

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 297**

51 Int. Cl.:

C07D 217/26 (2006.01)

A61K 31/472 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.01.2014** **PCT/US2014/012780**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.07.2014** **WO14116849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2014** **E 14704030 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018** **EP 2951159**

54 Título: **Formas cristalinas de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético**

30 Prioridad:

24.01.2013 US 201361756361 P

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

19.12.2018

73 Titular/es:

FIBROGEN, INC. (100.0%)
409 Illinois Street
San Francisco, CA 94158, US

72 Inventor/es:

WITSCHI, CLAUDIA;
THOMPSON, MICHAEL D.;
PARK, JUNG MIN y
AREND, MICHAEL P.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 694 297 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 cristalinas de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético

5 ANTECEDENTES

Campo

10 **[0001]** La presente descripción se refiere a formas cristalinas de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A), el proceso de preparación de formas cristalinas del Compuesto A, las composiciones farmacéuticas que las contienen y los métodos de uso de las mismas.

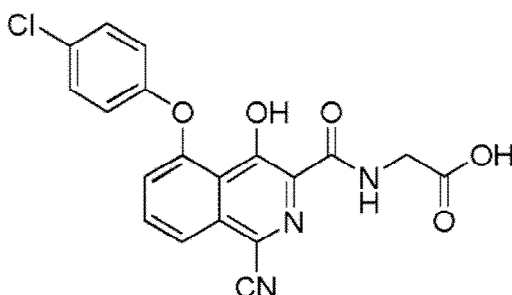
Técnica anterior

15 **[0002]** El ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (de aquí en adelante, Compuesto A) es un potente inhibidor del factor inducible de hipoxia (HIF) hidroxilasa de prolilo. Los inhibidores de la hidroxilasa de prolilo HIF son útiles para aumentar la estabilidad y/o la actividad de HIF, y son útiles para tratar y prevenir trastornos asociados con HIF, como anemia, isquemia e hipoxia. La patente de EE.UU. N°. 7.928.120 describe una familia de compuestos que abarca el Compuesto A, incluidas sus estructuras, síntesis y métodos de uso. El documento WO2009/075826A1 describe el Compuesto A, pero no describe una forma cristalina del mismo.

25 **[0003]** Un compuesto puede existir en una o más formas cristalinas. Las formas cristalinas de una sustancia farmacológica pueden tener diferentes propiedades químicas y físicas, incluyendo el punto de fusión, la reactividad química, la solubilidad, la velocidad de disolución, las propiedades ópticas y mecánicas, la presión de vapor, la higroscopicidad, la forma de las partículas, la densidad, la fluidez y la compatibilidad. Estas propiedades pueden tener un efecto directo en la capacidad de procesar y/o fabricar un compuesto como producto farmacológico. Las formas cristalinas también pueden exhibir diferentes estabilidades y biodisponibilidad. La forma cristalina más estable de un producto farmacológico se elige a menudo durante el desarrollo del fármaco basándose en el potencial mínimo para la conversión a otra forma cristalina y en su mayor estabilidad química. Para garantizar la calidad, la seguridad y la eficacia de un medicamento, es importante elegir una forma cristalina que sea estable, que se fabrique de manera reproducible y que tenga propiedades fisicoquímicas favorables. Por lo tanto, aquí se proporcionan, las formas cristalinas del Compuesto A, que se pueden fabricar como un producto farmacológico, y se pueden usar para tratar y prevenir trastornos asociados con HIF que incluyen afecciones que involucran anemia, isquemia e hipoxia.

35 RESUMEN

40 **[0004]** La presente descripción se refiere a formas cristalinas de Compuesto A y métodos para la preparación de formas cristalinas. El ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) tiene la siguiente estructura:



55 **[0005]** La Forma cristalina 1 del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) se describe en este documento. En una realización, el Compuesto A, Forma 1 se caracteriza por tener un difractograma de rayos X en polvo (XRPD) que comprende al menos un pico seleccionado entre 7,7, 11,2, 13,8, 14,7, 15,3, 15,8, 18,3, 21,1 y 22,2°2θ ±0,2 °2θ, como se determina en un difractograma usando radiación Cu-Kα. En una realización, la Forma 1 se caracteriza por tener un difractograma de rayos X en polvo que comprende un pico en 18,3 ± 0,2 °2θ. En otra realización, el difractograma de la Forma 1 comprende además un pico en 11,2 ± 0,2 °2θ. En otra forma de realización, el difractograma de la Forma 1 comprende además picos de 7,7, 13,8, 21,1 y 22,2 °2θ ± 0,2 °2θ. En otra realización, el difractograma del Compuesto A, Forma 1, es sustancialmente como se muestra en la Figura 1.

65 **[0006]** En una realización, el Compuesto A, la Forma 1 se caracteriza por una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 251 ° C. en otra realización, la curva de DSC de la

Forma 1 comprende además un endotermo a aproximadamente 210 °C. En otra realización, la curva DSC del Compuesto A, Forma 1 es sustancialmente como se muestra en la Figura 2.

[0007] En una realización, el Compuesto A, la Forma 1 se caracteriza por tener un difractograma de polvo de rayos X que comprende al menos un pico seleccionado de 7,7, 11,2, 13,8, 14,7, 15,3, 15,8, 18,3, 21,1 y 22,2 °2θ ± 0,2 °2θ, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación Cu-Kα; y mediante una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 251 °C. En una realización, la Forma 1 se caracteriza por tener un difractograma de rayos X en polvo que comprende un pico en 18,3 ± 0,2 °2θ; y mediante una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 251 °C. En otra realización, el difractograma de la Forma 1 comprende además picos en 11,2, 7,7, 13,8, 21,1 y 22,2 °2θ ± 0,2 °2θ; y la curva DSC de la Forma 1 comprende además un endotermo a aproximadamente 210°C. En otra realización, el difractograma del Compuesto A, Forma 1, es sustancialmente como se muestra en la Figura 1; y la curva DSC del Compuesto A, Forma 1 es sustancialmente como se muestra en la Figura 2.

[0008] Las reivindicaciones se refieren a la forma cristalina 2 de {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A), caracterizado por tener un difractograma de rayos X en polvo que comprende un pico en 19,3 ± 0,2 °2θ, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación Cu-Kα; y

- (i) el difractograma comprende además al menos un pico seleccionado entre 8,1, 10,6, 11,5, 14,5, 16,2, 21,5, 21,9, 22,7, 24,5 y 26,6 °2θ ± 0,2 °2θ, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación de Cu-Kα, o
- (ii) una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 249 °C, cuando se mide a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

[0009] En otra realización, el difractograma de la Forma 2 comprende además picos a 10,6 y 11,5 °2θ ± 0,2 °2θ. En otra realización, el difractograma de la Forma 2 comprende además picos en 14,5, 16,2, 24,5 y 26,6 °2θ ± 0,2 °2θ. En otra realización, el difractograma del Compuesto A, Forma 2, es sustancialmente como se muestra en la Figura 3.

[0010] En otra realización, el Compuesto A, la Forma 2 se caracteriza por una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 249 °C. En otra realización, la curva DSC del Compuesto A, Forma 2 es sustancialmente como se muestra en la Figura 4.

[0011] En una realización, la forma 2 se caracteriza por tener un difractograma de polvo de rayos X que comprende un pico a 19,3 ± 0,2 °2θ; y mediante una curva DSC que comprende un endotermo a aproximadamente 249 °C. En otra realización, el difractograma de la Forma 2 comprende además picos en 10,6, 11,5, 14,5, 16,2, 24,5 y 26,6 °2θ ± 0,2 °2θ; y mediante una curva DSC que comprende un endotermo a aproximadamente 249 °C. En otra realización, el difractograma del Compuesto A, Forma 2, es sustancialmente como se muestra en la Figura 3; y la curva DSC del Compuesto A, Forma 2 es sustancialmente como se muestra en la Figura 4.

[0012] También se describe un proceso para la fabricación de la forma cristalina 1 de {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A). En una realización, el proceso comprende:

- a) calentar una mezcla que comprende una sal de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) opcionalmente en presencia de una base;
- b) enfriar la mezcla; y
- c) agregar un ácido a la mezcla.

[0013] En una realización, el proceso comprende además el aislamiento de la Forma 1 del Compuesto A.

[0014] En ciertas realizaciones, el proceso para hacer la Forma cristalina 1 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) comprende:

- a) calentar una mezcla que comprende 1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carboxilato de etilo, glicina y metóxido de sodio en metanol;
- b) enfriar la mezcla; y
- c) agregar ácido clorhídrico a la mezcla.

[0015] En una realización, el proceso comprende además el aislamiento de la Forma 1 del Compuesto A.

[0016] En una realización, el proceso para hacer la Forma cristalina 1 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) comprende el calentamiento del Compuesto A en un disolvente adecuado. En una realización, el proceso comprende además el aislamiento de la Forma 1 del Compuesto A.

[0017] Las reivindicaciones se refieren a un proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A). En una realización, el proceso

comprende:

- a) calentar una mezcla que comprende una sal del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A);
- b) añadir un ácido a la mezcla y continuar calentando;
- c) enfriar la mezcla; y
- d) aislar la Forma 2 del Compuesto A.

[0018] En ciertas realizaciones, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) comprende:

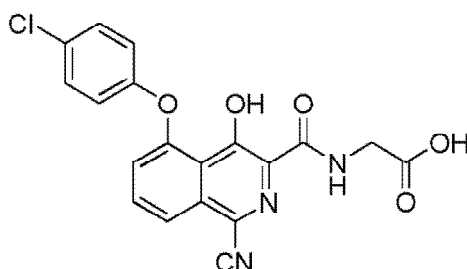
- a) calentar una mezcla que comprende la sal sódica del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) en agua hasta aproximadamente 80-85 °C;
- b) agregar ácido acético a la mezcla y continuar calentando a aproximadamente 80-85 °C;
- c) enfriar la mezcla; y
- d) aislar la Forma 2 del Compuesto A.

[0019] En una realización, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) comprende calentar el Compuesto A en un solvente adecuado, y aislar la Forma 2 del Compuesto A, en donde (i) el solvente adecuado es acetato de isopropilo y el calentamiento está a reflujo, o (ii) el solvente adecuado es agua y el calentamiento es de aproximadamente 80 °C.

[0020] En una realización, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A), comprende calentar la Forma 1 del Compuesto A.

[0021] En una realización, el proceso comprende además el aislamiento de la Forma 2 del Compuesto A.

[0022] en otro aspecto, las presentes reivindicaciones se dirigen a una composición farmacéutica que comprende una forma cristalina de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) que tiene la siguiente estructura:



en donde la forma cristalina del Compuesto A comprende la Forma 2, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0023] En una realización, la composición farmacéutica comprende el compuesto A, la Forma 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, al menos el 90% del cual está presente como Forma 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización más, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, al menos el 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% o 99,99% del cual está presente como Forma 1, y en al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, al menos 90% a 99,99% del cual está presente como Forma 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0024] En una realización, la composición farmacéutica comprende el compuesto A, la Forma 2, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, al menos el 90% del cual está presente como Forma 2, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización más, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, al menos el 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% o 99,99% del cual está presente como Forma 2, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, al menos 90% a 99,99% del cual está presente como Forma 2, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, no más del 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,02% o 0,01% del cual está presente como Forma 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, no más

de 0,1% a 10% del cual está presente como Forma 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

[0025] En una realización, la composición farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional seleccionado del grupo que consiste en vitamina B12, ácido fólico, sulfato ferroso, eritropoyetina humana recombinante, y un agente estimulador de eritropoyesis (ESA). En otra realización, la composición farmacéutica se formula para administración oral. En otra realización, la composición farmacéutica se formula como una tableta o una cápsula.

[0026] En otro aspecto, la composición farmacéutica de la invención es para uso en un método de tratamiento, tratamiento previo, o retraso en el comienzo de una condición asociada con el factor inducible por hipoxia (HIF) o mediada al menos en parte por el mismo. En una realización, la afección asociada o mediada, al menos en parte, por HIF es el daño tisular asociado con isquemia o hipoxia. En otra realización, la isquemia está asociada con un evento isquémico seleccionado del grupo que consiste en infarto de miocardio, embolia pulmonar, infarto intestinal, insuficiencia renal crónica, accidente cerebrovascular isquémico, lesión producida por isquemia reperfusión renal, cirrosis cardíaca, ataque isquémico transitorio, degeneración macular, enfermedad arterial periférica e insuficiencia cardíaca congestiva.

[0027] En otro aspecto, la composición farmacéutica de la invención es para uso en un método de tratamiento, tratamiento previo, o retraso en el comienzo de una condición asociada con la eritropoyetina (EPO) o mediada al menos en parte por la misma.

[0028] En otro aspecto, la composición farmacéutica de la invención es para uso en un método de tratamiento, tratamiento previo, o retraso en la aparición de la anemia. En una realización, la anemia está asociada con una enfermedad crónica o una condición seleccionada del grupo que consiste en diabetes, cáncer, úlceras, enfermedad renal, enfermedad inmunosupresora, infección e inflamación. En otra realización, la anemia está asociada con un procedimiento o tratamiento seleccionado del grupo que consiste en radioterapia, quimioterapia, diálisis y cirugía. En otra realización, la anemia está asociada con la pérdida de sangre causada por trastornos hemorrágicos, traumatismos, lesiones, cirugía, etc. En otra realización, la anemia está asociada con hemoglobina anormal, eritrocitos anormales o defectos en el transporte, procesamiento o utilización de hierro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0029]

La Figura 1 es un patrón XRPD de la Forma cristalina 1, Compuesto A.

La Figura 2 es un patrón DSC de la Forma cristalina 1, Compuesto A.

La Figura 3 es un patrón XRPD de la Forma cristalina 2, Compuesto A.

La Figura 4 es un patrón DSC de la Forma cristalina 2, Compuesto A.

La Figura 5 muestra los patrones de XRPD para solvatos del Compuesto A, XRPD3 y XRPD4.

La Figura 6 muestra los patrones de XRPD para el Compuesto A, Forma 2 y solvatos del Compuesto A, XRPD 3, XRPD 4, XRPD 5, XRPD 6 y XRPD 7.

La Figura 7 muestra los espectros de ¹H-RMN para el Compuesto A, la Forma 2 y los solvatos del Compuesto A, XRPD 3, XRPD 4, XRPD 5, XRPD 6 y XRPD 7.

La Figura 8 demuestra que el Compuesto A aumenta el hematocrito y la hemoglobina después de una semana de dosificación intermitente en ratones.

La Figura 9 demuestra que el Compuesto A aumenta el hematocrito y la hemoglobina después de dos semanas de dosificación diaria en monos normales.

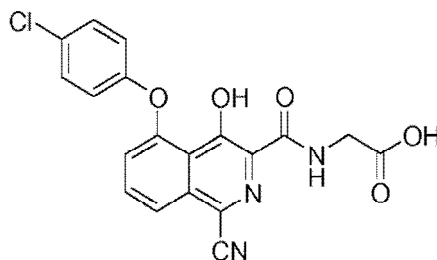
La Figura 10 demuestra que el Compuesto A aumenta la hemoglobina y el hematocrito en la anemia de la enfermedad crónica en ratas.

La Figura 11 demuestra que el Compuesto A alivia la anemia de la enfermedad renal crónica en ratas.

La Figura 12 muestra que el Compuesto A aumenta los niveles plasmáticos máximos medios de eritropoyetina en humanos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0030] Como se señaló anteriormente, esta descripción se dirige, en parte, a las formas cristalinas de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) que tiene la siguiente estructura:



[0031] Antes de discutir con más detalle, se definirán los siguientes términos.

1. Definiciones

[0032] Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen los siguientes significados.

[0033] Las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" y similares incluyen referentes plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye tanto un solo compuesto como una pluralidad de diferentes compuestos.

[0034] El término "aproximadamente" cuando se usa antes de una designación numérica, por ejemplo, temperatura, tiempo, cantidad y concentración, incluyendo un intervalo, indica aproximaciones que pueden variar por $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ o $\pm 1\%$.

[0035] La "administración" se refiere a la introducción de un agente en un paciente. Se puede administrar una cantidad terapéutica, que puede ser determinada por el médico tratante o similar. Se prefiere una vía de administración oral para las formas cristalinas del Compuesto A descrito en el presente documento. Los términos y frases relacionadas "administración" y "administración de", cuando se usan en relación con un compuesto o composición farmacéutica (y equivalentes gramaticales) se refieren tanto a la administración directa, que puede ser administrada a un paciente por un profesional médico o por autoayuda, la administración por parte del paciente y/o la administración indirecta, que puede ser el acto de prescribir un medicamento. Por ejemplo, un médico que instruye a un paciente para que se autoadministre un medicamento y/o le proporciona al paciente una receta para un medicamento, administra el medicamento al paciente. En cualquier caso, la administración implica la entrega del fármaco al paciente.

[0036] La "caracterización" se refiere a la obtención de datos que pueden usarse para identificar y distinguir una forma sólida de un compuesto, por ejemplo, para identificar si la forma sólida es amorfa o cristalina y si no está solvatada o solvatada. El proceso mediante el cual se caracterizan las formas sólidas implica analizar los datos recopilados sobre las formas polimórficas para permitir que un experto en la técnica distinga una forma sólida de otras formas sólidas que contienen el mismo material. La identidad química de formas sólidas a menudo se puede determinar con técnicas de estado de solución, tales como ^{13}C RMN o ^1H RMN. Si bien estos pueden ayudar a identificar un material y una molécula de disolvente para un solvato, estas técnicas de solución en sí mismas pueden no proporcionar información sobre el estado sólido. Sin embargo, existen técnicas analíticas de estado sólido que pueden usarse para proporcionar información sobre la estructura del estado sólido y diferenciar entre formas sólidas polimórficas, como la difracción de rayos X de cristal único, la difracción de rayos X en polvo (XRPD), la resonancia magnética nuclear de estado sólido (SS-RMN), espectroscopía infrarroja y Raman, y técnicas térmicas como la calorimetría diferencial de barrido (DSC), termogravimetría (TG), punto de fusión y microscopía de etapa caliente.

[0037] Para "caracterizar" una forma sólida de un compuesto, se puede, por ejemplo, recoger los datos de XRPD en formas sólidas de compuesto y comparación de los picos de XRPD de las formas. Por ejemplo, cuando solo se comparan dos formas sólidas, 1 y 2, y el patrón de la forma 1 muestra un pico en un ángulo donde no aparecen picos en el patrón de la forma 2, entonces ese pico, para ese compuesto, distingue la forma 1 de la forma 2 y actúa además para caracterizar la forma 1. La colección de picos que distinguen la forma 1 de las otras formas conocidas es una colección de picos que se puede usar para caracterizar la forma 1. Los expertos en la técnica reconocerán que a menudo hay múltiples formas, incluyendo múltiples formas utilizando la misma técnica analítica, para caracterizar formas sólidas. También podrían usarse picos adicionales, pero no son necesarios, para caracterizar la forma hasta e incluyendo un patrón de difracción completo. Aunque todos los picos dentro de un patrón XRPD completo se pueden usar para caracterizar tal forma, un subconjunto de esos datos puede, y generalmente se usa, para caracterizar la forma.

[0038] La "forma cristalina" del Compuesto A es una forma sólida cristalina del Compuesto A, por ejemplo, la Forma 1 o la Forma 2. La red cristalina de la Forma 1 o la Forma 2 está sustancialmente libre de solventes de cristalización. Sin embargo, cualquier disolvente presente no se incluye en la red cristalina y se distribuye aleatoriamente fuera de

la red cristalina. Por lo tanto, los cristales de Forma 1 o Forma 2 a granel pueden contener, fuera de la red cristalina, pequeñas cantidades de uno o más disolventes, como los disolventes utilizados en su síntesis o cristalización. Como se usó anteriormente, "sustancialmente libre de" y "pequeñas cantidades" se refiere a la presencia de solventes, preferiblemente menos de 10.000 partes por millón (ppm), o más preferiblemente, menos de 500 ppm.

[0039] "Excipiente" tal como se utiliza en este documento significa una sustancia inerte o inactiva utilizada en la producción de productos farmacéuticos, incluyendo, sin limitación, cualquier sustancia utilizada como un aglutinante, desintegrante, recubrimiento, auxiliar de la compresión/encapsulación, crema o loción, lubricante, parenteral, edulcorante o saborizante, agente de suspensión/gelificante o agente de granulación en húmedo. Los aglutinantes incluyen, por ejemplo, carbopol, povidona, goma xantana, *etc.*; los recubrimientos incluyen, por ejemplo, ftalato de acetato de celulosa, etilcelulosa, goma gellan, maltodextrina, *etc.*; los auxiliares de compresión/encapsulación incluyen, por ejemplo, carbonato de calcio, dextrosa, fructosa dc, miel dc, lactosa (anhidrato o monohidrato; opcionalmente en combinación con aspartamo, celulosa o celulosa microcristalina), almidón dc, sacarosa, *etc.*; los desintegrantes incluyen, por ejemplo, croscarmelosa sódica, goma gellan, glicolato sódico de almidón, *etc.*; cremas y lociones incluyen, por ejemplo, maltodextrina, carrageninas, *etc.*; los lubricantes incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, fumarato de estearilo sódico, *etc.*; los materiales para tabletas masticables incluyen, por ejemplo, dextrosa, fructosa dc, lactosa (monohidrato, opcionalmente en combinación con aspartamo o celulosa), *etc.*; los parenterales incluyen, por ejemplo, manitol, povidona, *etc.*; Los plastificantes incluyen, por ejemplo, sebacato de dibutilo, ftalato de poli (acetato de vinilo), *etc.*; los agentes de suspensión/gelificación incluyen, por ejemplo, carragenina, glicolato sódico de almidón, goma xantana, *etc.*; los edulcorantes incluyen, por ejemplo, aspartamo, dextrosa, fructosa dc, sorbitol, sacarosa dc, *etc.*; y los agentes de granulación húmedos incluyen, por ejemplo, carbonato de calcio, maltodextrina, celulosa microcristalina, *etc.*

[0040] "Maduración" o "madurar" se refiere a la incubación de una mezcla de un material sólido en un disolvente particular, sometida a ciclos de calor/frío durante un período de tiempo particular. Por ejemplo, la maduración se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 4 h, seguido de incubación a 50 °C durante otras 4 h (incubada a 50 °C/temperatura ambiente (4 h - ciclos)), durante un período de 16 a 24 h.

[0041] "Temperatura ambiente" se refiere a (22±5) °C.

[0042] "Cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad terapéutica" se refiere a una cantidad de un medicamento o un agente que, cuando se administra a un paciente que padece una afección, tendrá el efecto terapéutico deseado, por ejemplo, alivio, mejora, paliación o eliminación de una o más manifestaciones de la afección en el paciente. La cantidad terapéuticamente efectiva variará dependiendo del sujeto y la condición que se esté tratando, el peso y la edad del sujeto, la gravedad de la condición, la composición particular o el excipiente elegido, el régimen de dosificación a seguir, el momento de la administración, la manera de administración y similares, todo lo cual puede ser determinado fácilmente por un experto en la técnica. El efecto terapéutico completo no necesariamente ocurre por la administración de una dosis, y puede ocurrir solo después de la administración de una serie de dosis. Por lo tanto, una cantidad terapéuticamente eficaz puede administrarse en una o más administraciones. Por ejemplo, y sin limitación, una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente, en el contexto del tratamiento de la anemia, se refiere a una cantidad del agente que alivia, mejora, palia o elimina uno o más síntomas de anemia en el paciente.

[0043] "Tratamiento", "tratar" y "tratado" se definen como actuar sobre una enfermedad, trastorno o condición con un agente para reducir o mejorar los efectos dañinos o cualquier otro efecto no deseado de la enfermedad, trastorno o condición y/o sus síntomas. El tratamiento, como se usa en este documento, cubre el tratamiento de un paciente humano e incluye: (a) reducir el riesgo de aparición de la afección en un paciente determinado como predispuesto a la enfermedad pero aún no diagnosticado por tener la afección, (b) impedir el desarrollo de la afección y/o (c) aliviar la afección, es decir, provocar la regresión de la afección y/o aliviar uno o más síntomas de la afección.

[0044] Un "patrón XRPD" es un gráfico x-y con ángulo de difracción (típicamente 2θ) en el eje x y la intensidad en el eje y. Los picos dentro de este patrón se pueden usar para caracterizar una forma sólida cristalina. Al igual que con cualquier medición de datos, existe una variabilidad en los datos de XRPD. Los datos a menudo se representan únicamente por el ángulo de difracción de los picos en lugar de incluir la intensidad de los picos porque la intensidad máxima puede ser particularmente sensible a la preparación de la muestra (por ejemplo, el tamaño de las partículas, el contenido de humedad, el contenido de disolvente y los efectos de orientación preferidos influyen la sensibilidad), por lo que las muestras del mismo material preparadas en diferentes condiciones pueden producir patrones ligeramente diferentes; esta variabilidad suele ser mayor que la variabilidad en los ángulos de difracción. La variabilidad del ángulo de difracción también puede ser sensible a la preparación de la muestra. Otras fuentes de variabilidad provienen de los parámetros del instrumento y el procesamiento de los datos no procesados de rayos X: diferentes instrumentos de rayos X funcionan con diferentes parámetros y pueden llevar a patrones de XRPD ligeramente diferentes desde la misma forma sólida, y paquetes de software igualmente diferentes procesan datos de rayos X de manera diferente y esto también conduce a la variabilidad. Estas y otras fuentes de variabilidad son conocidas por los expertos en las técnicas farmacéuticas. Debido a estas fuentes de variabilidad, es habitual asignar una variabilidad de $\pm 0,2^\circ 2\theta$ a los ángulos de difracción en los patrones de XRPD.

2. Preparación de formas cristalinas del compuesto A

[0045] En un aspecto, la presente descripción se dirige a un proceso para la fabricación de la forma cristalina 1 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (compuesto A). En una realización, el proceso comprende:

- 5 a) calentar una mezcla que comprende una sal de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) opcionalmente en presencia de una base;
- b) enfriar la mezcla; y
- c) agregar un ácido a la mezcla.

10 Típicamente para este proceso, la base, si se agrega, está en exceso a la sal. Por ejemplo, para 1 equivalente de sal, se agregan aproximadamente 2 a aproximadamente 20 equivalentes de base, aproximadamente 5 a aproximadamente 15 equivalentes de base, aproximadamente 10 a aproximadamente 15 equivalentes de base, o aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14 o aproximadamente 15 equivalentes de base. Típicamente, para este proceso, el calentamiento se realiza a aproximadamente 60 °C a aproximadamente 85 °C, a aproximadamente 65 °C a aproximadamente 82 °C, o a aproximadamente 65 °C, aproximadamente 80 °C o aproximadamente 82 °C, hasta que la reacción se complete según lo determinado por LC-MS. Típicamente, el ácido se agrega para llevar la mezcla a un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, a un pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 3, o a un pH de aproximadamente 3.

20 **[0046]** En una realización, el proceso comprende además el aislamiento de la Forma 1 del Compuesto A.

[0047] En una realización, la sal de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) se proporciona mezclando el 1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carboxilato de etilo, glicina y una base. Típicamente para este proceso, por 1 equivalente de 1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carboxilato de etilo, se agregan aproximadamente 15 a aproximadamente 25 equivalentes de glicina y aproximadamente 10 a aproximadamente 20 equivalentes de base, o aproximadamente 20 equivalentes de glicina y aproximadamente 15 equivalentes de base.

30 **[0048]** En una realización, la base es metóxido de sodio.

[0049] En una realización, el ácido es ácido clorhídrico.

[0050] En una realización, el proceso se realiza en metanol.

35 **[0051]** En otra realización, el proceso para fabricar la forma cristalina 1 del Compuesto A comprende:

- a) calentar una mezcla que comprende 1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carboxilato de etilo, glicina y metóxido de sodio en metanol;
- 40 b) enfriar la mezcla;
- c) añadir ácido clorhídrico a la mezcla; y
- d) aislar la Forma 1 del Compuesto A.

45 Típicamente para este proceso, por 1 equivalente de 1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carboxilato de etilo, se agrega aproximadamente 15 a aproximadamente 25 equivalentes de glicina y aproximadamente 10 a aproximadamente 20 equivalentes de metóxido de sodio o aproximadamente 20 equivalentes de glicina y aproximadamente 15 equivalentes de metóxido de sodio. Típicamente, para este proceso, el calentamiento se lleva a cabo a reflujo hasta que la reacción se completa según lo determinado por LC-MS. Típicamente, el ácido se agrega para llevar la mezcla a un pH de aproximadamente 1 a aproximadamente 4, a un pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 3, o a un pH de aproximadamente 3.

[0052] En una realización, la presente descripción proporciona un proceso para la fabricación de la forma cristalina 1 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A), que comprende el calentamiento del Compuesto A en un disolvente adecuado. En una realización, el procedimiento comprende además el aislamiento de la Forma 1 del Compuesto A.

[0053] En una realización, el disolvente adecuado es acetonitrilo y el calentamiento es a reflujo (generalmente alrededor de 81-82 °C). Típicamente, el calentamiento se lleva a cabo hasta que se forma una solución clara. Típicamente, la solución se enfría a aproximadamente temperatura ambiente y luego a una temperatura baja, por ejemplo, aproximadamente 5 °C.

[0054] En una realización, el disolvente adecuado es el ácido acético puro y el calentamiento es a aproximadamente 80 °C.

65 **[0055]** En otra realización, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 1 del Compuesto A comprende:

- a) calentar el compuesto A en acetonitrilo a reflujo;
- b) enfriar la mezcla; y
- c) aislar la Forma 1 del Compuesto A.

5 Normalmente el enfriamiento es a temperatura ambiente.

[0056] En otra realización, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 1 del Compuesto A comprende:

- 10 a) calentar el Compuesto A en ácido acético puro a aproximadamente 80°C;
- b) enfriar la mezcla; y
- c) aislar la Forma 1 del Compuesto A.

Normalmente el enfriamiento es a temperatura ambiente.

15 **[0057]** En una realización, la presente descripción proporciona un proceso para la fabricación de la forma cristalina 1 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A), que comprende calentar XRPD 3 o XRPD 4 del Compuesto A a una temperatura superior a aproximadamente 40 °C.

20 **[0058]** En las realizaciones anteriores, la etapa de aislamiento puede comprender uno o más de los siguientes: el enfriamiento de la mezcla, agitar la mezcla, filtrar, lavar y secar el sólido en un horno de vacío hasta peso constante.

25 **[0059]** En otro aspecto, la presente descripción está dirigida a un proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A). En una realización, el proceso comprende:

- a) calentar una mezcla que comprende una sal del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A);
- b) añadir un ácido a la mezcla y continuar calentando; y
- 30 c) enfriar la mezcla; y
- d) aislar la Forma 2 del Compuesto A.

Típicamente, se agregan de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 equivalentes, o aproximadamente 5 equivalentes del ácido. Típicamente, el calentamiento es de aproximadamente 80 °C. Típicamente, el enfriamiento es a temperatura ambiente.

35 **[0060]** En una realización, la sal del Compuesto A se proporciona mediante la mezcla de Compuesto A con una base. Típicamente, se usan aproximadamente de 1 a 1,5 equivalentes o aproximadamente 1,25 equivalentes de la base.

40 **[0061]** En una realización, la base es hidróxido de sodio.

[0062] En una realización, el proceso se realiza en agua.

45 **[0063]** En una realización, el calentamiento es una temperatura de más de aproximadamente 80 °C. En ciertas realizaciones, el calentamiento es una temperatura de unos 80-85 °C.

[0064] En una realización, el ácido es ácido acético.

50 **[0065]** En una realización, la sal del Compuesto A se proporciona mediante la mezcla de acetato de 1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carboxilato, glicina y una base.

[0066] En una realización, la base es metóxido de sodio.

55 **[0067]** En otra realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar la forma cristalina 2 de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) que comprende:

- a) calentar una mezcla que comprende la sal sódica del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) en agua hasta aproximadamente 80-85 °C;
- 60 b) agregar ácido acético a la mezcla y continuar calentando a aproximadamente 80-85 °C;
- c) enfriar la mezcla; y
- d) aislar la Forma 2 del Compuesto A.

65 **[0068]** En una realización, la sal de sodio del Compuesto A se proporciona mediante la mezcla de Compuesto A con hidróxido sódico. Típicamente, se añade aproximadamente 1 a 1,5 equivalentes o aproximadamente 1,25 equivalentes de hidróxido de sodio en el Compuesto A.

[0069] En una realización, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 del Compuesto A comprende:

- a) calentar una mezcla que comprende el Compuesto A y el hidróxido de sodio en agua a aproximadamente 80-85 °C;
- b) agregar ácido acético a la mezcla y continuar calentando a aproximadamente 80-85 °C;
- c) enfriar la mezcla; y
- d) aislar la Forma 2 del Compuesto A.

[0070] En otra realización, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar la forma cristalina 2 de ácido {[1-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo-5-ciano]-amino}-acético (Compuesto a) que comprende el calentamiento del Compuesto a en un disolvente adecuado, y aislando la Forma 2 del Compuesto A.

[0071] En una realización, el disolvente adecuado es acetato de isopropilo y el calentamiento es a reflujo. Típicamente, en esta realización, el calentamiento se lleva a cabo desde 1 hora hasta la noche.

[0072] En una realización, el disolvente adecuado es el agua y la calefacción es a aproximadamente 80 °C. Típicamente, en esta realización, el calentamiento se lleva a cabo desde 1 hora hasta la noche.

[0073] En una realización, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 del Compuesto A comprende:

- a) calentar el compuesto A en acetato de isopropilo a reflujo; y
- b) aislar la Forma 2 del Compuesto A.

[0074] En otra realización, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 del Compuesto A comprende:

- a) calentar el compuesto A en agua a aproximadamente 80 °C;
- b) aislar la Forma 2 del Compuesto A.

[0075] En otra realización, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 del Compuesto A comprende la maduración del Compuesto A, Forma 1 a una temperatura elevada (por ejemplo, a aproximadamente 50 °C), y en cierta humedad relativa (HR) (por ejemplo, en aproximadamente 75% de HR), por lo que se forma el Compuesto A, Forma 2. En una realización, el proceso comprende además el aislamiento de la Forma 2 del Compuesto A.

[0076] En otra realización, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 del Compuesto A comprende calentar la Forma cristalina 1 del Compuesto A, mediante el cual, se forma el Compuesto A Forma 2. En una realización, el calentamiento comprende una temperatura de aproximadamente 200°C. En una realización, el procedimiento comprende además el aislamiento de la Forma 2 del Compuesto A.

[0077] En otra realización, el proceso para la fabricación de la forma cristalina 2 del Compuesto A comprende el calentamiento XRPD 5, XRPD 6 o 7 XRPD del Compuesto A de a una temperatura de superior a unos 40 °C.

[0078] En las realizaciones anteriores, la etapa de aislamiento puede comprender uno o más de los siguientes: el enfriamiento de la mezcla, agitando la mezcla, filtrando, lavando y secando el sólido en un horno de vacío hasta peso constante.

3. Caracterización de las formas cristalinas del Compuesto A

[0079] La forma cristalina de ácido {[4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo-5-1-ciano]-amino}-acético (compuesto A) se caracteriza por una variedad de métodos como se explica a continuación.

Difracción de rayos X en polvo (XRPD)

[0080] En una realización, el Compuesto A, la Forma 1 se caracteriza por tener un difractograma de polvo de rayos X que comprende al menos un pico seleccionado de 7,7, 11,2, 13,8, 14,7, 15,3, 15,8, 18,3, 21,1, y 22,2 °2θ ± 0,2 °2θ, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación Cu-Kα. En una realización, la forma 1 se caracteriza por tener un difractograma de rayos X en polvo que comprende un pico en 18,3 ± 0,2 °2θ. En otra realización, el difractograma de la Forma 1 comprende además un pico en 11,2 ± 0,2 °2θ. En otra realización, el difractograma de la Forma 1 comprende además picos a 7,7, 13,8, 21,1 y 22,2 °2θ ± 0,2 °2θ. En otra realización, el difractograma del Compuesto A, Forma 1, es sustancialmente como se muestra en la Figura 1.

[0081] En una realización, el Compuesto A, la Forma 2 se caracteriza por tener un difractograma de rayos X de polvo que comprende al menos un pico seleccionado de 8,1, 10,6, 11,5, 14,5, 16,2, 19,3, 21,5, 21,9, 22,7, 24,5, y 26,6 °2θ ± 0,2 °2θ, como se ha determinado en un difractograma utilizando radiación Cu-Kα. En una realización, la forma 2 se caracteriza por tener un difractograma de rayos X en polvo que comprende un pico en 19,3 ± 0,2 °2θ. En otra realización, el difractograma de la Forma 2 comprende además picos de 10,6 y 11,5 °2θ ± 0,2 °2θ. En otra realización, el difractograma de la Forma 2 comprende además picos de 14,5, 16,2, 24,5 y 26,6 °2θ ± 0,2 °2θ. En

otra realización, el difractograma del Compuesto A, Forma 2, es sustancialmente como se muestra en la Figura 3.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

[0082] En una realización, el Compuesto A, la Forma 1 se caracteriza por una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 251 °C. En otra realización, la curva de DSC de la Forma 1 comprende además un endotermo a aproximadamente 210°C. En otra realización, la curva DSC del Compuesto A, Forma 1 es sustancialmente como se muestra en la Figura 2.

[0083] En una realización, el Compuesto A, la Forma 2 se caracteriza por una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 249 °C. En otra realización, la curva de DSC del Compuesto A, Forma 2 es sustancialmente como se muestra en la Figura 4.

[0084] En una realización, el Compuesto A, la Forma 1 se caracteriza por tener un difractograma de polvo de rayos X que comprende al menos un pico seleccionado de 7,7, 11,2, 13,8, 14,7, 15,3, 15,8, 18,3, 21,1 y 22,2 °2θ ± 0,2 °2θ, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación Cu-Kα; y mediante una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 251 °C. En una realización, la forma 1 se caracteriza por tener un difractograma de rayos X en polvo que comprende un pico en 18,3 ± 0,2 °2θ; y mediante una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 251 °C. En otra realización, el difractograma de la Forma 1 comprende además picos en 11,2, 7,7, 13,8, 21,1 y 22,2 °2θ ± 0,2 °2θ; y la curva DSC de la Forma 1 comprende además un endotermo a aproximadamente 210°C. En otra realización, el difractograma del Compuesto A, Forma 1, es sustancialmente como se muestra en la Figura 1; y la curva DSC del Compuesto A, Forma 1 es sustancialmente como se muestra en la Figura 2.

[0085] En una realización, el Compuesto A, Forma 2 se caracteriza por tener un difractograma de rayos X en polvo que comprende al menos un pico seleccionado de 8,1, 10,6, 11,5, 14,5, 16,2, 19,3, 21,5, 21,9, 22,7, 24,5, y 26,6 °2θ ± 0,2 °2θ, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación de Cu-Kα; y mediante una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 249 °C. En una realización, la forma 2 se caracteriza por tener un difractograma de rayos X en polvo que comprende un pico en 19,3 ± 0,2 °2θ; y mediante una curva DSC que comprende un endotermo a aproximadamente 249 °C. En otra realización, el difractograma de la Forma 2 comprende además picos en 10,6, 11,5, 14,5, 16,2, 24,5 y 26,6 °2θ ± 0,2 °2θ; y mediante una curva DSC que comprende un endotermo a aproximadamente 249 °C. En otra realización, el difractograma del Compuesto A, Forma 2, es sustancialmente como se muestra en la Figura 3; y la curva DSC del Compuesto A es sustancialmente como se muestra en la Figura 4.

Análisis Termogravimétrico (TGA)

[0086] En una realización, un análisis termogravimétrico del Compuesto A, la Forma 1, no muestra pérdida de peso hasta que la degradación a partir de unos 260 °C.

[0087] En una realización, un análisis termogravimétrico del Compuesto A, la Forma 2, no muestra pérdida de peso hasta la degradación a partir de unos 260 °C.

4. Estabilidad de las formas cristalinas del compuesto A

[0088] La estabilidad relativa de la Forma 1 y la Forma 2 se ha estudiado en diferentes condiciones (véase el Ejemplo 3). Tanto la Forma 1 y la Forma 2 son estables a la humedad y a la temperatura hasta al menos ~ 200 °C y ambas formas presentan baja higroscopicidad.

[0089] Un número de experimentos (véase el Ejemplo 3) muestran que la Forma 1 convierte a la Forma 2 en diversas condiciones: calentamiento por encima de 200 °C; maduración en acetato de isopropilo (IPAc) a 5 °C, 25 °C y 50 °C; maduración en agua a 50 °C/temperatura ambiente; y por reflujo en agua. No se ha observado la transformación de la Forma 2 en la Forma 1. La Forma 1, sin embargo, permanece sin cambios en el agua a 25 °C después de seis días.

[0090] Por lo tanto, la Forma 2 es termodinámicamente más estable que la Forma 1 bajo las condiciones investigadas y por lo tanto, la Forma 2 puede proporcionar ventajas en la fabricación y formulación de Compuesto A.

5. Otros solvatos del Compuesto A

[0091] La descripción también proporciona solvatos de Compuesto A. La maduración del Compuesto A, la forma 1 en resultados diferentes disolventes en varios solvatos del Compuesto A (véase el Ejemplo 4). Estos solvatos se caracterizan por XRPD y llevan el nombre de sus patrones de XRPD:

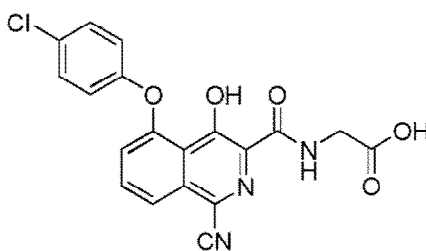
XRPD 3 y XRPD 4, un grupo de solvatos *iso*-estructurales de tolueno, n-heptano, tetrahidrofurano (THF), acetato de etilo (EtOAc), alcohol iso-propílico (IPA), etanol (EtOH), nitrometano o EtOH-agua;

XRPD 5, solvato de dimetilformamida (DMF);
 XRPD 6, solvato de n-metilpirrolidona (NMP); y
 XRPD 7 - solvato de 1,4-dioxano.

- 5 **[0092]** Los análisis de ^1H RMN, los análisis térmicos de DSC y TGA confirman que estos sólidos son solvatos en lugar de polimorfos (véase el Ejemplo 4).

6. Composiciones farmacéuticas, formulaciones y vías de administración.

- 10 **[0093]** En un aspecto, la presente descripción está dirigida a una composición farmacéutica que comprende una o más formas cristalinas de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (compuesto A) que tiene la siguiente estructura:



- 25 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- [0094]** En una realización, la composición farmacéutica comprende el compuesto A, la Forma 2, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, al menos el 90% del cual está presente como Forma 2, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En otra realización más, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, al menos el 95%, 98%, 99%, 99,5%, 99,8%, 99,9%, 99,95%, 99,98% o 99,99% del cual está presente como Forma 2, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende el Compuesto A, no más del 10%, 5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,02% o 0,01% del cual está presente como Forma 1, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

- [0095]** En una realización, la composición farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional seleccionado del grupo que consiste en vitamina B12, ácido fólico, sulfato ferroso, eritropoyetina humana recombinante, y un agente estimulador de eritropoyesis (ESA). En otra realización, la composición farmacéutica se formula para la administración oral. En otra realización, la composición farmacéutica se formula como una tableta o una cápsula.

- [0096]** Las formas cristalinas de la presente divulgación se pueden administrar directamente o en composiciones farmacéuticas junto con excipientes adecuados, como es bien conocido en la técnica. Varios tratamientos incorporados en el presente documento pueden comprender la administración de una cantidad eficaz de una forma cristalina de la divulgación a un sujeto que lo necesite, por ejemplo, un sujeto que tenga o tenga riesgo de anemia debido a, por ejemplo, insuficiencia renal crónica, diabetes, cáncer, SIDA, radiación. Terapia, quimioterapia, diálisis renal o cirugía. En una realización, el sujeto es un sujeto mamífero, y en una realización, el sujeto es un sujeto humano.

- [0097]** Una cantidad eficaz de una forma cristalina puede ser determinada fácilmente por experimentación de rutina, al igual que la ruta más eficaz y conveniente de administración y la formulación más apropiada. En una realización, la dosis puede ser de 0,1 mg/kg a aproximadamente 700 mg/kg por día. Varias formulaciones y sistemas de administración de fármacos están disponibles en la técnica. Véase, por ejemplo, Gennaro, AR, ed. (1995) Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

- [0098]** Las vías adecuadas de administración pueden, por ejemplo, incluir administración oral, rectal, transmucosa, nasal o intestinal y administración parenteral, incluyendo intramuscular, subcutánea, inyecciones intramedulares, así como intratecal, intraventricular directa, intravenosa, inyecciones intraperitoneales, intranasales o intraoculares. La forma cristalina o la composición de los mismos puede administrarse de manera local en lugar de sistémica. Por ejemplo, una forma cristalina o una composición de la misma puede administrarse mediante inyección o en un sistema de administración de fármacos dirigido, como un depósito o una formulación de liberación sostenida. En una realización, la vía de administración es oral.

- [0099]** Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser fabricadas por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica, tales como mediante mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, de encapsulado, atrapamiento, o procesos de liofilización. Como se señaló

anteriormente, las composiciones pueden incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables que facilitan el procesamiento de moléculas activas en preparaciones para uso farmacéutico.

[0100] La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida. Para inyección, por ejemplo, la composición puede formularse en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, como la solución de Hanks, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa o nasal, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. En una realización preferida de la presente divulgación, las presentes formas cristalinas se preparan en una formulación destinada para administración oral. Para administración oral, se puede formular fácilmente combinando las formas cristalinas con excipientes farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos excipientes permiten que las formas cristalinas de la divulgación se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, y similares, para la ingestión oral por parte de un sujeto. Las formas cristalinas también pueden formularse en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

[0101] Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener utilizando excipientes sólidos, moliendo opcionalmente una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragaquem, celulosa de metilo, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, celulosa microcristalina y/o polivinilpirrolidona (PVP o povidona). Si se desea, se pueden agregar agentes desintegrantes, como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, croscarmelosa sódica o ácido algínico o una sal de los mismos, tal como alginato sódico. Además, se pueden incluir agentes humectantes tales como sulfato de dodecilo sódico o estearato de magnesio.

[0102] Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden usar soluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden agregar colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis activas.

[0103] Las preparaciones farmacéuticas para administración oral incluyen cápsulas de ajuste suave hechas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de inserción por presión pueden contener los ingredientes activos en mezcla con una carga como la lactosa, aglutinantes como almidones y/o lubricantes como el talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En cápsulas blandas, las formas cristalinas se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para dicha administración.

[0104] En una realización, las formas cristalinas que se describen en el presente documento se pueden administrar por vía transdérmica, tal como a través de un parche cutáneo, o por vía tópica. En un aspecto, las formulaciones transdérmicas o tópicas pueden comprender adicionalmente uno o múltiples potenciadores de la penetración u otros efectores, incluyendo agentes que mejoran la migración del compuesto administrado. La administración transdérmica o tópica podría ser preferida, por ejemplo, en situaciones en las que se desea una administración específica de la ubicación.

[0105] Para la administración por inhalación, las formas cristalinas para uso de acuerdo con la presente descripción se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono o cualquier otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación apropiada puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para uso en un inhalador o insuflador. Estos contienen típicamente una mezcla en polvo de la forma cristalina y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

[0106] Las composiciones formuladas para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua, pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante agregado. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Las formulaciones para administración parenteral incluyen soluciones acuosas u otras composiciones en forma soluble en agua.

[0107] Las suspensiones de las formas cristalinas también se pueden preparar como suspensiones oleosas apropiadas para inyección. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como

aceite de sésamo y ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, como la carboximetilcelulosa sódica, el sorbitol o el dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de las formas cristalinas para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes del uso.

[0108] Como se ha mencionado anteriormente, las composiciones de la presente divulgación también se pueden formular como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las presentes formas cristalinas pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

[0109] Para cualquier composición usada en los diversos tratamientos incorporados en el presente documento, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente usando una variedad de técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, en un ensayo de cultivo celular, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante que incluya la CI_{50} determinada en el cultivo celular. Los rangos de dosificación apropiados para sujetos humanos pueden determinarse, por ejemplo, usando datos obtenidos de ensayos de cultivo celulares y estudios en animales no humanos.

[0110] Una dosis terapéuticamente eficaz de un compuesto se refiere a aquella cantidad del compuesto que se traduce en mejoría de los síntomas o una prolongación de la supervivencia en un sujeto. La toxicidad y la eficacia terapéutica de tales moléculas pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la LD_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) y la ED_{50} (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosis de efectos tóxicos a terapéuticos es el índice terapéutico, que puede expresarse como la relación LD_{50}/ED_{50} . Se prefieren los compuestos que exhiben altos índices terapéuticos.

[0111] Las dosificaciones caen preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones que incluye la ED_{50} de circulación con poca o ninguna toxicidad. Las dosis pueden variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis deben elegirse, de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, en vista de las características específicas de la condición de un sujeto.

[0112] La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles plasmáticos del resto activo que sean suficientes para modular un parámetro deseado, por ejemplo, niveles plasmáticos de eritropoyetina endógena, es decir, concentración mínima efectiva (MEC). El MEC variará para cada compuesto, pero puede estimarse a partir de, por ejemplo, datos *in vitro*. Las dosis necesarias para lograr el MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Los compuestos o composiciones de los mismos deben administrarse utilizando un régimen que mantenga los niveles plasmáticos por encima de la MEC durante aproximadamente el 10-90% de la duración del tratamiento, preferiblemente aproximadamente el 30-90% de la duración del tratamiento, y más preferiblemente entre el 50-90%. En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local efectiva del fármaco puede no estar relacionada con la concentración plasmática. Alternativamente, la modulación de un parámetro deseado, por ejemplo, la estimulación de la eritropoyetina endógena, se puede lograr 1) administrando una dosis de carga seguida de una dosis de mantenimiento, 2) administrando una dosis de inducción para lograr rápidamente el parámetro deseado, por ejemplo, niveles de eritropoyetina, dentro de un rango objetivo, seguido por una dosis de mantenimiento más baja para mantener, por ejemplo, hematocrito, dentro de un rango objetivo deseado, o 3) repetición de la dosis intermitente.

[0113] La cantidad de compuesto o composición administrada dependerá, por supuesto, de una variedad de factores, incluyendo el sexo, la edad, y el peso del sujeto a tratar, la gravedad de la afección, la manera de administración, y el juicio del médico prescriptor.

[0114] Una dosis eficaz (o dosis terapéuticamente eficaz) puede estimarse inicialmente usando una variedad de técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, en un ensayo de cultivo celular, se puede formular una dosis en modelos animales para lograr un rango de concentración circulante que incluya la CI_{50} determinada en el cultivo celular. Los rangos de dosificación apropiados para sujetos humanos se pueden determinar, por ejemplo, usando datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales no humanos. En una realización, la dosis puede ser de 0,001 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg. Típicamente, la dosis puede ser de aproximadamente 0,002 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg; de aproximadamente 0,005 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg; de aproximadamente 0,008 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg; de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg; de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 0,4 mg/kg; o de aproximadamente 0,15 mg/kg a aproximadamente 0,4 mg/kg. Por ejemplo, la dosis puede ser de aproximadamente 0,01 mg/kg; alrededor de 0,02 mg/kg; alrededor de 0,03 mg/kg; alrededor de 0,04 mg/kg; alrededor de 0,05 mg/kg; alrededor de 0,06 mg/kg; alrededor de 0,07 mg/kg; alrededor de 0,08 mg/kg; alrededor de 0,09 mg/kg; alrededor de 0,1 mg/kg; alrededor de

0,15 mg/kg; aproximadamente 0,2 mg/kg; alrededor de 0,25 mg/kg; alrededor de 0,3 mg/kg; alrededor de 0,4 mg/kg; alrededor de 0,5 mg/kg; alrededor de 0,6 mg/kg; alrededor de 0,7 mg/kg; alrededor de 0,8 mg/kg; alrededor de 0,9 mg/kg; o alrededor de 1 mg/kg. Las dosis se pueden administrar a diversos intervalos, por ejemplo, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, cada día, cada dos días, 1, 2, o 3 veces a la semana, etc.

[0115] Las presentes composiciones pueden, si se desea, presentarse en un paquete o dispositivo dispensador que contenga una o más formas de dosificación unitaria que contengan el ingrediente activo. Un paquete o dispositivo de este tipo puede comprender, por ejemplo, una lámina de metal o plástico, como un envase de tipo ampolla. El paquete o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. Las composiciones que comprenden una forma cristalina de la divulgación formulada en un excipiente farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada. Las condiciones adecuadas indicadas en la etiqueta pueden incluir el tratamiento de afecciones, trastornos o enfermedades en las que la anemia es una indicación importante.

7. Método de uso

[0116] Un aspecto de la descripción proporciona el uso de una o más de una forma cristalina de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A), o una composición que comprende una o más formas cristalinas del Compuesto A, para la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de diversas afecciones o trastornos como se describe en el presente documento. También proporciona métodos para usar la forma cristalina, o la composición o medicamento de la misma, para tratar, pretratar o retrasar la progresión o el inicio de diversas afecciones o trastornos como se describe en el presente documento. En una realización, la forma cristalina del Compuesto A utilizado en el método es la Forma 2.

[0117] Los medicamentos o composiciones se pueden utilizar para modular la estabilidad y/o actividad de HIF, y de ese modo activar la expresión génica regulada por HIF. La forma cristalina, o composición o medicamento de la misma, se puede usar en métodos para tratar, pretratar o retrasar la progresión o el inicio de afecciones asociadas con HIF que incluyen, entre otras, afecciones anémicas, isquémicas e hipóxicas. En diversas realizaciones, la forma cristalina, o composición o medicamento se administra inmediatamente después de una afección que produce isquemia aguda, p. ej., infarto de miocardio, embolia pulmonar, infarto intestinal, accidente cerebrovascular isquémico y lesión renal por isquemia-reperfusión. En otra realización, la forma cristalina, o composición o medicamento de la misma, se administra a un paciente diagnosticado con una afección asociada con el desarrollo de isquemia crónica, por ejemplo, cirrosis cardíaca, degeneración macular, embolia pulmonar, insuficiencia respiratoria aguda, síndrome de dificultad respiratoria neonatal, y la insuficiencia cardíaca congestiva. En otra realización más, la forma cristalina, o composición o medicamento de la misma, se administra inmediatamente después de un trauma o lesión. En otras realizaciones, la forma cristalina, o su composición o medicamento, puede administrarse a un sujeto basándose en afecciones predisponentes, por ejemplo, hipertensión, diabetes, enfermedad arterial oclusiva, insuficiencia venosa crónica, enfermedad de Raynaud, úlceras crónicas de la piel, cirrosis, insuficiencia cardíaca congestiva y la esclerosis sistémica. En otras realizaciones más, la forma cristalina, o su composición o medicamento, puede administrarse para tratar previamente a un sujeto para disminuir o prevenir el desarrollo de daño tisular asociado con isquemia o hipoxia.

[0118] La forma cristalina, o composiciones o medicamentos de las mismas, también se pueden utilizar para aumentar la eritropoyetina endógena (EPO). La forma cristalina, o la composición o medicamento de la misma, se puede administrar para prevenir, pretratar o tratar afecciones asociadas con EPO, que incluyen, por ejemplo, afecciones asociadas con anemia y trastornos neurológicos. Las afecciones asociadas con la anemia incluyen trastornos tales como enfermedad renal aguda o crónica, diabetes, cáncer, úlceras, infección con virus, por ejemplo, VIH, bacterias o parásitos; inflamación, etc. Las condiciones anémicas pueden incluir además aquellas asociadas con procedimientos o tratamientos que incluyen, por ejemplo, radioterapia, quimioterapia, diálisis y cirugía. Los trastornos asociados con la anemia también incluyen hemoglobina y/o eritrocitos anormales, como los que se encuentran en trastornos como la anemia microcítica, la anemia hipocrómica, la anemia aplásica, etc.

[0119] La descripción también está dirigida al uso de una forma cristalina, o composición o medicamento de la misma, para tratar, pretratar, o retrasar el inicio de una condición asociada con un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastornos anémicos; trastornos neurológicos y/o lesiones que incluyen casos de accidente cerebrovascular, traumatismo, epilepsia y enfermedad neurodegenerativa; isquemia cardíaca que incluye, entre otros, infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca congestiva; isquemia hepática que incluye, pero no se limita a, cirrosis cardíaca; isquemia renal que incluye, entre otros, insuficiencia renal aguda e insuficiencia renal crónica; trastornos vasculares periféricos, úlceras, quemaduras y heridas crónicas; embolia pulmonar; y lesión por isquemia-reperfusión.

[0120] La descripción también está dirigida a un método de inhibición de la actividad de al menos una enzima de hidroxilasa que modifica la subunidad alfa del factor inducible por hipoxia. La enzima de hidroxilasa HIF puede ser una hidroxilasa de prolilo que incluye, entre otras, el grupo que consta de EGLN1, EGLN2 y EGLN3, descrito por Taylor (2001, Gene 275: 125-132) y caracterizado por Aravind y Koonin (2001, Genome Biol 2: RESEARCH0007), Epstein y col. (2001, Cell 107: 43-54), y Bruick y McKnight (2001, Science 294: 1337-1340). El método comprende

poner en contacto la enzima con una cantidad inhibidora efectiva de una o más formas cristalinas del Compuesto A.

[0121] Si bien esta descripción se ha descrito junto con realizaciones y ejemplos específicos, será evidente para un experto en la técnica, teniendo en cuenta esa habilidad y esta descripción, que los equivalentes de los materiales y métodos descritos específicamente también serán aplicables a esta divulgación.

EJEMPLOS

[0122] Las reivindicaciones se refieren a la forma cristalina 2 del Compuesto A. Ejemplos que no se refieren a las reivindicaciones se proporcionan para referencia.

[0123] A menos que se indique lo contrario, las siguientes abreviaturas utilizadas a lo largo de la especificación tienen la siguiente definición:

15	d	doblete
	DCM	diclorometano, cloruro de metileno
	DMF	dimetilformamida
	DMSO	dimetilsulfóxido
	DSC	calorimetría de barrido diferencial
20	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
	eq.	equivalente
	EtOAc	acetato de etilo
	EtOH	etanol, alcohol etílico
	g	gramo
25	HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
	hr o h	hora
	Hz	Hertz
	IPA	alcohol iso-propílico, propan-2-ol
	IPAc	acetato iso-propílico
30	IR	infrarrojo
	J	constante de acoplamiento
	kg	kilogramo
	kV	kilovoltios
	L	litro
35	LOD	límite de detección
	M	molar
	m	multiplete
	mA	miliamperio
	Me	metilo
40	MeO	metoxi
	MeOH	metanol
	mg	miligramo
	min.	minuto
	mL	mililitro
45	mm	milímetro
	MTBE	éter de terc-butilo metílico
	N	normal
	NaOMe	metóxido
	nM	nanomolar
50	NMP	n-metilo pirrolidona
	RMN	resonancia magnética nuclear
	s	singlete
	RH	humedad relativa
	SS-RMN	Resonancia magnética nuclear de estado sólido
55	TGA	análisis gravimétrico térmico
	THF	tetrahidrofurano
	XRPD	difracción de polvo de rayos X
	VT-XRPD	temperatura variable de difracción de polvo de rayos X

60 **DSC - Calorimetría de barrido diferencial**

[0124] Los datos de DSC se recogieron en un Mettler DSC 823e equipado con un muestreador automático de 50 posiciones. El instrumento fue calibrado para energía y temperatura usando indio certificado. Típicamente, se calentaron 0,5-3 mg de cada muestra, en una bandeja de aluminio con orificio, a 10 °C/min desde 25 °C hasta 350 °C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml/min sobre la muestra. El software de control de instrumentos y análisis de datos fue STARe v 9.10.

[0125] Los datos de DSC modulados se recopilaron en un TA Instruments Q2000 equipado con un muestreador automático de 50 posiciones. La calibración de la capacidad térmica se realizó con zafiro y la calibración de la energía y la temperatura se realizó con indio certificado. Típicamente, se calentaron 0,5-2 mg de cada muestra, en una bandeja de aluminio con orificio, utilizando una velocidad de calentamiento subyacente de 2 °C/min y parámetros de modulación de temperatura de $\pm 0,2$ °C/min y 40 segundos. El software de control del instrumento fue Advantage para Q Series v2.8.0.392 y Thermal Advantage v4.8,3 y los datos se analizaron utilizando Universal Analysis v4.3A.

RMN - Resonancia magnética nuclear: ^1H y ^{13}C RMN

[0126] Los espectros de RMN se recogieron en un instrumento Bruker 400MHz equipado con un muestreador automático y controlado por una consola DRX400. Los experimentos automatizados se adquirieron utilizando ICON-RMN v4.0.4 (compilación 1) ejecutándose con Topspin v 1,3 (nivel de parche 8) utilizando los experimentos cargados de Bruker estándar. Para la espectroscopia no rutinaria, los datos se obtuvieron mediante el uso de Topspin solo. Las muestras se prepararon en d_6 -DMSO, a menos que se indique lo contrario. El análisis fuera de línea se llevó a cabo con el ACD SpecManager v 9.09 (compilación 7703).

TGA - Análisis Termogravimétrico

[0127] Los datos TGA se recopilaron en un Mettler TGA/SDTA 851e equipado con un muestreador automático de 34 posiciones. El instrumento se calibró a temperatura utilizando indio certificado. Típicamente, se cargaron 5 a 30 mg de cada muestra en un crisol de aluminio previamente pesado y se calentó a 10°C/min desde la temperatura ambiente hasta 350°C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 50 ml/min sobre la muestra. El software de control de instrumentos y análisis de datos fue STARE v 9.10.

XRPD - Difracción de rayos X en polvo

[0128] Patrones de polvo de rayos X de difracción se recogieron en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando Cu K radiación (40 kV, 40 mA), la etapa automatizada XYZ, láser microscopio de vídeo para el posicionamiento automático de la muestra y un HiStar detector de área dos dimensional. La óptica de rayos X consiste en un único espejo multicapa Göbel acoplado con un colimador de orificios de 0,3 mm.

[0129] La divergencia del haz, es decir, el tamaño efectivo del haz de rayos X sobre la muestra, fue de aproximadamente 4 mm. Se empleó un modo de escaneo continuo de θ - θ con una distancia de detector de muestra de 20 cm que proporciona un rango efectivo de 2θ de $3,2^\circ$ - $29,7^\circ$. Normalmente, la muestra se expondría al haz de rayos X durante 120 segundos. El software utilizado para la recopilación de datos fue GADDS para WNT 4.1.16 y los datos se analizaron y presentaron utilizando Diffrac Plus EVA v 9.0.0.2 o v 13.0.0.2.

[0130] Las muestras ejecutadas bajo condiciones ambientales se prepararon como muestras de placa plana utilizando polvo tal como se recibieron sin moler. Aproximadamente 1-2 mg de la muestra se presionaron ligeramente en un portaobjetos de vidrio para obtener una superficie plana.

[0131] Las muestras realizadas en condiciones no ambientales fueron montadas en una oblea de silicio con un compuesto conductor de calor. La muestra se calentó entonces a la temperatura apropiada en aproximadamente 20 °C.min⁻¹ y posteriormente se fijó isotérmicamente durante aproximadamente 1 minuto antes de que se inició la recolección de datos.

[0132] Patrones de difracción de polvo de rayos X también se recogieron en un difractómetro Bruker D8 usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), goniómetro θ - 2θ , y divergencia de V4 y rendijas de recepción, un monocromador de Ge y un detector Lynxeye. Se verificó el rendimiento del instrumento utilizando un estándar de corindón certificado (NIST 1976). El software utilizado para la recopilación de datos fue Diffrac Plus XRD Commander v 2.5.0 y los datos se analizaron y presentaron utilizando Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 o v 13.0.0.2.

[0133] Las muestras se realizaron en condiciones ambientales como especímenes de placas planas utilizando polvo como se ha preparado en los Ejemplos 1 y 2. Aproximadamente 50-100 mg de la muestra se llenó suavemente en una cavidad cortada en pulido, cero de fondo (510) de la oblea de silicio. La muestra fue rotada en su propio plano durante el análisis. Los detalles de la recopilación de datos son:

- Rango angular: 2 a 42 ° 2θ
- Tamaño del escalón: 0,05 ° 2θ
- Tiempo de recolección: 0,5 s.escalón⁻¹.

Ejemplo 1. Representación de la Forma cristalina 1 del Compuesto A

Método 1

[0134] Se suspendieron 1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carboxilato de etilo (74,4 g, véase patente de EE.UU. 7.928.120 para métodos sintéticos generales) y glicina (302,9 g, 20 eq.) en metanol (4,0 l) a temperatura ambiente. Se añadió NaOMe (25%, 692 mL, 15 eq.) y la mezcla se calentó a reflujo y se agitó durante la noche. Después de que LC-MS mostró la finalización de la reacción, la suspensión se enfrió y se acidificó a pH ~ 3 con 1 N HCl. La mezcla resultante se filtró, se lavó con agua y se secó en un horno de vacío (40 °C) hasta peso constante para dar un sólido blanquecino, Compuesto A, Forma 1 (77,8 g).

Método 2

[0135] El Compuesto A (12 g, véase la Patente de EE.UU. 7.928.120 para métodos sintéticos generales) se suspendió en acetonitrilo (620 mL). Esta mezcla se agitó y se calentó a reflujo durante 30 minutos dando una solución clara de color amarillo pálido. Se enfrió lentamente a temperatura ambiente y luego a 5 °C, se agitó durante 30 minutos, se filtró, se lavó con acetonitrilo frío y se secó en un horno de vacío (65 °C) hasta peso constante para dar un sólido blanco, Compuesto A, Forma 1 (10,0 g).

Método 3

[0136] El compuesto A (0,5 g) se suspendió en ácido acético puro (10 ml) y se agitó a 80°C durante 16 h. Esta mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se secó en un horno de vacío (80 °C) hasta peso constante para dar un sólido blanquecino, Compuesto A, Forma 1 (0,44 g).

[0137] XRPD del Compuesto A, forma 1 mostró el patrón en la Figura 1. Los picos estaban en 7,7, 11,2, 13,8, 14,7, 15,3, 15,8, 18,3, 21,1, 22,2, 23,2, 25,2, 25,9° y 27,7 °2θ ±0,2 °2θ, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación Cu-Kα. Para la caracterización, se usaron al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres de estos picos.

[0138] El análisis de DSC del Compuesto A, forma 1 mostró el patrón en la Figura 2. La curva de DSC en la Figura 2 mostró un endotermo a aproximadamente 251 °C y un endotermo a aproximadamente 210 °C.

[0139] ¹H-RMN del Compuesto A en solución fue consistente con su estructura. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, 298K): 14,92 (s, 1H), 12,88 (bs, 1H), 9,61 (bt, 1H, J 6,06), 8,10 (dd, 1H, J 1,01, 8,34), 8,03 (dd, 1H, J 7,58, 8,34), 7,51 (dd, 1H, J 1,01, 7,58), 7,42 (d, 2H, J 9,09), 6,99 (d, 2H, J 9,09) y 4,02 (d, 2H, J 6,32) ppm.

Ejemplo 2. Preparación de la forma cristalina 2 del Compuesto A

Método 1

[0140] Sal de sodio del Compuesto A (1,22 Kg) se disolvió en agua, se agitó y se calentó a 80 °C. Se añadió ácido acético (830 g) lentamente durante 3 h. Esta mezcla se agitó durante 2 horas a 80 °C (para asegurar que el sólido se convierta en la Forma 2). Este se enfrió a 20-25°C, se agitó durante 1 h, se filtró y se lavó con agua (31 L). El sólido se secó en un horno de vacío (80 °C) hasta peso constante para dar un sólido blanquecino, Compuesto A, Forma 2 (880 g).

Método 2

[0141] El compuesto A (7,5 g) y 1 N NaOH (23,6 mL) se agitó en agua y se calentó a 80°C hasta que se disolvieron los sólidos. Se añadió lentamente ácido acético (2,25 g). La mezcla se agitó a 80°C durante 2 h. Esta mezcla se enfrió a aproximadamente 20°C, se filtró, se lavó con agua y se secó en un horno de vacío (80°C) hasta peso constante para dar un sólido blanco, Compuesto A, Forma 2 (7,25 g).

Método 3

[0142] El compuesto A (0,6 g) se sometió a reflujo con acetato de isopropilo (aproximadamente 30 mL) durante la noche, se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y se lavó con acetato de isopropilo y se secó hasta peso constante para dar un sólido blanco, Compuesto A, Forma 2 (0,4 g).

Método 4

[0143] El compuesto A (26 g) se suspendió en agua, se calentó a 80°C, se agitó durante 1 h, se enfrió a temperatura ambiente, se filtró, se lavó con agua y se secó en un horno de vacío (80°C) hasta peso constante. para dar un sólido blanquecino, Compuesto A, Forma 2 (25,3 g).

[0144] La XRPD del Compuesto A, forma 2, mostró el patrón en la Figura 3. Los picos estaban en 7,2, 8,1, 10,6, 11,5, 13,9, 14,5, 16,2, 19,3, 21,5, 21,9, 22,7, 23,2, 24,5, 25,9, 26,6, 27,8 y 29,1 °2θ ±0,2 °2θ, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación Cu-Kα. Para la caracterización, se usaron al menos uno, preferiblemente al menos dos, más preferiblemente al menos tres de estos picos.

[0145] El análisis de DSC del Compuesto A, forma 2, mostró el patrón en la Figura 4. La curva de DSC en la Figura 4 mostró un endotermo a aproximadamente 249 °C.

[0146] ¹H-RMN del Compuesto A en solución fue consistente con su estructura. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆, 298K): 14,92 (s, 1H), 12,88 (bs, 1H), 9,61 (bt, 1H, J 6,06), 8,10 (dd, 1H, J 1,01, 8,34), 8,03 (dd, 1H, J 7,58, 8,34), 7,51 (dd, 1H, J 1,01, 7,58), 7,42 (d, 2H, J 9,09), 6,99 (d, 2H, J 9,09) y 4,02 (d, 2H, J 6,32) ppm.

Ejemplo 3. Estabilidad de la forma 1 y la forma 2 del compuesto A

Experimentos de siembra cruzada

[0147] Se colocó una mezcla sólida que contenía aproximadamente el 50% de la Forma 1 y aproximadamente el 50% de la Forma 2 (obtenida de la maduración en IPAc) (< 10 mg) en seis viales diferentes. Tres de estos viales se trataron con DCM (< 50 µL en cada uno) y los otros tres se trataron con IPAc (< 50 µL en cada uno). Las mezclas de la mezcla sólida en DCM e IPAc se agitaron a 5°C, 25°C y 50°C durante 10 días.

[0148] Los sólidos de DCM, después de secado en condiciones ambientales, se analizaron mediante XRPD, los patrones cristalinos se adecuaron a la Forma 1.

[0149] Los sólidos de IPAc, después de secado en condiciones ambientales, se analizaron mediante XRPD, los patrones cristalinos se adecuaron a la Forma 2.

Maduración de la Forma 1 en agua con semillas de la Forma 2.

[0150] Una suspensión de una mezcla sólida de la Forma 1 y la Forma 2 (1:1) en agua se incubó a 50 °C/temperatura ambiente (4 h - ciclos), y al 75% de RH durante cuatro días. Después de este tiempo, el sólido fue analizado por XRPD. El patrón cristalino coincidió con la Forma 2, y no se detectaron rastros de la Forma 1 en este análisis.

Maduración de la Forma 1 en agua sin semillas de Forma 2

[0151] La forma 1 se suspendió en agua y se incubó a 50 °C/temperatura ambiente (4 h - ciclos), y al 75% de HR. En este caso, la transformación de la Forma 1 en la Forma 2 fue más lenta. Después de 4 días, hubo una clara indicación de que se formó la Forma 2, pero también quedó una cantidad significativa de Forma 1 restante. Después de 15 días en estas condiciones, la forma 1 se había convertido completamente en la forma 2.

Estabilidad de la Forma 2

[0152] La Forma 2 permaneció sin cambios después de una semana en una cámara de humedad a 40 °C y 75% de HR.

Reflujo de Forma 1 en agua

[0153] La Forma 1 se sometió a reflujo en agua y la cristalinidad del sólido se controló mediante XRPD. Después de 2,5 h, ya se pudieron observar varios picos de difracción nuevos correspondientes a la Forma 2. Después de 10 horas a reflujo, se completó la transformación de la Forma 1 en la Forma 2.

Estabilidad de Forma 1 en agua a 25 °C

[0154] La forma 1 se suspendió en agua a 25°C, y la cristalinidad del sólido se analizó mediante XRPD durante un período de tiempo. No se observaron cambios en el patrón cristalino de la Forma 1 después de seis días en una suspensión acuosa a 25°C.

[0155] Estos estudios indican que la Forma 2 es termodinámicamente más estable que la Forma 1.

Ejemplo 4. Preparación y caracterización de solvatos del compuesto A

Preparación y caracterización por XRPD.

[0156] La Forma 1 (200 mg) se suspendió en el disolvente correspondiente (véase Tabla 1) y se incubó a 40 °C/temperatura ambiente (ciclos de 4 h) durante 16 h. El disolvente se eliminó luego al vacío (excepto el experimento en 1,4-dioxano, que se secó en condiciones ambientales) y los sólidos se analizaron por XRPD. La Figura 5 muestra los patrones de XRPD para solvatos del Compuesto A, XRPD3 y XRPD4. La Figura 6 muestra los patrones de XRPD para el Compuesto A, Forma 2 y solvatos del Compuesto A, XRPD3, XRPD4, XRPD5, XRPD6 y XRPD7.

Tabla 1. Solvatos del Compuesto A

Solvente	Solvato caracterizado por XRPD	Estabilidad a 40 °C/75% RH
IPAc (10 volúmenes)	Forma 2	Forma 2
THF (3 volúmenes)	XRPD 3	Forma 1
Tolueno (5 volúmenes)	XRPD 4	Forma 1
DMF (4 volúmenes)	XRPD 5	Forma 2
NMP (4 volúmenes)	XRPD 6	Forma 2 - incompleta
1,4-dioxano (5 volúmenes)	XRPD 7	Forma 2

Estabilidad

[0157] Los sólidos se almacenan entonces en la cámara de humedad a 40 °C y 75% de humedad relativa durante una semana para evaluar su estabilidad bajo estas condiciones, y se re-analizaron por XRPD.

[0158] La forma 2 permaneció sin cambios después de una semana en una cámara de humedad a 40 °C y 75% de HR. Tanto los sólidos de XRPD 3 como los de XRPD 4 se transformaron en la Forma 1 después del almacenamiento durante una semana en estas condiciones. Los sólidos de XRPD 5, XRPD 6 y XRPD 7 cambiaron a la Forma 2 después de una semana a 40 °C y 75% de HR. en el caso del sólido obtenido a partir de NMP (XRPD 6), la transformación no fue completa, y algunos picos de las formas cristalinas iniciales aún se podían observar en su patrón de polvo. Los resultados se resumen en la Tabla 1.

Análisis de ¹H-RMN

[0159] Los análisis de ¹H-RMN se llevaron a cabo para el Compuesto A, la Forma 2 y los solvatos del Compuesto A (Figura 7). Los espectros fueron consistentes con la estructura propuesta. Se identificó y se cuantificó algo de solvente residual para los sólidos con patrones cristalinos XRPD 3, XRPD 4, XRPD 5, XRPD 6 y XRPD 7, mediante la integración de las señales resaltadas en la Figura 7. Este resultado sugirió que estos sólidos eran solvatos en lugar de nuevos polimorfos.

Análisis térmico

[0160] Los análisis térmicos se realizaron también para el Compuesto A, Forma 2, y solvatos de Compuesto A.

[0161] No se observó pérdida de peso en el termograma TGA para la Forma 2 hasta que la degradación se inició a ~ 260 °C. El termograma de DSC solo mostró un evento endotérmico, que se correspondía con la fusión de la Forma 2 (inicio 249 °C, entalpía de fusión -132.5 J/g).

[0162] Se observó una pérdida de peso de ~ 7,5% en el termograma de TGA para XRPD 3 sólida entre 45 y 140 °C. Esta pérdida de peso en correlación con la cantidad de THF residual observado en el espectro ¹H-RMN y se asoció con un evento endotérmico amplio en el termograma DSC, probablemente desolvatación a la Forma 1. Un evento exotérmico pequeño con un inicio de <200 °C indicó que se había producido una transición sólido-sólido de la Forma 1 para producir la Forma 2. El material se fundió entonces a 251°C. La degradación de la muestra comenzó a < 260 °C.

[0163] Se observó una pérdida de peso de ~ 4,5% en el termograma de TGA para XRPD 4 sólida entre 60 y 160 °C. Esta pérdida de peso se correlaciona con la cantidad de tolueno residual observado en el espectro ¹H-RMN y se asocia con un evento endotérmico en el termograma de DSC, probablemente desolvatación a la Forma 1. Un pequeño evento exotérmico con un inicio ~ 193 °C indicó que tuvo lugar una transición sólido-sólido de la Forma 1 para producir la Forma 2. El material se fundió entonces a 251°C. La degradación de la muestra comenzó a < 260 °C.

[0164] Se observó una pérdida de peso de ~15,3% en el termograma de TGA para XRPD 5 sólida entre 100 y 150 °C. Esta pérdida de peso se correlacionó con la cantidad de DMF residual observada en el espectro de ¹H-RMN y se asoció con un evento endotérmico en el termograma de DSC, probablemente desolvatación para producir la Forma 2. Se observó que la ausencia del evento exotérmico a < 200 °C para XRPD 3 y XRPD 4 indicó que la desolvatación de este material no produjo la Forma 1 sino la Forma 2, que se confirmó mediante la fusión a 250 °C. La degradación de la muestra comenzó a < 260 °C.

[0165] Se observó una pérdida de peso de ~ 19,8% en el termograma de GA para XRPD 6 sólida entre 100 y 170 °C. Esta pérdida de peso se correlacionó con la cantidad de NMP residual observada en el espectro de ¹H-RMN y se asoció con un evento endotérmico en el termograma DSC, probablemente desolvatación para producir la Forma 2. en cuanto al material XRPD 5, la desolvatación no produjo la Forma 1, pero Forma 2. El material se fundió a 250 °C.

La degradación de la muestra comenzó a < 260 °C.

[0166] Se observó una pérdida de peso de ~ 16,9% en el termograma de TGA para XRPD 7 sólida entre 80 y 110 °C. Esta pérdida de peso se correlacionó con la cantidad de 1,4-dioxano residual observado en el espectro de ¹H-RMN y se asoció con un evento endotérmico en el termograma de DSC, probablemente desolvatación para producir la Forma 2. El material se fundió luego a 249 °C. La degradación de la muestra comenzó a < 260 °C.

Ejemplo 5. El compuesto A aumenta los niveles de hemoglobina y hematocrito en ratones

[0167] El compuesto A (2, 6, 20, 60, 100 o 200 mg/kg como sonda oral) o el control del vehículo se administraron por vía oral 3 veces en 1 semana los lunes, miércoles y viernes (4-8 hombres Swiss Webster) ratones/grupo). Tres días después de la última dosis, todos los animales se sometieron a eutanasia y se recogieron sangre y suero para recuentos sanguíneos completos (CBC) y química del suero.

[0168] La media de hemoglobina (Hb), hematocrito (HCT), y los niveles de recuentos de glóbulos rojos (RBC) fueron significativamente mayores en todos los grupos de dosis de compuesto A cuando se comparan con el control del vehículo (Figura 8). Los niveles medios para los tres parámetros fueron dependientes de la dosis en dosis de entre 2 y 20 mg/kg, alcanzando un nivel de entre 20 y 60 mg/kg. Los niveles de Hb aumentaron en más de 1 g/dL a la dosis más baja ensayada, 2 mg/kg en este estudio de 1 semana en ratones Swiss Webster. La administración del Compuesto A resultó en aumentos significativos dependientes de la dosis en los parámetros hematológicos de la eritropoyesis.

Ejemplo 6. El compuesto A aumenta los niveles de hemoglobina y hematocrito en monos

[0169] Monos cynomolgus machos (n = 5/grupo de dosis) recibieron la administración oral diaria de 0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 y 30 mg/kg Compuesto A durante 14 días consecutivos. Se recogió sangre para los recuentos sanguíneos completos (CBC), una vez antes de la dosis, y antes de la dosificación en los días 8 y 14.

[0170] La administración oral (sonda oral) del compuesto A a dosis de 0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 y 30 mg/kg a monos cynomolgus durante 14 días consecutivos se asociaron con cambios en la hematología a ≥ 1 mg/kg/día. en los días 8 y 14, hubo aumentos relacionados con la dosis de reticulocitos (RETI) (54% a 724%) a >1 mg/kg y a ≥3 mg/kg/día, aumentos de RBC (13% a 41%), Hb (18% a 38%) y HCT (14% a 46%). La Figura 9 muestra los niveles de HCT, Hb y RBC después de 2 semanas de dosificación diaria.

Ejemplo 7. Tratamiento de la anemia de la enfermedad crónica.

[0171] La anemia de la enfermedad crónica (AEC) se asocia con diversas afecciones inflamatorias, que incluyen artritis y enfermedad neoplásica. Esta anemia se caracteriza por una producción inadecuada de EPO, alteraciones en el metabolismo del hierro, reducción de la vida útil de los glóbulos rojos y alteración de la respuesta eritropoyética de la médula ósea.

[0172] Ratas Lewis hembra fueron desafiadas con polímeros de peptidoglicano-polisacárido (PG-PS) para inducir artritis y anemia. La artritis y la anemia se dejaron desarrollar durante 28 días antes del inicio del tratamiento con el Compuesto A (sonda oral, 8 o 20 mg/kg) o vehículo (n = 8/grupo). Los tratamientos se administraron 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes), durante 2 semanas. La progresión del modelo se monitorizó mediante la medición de la hinchazón de la pata y los parámetros hematológicos. Las muestras de sangre fueron analizadas para hematopoyesis y parámetros de hierro. El estudio también incluyó tres grupos de control sin desafío (n = 5/grupo) que se inyectaron con solución salina en lugar de PG-PS y luego se trataron con vehículo o Compuesto A (8 o 20 mg/kg) como se describe para los animales PG-PS.

[0173] El desafío con polímeros de PG-PS en ratas Lewis hembra dio como resultado una anemia que se manifestó 4 semanas después del desafío con PG-PS. Este modelo mostró características de deficiencia de hierro funcional que incluyen microcitosis (disminución del volumen celular promedio) e hipocromía (disminución de la hemoglobina corpuscular media), disminución de hierro sérico y aumento de la capacidad de unión al hierro total (TIBC) y capacidad de unión al hierro insaturado (UIBC), y características de la anemia incluyendo hemoglobina, hematocrito y recuento de glóbulos rojos significativamente reducidos. Además de la anemia, las ratas expuestas a PG-PS desarrollaron inflamación sistémica y artritis, según lo indicado por los recuentos elevados de glóbulos blancos y la hinchazón de las extremidades. Los animales con anemia de PG-PS tratados con vehículo no mostraron cambios significativos en los parámetros hematológicos durante el transcurso del estudio.

[0174] El tratamiento intermitente con el Compuesto A (8 o 20 mg/kg) durante 2 semanas corrigieron Hb, HCT, RBC, MCH disminuye, y aumenta TIBC inducidos por reto PG-PS, con efectos estadísticamente significativos a 20 mg/kg de dosis (Figura 10).

[0175] En resumen, el tratamiento del compuesto A intermitente alivió significativamente la anemia asociada con la anemia de la enfermedad crónica.

Ejemplo 8. Tratamiento de la anemia inducida por la enfermedad renal crónica

[0176] El riñón es la fuente principal de la producción de eritropoyetina en el mamífero adulto; por lo tanto, la anemia y la disminución de la producción de eritropoyetina son una secuela común de la insuficiencia renal. El modelo de riñón remanente (inducido por 5/6 nefrectomía) es un modelo bien establecido de anemia por insuficiencia renal progresiva.

[0177] Las ratas Wistar hembras se sometieron a nefrectomía subtotal (5/6) de la cirugía para inducir la enfermedad renal crónica ligando el riñón izquierdo para infartar 2/3 del riñón mientras que el riñón derecho se sometió a nefrectomía total simultánea. Como control, animales adicionales se sometieron a una cirugía simulada, sin nefrectomía. Cinco semanas después de la cirugía, la anemia y la enfermedad renal crónica en los animales nefrectomizados se confirmaron mediante patología clínica y los animales se asignaron a uno de los tres grupos de tratamiento (n = 8/grupo) y se trataron con 0 (vehículo), 8 o 20 mg/kg Compuesto A. El grupo simulado (n = 8) recibió 0 mg/kg (vehículo). Comenzando 6 semanas después de la cirugía, todos los animales recibieron una dosis de TIW (lunes, miércoles y viernes) por sonda oral durante 2 semanas. Se recogieron muestras de sangre entera 5, 7 y 8 semanas después de la cirugía.

[0178] Animales nefrectomizados mostraron características clásicas de anemia, a saber, la reducción de Hb, HCT y RBC en comparación con el grupo de tratamiento simulado, así como aumento de la presión arterial sistólica a las 5 y 8 semanas después de la cirugía. Además, los animales nefrectomizados tratados con vehículo mostraron una enfermedad renal crónica a las 5 semanas posteriores a la cirugía, aparente en cambios significativos en los parámetros de química del suero. Después de 2 semanas de tratamiento, la administración del Compuesto A a 8 y 20 mg/kg elevó significativamente la Hb, HCT y RBC en comparación con los controles del vehículo (Figura 11). La administración de 20 mg/kg del Compuesto A normalizó los tres parámetros a niveles similares al grupo de control simulado (no anémico). Además, los tratamientos con el Compuesto A parecieron causar valores más altos de MCV y MCH en animales nefrectomizados; sin embargo, solo MCV a 20 mg/kg fue significativamente mayor después de 2 semanas de tratamiento.

[0179] Se concluyó que el tratamiento intermitente del Compuesto A durante 2 semanas corrigió la anemia y la mejora de la utilización del hierro como se evidencia por la corrección parcial de la microcitosis y hipocromía asociada con 5/6 nefrectomía.

Ejemplo 9. El compuesto A aumenta los niveles de eritropoyetina, reticulocitos y hemoglobina en humanos

[0180] Una sola dosis del Compuesto A (Forma 2, cápsulas) se administró por vía oral a voluntarios sanos de sexo masculino. El Compuesto A se proporcionó en cápsulas de 1 mg y 5 mg, redondeando la dosis a la cápsula completa más cercana. En las cohortes 1-4 las dosis fueron 0,05 mg/kg, 0,15 mg/kg, 0,3 mg/kg y 0,4 mg/kg respectivamente. Los puntos temporales para la extracción de sangre fueron: dosis previa, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 48, 72, 96 y 120 horas, días 8, 10, 12 y 15 después de la dosis.

Eritropoyetina

[0181] La Figura 12 muestra que los niveles plasmáticos máximos medios de eritropoyetina aumentan después de la dosificación con el Compuesto A.

[0182] En la cohorte 1, todos los sujetos habían aumentado las concentraciones de eritropoyetina en plasma en comparación con la línea base (pretratamiento después de la dosificación con el Compuesto A. Los niveles máximos de eritropoyetina se produjeron aproximadamente a las 16,8 horas con una concentración plasmática máxima media de eritropoyetina de 27,2 mIU/mL en comparación con la concentración plasmática media de eritropoyetina de 11,4 mIU/mL al inicio.

[0183] En la cohorte 2 todos los sujetos habían aumentado las concentraciones de eritropoyetina en plasma después de la dosificación con el Compuesto A, que se incrementó aproximadamente proporcionalmente a la dosis con la excepción de un sujeto que mostró una respuesta de eritropoyetina más robusta. Los niveles máximos de eritropoyetina se produjeron a una media de 14 horas después de la administración del Compuesto A con una concentración media máxima de eritropoyetina de 81,7 mIU/mL. Los niveles medios de eritropoyetina volvieron a la línea de base después de aproximadamente 5 días.

[0184] En la cohorte 3, los niveles de eritropoyetina de pico se produjeron a una media de 23 horas después de la dosificación con una concentración máxima media de aproximadamente 620 mIU/mL. Los niveles de eritropoyetina aumentaron más que proporcionalmente a la dosis en la cohorte 3 en comparación con la cohorte 2.

[0185] En la cohorte 4, todos los sujetos habían aumentado las concentraciones de eritropoyetina en plasma después de la dosificación con el Compuesto A en comparación con la línea base (pretratamiento). Como se muestra en la Figura 12, las concentraciones máximas de eritropoyetina (EPO) (C_{max}) y EPO sustraída basal (C_{max} -BL) aumentaron más de lo proporcionalmente a la dosis entre la cohorte 3 (0,3 mg/kg) y la cohorte 4 (0,4

mg/kg). La concentración plasmática máxima media de eritropoyetina para todos los sujetos en la cohorte 4 fue de 2.900 mIU/mL, en espera de un nuevo análisis de una muestra que estaba por encima del límite superior de cuantificación. El tiempo medio hasta la concentración máxima de EPO fue de 20 horas.

5 Recuentos de reticulocitos

[0186] Hubo una tendencia al aumento de los recuentos de reticulocitos en las Cohortes 1-4, lo que sugiere que el Compuesto A estaba activo en su diana biológica provocando una respuesta eritropoyética (Tabla 2).

Tabla 2. Cambios en los recuentos de reticulocitos

Valores de reticulocitos (% basal $\pm$ DE)	Cohorte 1	Cohorte 2	Cohorte 3	Cohorte 4
	0,05 mg/kg (N = 5)	0,15 mg/kg (N = 7)	0,3 mg/kg (N = 6)	0,4 mg/kg (N = 6)
Día 0	100	100	100	100
Día 3	104 $\pm$ 8	111 $\pm$ 19	127 $\pm$ 3	163 $\pm$ 21
Día 5	111 $\pm$ 10	121 $\pm$ 22	141 $\pm$ 22	134 $\pm$ 22
Día 8	120 $\pm$ 20	180 $\pm$ 53	231 $\pm$ 40	376 $\pm$ 60

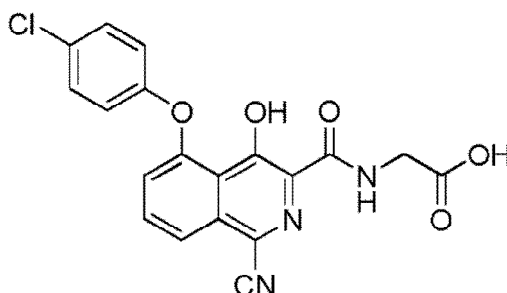
Niveles de hemoglobina

[0187] En la cohorte 1, los niveles medios de hemoglobina no cambiaron desde el Día 0 al Día 8. En la cohorte 2, la hemoglobina media aumentó en 0,3 g/dL en el día 8; en la cohorte 3, el promedio de hemoglobina aumentó 0,8 g/dL en el día 8; y en la cohorte 4 la hemoglobina media aumentó en 0,7 g/dL en el día 8 y por 1,1 g/dL en el día 15.

[0188] Estos datos demuestran que el Compuesto A, cuando se administra como la forma cristalina 2, es eficaz para aumentar plasma EPO, aumentar los niveles de reticulocitos, y aumentar los niveles medios de hemoglobina.

REIVINDICACIONES

1. Forma cristalina 2 del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (compuesto A) que tiene la siguiente estructura:



(Compuesto A, Forma 2), y **se caracteriza por** tener un difractograma de rayos X en polvo que comprende un pico a $19,3 \pm 0,2^\circ 2\theta$, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación de Cu-K α ; y

- (i) el difractograma comprende además al menos un pico seleccionado entre 8,1, 10,6, 11,5, 14,5, 16,2, 21,5, 21,9, 22,7, 24,5 y $26,6^\circ 2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación Cu-K α , o
- (ii) una curva de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 249°C , cuando se mide a una velocidad de calentamiento de $10^\circ\text{C}/\text{min}$.

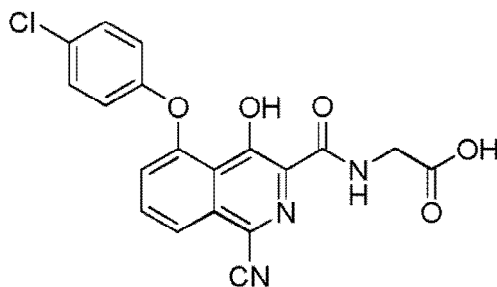
2. Compuesto A, Forma 2 de la reivindicación 1, en el que:

- (i) el difractograma comprende además picos de $10,6$ y $11,5^\circ 2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$; y opcionalmente
- (ii) el difractograma comprende además picos en $14,5$, $16,2$, $24,5$ y $26,6^\circ 2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$; y opcionalmente
- (iii) el difractograma es sustancialmente como se muestra en la Figura 3.

3. Compuesto A, Forma 2 de la reivindicación 1, **caracterizado por** una curva de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que comprende un endotermo a aproximadamente 249°C , y opcionalmente

- (i) en donde la curva DSC es sustancialmente como se muestra en la Figura 4; o
- (ii) en donde un difractograma de rayos X en polvo es sustancialmente como se muestra en la Figura 3, y una curva DSC es sustancialmente como se muestra en la Figura 4.

4. Una composición farmacéutica que comprende una forma cristalina de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) que tiene la siguiente estructura:



(Compuesto A),

en donde la forma cristalina del Compuesto A comprende la Forma 2 como en cualquier reivindicación precedente, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que:

- (i) al menos el 95% de la forma cristalina es el Compuesto A, Forma 2; o
- (ii) al menos el 99% de la forma cristalina es el Compuesto A, Forma 2; o
- (iii) al menos el 99,9% de la forma cristalina es el Compuesto A, Forma 2; o
- (iv) al menos el 99,99% de la forma cristalina es el Compuesto A, Forma 2.

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que la composición se formula para administración oral,

por ejemplo, como una tableta o una cápsula.

7. Una composición de la reivindicación 4 para uso en un método para tratar, pretratar o retrasar la aparición de:

- 5 (i) una afección asociada o mediada al menos en parte por el factor inducible por hipoxia (HIF) seleccionado entre afecciones anémicas, afecciones isquémicas, afecciones hipóxicas, afección que produce isquemia aguda, como infarto de miocardio, embolia pulmonar, infarto intestinal, infarto de miocardio o lesión por insuficiencia renal por isquemia-reperfusión, una afección asociada con el desarrollo de isquemia crónica, como cirrosis cardíaca, degeneración macular, embolia pulmonar, insuficiencia respiratoria aguda, síndrome de dificultad respiratoria neonatal o insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión, diabetes, enfermedad arterial oclusiva, enfermedad por insuficiencia venosa crónica, enfermedad de Raynaud, úlceras crónicas de la piel, cirrosis, insuficiencia cardíaca congestiva o esclerosis sistémica, o para disminuir o prevenir el desarrollo de daño tisular asociado con isquemia o hipoxia; o
- 10 (ii) una afección asociada o mediada al menos en parte por la eritropoyetina (EPO) seleccionada de una afección asociada con trastornos neurológicos o anemia, como enfermedad renal aguda o crónica, diabetes, cáncer, úlceras, inflamación, infección por virus, como el VIH, bacterias o parásitos, una afección asociada con radioterapia, quimioterapia, diálisis o cirugía, anemia microcítica, anemia hipocrómica o anemia aplásica; o
- 15 (iii) un trastorno o lesión neurológica, como apoplejía, trauma, epilepsia, enfermedad neurodegenerativa, isquemia cardíaca, como infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca congestiva, isquemia hepática como cirrosis cardíaca, isquemia renal como insuficiencia renal aguda o insuficiencia renal crónica, trastornos vasculares periféricos, úlceras, quemaduras o heridas crónicas, embolia pulmonar o lesión por isquemia-reperfusión; o
- 20 (iv) anemia.

25 **8.** Un proceso para hacer la Forma 2 cristalina del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:

- 30 a) calentar una mezcla que comprende una sal de ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A);
- b) añadir un ácido a la mezcla y continuar calentando;
- c) enfriar la mezcla; y
- d) aislar la Forma 2 del Compuesto A;

35 opcionalmente en el que el proceso se realiza en agua.

9. El proceso de la reivindicación 8, en el que la sal del Compuesto A se proporciona mezclando el Compuesto A con una base, por ejemplo, en donde la base es hidróxido de sodio.

40 **10.** El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 9-10, en el que el calentamiento es a una temperatura de (i) mayor que aproximadamente 80°C, o (ii) aproximadamente 80-85°C.

11. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que el ácido es ácido acético.

45 **12.** El proceso de la reivindicación 8, en el que la sal del Compuesto A se proporciona mezclando 1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carboxilato de etilo, glicina y una base, por ejemplo, en donde la base es metóxido de sodio.

50 **13.** Un proceso de acuerdo con la reivindicación 8 para fabricar la Forma 2 cristalina del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinoleína-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A), que comprende:

- a) calentar una mezcla que comprende la sal de sodio del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) en agua a aproximadamente 80-85 °C;
- 55 b) agregar ácido acético a la mezcla y continuar calentando a aproximadamente 80-85 °C;
- c) enfriar la mezcla; y
- d) aislar la Forma 2 del Compuesto A,

en donde opcionalmente se proporciona la sal de sodio del Compuesto A mezclando el Compuesto A con hidróxido de sodio.

60 **14.** Un proceso para hacer la Forma 2 cristalina del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende calentar el Compuesto A en un solvente adecuado y aislar la Forma 2 del Compuesto A, en donde (i) el solvente adecuado es acetato de isopropilo y el calentamiento es a reflujo, o (ii) el solvente adecuado es agua y el calentamiento está a unos 80 °C.

65

15. Un proceso para hacer la Forma 2 cristalina del ácido {[1-ciano-5-(4-clorofenoxi)-4-hidroxi-isoquinolina-3-carbonilo]-amino}-acético (Compuesto A) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende calentar la Forma 1 del Compuesto A, en donde la Forma 1 del Compuesto A **se caracteriza por** tener un difractograma de rayos X en polvo que comprende un pico en $18,3^{\circ}2\theta \pm 0,2^{\circ}2\theta$ y que comprende además al menos un pico seleccionado entre 7,7, 11,2, 13,8, 14,7, 15,3, 15,8, 21,1, y $22,2^{\circ}2\theta \pm 0,2^{\circ}2\theta$, según lo determinado en un difractograma utilizando radiación Cu-Ka.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

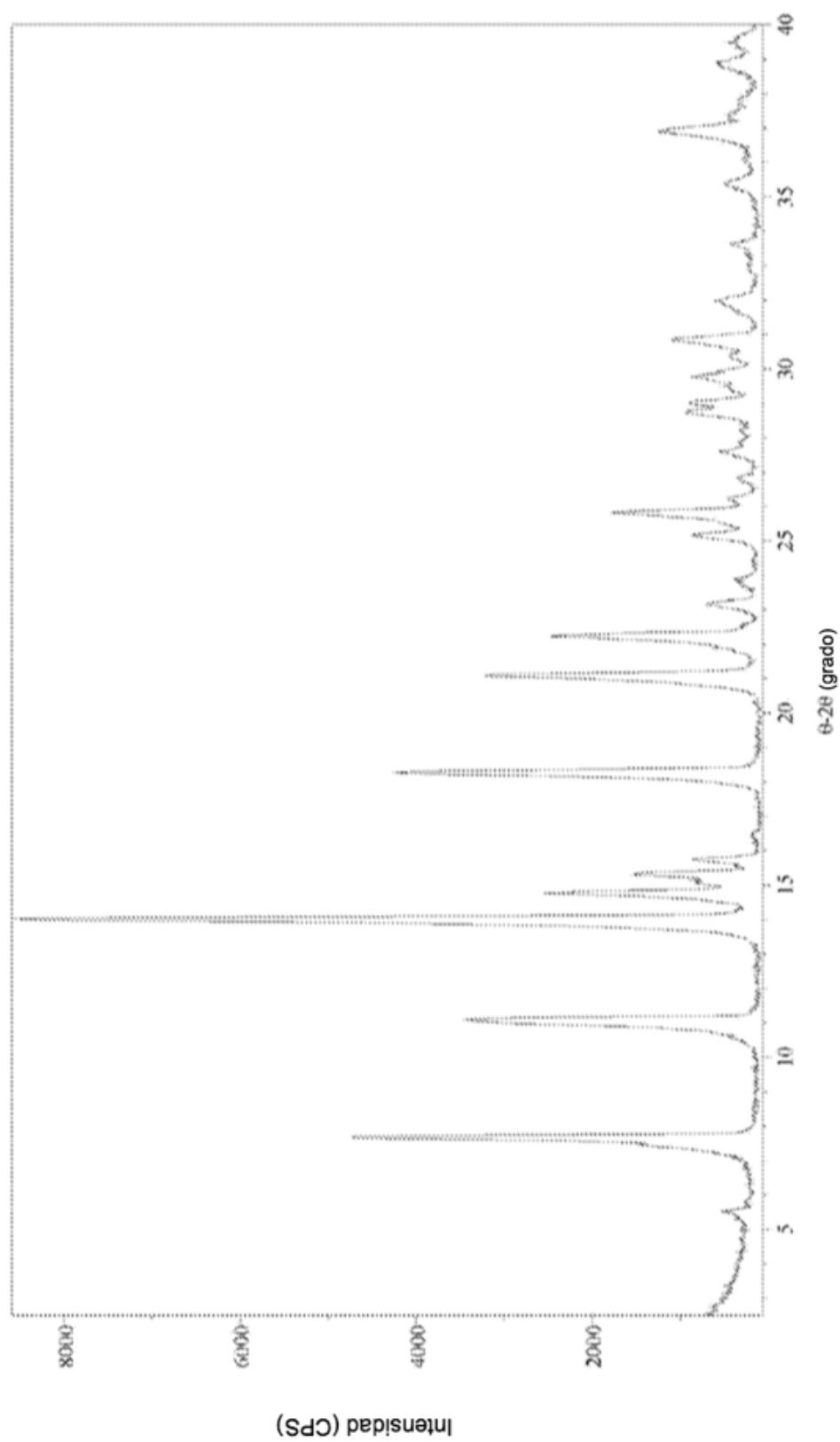


Fig. 1

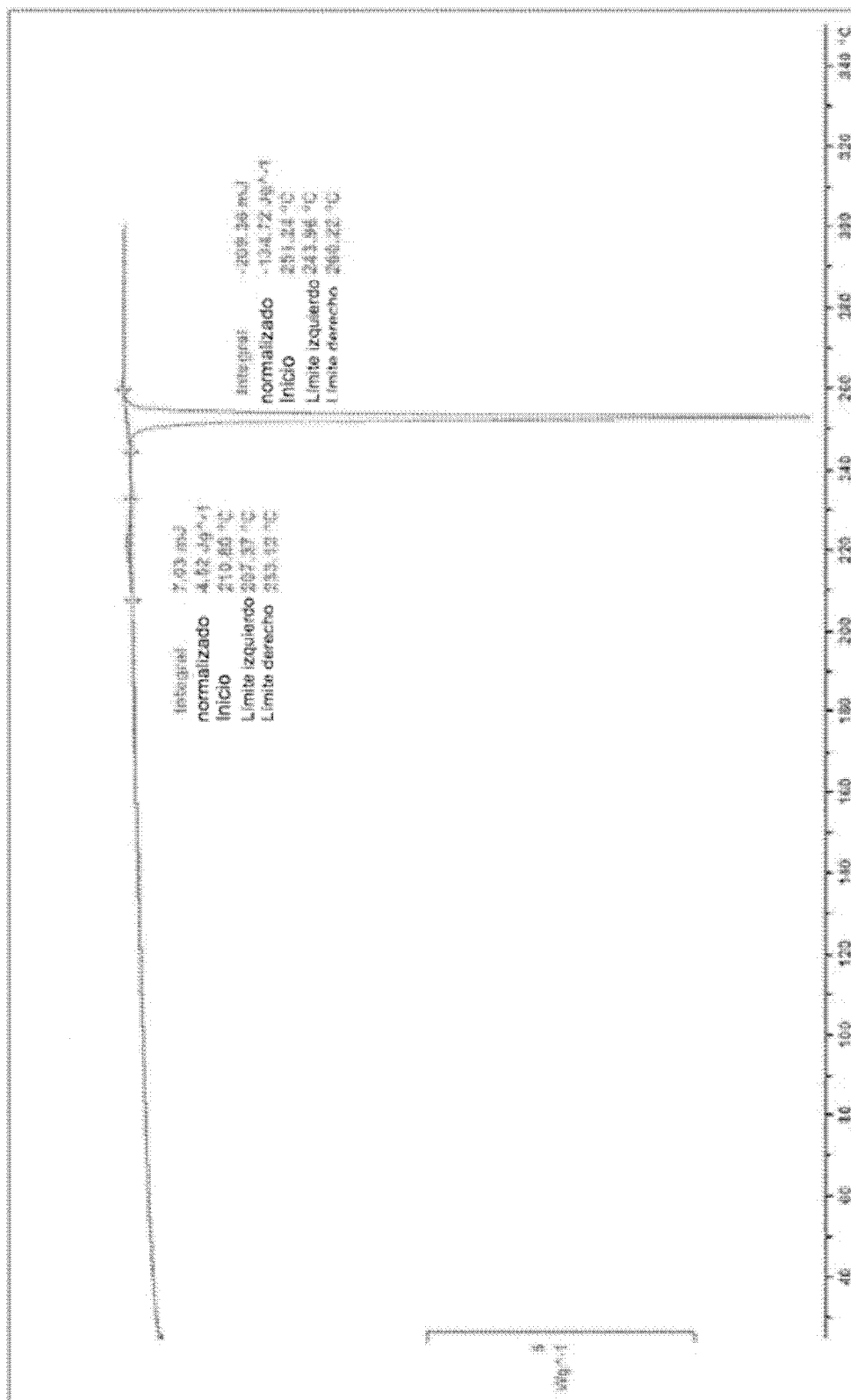


Fig. 2

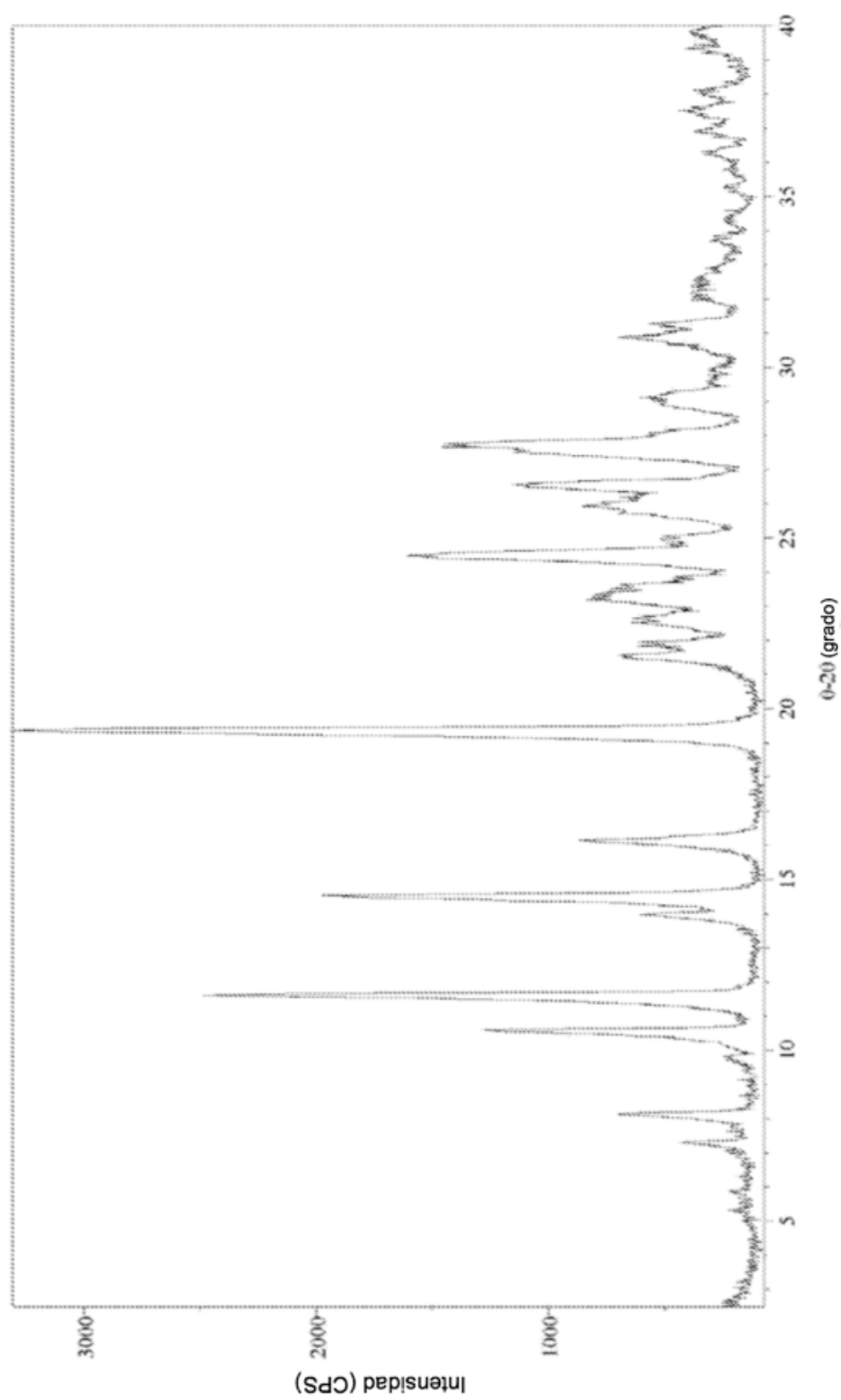


Fig. 3

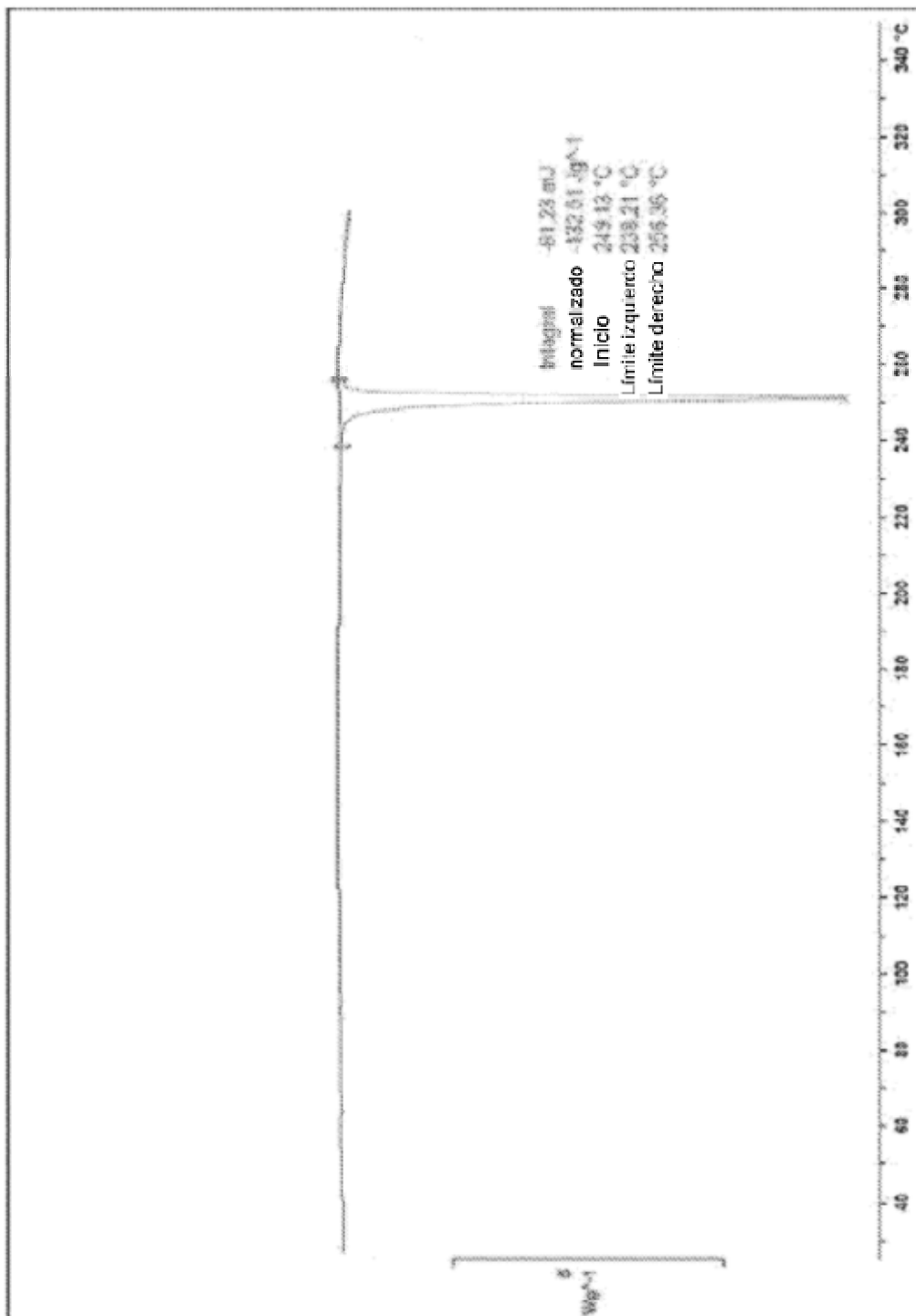


Fig. 4

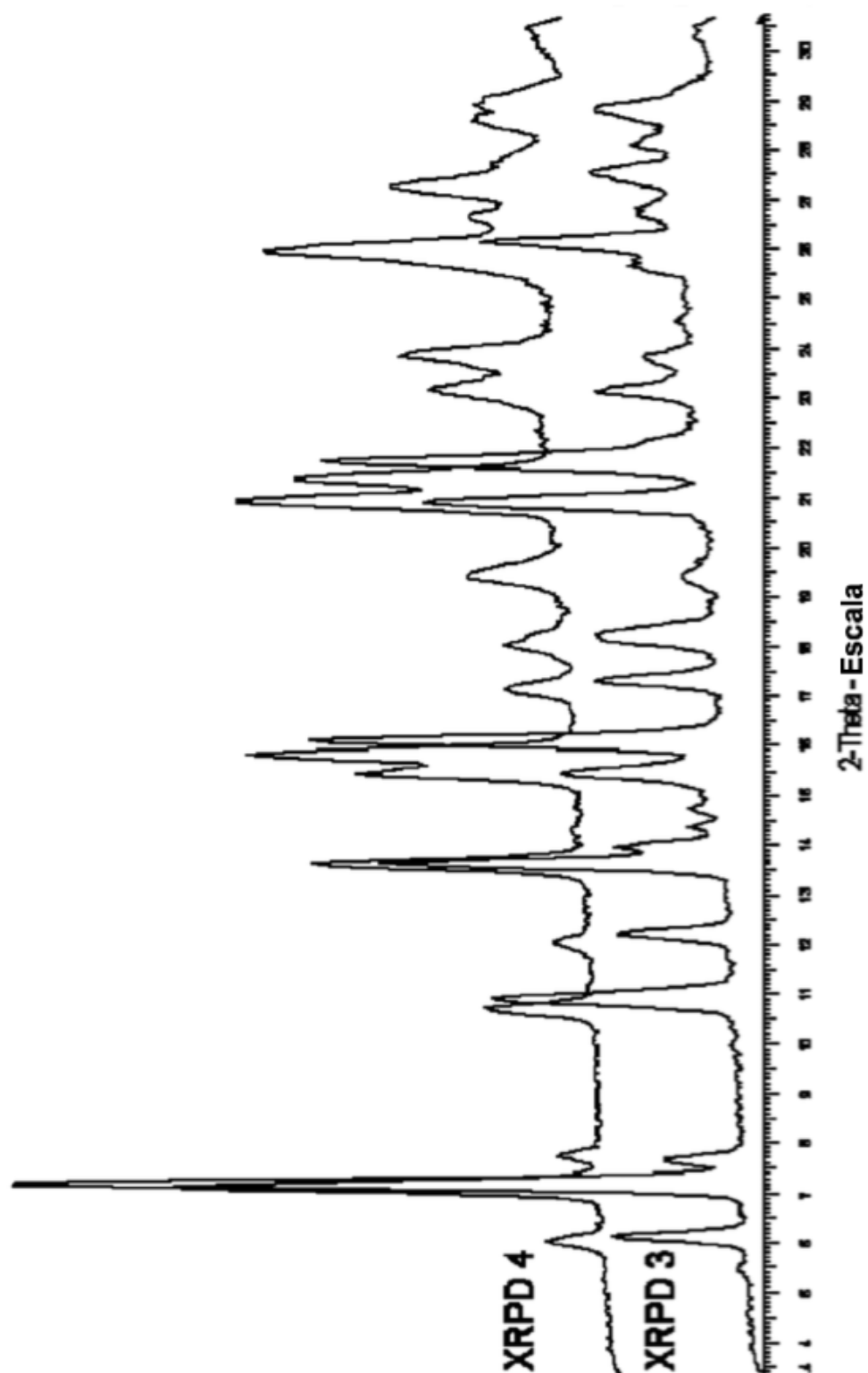


Fig. 5

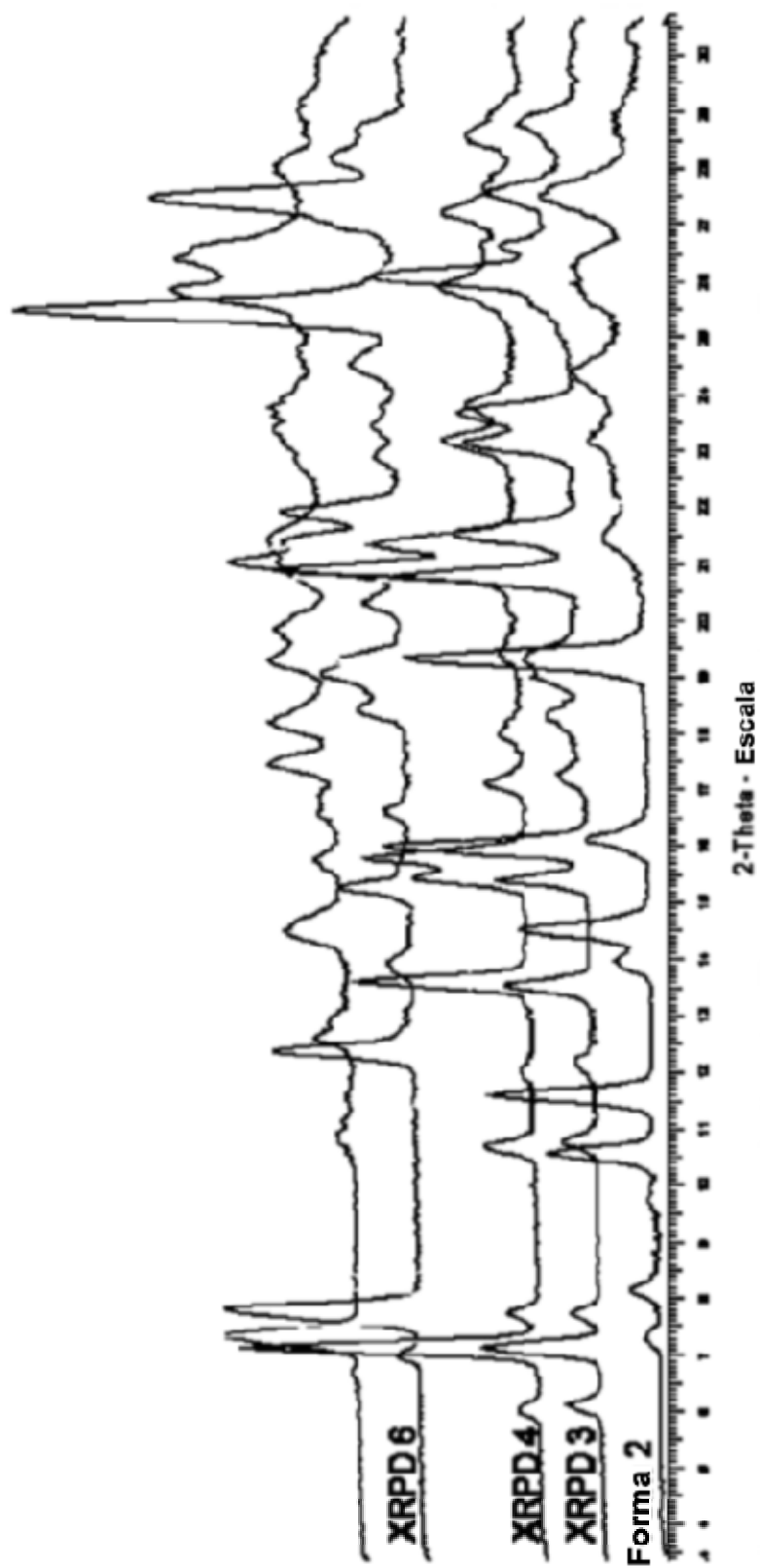


Fig. 6

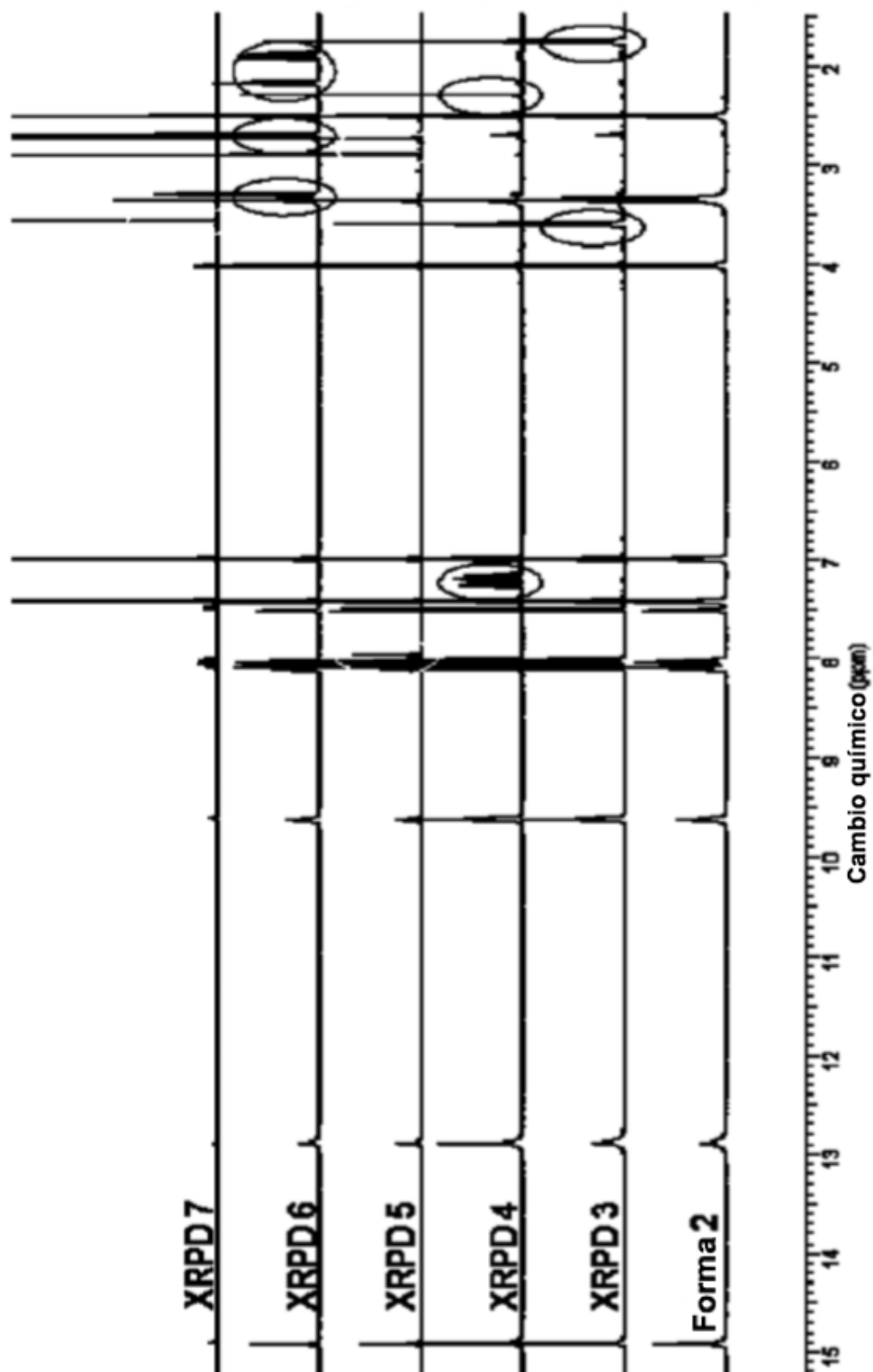


Fig. 7

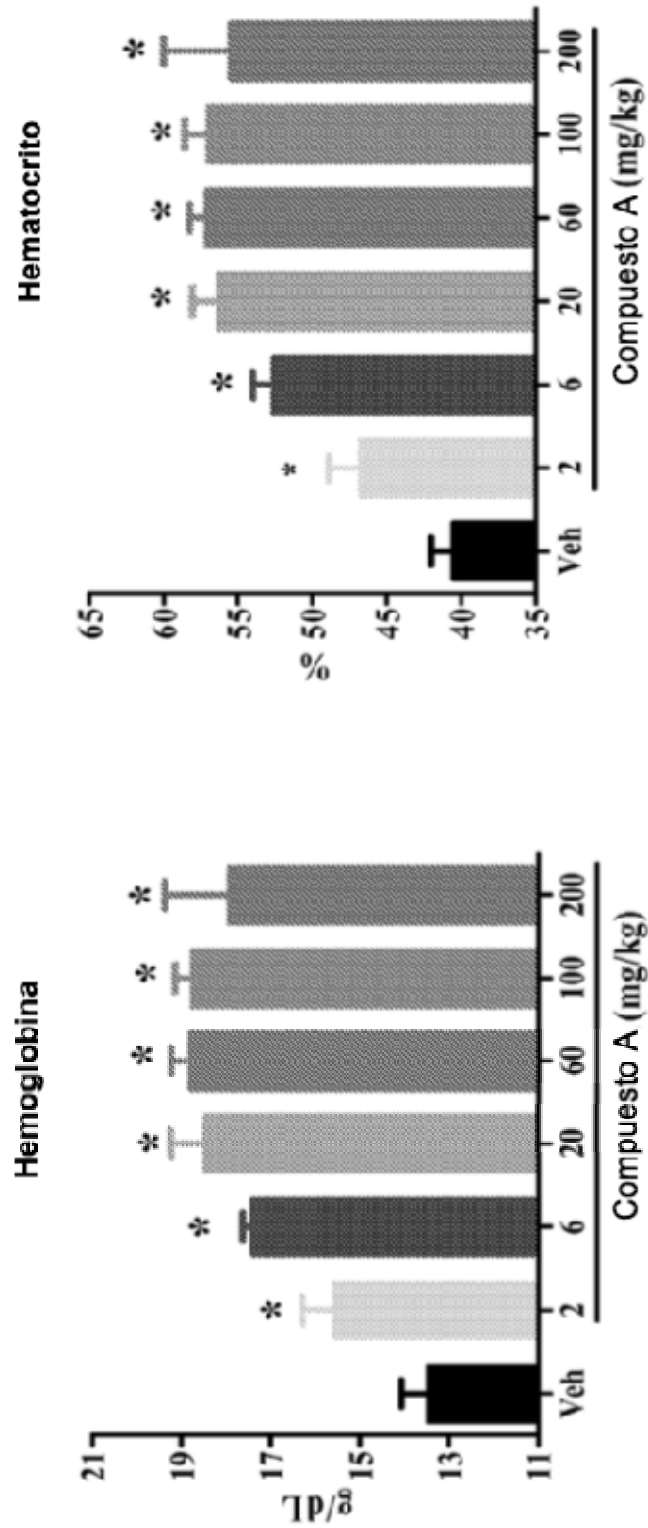


Fig. 8

Media $\pm$ DE * $P < 0,05$ vs. grupo de vehículo

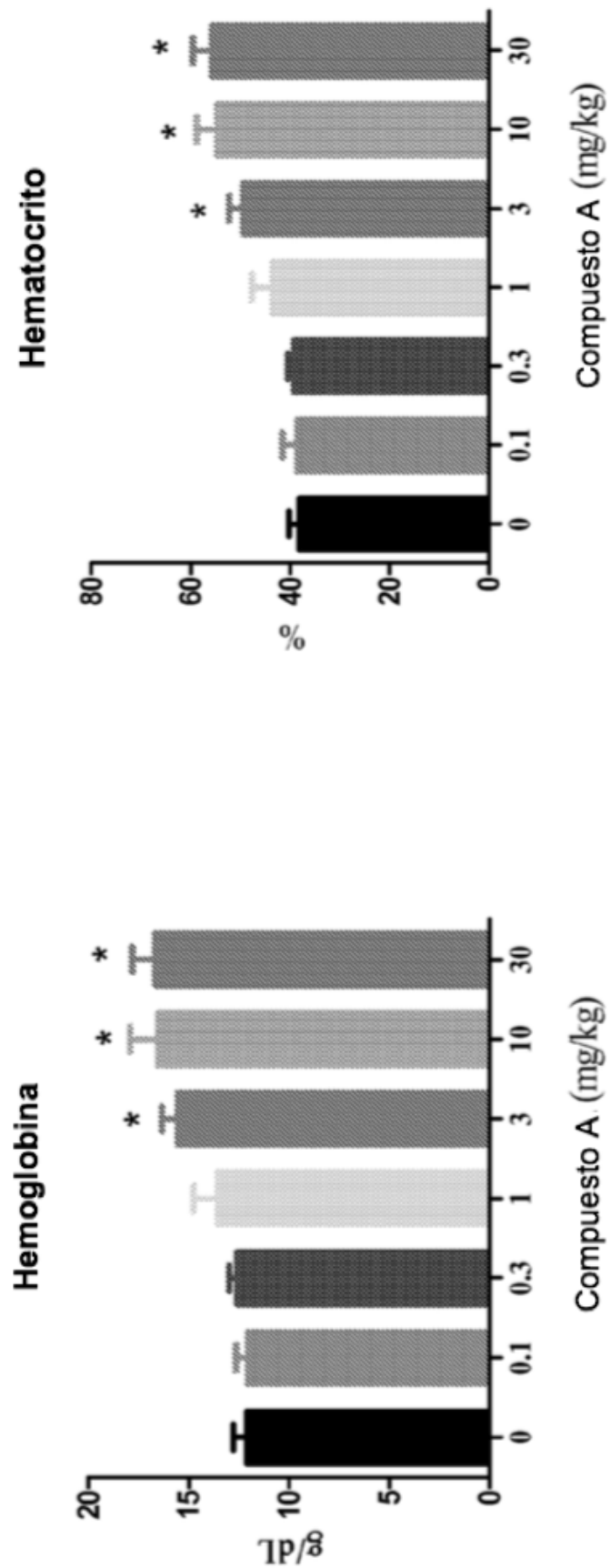
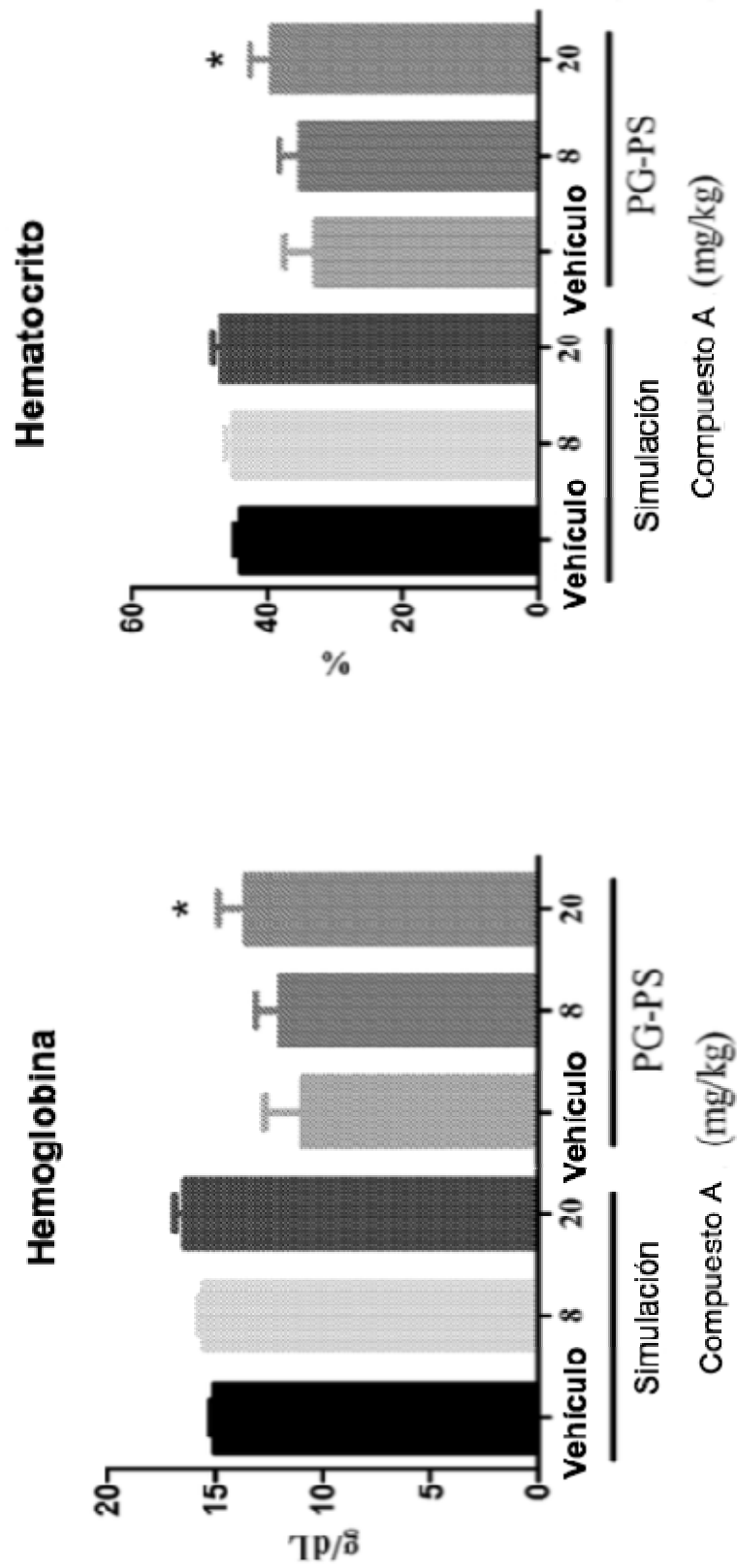


Fig. 9

Media $\pm$ DE * $P < 0,05$ vs. 0 mg/kg grupo



Media $\pm$ DE * $P < 0,05$ vs. PG-PS grupo de vehículo

Fig. 10

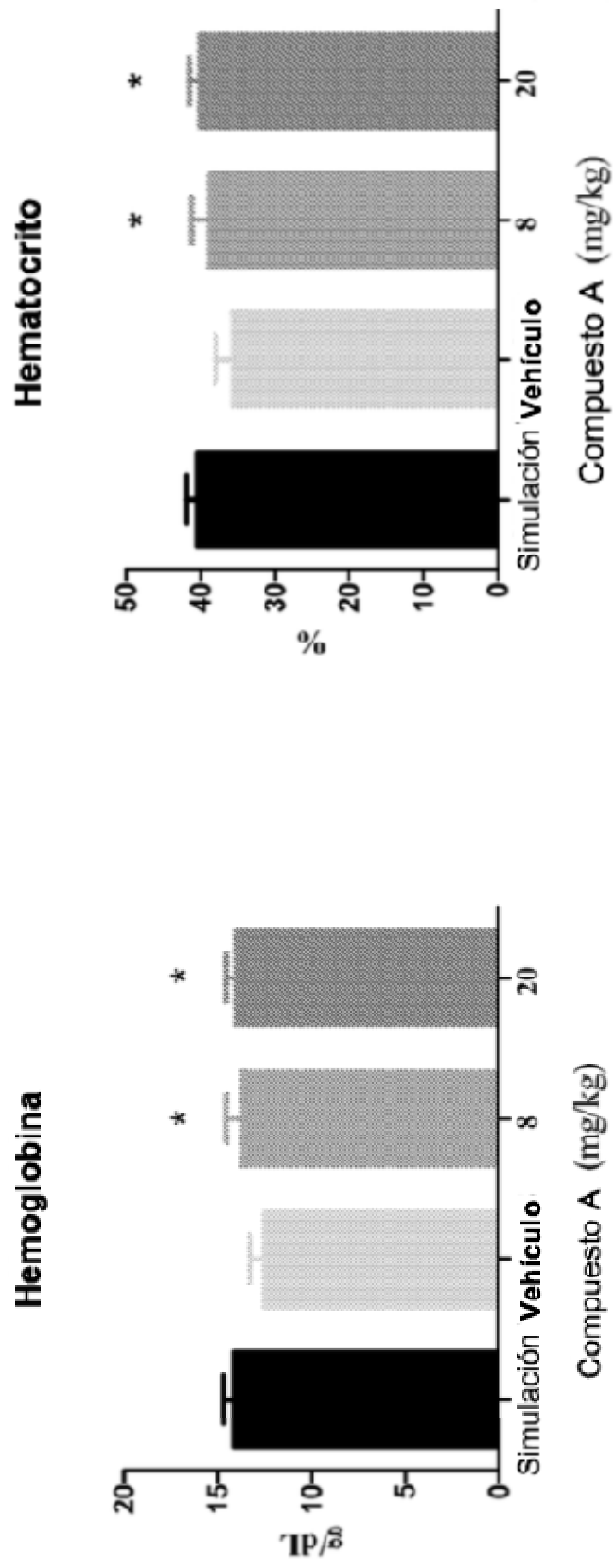
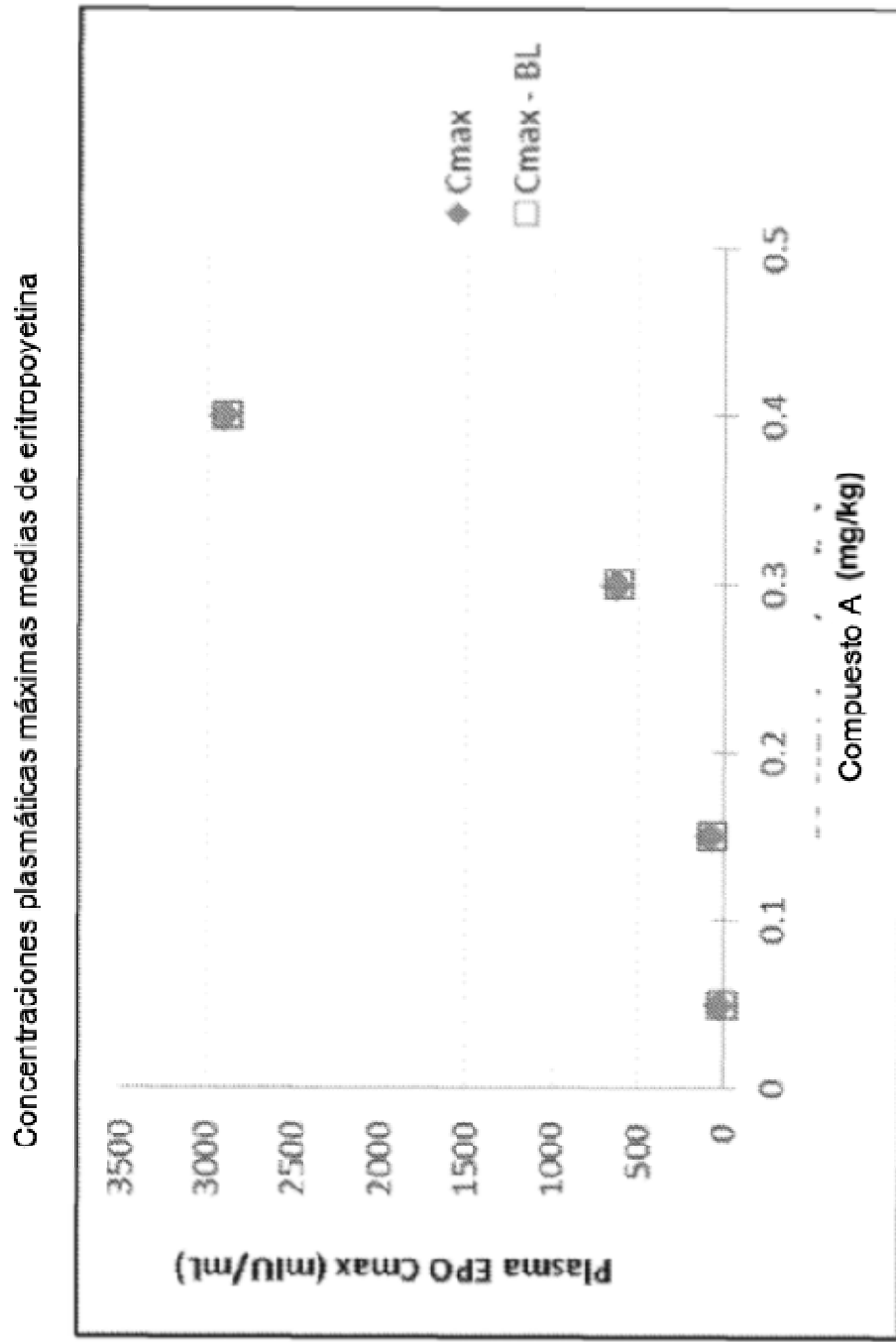


Fig. 11

Media $\pm$ DE * $P < 0,05$ vs. grupo de vehículo



BL = línea de base

Fig. 12