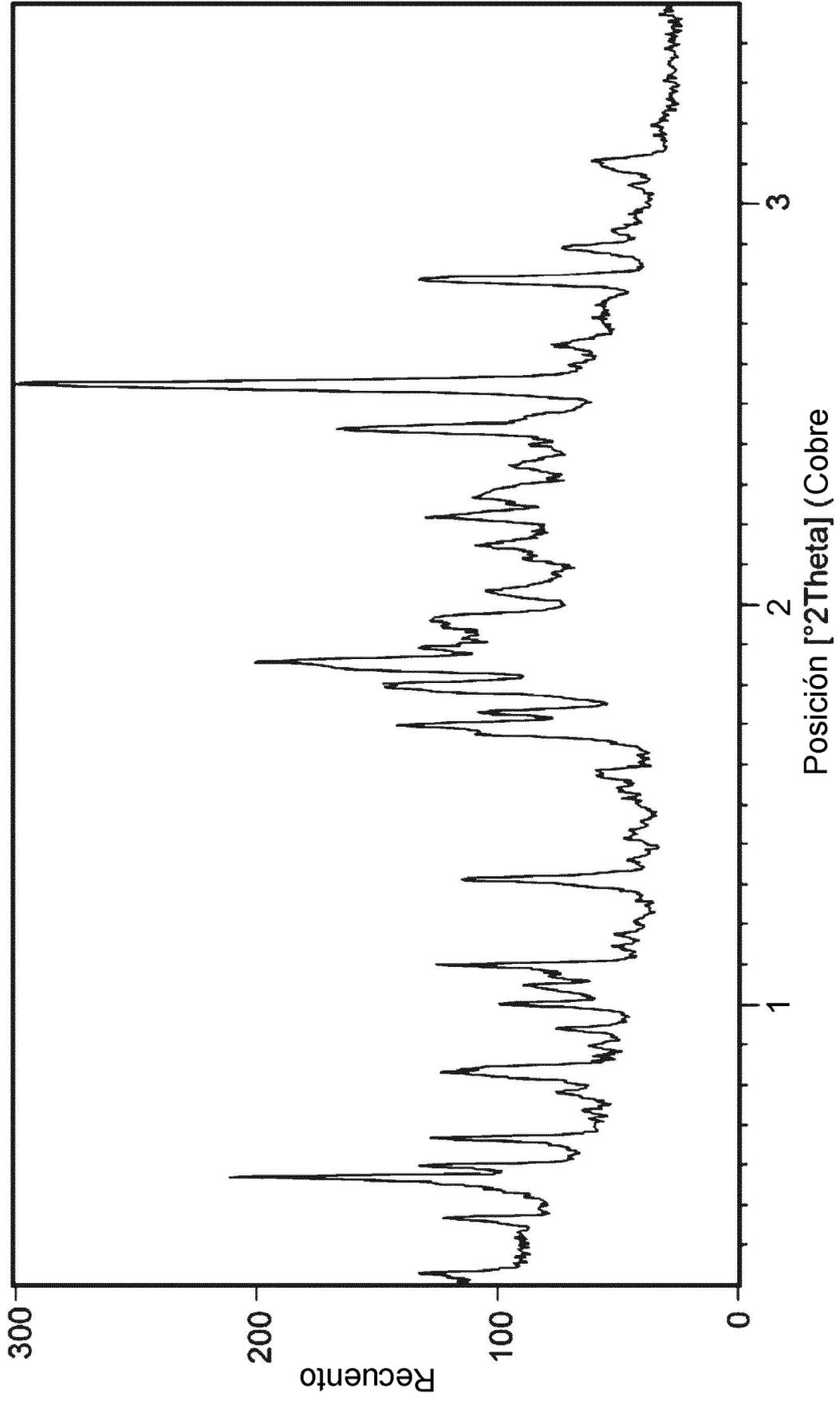


FIG. 5



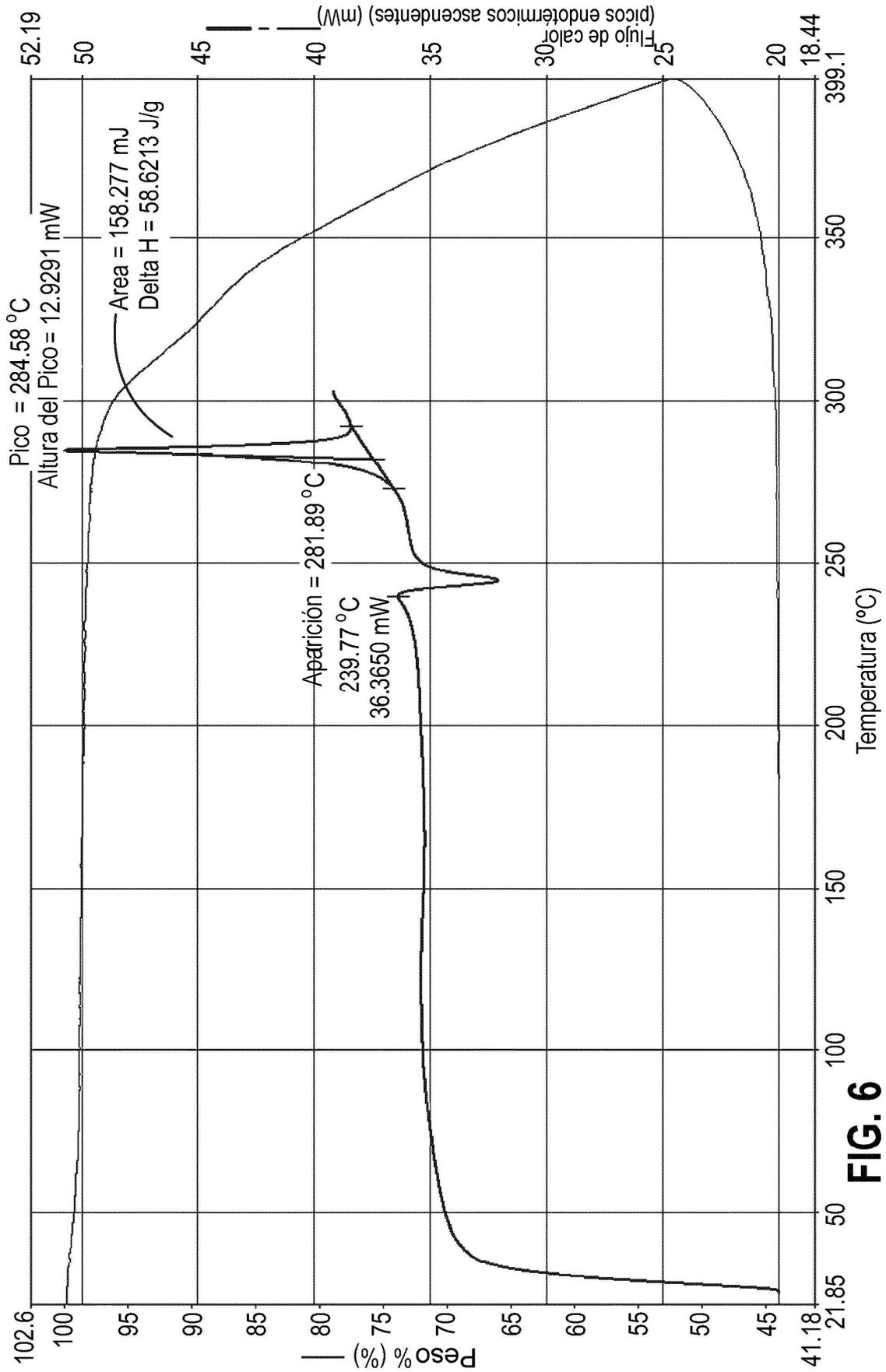


FIG. 6

FIG. 7

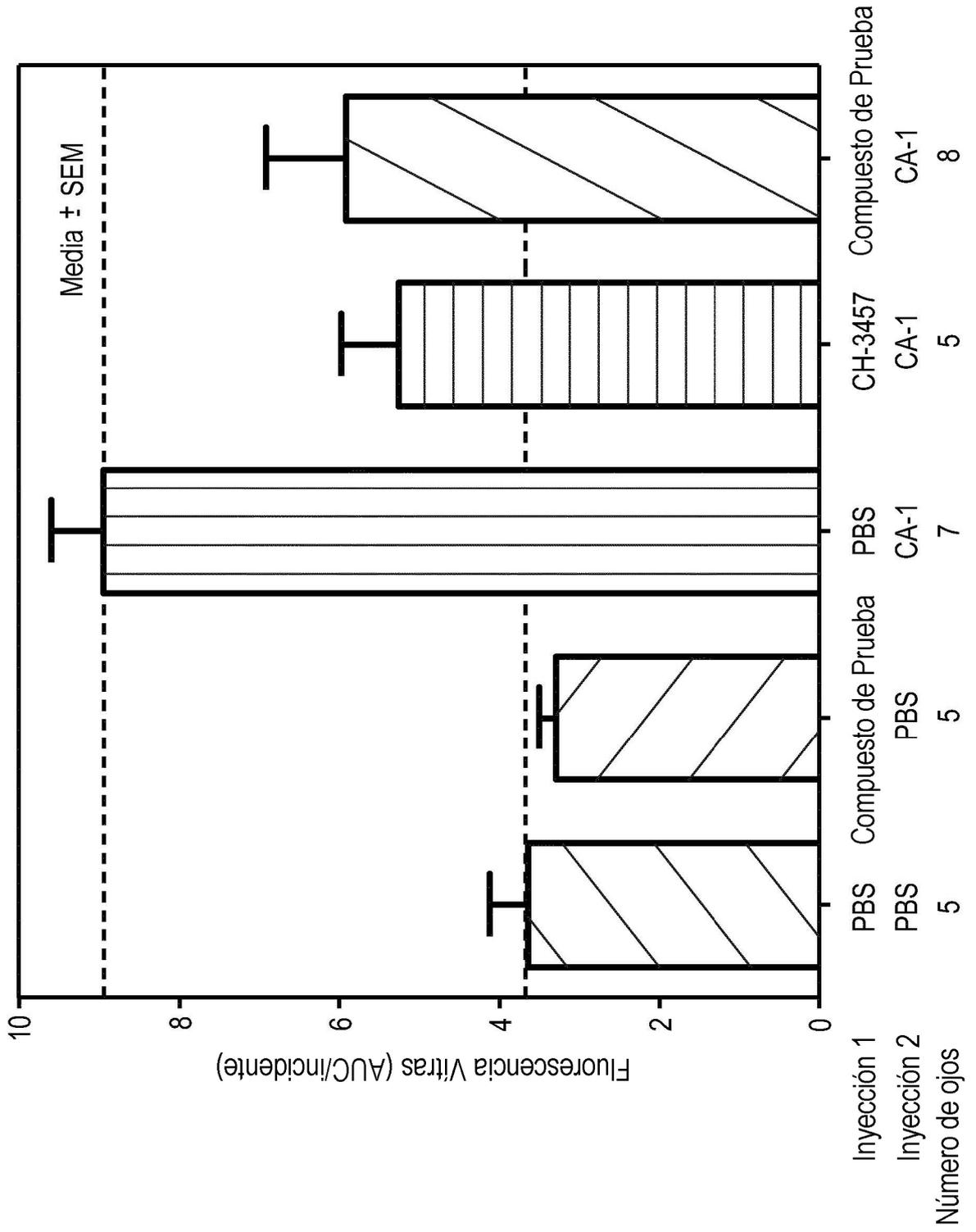


FIG. 8

