

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 556**

51 Int. Cl.:

C07D 243/08 (2006.01)

A61K 31/551 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.07.2015 PCT/CN2015/085025**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017 WO17015784**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.07.2015 E 15899136 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3327007**

54 Título: **Azina orbital-fumarato, hidrato, forma cristalina y método de preparación de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2021

73 Titular/es:

SHENZHEN ZHENXING MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD. (100.0%)
Room 201, Building A, No. 1, Qianwan 1 Road, Qianhai Shenzhen-Hong Kong Cooperation Zone, Shenzhen City (get Settled in Shenzhen Qianhai Business Secretary Co., Ltd.) Guangdong 518000, CN

72 Inventor/es:

CHENG, LIREN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 809 556 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

Azina orbital-fumarato, hidrato, forma cristalina y método de preparación de los mismos

5 Campo técnico

La invención se refiere al campo de la química farmacéutica, particularmente se refiere a un azina orbital-fumarato, un hidrato, una forma cristalina y un método de preparación de los mismos.

10 Técnica antecedente

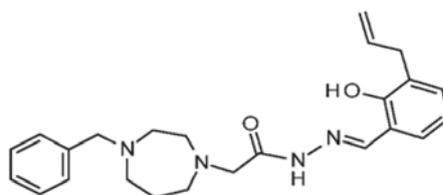
Un tumor maligno es una gran clase de enfermedades en clínica que ponen en grave riesgo la vida y la salud humanas. Se han desarrollado y aplicado en clínica muchos tipos diferentes de fármacos para el tratamiento de tumores. Entre ellos, los fármacos antitumorales dirigidos a moléculas atraen una amplia atención debido a su eficacia terapéutica y sus pocos efectos secundarios. Sin embargo, han aparecido problemas relativos a la resistencia a fármacos en la aplicación clínica para los fármacos existentes dirigidos a moléculas, que afectaban a los efectos de los fármacos.

La caspasa-3, que es una proteasa que interviene en la apoptosis, y es una molécula ejecutora clave de la apoptosis. Como proteína efectora, su acción no puede ser ejecutada salvo que se active la proenzima Procaspasa-3 para que se transforme en la Caspasa-3 activa, para que degrade las proteínas importantes de una célula y cause la apoptosis. Por lo tanto, es una estrategia antitumoral novedosa y muy eficaz activar específicamente la Procaspasa-3 para inducir la apoptosis.

La patente WO2006128173 divulga una clase de compuestos heterocíclicos de piperazina acetidrazida, que pueden inducir selectivamente la apoptosis en una célula cancerosa, lo que indica que dichos compuestos pueden usarse como potenciales fármacos antitumorales dirigidos a moléculas. El mecanismo funcional de dichos compuestos es exactamente activar la proenzima Procaspasa-3 para que se transforme en la Caspasa-3 activa y ejerza así su acción.

En la Patente China CN101503394A, el inventor ha divulgado una clase de compuestos heterocíclicos de diazepan acetidrazida, cuya actividad antitumoral también es ejercida mediante la activación de la proenzima Procaspasa-3 para que se transforme en la Caspasa-3 activa. Por lo tanto, los compuestos también se pueden desarrollar como fármacos antitumorales. La patente divulga un método para preparar el compuesto monofumarato de azina orbital y la actividad antitumoral del compuesto. El nombre químico de la azina orbital es:

(E)-N'-(3-alil-(2-hidroxifenil)metileno)-2-(4-bencil-1,4-diazepan-1-il) acetidrazida. Su fórmula química es:



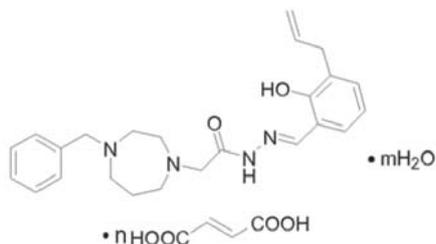
Dado que las sales en diferentes cocientes, los solvatos y el polimorfo pueden dar lugar a diferentes propiedades físicas y químicas y afectar adicionalmente a la eficacia terapéutica y los efectos secundarios de los fármacos, la preparación de las sales en diferentes cocientes, los solvatos y el polimorfo de los fármacos es un problema importante durante el desarrollo de los fármacos. Sin embargo, con respecto al problema anterior, aún no hay informes pertinentes sobre la azina orbital.

El documento WO 2010/102513 describe varios derivados de homopiperazin acetidrazida, métodos para preparar dichos derivados y los usos de dichos derivados para el tratamiento y/o la profilaxis de tumores y/o cánceres, también se divulgan las composiciones farmacéuticas que comprenden dichos derivados de homopiperazin acetidrazida. Sin embargo, este documento no divulga las formas cristalinas de azina orbital-hidrato de fumarato de acuerdo con la presente invención.

Contenidos de la invención

El inventor ha realizado amplias investigaciones sobre el azina orbital-fumarato, y sorprendentemente encontró hidratos y diferentes formas cristalinas del mismo. Esto hace posible proporcionar un azina orbital-fumarato que tiene un mayor efecto farmacéutico, puede prepararse más fácilmente y tiene una mejor estabilidad durante el almacenamiento. La invención se consigue sobre la base del descubrimiento anterior.

La invención se refiere a una forma cristalina de azina orbital-hidrato de fumarato, en donde, el azina orbital-hidrato de fumarato tiene una estructura como se muestra en la Fórmula II, n es 1 y m es 1.

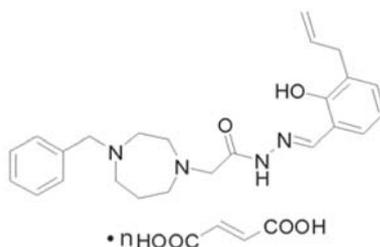


Fórmula II

5 El patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina comprende picos al menos en las siguientes posiciones 2θ : $7,0 \pm 0,2$, $17,3 \pm 0,2$ y $21,3 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

También se divulga en el presente documento una forma cristalina del azina orbital-fumarato, en donde, el azina orbital-fumarato tiene una estructura como se muestra en la Fórmula I, y n es aproximadamente 1 o 2.

10



Fórmula I

15 La forma cristalina del azina orbital-fumarato de acuerdo con la Fórmula I anterior comprende los siguientes elementos:

1. La forma cristalina del azina orbital-fumarato de Fórmula I anterior tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos al menos en las siguientes posiciones 2θ : $5,9 \pm 0,2$, $16,8 \pm 0,2$ y $18,1 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

20 El patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina puede comprender adicionalmente al menos uno (tal como uno, dos o tres) picos en una posición 2θ seleccionada entre: $10,1 \pm 0,2$, $14,2 \pm 0,2$ y $22,4 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

25 El patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina puede comprender adicionalmente al menos uno (tal como uno, dos o tres) picos en una posición 2θ seleccionada entre: $11,4 \pm 0,2$, $20,8 \pm 0,2$ y $23,8 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

La forma cristalina puede tener un punto de fusión de $156,27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$, como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido. En la Fórmula I, n puede ser aproximadamente 1.

La forma cristalina puede ser la Forma A.

El patrón de XRPD típico de la Forma A se muestra en la Fig. 2.

30 El termograma de DSC típico de la Forma A se muestra en la Fig. 3.

2. También se describe en el presente documento una forma cristalina del azina orbital-fumarato, que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo comprende picos al menos en las siguientes posiciones 2θ : $6,5 \pm 0,2$, $20,0 \pm 0,2$ y $24,9 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

35 El patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina puede comprender adicionalmente al menos uno (tal como uno, dos o tres) picos en una posición 2θ seleccionada entre: $5,3 \pm 0,2$, $13,3 \pm 0,2$ y $19,5 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

El patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina puede comprender adicionalmente al menos uno (tal como uno, dos o tres) picos en una posición 2θ seleccionada entre: $12,0 \pm 0,2$, $14,8 \pm 0,2$ y $26,7 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

40 La forma cristalina puede tener un punto de fusión de $171,45 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$, como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido. En la Fórmula I, n puede ser aproximadamente 2.

La forma cristalina puede ser la Forma C.

El patrón de XRPD típico de la Forma C se muestra en la Fig. 28.

El termograma de DSC típico de la Forma C se muestra en la Fig. 29.

45 3. También se describe en el presente documento una forma cristalina del azina orbital-fumarato, que tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo comprende picos al menos en las siguientes posiciones 2θ : $5,7 \pm 0,2$, $9,5 \pm 0,2$ y $10,0 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

El patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina puede comprender adicionalmente al menos uno

(tal como uno, dos o tres) picos en una posición 2θ seleccionada entre: $14,7 \pm 0,2$, $19,2 \pm 0,2$ y $26,7 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

5 El patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina puede comprender adicionalmente al menos uno (tal como uno, dos o tres) picos en una posición 2θ seleccionada entre: $13,3 \pm 0,2$, $22,2 \pm 0,2$ y $23,6 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

La forma cristalina puede tener un punto de fusión de $156,93 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$, como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

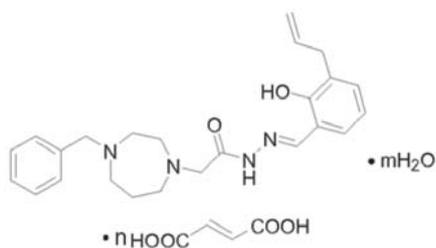
10 En la Fórmula I, n puede ser aproximadamente 2.

La forma cristalina puede ser la Forma D.

15 El patrón de XRPD típico de la Forma D se muestra en la Fig. 34.

El termograma de DSC típico de la Forma D se muestra en la Fig. 35.

20 La invención se refiere a una forma cristalina de azina orbital-hidrato de fumarato, en donde, el azina orbital-hidrato de fumarato tiene una estructura como se muestra en la Fórmula II, n es 1 y m es 1.



Fórmula II

25 En una realización de la invención, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina comprende picos al menos en las siguientes posiciones 2θ : $7,0 \pm 0,2$, $17,3 \pm 0,2$ y $21,3 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

30 En una realización de la invención, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina comprende adicionalmente al menos uno (tal como uno, dos o tres) picos en una posición 2θ seleccionada entre: $12,9 \pm 0,2$, $17,9 \pm 0,2$ y $19,7 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

35 En una realización de la invención, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina comprende adicionalmente al menos uno (tal como uno, dos o tres) picos en una posición 2θ seleccionada entre: $13,4 \pm 0,2$, $14,7 \pm 0,2$ y $23,5 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

En una realización de la invención, la forma cristalina tiene dos puntos de fusión.

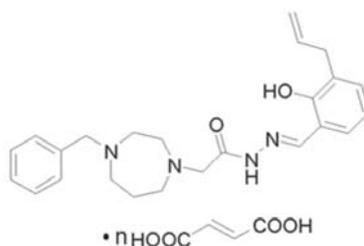
40 En una realización de la invención, los dos puntos de fusión son $102,18 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y $153,72 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente, como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

En una realización de la invención, la forma cristalina es la Forma B.

45 En una realización de la invención, el patrón de XRPD típico de la Forma B se muestra en la Fig. 16.

En una realización de la invención, el termograma de DSC típico de la Forma B se muestra en la Fig. 17.

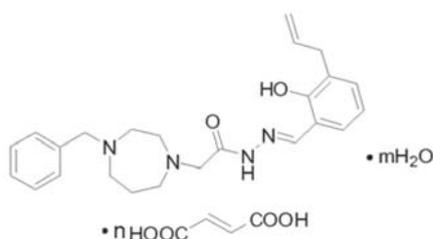
50 También se describe en el presente documento una forma amorfa de azina orbital-fumarato, en donde, el azina orbital-fumarato tiene una estructura como se muestra en la Fórmula I, en donde n es aproximadamente 1.



Fórmula I

5 La forma amorfa del azina orbital-fumarato puede tener una temperatura de transición vítrea de $51,12\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

La invención relates se refiere a un azina orbital-hidrato de fumarato, en donde el azina orbital-fumarato tiene una estructura como se muestra en la Fórmula II, en donde n es 1 y m es 1.



Fórmula II

10

También se describe en el presente documento un método para preparar la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior, que comprende la siguiente etapa:

15 el monofumarato de azina orbital o la forma cristalina de acuerdo con uno cualquiera de los Elementos 2-3 anteriores o de la invención es cristalizado en un disolvente, para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1.

El monofumarato de azina orbital puede ser la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital.

20 El disolvente puede seleccionarse entre agua, alcohol (tal como metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, *terc*-butanol, pentanol, isopentanol, etc.), cetona, (tal como acetona, butanona, etc.), alcano o haloalcano (tal como n-hexano, ciclohexano, n-heptano, diclorometano (DCM), cloroformo (CHCl_3), etc.), éster (tal como acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de *terc*-butilo, etc.), éter (tal como isopropil éter, metil *terc*-butil éter, éter de petróleo, etc.), tetrahidrofurano (THF), 1, 4-dioxano, tolueno, acetonitrilo, N,N-dimetilformamida (DMF), N,N-dimetilacetamida (DMA), N-metilpirrolidinona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), etc., y cualquier combinación de los mismos.

30 El monofumarato de azina orbital puede ser sometido a una cristalización por evaporación para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior. Preferentemente, un disolvente para la cristalización por evaporación se selecciona entre alcohol (tal como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, sec-butanol, *terc*-butanol, n-pentanol, isopentanol, etc.), cetona, (tal como acetona, butanona, etc.), haloalcano (tal como DCM, CHCl_3 , etc.), éster (tal como acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de *terc*-butilo, etc., en donde no se incluye *terc*-formiato de butilo), 1,4-dioxano, tolueno, acetonitrilo, DMF, etc., o cualquier combinación de los mismos (tal como glicerol/etanol (1:1, V/V), tal como metanol o etanol/heptano (1:1, V/V), tal como THF/heptano (2:1, V/V), THF/acetonitrilo (1:1, V/V), THF/acetato de isopropilo (1:1, V/V), THF/DCM (1:1, V/V), THF/acetona (1:1, V/V), THF/acetato de etilo (1:1, V/V), THF/formiato de butilo (1:1, V/V), etc.); preferentemente, la cristalización por evaporación se realiza a la temperatura ambiente.

40 El monofumarato de azina orbital puede ser sometido a una recristalización para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior. Preferentemente, un disolvente para recristalización se selecciona entre alcoholes (tales como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, sec-butanol, *terc*-butanol, n-pentanol, isopentanol, etc.), cetonas (tales como acetona, butanona, etc.), ésteres (tales como acetato de etilo, acetato de isopropilo, etc., en donde no se incluye formiato de butilo), acetonitrilo, THF, etc., o cualquier combinación de los mismos (tal como metanol/agua (1:4, V/V), metanol/metil *terc*-butil éter (1:4, V/V), metanol/acetato de isopropilo (1:4, V/V), etanol/n-hexano (3:2, V/V)); preferentemente, el monofumarato de azina orbital se disuelve a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ - $90\text{ }^{\circ}\text{C}$, por ejemplo, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ u $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, y el monofumarato de azina orbital se cristaliza a una temperatura de $0\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, por ejemplo, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$.

45

El monofumarato de azina orbital puede ser sometido a una cristalización en antisolvente para obtener la forma

5 cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior. Preferentemente, un buen disolvente para recristalización en antisolvente se selecciona entre DMA, DMF, DMSO y NMP, y un antisolvente se selecciona entre éteres (tales como isopropil éter, metil *terc*-butil éter, etc.), n-pentanol y butanona), ésteres (tales como acetato de isopropilo o formiato de butilo), tolueno, agua (preferentemente, el buen disolvente es DMF), acetonitrilo, etc., o un disolvente mixto, tal como DCM/n-hexano (2:1, V/V), CHCl₃/metil *terc*-butil éter (2:5, V/V); preferentemente, el proceso de cristalización en antisolvente se realiza a una temperatura de 0-25 °C en reposo o con agitación para preparar la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior.

10 El monofumarato de azina orbital puede ser sometido a una cristalización de la suspensión para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior. Preferentemente, un disolvente para recristalización de la suspensión se selecciona entre alcohol (tal como metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, sec-butanol, *terc*-butanol, n-pentanol, isopentanol, etc.), cetona, (tal como acetona, butanona, etc.), alcano (tal como n-hexano, ciclohexano, n-heptano, etc.), haloalcano (tal como DCM, CHCl₃, etc.), éster (tal como acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de *terc*-butilo, etc. excepto por formiato de butilo), éter (tal como éter de petróleo, isopropil éter, metil *terc*-butil éter, etc.), 1, 4-dioxano, tolueno, acetonitrilo, THF, etc.; preferentemente, la cristalización de la suspensión se realiza a una temperatura de 25-50 °C.

20 Una forma cristalina de acuerdo con la invención puede agitarse en etanol a la temperatura ambiente durante 12-36 h (tal como 24 h), para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior.

Una forma cristalina de acuerdo con la invención puede calentarse hasta 100 °C-120 °C (tal como 105 °C-115 °C, tal como 110 °C), para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior.

25 La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 2 o el Elemento 3 anteriores puede disolverse en etanol, y después se enfría y se precipita para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior.

La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior puede ser la Forma A.

30 El patrón de XRPD típico de la Forma A se muestra en la Fig. 2.

El termograma de DSC típico de la Forma A se muestra en la Fig. 3.

35 También se describe en el presente documento un método para preparar la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 2 anterior, que comprende la siguiente etapa:

la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 o el Elemento 3 anteriores o de la invención se cristaliza en formiato de butilo, para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 2; opcionalmente, que comprende además una etapa de filtración o de secado.

40 La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior puede ser recristalizada en formiato de butilo a la temperatura ambiente, después, el cristal obtenido puede filtrarse y secarse a 40 °C-60 °C, para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 2 anterior.

45 La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior puede agitarse en formiato de butilo a la temperatura ambiente durante 12-36 h (tal como 24 h), para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 2 anterior.

La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior puede ser recristalizada en formiato de butilo a una alta temperatura de 50-75 °C (tal como 60 °C) y a una baja temperatura de 15-30 °C (tal como 25 °C), para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento anterior.

50 La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 3 anterior puede agitarse en formiato de butilo a una temperatura de 40-80 °C (tal como 50-75 °C, por ejemplo, 60 °C) durante 12-36 h, para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 2 anterior.

55 La forma cristalina de acuerdo con la invención puede agitarse en formiato de butilo a la temperatura ambiente durante 12-36 h (tal como 24 h), para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 2 anterior.

La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 2 anterior puede ser la Forma C.

60 El patrón de XRPD típico de la Forma C se muestra en la Fig. 28.

El termograma de DSC típico de la Forma C se muestra en la Fig. 29.

También se describe en el presente documento un método para preparar la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 3 anterior, que comprende la siguiente etapa:

65 la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior se cristaliza en formiato de butilo, para obtener dicha forma cristalina; opcionalmente, que comprende además una etapa de filtración o de secado.

La filtración puede ser una filtración en caliente.

5 La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior puede ser recristalizada en formiato de butilo a una temperatura de 40-60 °C (preferentemente 50 °C), y el cristal obtenido sometido a una filtración en caliente y un secado para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 3 anterior.

10 La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior puede agitarse en formiato de butilo a una temperatura de 40-60 °C (tal como 50 °C) durante 4-12 h, para obtener la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 3 anterior.

La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 3 anterior puede ser la Forma D.

El patrón de XRPD típico de la Forma D se muestra en la Fig. 34.

15 El termograma de DSC típico de la Forma D se muestra en la Fig. 35.

La invención también se refiere a un método para preparar la forma cristalina de acuerdo con la invención, seleccionada entre cualquiera de los siguientes elementos:

20 1) la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior se cristaliza en agua, un disolvente orgánico (tal como acetato de etilo) o un disolvente mixto de un disolvente orgánico (tal como etanol, DMA, NMP o DMSO) y agua, para obtener dicha forma cristalina; opcionalmente, comprende además una filtración o un secado.

25 En una realización de la invención, la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior se cristaliza en acetato de etilo o un disolvente mixto de etanol y agua (a un cociente de volumen de 1:(1-3), por ejemplo, 1:1) para obtener la forma cristalina de acuerdo con la invención.

En una realización de la invención, la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior se agita en agua a la temperatura ambiente durante 12-36 h (tal como 24 h), para obtener la forma cristalina de acuerdo con la invención.

30 2) La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 3 anterior se agita en agua a la temperatura ambiente durante 12-36 h (tal como 24 h), para obtener la forma cristalina de acuerdo con la invención.

35 3) La forma amorfa del azina orbital-fumarato como se ha descrito más arriba se agita en agua a la temperatura ambiente durante 12-36 h (tal como 24 h), y se convierte en la forma cristalina de acuerdo con la invención.

En una realización de la invención, la forma cristalina de acuerdo con la invención es la Forma B.

En una realización de la invención, el patrón de XRPD típico de la Forma B se muestra en la Fig. 16.

40 En una realización de la invención, el termograma de DSC típico de la Forma B se muestra en la Fig. 17.

También se describe en el presente documento un método para preparar la forma amorfa del azina orbital-fumarato como se ha descrito más arriba, que comprende las siguientes etapas:

45 la forma cristalina de acuerdo con la invención o cualquiera de los elementos descritos más arriba, se disuelve en un disolvente orgánico (por ejemplo, se disuelve en alcohol o THF, dicho alcohol puede ser metanol o etanol), y el disolvente orgánico se elimina mediante evaporación o evaporación rotatoria para obtener la forma amorfa del azina orbital-fumarato como se ha descrito más arriba.

50 El disolvente orgánico puede ser eliminado mediante evaporación a la presión atmosférica o a presión reducida, por ejemplo, el disolvente orgánico puede ser eliminado mediante evaporación en reposo o evaporación rotatoria a presión reducida.

55 A una temperatura de desde la temperatura ambiente hasta 60 °C (tal como 20-50 °C, por ejemplo, 30-45 °C), la forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior puede disolverse en etanol y después someterse a una evaporación rotatoria para obtener la forma amorfa del azina orbital-fumarato descrito más arriba.

60 La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 1 anterior puede calentarse hasta una temperatura de 150-175 °C (tal como 160 °C) y después enfriarse hasta una temperatura de desde la temperatura ambiente hasta 60 °C (tal como 40 °C), para obtener la forma amorfa del azina orbital-fumarato descrito más arriba.

La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 2 anterior puede disolverse en etanol, y después se somete a una evaporación rotatoria para obtener la forma amorfa del azina orbital-fumarato descrito más arriba.

65 La forma cristalina de acuerdo con el Elemento 3 anterior puede disolverse en etanol y después se somete a una evaporación rotatoria para obtener la forma amorfa del azina orbital-fumarato descrito más arriba.

La forma cristalina de acuerdo con la invención puede disolverse en etanol y después someterse a una evaporación rotatoria para obtener la forma amorfa del azina orbital-fumarato descrito más arriba.

5 La invención también se refiere a una composición farmacéutica, que comprende la forma cristalina del azina orbital-fumarato de acuerdo con la invención, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La invención también se refiere a la forma cristalina del azina orbital-fumarato de acuerdo con la invención o a la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de un tumor.

10 En una realización de la invención, el tumor es un tumor asociado con la expresión anormal de la Caspasa-3.

En una realización de la invención, el tumor se selecciona entre un grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, linfoma maligno, cáncer de cuello de útero, neuroblastoma, meduloblastoma y cáncer de pulmón.

15 También se describe en el presente documento un método para prevenir y/o tratar un tumor, que comprende la administración al sujeto en necesidad de la misma de una cantidad eficaz de la forma cristalina del azina orbital-fumarato de acuerdo con la invención o de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

20 El tumor puede ser un tumor asociado con la expresión anormal de la Caspasa-3.

El tumor puede seleccionarse entre un grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, linfoma maligno, cáncer de cuello de útero, neuroblastoma, meduloblastoma y cáncer de pulmón.

25 El sujeto puede ser un mamífero, tal como bovino, equino, cáprido, suidos, canino, felino, roedor o primate. El sujeto preferido es un ser humano.

30 También se describe en el presente documento un método para destruir o eliminar una célula tumoral, que comprende la administración a la célula una cantidad eficaz de la forma cristalina del azina orbital-fumarato de acuerdo con la invención o de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención.

El método puede realizarse *in vitro*.

35 El método puede realizarse *in vivo*.

La célula tumoral puede ser una línea celular tumoral o una célula tumoral de un sujeto.

40 La célula tumoral puede seleccionarse entre un grupo que consiste en célula cancerosa gástrica, célula cancerosa colorrectal, célula cancerosa de hígado, célula cancerosa de vesícula biliar, célula de linfoma maligno, célula cancerosa de cuello uterino, célula de neuroblastoma, célula de meduloblastoma y célula cancerosa de pulmón.

45 La presente invención también proporciona la forma cristalina del azina orbital-fumarato de acuerdo con la invención o de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, para su uso en la destrucción o la eliminación de una célula tumoral.

En una realización de la invención, se usa en un método *in vivo*.

50 En una realización de la invención, la célula tumoral es una línea celular tumoral o una célula tumoral de un sujeto.

En una realización de la invención, la célula tumoral se selecciona entre un grupo que consiste en célula cancerosa gástrica, célula cancerosa colorrectal, célula cancerosa de hígado, célula cancerosa de vesícula biliar, célula de linfoma maligno, célula cancerosa de cuello uterino, célula de neuroblastoma, célula de meduloblastoma y célula cancerosa de pulmón.

55 La invención también se refiere a un kit para destruir y/o eliminar una célula tumoral, que comprende la forma cristalina del azina orbital-fumarato de acuerdo con la invención o la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, y opcionalmente, una instrucción para su uso.

60 Los aspectos y las características de la invención se describen adicionalmente como sigue.

65 Los términos y las expresiones usadas en la invención tienen los significados generales bien conocidos por una persona experta en la técnica; aún así, la invención aún pretende describir y explicar estos términos y frases de nuevo con detalle. Si los significados de los términos y las expresiones mencionadas en el presente documento son incoherentes con los significados bien conocidos, prevalecerán los significados expresados en la invención.

El término "azina orbital-fumarato" usado en la invención se refiere a una sal formada por la unión de azina orbital a ácido fumárico. En una realización de la invención, 1 molécula de azina orbital puede unirse a 1 o 2 moléculas de ácido fumárico, es decir, el cociente molar (valor de n) entre el ácido fumárico y la azina orbital es 1 o 2. Debido a la competición intermolecular durante la formación de la sal, el n medido es generalmente un número no entero
5 alrededor de 1 o 2. En una realización de la invención, la expresión "n es aproximadamente 1" o "n es aproximadamente 2" se refiere a que el valor de n está en un intervalo del 90 %-110 % de 1 o 2, por ejemplo, en un intervalo del 95 %-105 % de 1 o 2.

El valor de n puede ser determinado mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, métodos tales como un análisis elemental, RMN^H y cromatografía iónica. En una realización de la invención, el valor de n puede ser determinado mediante el espectro de RMN del correspondiente compuesto.
10

Un cristal se refiere a un compuesto cuyos constituyentes, tales como átomos, moléculas o iones están dispuestos periódicamente en un determinado orden, en donde la disposición es periódica en el espacio tridimensional y aparece repetidamente a lo largo de una determinada distancia. Un compuesto puede estar presente en dos o más estados cristalinos. Las moléculas con la misma estructura pueden ser cristalizadas para formar diferentes formas sólidas, denominadas "polimorfos". Cuando está implicada una forma cristalizada en particular, a menudo se denomina "forma cristalina", es decir, un término usado en la invención. Los términos "Forma A" y "forma cristalina A" pueden usarse indistintamente con los términos "Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital" y "materia prima cristalina del monofumarato de azina orbital", que se refiere a la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital. En una realización, su caracterización se muestra en la Fig. 1, 2 o 3.
15

Los términos "Forma B" y "forma cristalina B" usados en la invención pueden usarse indistintamente con los términos "Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado", que se refiere a la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado. En una realización de la invención, su caracterización se muestra en la Fig. 15, 16, 17 o 18.
20

Los términos "Forma C" y "forma cristalina C" pueden usarse indistintamente con el término "forma cristalina I del difumarato de azina orbital", que se refiere a la Forma cristalina C del difumarato de azina orbital. En una realización, su caracterización se muestra en la Fig. 27, 28 o 29.
25

Los términos "Forma D" y "forma cristalina D" pueden usarse indistintamente con el término "forma cristalina II del difumarato de azina orbital", que se refiere a la Forma cristalina D del difumarato de azina orbital. En una realización, su caracterización se muestra en la Fig. 33, 34 o 35.
30

La forma cristalina del compuesto de acuerdo con la invención tiene una determinada pureza, que se refiere al porcentaje que supone la forma cristalina específica en el peso total del compuesto, por ejemplo, por encima del 50 %, por encima del 60 %, por encima del 70 %, por encima del 80 %, por encima del 85 %, por encima del 90 %, por encima del 92 %, por encima del 95 %, por encima del 98 %, por encima del 99 %, por encima del 99,5 % o por encima del 99,9 %, en donde el resto de la sustancia es las otras formas cristalinas o la forma amorfa del compuesto o una impureza farmacéuticamente aceptable.
35

Debería entenderse que cuando se usa un tipo diferente de aparato o unas condiciones de análisis diferentes, puede obtenerse un patrón y un valor del pico de XRPD (difracción de rayos X en polvo) ligeramente diferentes. El patrón, el valor del pico y la intensidad relativa del pico de difracción de una forma cristalina dependen de la pureza de un compuesto, del pretratamiento de una muestra, de la velocidad de barrido, del tamaño de partícula, así como de la verificación y el mantenimiento de un aparato de análisis. El valor numérico proporcionado no puede considerarse un valor absoluto.
40

En la invención, la posición del pico de absorción en el patrón de difracción de rayos X en polvo de cada forma cristalina puede estar en el intervalo del valor divulgado $\pm 0,2^\circ$, por ejemplo, en el intervalo del valor divulgado $\pm 0,1^\circ$, y el punto de fusión medido mediante calorimetría diferencial de barrido puede estar en el intervalo del valor divulgado $\pm 3,0^\circ\text{C}$, por ejemplo, en el intervalo del valor divulgado $\pm 2,0^\circ\text{C}$.
45

Debería entenderse que cuando se usa un tipo diferente de aparato o unas condiciones de análisis diferentes, podría leerse un punto de fusión ligeramente diferente. El valor absoluto para una forma cristalina depende de la pureza de un compuesto, del peso de una muestra, de la tasa de calentamiento, del tamaño de partícula, así como de la verificación y el mantenimiento de un aparato de análisis. El valor numérico proporcionado no puede considerarse un valor absoluto.
50

Los métodos para preparar cristales son bien conocidos en la técnica. Los cristales pueden prepararse mediante diversos métodos que incluyen, por ejemplo, una cristalización o una recristalización en un disolvente adecuado, una sublimación, crecimiento en un fundido, conversión de otras fases en sólido, cristalización en un fluido supercrítico y pulverización o salpicadura. Las técnicas para la cristalización o la recristalización de una forma cristalina en una mezcla disolvente incluyen, por ejemplo, evaporación de un disolvente, reducir la temperatura de una mezcla disolvente, añadir cristales de siembra a una mezcla disolvente supersaturada de una molécula y/o una sal, liofilizar
55

una mezcla disolvente y añadir un antisolvente a una mezcla disolvente. Pueden usarse técnicas de cristalización de alto rendimiento para preparar formas cristalinas, incluyendo las formas polimorfas. En una realización de la invención, los cristales del azina orbital-fumarato pueden obtenerse con medios tales como evaporación, recristalización, cristalización en antisolvente, cristalización de la suspensión, evaporación rotatoria, molienda o fusión.

El término "una forma amorfa" usado en el presente documento se refiere a una forma sólida de una molécula y/o de un ion, distinta a una forma cristalina. El patrón de difracción de rayos X en polvo de un sólido amorfo no tiene un pico agudo.

El término "temperatura de transición vítrea" usado en la invención es una propiedad inherente de una sustancia no cristalina, y se refiere a una temperatura a la cual cambia a un estado vítreo.

El término "hidrato" usado en la invención se refiere a un compuesto obtenido mediante la interacción de la(s) molécula(s) de agua con un compuesto parental, por ejemplo, por la unión a través de un enlace covalente o de un enlace de coordinación, en donde el hidrato puede contener molécula(s) de agua de una manera estequiométrica o de una manera no estequiométrica, y en el hidrato, la(s) molécula(s) de agua está(n) dispuesta(s) en orden o aleatoriamente.

El término "temperatura ambiente" usado en la invención, denominado también una temperatura habitual o una temperatura ordinaria, se refiere generalmente a una temperatura interior, en donde la temperatura interior óptima es de 16-18 °C en invierno y de 24-26 °C en verano. En general, la temperatura ambiente se define como 20 °C ± 2 °C, 23 °C ± 2 °C o 25 °C ± 2 °C, por ejemplo, 25 °C.

El término "farmacéuticamente aceptable" usado en la invención se refiere generalmente a que es útil en el campo farmacéutico, sin perjudicar los productos o a los mamíferos, o con un cociente de beneficio/riesgo razonable o aceptable.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención comprende una forma cristalina de azina orbital-hidrato de fumarato, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. El portador descrito en el presente documento incluye, pero no se limita a, intercambiador iónico, óxido de aluminio, estearato de aluminio, lecitina, proteína sérica, tal como albúmina humana; sustancia tampón tal como fosfato, glicerol, ácido sórbico, sorbato de potasio, una mezcla parcial de glicéridos de un ácido graso vegetal saturado, agua, sal o electrolito, tal como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato potásico, cloruro de sodio, sal de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancia celulósica, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, éster poliacrílico, cera de abeja y lanocerina. El excipiente se refiere al (los) adyuvante(s) distinto(s) al (los) agente(s) activo(s) de una formulación farmacéutica. El excipiente es estable en lo que respecta a sus propiedades, no tiene incompatibilidades con el agente activo, no provoca efectos secundarios, no afecta al efecto terapéutico, no es fácilmente deformable, agrietable en seco, ablandable ni putrescible, ni apollillable a la temperatura ambiente, no es perjudicial para el cuerpo humano, no tiene ninguna acción fisiológica, no interactúa con el agente activo química o físicamente, no afecta a la medición de la cantidad de agente activo, etc. El excipiente puede ser, por ejemplo, un agente aglutinante, una carga, un agente disgregante, un lubricante de comprimidos; alcohol, vinagre, jugo medicinal, etc. en píldoras de medicina tradicional china; el material de base en formulaciones semisólidas tales como ungüento y crema; un conservante, un antioxidante, un agente aromatizante, un aromático, un cosolvente, un emulsionante, un solubilizante, un regulador de la presión osmótica, un agente colorante, etc. en formulación líquida.

El término "tratamiento" usado en la invención incluye, pero no se limita a, un tratamiento curable, un tratamiento profiláctico y un tratamiento preventivo. Un tratamiento profiláctico incluye generalmente la prevención completa de la aparición de una enfermedad o el retraso en el inicio de una enfermedad en una fase preclínica en un individuo.

Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital de acuerdo con la invención generalmente pueden ser administradas a un sujeto en una forma de una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede ser preparada en una diversidad de formas de dosificación mediante los métodos convencionales en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, cápsulas, soluciones, suspensiones, gránulos o inyecciones, etc., que, por ejemplo, pueden administrarse por vías tales como la vía oral o parenteral.

En una realización preferida, la composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede ser administrada por vía oral a un sujeto. La composición farmacéutica administrada por vía oral puede estar en la forma de una cápsula, un comprimido, una píldora, una gragea, una oblea, un gránulo, un polvo y similares; o en la forma de una solución o una suspensión en un líquido no acuoso; o en la forma de una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite; o en la forma de un elixir o un jarabe; cada una de las cuales comprende azina orbital-fumarato o un hidrato del mismo o una forma cristalina del mismo, como principio activo.

De acuerdo con la necesidad práctica, puede usarse hidroxipropil metil celulosa u otra matriz polimérica, liposoma y/o microesfera, por ejemplo, en cualquier cociente para formular la composición farmacéutica de acuerdo con la invención de forma que se consiga la liberación retardada o la liberación controlada del principio activo.

Además, debe señalarse que la dosis o el método de uso del compuesto o de un hidrato del mismo o de una forma cristalina del mismo, depende de múltiples factores, que incluyen la edad, el peso corporal, el género, el estado general de salud, el estado nutricional, la actividad de un compuesto, el momento de administración, la tasa metabólica, la gravedad de una enfermedad y la opinión subjetiva de los médicos. La dosis preferida es de entre 0,01 y 100 mg/kg de peso corporal/día.

Descripción de los dibujos

- 10 La Fig. 1 muestra el espectro de RMNH de ¹ (Resonancia Magnética Nuclear ¹H) de la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital en una realización de la invención;
- La Fig. 2 muestra el patrón de XRPD (difracción de rayos X en polvo) de la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital en una realización de la invención;
- 15 La Fig. 3 muestra el termograma de DSC (calorimetría diferencial de barrido) de la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital en una realización de la invención;
- Las Fig. 4 - Fig. 11 muestran los patrones de XRPD de la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital preparado mediante diferentes métodos en las realizaciones de la invención;
- 20 La Fig. 12 muestra el espectro de RMNH ¹ de la forma amorfa del monofumarato de azina orbital en una realización de la invención;
- 25 La Fig. 13 muestra el patrón de XRPD de la forma amorfa del monofumarato de azina orbital en una realización de la invención;
- La Fig. 14 muestra el termograma de DSC de la forma amorfa del monofumarato de azina orbital en una realización de la invención;
- 30 La Fig. 15 muestra el espectro de RMNH ¹ de la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado en una realización de la invención;
- La Fig. 16 muestra el patrón de XRPD de la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado en una realización de la invención;
- 35 La Fig. 17 muestra el termograma de DSC de la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado en una realización de la invención;
- 40 La Fig. 18 muestra el termograma del TGA (análisis termogravimétrico) de la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado en una realización de la invención;
- Las Fig. 19 - Fig. 24 muestran los patrones de XRPD de la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado preparado mediante diferentes métodos en las realizaciones de la invención;
- 45 La Fig. 25 muestra las microfotografías de la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado durante la transformación cristalina térmica en una realización de la invención;
- La Fig. 26 muestra la comparación de los patrones de XRPD de la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado en diferentes fases durante la transformación cristalina térmica en una realización de la invención; en donde la primera y la tercera curva son los patrones de XRPD de la Forma A, y la segunda curva es el patrón de XRPD de la Forma B;
- 50 La Fig. 27 muestra el espectro de RMNH ¹ de la forma cristalina I del difumarato de azina orbital en una realización de la invención;
- 55 La Fig. 28 muestra el patrón de XRPD de la forma cristalina I del difumarato de azina orbital en una realización de la invención;
- 60 La Fig. 29 muestra el termograma de DSC de la forma cristalina I del difumarato de azina orbital en una realización de la invención;
- Las Fig. 30 - Fig. 32 muestran los patrones de XRPD de la forma cristalina I del difumarato de azina orbital preparado mediante diferentes métodos en las realizaciones de la invención;
- 65 La Fig. 33 muestra el espectro de RMNH¹ de la forma cristalina II del difumarato de azina orbital en una

realización de la invención;

La Fig. 34 muestra el patrón de XRPD de la forma cristalina II del difumarato de azina orbital en una realización de la invención;

5 La Fig. 35 muestra el termograma de DSC de la forma cristalina II del difumarato de azina orbital en una realización de la invención;

10 La Fig. 36 muestra los patrones de XRPD de la forma cristalina II del difumarato de azina orbital preparado mediante un método diferente en una realización de la invención;

La Fig. 37 muestra las curvas de las formas cristalinas del fumarato de azina orbital en la inhibición de una célula cancerosa colorrectal humana SW480 en una realización de la invención;

15 La Fig. 38 muestra las curvas de las formas cristalinas del fumarato de azina orbital en la inhibición de una célula de adenocarcinoma gástrico humano MGC-803 en una realización de la invención;

20 La Fig. 39 muestra las curvas de las formas cristalinas del fumarato de azina orbital en la inhibición de una célula de adenocarcinoma pulmonar microcítico humano A549 en una realización de la invención;

La Fig. 40 muestra las curvas de las formas cristalinas del fumarato de azina orbital en la inhibición de una célula de linfoma humano U937 en una realización de la invención;

25 La Fig. 41 muestra las curvas de las formas cristalinas del fumarato de azina orbital en la inhibición de una célula cancerosa de hígado humano Hep-62 en la inhibición de en una realización de la invención;

La Fig. 42 muestra las curvas de las formas cristalinas del fumarato de azina orbital en la inhibición de una célula cancerosa de cuello uterino humana Hela en una realización de la invención;

30 La Fig. 43 muestra las curvas de las formas cristalinas del fumarato de azina orbital en la inhibición de una célula de neuroglioma humano BT-325 en una realización de la invención;

La Fig. 44 muestra las curvas de las formas cristalinas del fumarato de azina orbital en la inhibición de una célula de meduloblastoma humano D341 Med en una realización de la invención;

35 La Fig. 45 muestra las curvas de las formas cristalinas del fumarato de azina orbital en la inhibición de una célula cancerosa de vesícula biliar humana GBC-SD en una realización de la invención.

40 Modos específicos para llevar a cabo la invención

Se pretende que cualquier Ejemplo que no esté en las reivindicaciones tenga propósitos de referencia.

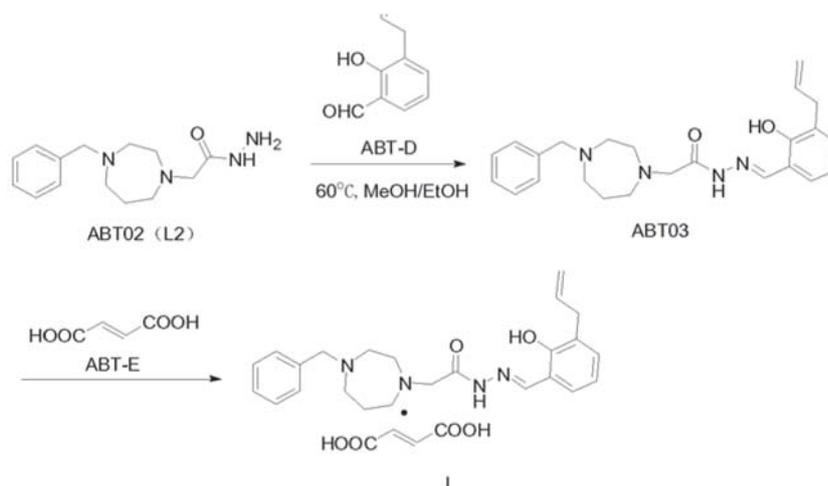
45 Las realizaciones de la invención se describen en detalle mediante la referencia a los siguientes ejemplos. En el caso en el que en los ejemplos no se indiquen las condiciones concretas, los ejemplos se llevan a cabo de acuerdo con las condiciones convencionales o las condiciones recomendadas por el fabricante. Los reactivos o aparatos, cuyos fabricantes no están indicados, son los productos convencionales que están disponibles comercialmente.

50 (4-bencil-[1,4]diazepan-1-il)-acetidrazida (ABT02) (cotéjese el Ejemplo 1 del documento CN101503394A para la preparación); Aparatos y condiciones para el análisis de XRPD: Fabricante: PANalytical B.V.; Tipo: Empyrean; ajustes del generador de rayos X: 45 kV, 40 mA; Intervalo de barrido: 3-40°; Longitud de la etapa de barrido: 0,0168°; Velocidad de barrido: 10 s/etapa.

Aparatos y condiciones para el análisis de DSC: Fabricante: TA; Tipo: Q2000; Intervalo de temperatura: 30-300 °C; Velocidad de calentamiento: 10 °C /min; Caudal de nitrógeno: 50 ml/min.

55 Resonancia magnética nuclear (RMN): Bruker Avance III HD 600;
Análisis termogravimétrico (TGA)--TA Q500;
Horno de secado a vacío--Shanghai Yi Heng Scientific Instruments Co., Ltd.;
Aparato de agitación magnética--OragonLab MS-Pro.

60 **Ejemplo 1 Preparación de la forma cristalina (Forma A) del monofumarato de azina orbital**



A la temperatura ambiente, a un frasco de reacción equipado con un agitador mecánico, se añadieron (4-bencil-[1,4]diazepan-1-il)-acetidrazida (22,30 g), etanol (133,80 ml) y 3-aliil-2-hidroxibenzaldehído (13,79 g) y se agitaron uniformemente. La mezcla resultante se calentó después hasta 60 °C y realizó una reacción termostática durante 4 h, se tomaron muestras para el control del medio (la muestra se tomó cada 2 h) hasta que la (4-bencil-[1,4]diazepan-1-il)-acetidrazida $\leq 1,0$ %. Se añadió ácido fumárico (9,87 g) y después la temperatura se aumentó hasta 80 °C. Después de la adición de 134 ml de ciclohexano, la temperatura se redujo hasta 75 °C para precipitar un sólido de color blanco; la temperatura alcanzó la temperatura ambiente (18 °C) en 35 min; la filtración se llevó a cabo 1 h después, y la torta del filtro se secó hasta el día siguiente a vacío a 40 °C, para obtener la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital, que era un monocristal anhidro, no tenía absorbabilidad de agua y era cristal a granel. El espectro de RMN se mostró en la Fig. 1, y el patrón de XRPD y el termograma de DSC se mostraron en la Fig. 2 y en la Fig. 3, respectivamente. El producto obtenido se usó como materia prima para el posterior cribado de la forma cristalina y los ejemplos de preparación.

Ejemplo 2 Preparación de la forma cristalina (Forma A) del monofumarato de azina orbital

se disolvieron 100 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 2 ml de etanol anhidro/isopropanol a 60 °C. Después de enfriar hasta 25 °C, la mezcla resultante se dejó reposar y se evaporó a sequedad, para obtener la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital, cuyo patrón de XRPD se mostró en la Fig. 4.

La Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital también se obtuvo mediante cristalización por evaporación. Las operaciones particulares eran como sigue: la materia prima preparada en el Ejemplo 1 se disolvió en un disolvente, y se dejó reposar a la temperatura ambiente, y el sólido precipitó por medio de una evaporación, es decir, la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital. El disolvente se selecciona entre metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, sec-butanol, *terc*-butanol, n-pentanol, isopentanol, acetona, butanona, DCM, CHCl_3 , acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de *terc*-butilo, 1,4-dioxano, tolueno, acetonitrilo y DMF, o la siguiente mezcla disolvente: glicerol/etanol (1:1, V/V), metanol o etanol/heptano (1:1, V/V), THF/heptano (2:1, V/V), THF/acetonitrilo (1:1, V/V), THF/acetato de isopropilo (1:1, V/V), THF/DCM (1:1, V/V), THF/acetona (1:1, V/V), THF/acetato de etilo (1:1, V/V) o THF/formiato de butilo (1:1, V/V).

Ejemplo 3 Preparación de la forma cristalina (Forma A) del monofumarato de azina orbital

se disolvieron 100 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 15 ml de acetona a 50 °C, y la temperatura se redujo hasta 0 °C. La mezcla resultante se agitó hasta el día siguiente, y precipitó un sólido de color blanco. Después de la filtración, el sólido se secó a vacío a 40 °C para obtener la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital, cuyo patrón de XRPD se mostró en la Fig. 5.

Mediante referencia al método anterior, la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital también se obtuvo mediante la recristalización de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en el siguiente disolvente: metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, sec-butanol, *terc*-butanol, n-pentanol, isopentanol, butanona, acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetonitrilo, THF o la siguiente mezcla disolvente: metanol/agua (1:4, V/V), metanol/metil *terc*-butil éter (1:4, V/V), metanol/acetato de isopropilo (1:4, V/V), etanol/n-hexano (3:2, V/V), en donde dependiendo del punto de ebullición de un disolvente, la recristalización tenía una alta temperatura de 25-70 °C, y una temperatura de cristalización de 0-25 °C.

Ejemplo 4 Preparación de la forma cristalina (Forma A) del monofumarato de azina orbital

se disolvieron 30 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 0,2 ml de dimetilsulfóxido a 25 °C y se

añadieron 4 ml de isopropil éter. Con agitación precipitó un sólido de color blanco. Después de la filtración, el sólido se secó a vacío a 40 °C para obtener la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital, cuyo patrón de XRPD se mostró en la Fig. 6.

5 Mediante referencia al método anterior, la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital también se obtuvo mediante una cristalización en antisolvente de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en el siguiente disolvente: el buen disolvente era DMA, DMF, DMSO o NMP; el antisolvente era isopropil éter, metil *terc*-butil éter, n-pentanol, butanona, acetato de isopropilo, formiato de butilo, tolueno, agua, acetonitrilo o la siguiente mezcla disolvente: DCM/n-hexano (2:1, V/V), CHCl₃/metil *terc*-butil éter (2:5, V/V), en donde el buen disolvente se añadió en una
10 cantidad suficiente para disolver la materia prima, la cristalización en antisolvente se llevó a cabo a una temperatura de 0-25 °C, y la mezcla resultante se dejó reposar o se agitó para obtener la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital.

Ejemplo 5 Preparación de la forma cristalina (Forma A) del monofumarato de azina orbital

15 se suspendieron 100 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 2 ml de acetato de etilo a 25 °C y se agitaron durante 24 h. Después de la filtración, el sólido se secó a vacío a 40 °C para obtener la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital, cuyo patrón de XRPD se mostró en la Fig. 7.

20 Mediante referencia al método anterior, la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital también se obtuvo mediante la cristalización de la suspensión de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en el siguiente disolvente: metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, sec-butanol, *terc*-butanol, n-pentanol, isopentanol, acetona, butanona, n-hexano, ciclohexano, n-heptano, DCM, CHCl₃, acetato de etilo, acetato de isopropilo, acetato de *terc*-butilo, éter de petróleo, isopropil éter, metil *terc*-butil éter, 1, 4-dioxano, tolueno, acetonitrilo, THF. La
25 cristalización de la suspensión se llevó a cabo a una temperatura de 25-50 °C.

Ejemplo 6 Preparación de la forma cristalina (Forma A) del monofumarato de azina orbital

30 se disolvieron 150 mg de la Forma cristalina C del difumarato de azina orbital (preparado mediante el método del Ejemplo 24) en 5 ml de etanol anhidro a 70 °C, y después se enfriaron hasta 0 °C para precipitar el cristal. Después de la filtración, el cristal se secó a vacío a 40 °C para obtener la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital, cuyo patrón de XRPD se mostró en la Fig. 8.

Ejemplo 7 Preparación de la forma cristalina (Forma A) del monofumarato de azina orbital

35 Se disolvieron 100 mg de la Forma cristalina II (Forma D) del difumarato de azina orbital (preparado mediante el método del Ejemplo 28) en 5 ml etanol anhidro a 70 °C, y después se enfriaron hasta 0 °C para precipitar el cristal. Después de la filtración, el cristal se secó a vacío a 40 °C para obtener la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital, cuyo patrón de XRPD se mostró en la Fig. 9.

Ejemplo 8 Preparación de la forma cristalina (Forma A) del monofumarato de azina orbital

40 se agitaron 100 mg de monofumarato de azina orbital monohidratado (Forma B) (preparado mediante el método del Ejemplo 16) en 5 ml de etanol anhidro a 25 °C durante 24 h, y se convirtieron en la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital, cuyo patrón de XRPD se mostró en la Fig. 10.

Ejemplo 9 Preparación de la forma cristalina (Forma A) del monofumarato de azina orbital

50 se calentaron 50 mg de monofumarato de azina orbital monohidratado (Forma B) (preparado mediante el método del Ejemplo 16) hasta 110 °C para obtener la Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital, cuyo patrón de XRPD se mostró en la Fig. 11.

Ejemplo 10 Preparación de una forma amorfa del monofumarato de azina orbital

55 Se disolvieron 3 g de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 60 ml de etanol anhidro a 60 °C, y se evaporaron a sequedad a 40 °C mediante evaporación rotatoria. El residuo se secó adicionalmente a vacío a 40 °C durante 20 h para obtener una forma amorfa. El espectro de RMNH, el patrón de XRPD y el termograma de DSC del producto se mostraron en las Figs. 12-14, respectivamente.

Ejemplo 11 Preparación de una forma amorfa del monofumarato de azina orbital

60 Se disolvieron 200 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 20 ml de etanol a la temperatura ambiente y se sometieron a una evaporación rotatoria, y después se secaron a vacío a 40 °C durante 20 h para obtener una forma amorfa del azina orbital-fumarato.

65 Mediante referencia al método anterior, también pudo obtenerse una forma amorfa del monofumarato de azina

orbital como sigue: la materia prima preparada en el Ejemplo 1 se disolvió en THF, y después se dejó reposar a la temperatura ambiente para evaporar el disolvente y precipitar el sólido.

Ejemplo 12 Preparación de una forma amorfa del monofumarato de azina orbital

Se calentaron 50 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 hasta 160 °C, y después se enfriaron hasta 40 °C para obtener una forma amorfa del monofumarato de azina orbital.

Ejemplo 13 Preparación de una forma amorfa del monofumarato de azina orbital

Se disolvieron 200 mg de monofumarato de azina orbital monohidratado (Forma B) (preparado mediante el método del Ejemplo 16) en 20 ml de etanol a la temperatura ambiente, y después se evaporaron a sequedad mediante evaporación rotatoria. Después de secar a vacío a 40 °C durante 20 h, se obtuvo una forma amorfa del monofumarato de azina orbital.

Ejemplo 14 Preparación de una forma amorfa del monofumarato de azina orbital

Se disolvieron 200 mg de la forma cristalina I (Forma C) del difumarato de azina orbital (preparado mediante el método del Ejemplo 24) en 20 ml de etanol a la temperatura ambiente, y después se evaporaron a sequedad mediante evaporación rotatoria. Después de secar a vacío a 40 °C durante 20 h, se obtuvo una forma amorfa del monofumarato de azina orbital.

Ejemplo 15 Preparación de una forma amorfa del monofumarato de azina orbital

Se disolvieron 200 mg de la forma cristalina II (Forma D) del difumarato de azina orbital (preparado mediante el método del Ejemplo 28) en 20 ml de etanol a la temperatura ambiente, y después se evaporaron a sequedad mediante evaporación rotatoria. Después de secar a vacío a 40 °C durante 20 h, se obtuvo una forma amorfa del monofumarato de azina orbital.

Ejemplo 16 Preparación de la forma cristalina (Forma B) del monofumarato de azina orbital monohidratado

se suspendieron 30 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 2 ml de acetato de etilo a 25 °C y se agitaron durante 24 h. Después de la filtración, el sólido se secó a vacío a 40 °C para obtener la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado. El espectro de RMNH¹, el patrón de XRPD y el termograma de DSC se mostraron en las Figs. 15-17, respectivamente. El contenido de agua era del 3,308 %, medido mediante un análisis de TGA (como se muestra en la Fig. 18), y el contenido teórico de agua del monohidratado era del 3,330 %.

Mediante referencia al método del Ejemplo 4, la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado se obtuvo mediante la cristalización en antisolvente de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en un disolvente mixto de DMA (NMP o DMSO) y agua.

Ejemplo 17 Preparación de la forma cristalina (Forma B) del monofumarato de azina orbital monohidratado

se suspendieron 100 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 2 ml de agua pura a 80 °C, y se enfriaron hasta 25 °C para precipitar un sólido de color blanco. Después de la filtración, el sólido se secó a vacío a 40 °C para obtener la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado. El patrón de XRPD del producto obtenido se mostró en la Fig. 19.

Ejemplo 18 Preparación de la forma cristalina (Forma B) del monofumarato de azina orbital monohidratado

se disolvieron 100 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en un disolvente mixto de 1 ml de etanol anhidro y 1 ml de agua a 70 °C. Después de enfriar hasta 25 °C, se añadieron 3 ml de agua y precipitó un sólido. Después de la filtración, el sólido se secó a vacío a 40 °C para obtener la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado. El patrón de XRPD del producto obtenido se mostró en la Fig. 20.

Ejemplo 19 Preparación de la forma cristalina (Forma B) del monofumarato de azina orbital monohidratado

A 5 g de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 se añadieron 100 ml de agua purificada, y la mezcla resultante se sometió a agitación magnética a la temperatura ambiente (25 °C) durante 24 h. Después de la filtración, el sólido se secó a vacío a 40 °C durante 20 h para obtener la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado. El patrón de XRPD del producto obtenido se mostró en la Fig. 21.

Ejemplo 20 Preparación de la forma cristalina (Forma B) del monofumarato de azina orbital monohidratado

Se agitaron 30 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 3 ml de agua a 25 °C durante 24 h, y se convirtieron en la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado. El patrón de XRPD del

producto obtenido se mostró en la Fig. 22.

Ejemplo 21 Preparación de la forma cristalina (Forma B) del monofumarato de azina orbital monohidratado

- 5 Se agitaron 30 mg de la forma cristalina II del difumarato de azina orbital (preparado mediante el método del Ejemplo 28) en 3 ml de agua a 25 °C durante 24 h, y se convirtieron en la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado. El patrón de XRPD del producto obtenido se mostró en la Fig. 23.

Ejemplo 22 Preparación de la forma cristalina (Forma B) del monofumarato de azina orbital monohidratado

- 10 Se agitaron 30 mg de la forma amorfa del monofumarato de azina orbital (preparado mediante el método del Ejemplo 10) en 3 ml de agua a 25 °C durante 24 h, y se convirtieron en la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado. El patrón de XRPD del producto obtenido se mostró en la Fig. 24.

Ejemplo 23 Experimento de transformación cristalina de la forma cristalina (Forma B) del monofumarato de azina orbital monohidratado

Una cantidad adecuada de la Forma cristalina B se sometió al experimento de transformación cristalina térmica mediante microscopía óptica polarizada de platina caliente. El proceso de calentamiento fue como sigue:

20

40 °C $\xrightarrow{10\text{ °C/min}}$ 80 °C $\xrightarrow{2\text{ °C/min}}$ 110 °C $\xrightarrow{10\text{ °C/min}}$ 140 °C $\xrightarrow{2\text{ °C/min}}$ 160 °C $\xrightarrow{10\text{ °C/min}}$ 40 °C

- Se fotografiaron los estados del cristal a diferentes temperaturas, y los resultados se mostraron en la Fig. 25. Cuando se calentó la Forma cristalina B hasta 80 °C, obviamente comenzó a fundirse, y se fundió completamente cuando se calentó hasta 100 °C, y una parte del líquido fundido se cristalizó de nuevo. Después de calentar adicionalmente hasta 110 °C, el líquido fundido había cristalizado casi completamente. La muestra a la temperatura se sometió a XRPD (HCS14437-06-01-110C), y se identificó como la Forma A. Después de calentar adicionalmente hasta 150 °C, el sólido se fundió de nuevo. El líquido fundido se calentó hasta 160 °C y después se enfrió hasta 40 °C, no se produjo cristalización, y el sólido obtenido era una forma amorfa. El termograma de DSC se mostró en la Fig. 17, y el patrón de XRPD se mostró en la Fig. 26. En la Fig. 26, la primera curva era el patrón habitual de XRPD de la Forma A, la segunda curva era el patrón de XRPD de la Forma B, y la tercera curva era el patrón de XRPD de la Forma A obtenido cristalizando de nuevo. A partir de la comparación de los patrones de XRPD puede observarse que la Forma B pudo ser convertida en la Forma A mediante un calentamiento hasta 110 °C y perdiendo agua cristalina.

35

Ejemplo 24 Preparación de la forma cristalina I (Forma C) del difumarato de azina orbital

- A 5 g de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 de añadieron 100 ml de formiato de butilo, y la mezcla resultante se sometió a agitación mecánica a la temperatura ambiente (25 °C) durante 48 h. Después de la filtración, el sólido se secó a vacío a 40 °C durante 20 h para obtener la Forma cristalina C del difumarato de azina orbital. El espectro de RMNH, el patrón de XRPD y el termograma de DSC se mostraron en las Figs. 27-29, respectivamente.

- Se disolvieron 30 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 2 ml de formiato de butilo a 60 °C, y se enfriaron hasta 25 °C para precipitar un sólido. De este modo, también pudo obtenerse la Forma cristalina C del difumarato de azina orbital.

45

Ejemplo 25 Preparación de la forma cristalina I (Forma C) del difumarato de azina orbital

- Se agitaron 30 mg de la materia prima preparada en el Ejemplo 1 en 3 ml de formiato de butilo a 25 °C durante 24 h para obtener la forma cristalina I (Forma C) del difumarato de azina orbital. El patrón de XRPD del producto obtenido se mostró en la Fig. 30.

50

Ejemplo 26 Preparación de la forma cristalina I (Forma C) del difumarato de azina orbital

- Se agitaron 30 mg de la Forma cristalina B del monofumarato de azina orbital monohidratado (preparado mediante el método del Ejemplo 16) en 3 ml de formiato de butilo a 25 °C durante 24 h para obtener la forma cristalina I (Forma C) del difumarato de azina orbital. El patrón de XRPD del producto obtenido se mostró en la Fig. 31.

55

Ejemplo 27 Preparación de la forma cristalina I (Forma C) del difumarato de azina orbital

- Se agitaron 50 mg de la forma cristalina II (Forma D) del difumarato de azina orbital (preparado mediante el método del Ejemplo 28) en 5 ml de formiato de butilo a 60 °C durante 24 h para obtener la forma cristalina I (Forma C) del difumarato de azina orbital. El patrón de XRPD del producto obtenido se mostró en la Fig. 32.

60

Ejemplo 28 Preparación de la forma cristalina (Forma D) del difumarato de azina orbital

5 A 0,2 g de la materia prima preparada en el Ejemplo se añadieron 1,8 ml de formiato de butilo. La mezcla resultante se calentó hasta 40 °C, y se suspendió hasta el día siguiente. Después, la mezcla resultante se sometió a una filtración en caliente, la torta del filtro se secó para obtener la Forma cristalina D del difumarato de azina orbital. El espectro de RMNH, el patrón de XRPD y el termograma de DSC se mostraron en las Figs. 33-35, respectivamente.

Ejemplo 29 Preparación de la forma cristalina (Forma D) del difumarato de azina orbital

10 A 0,2 g de la materia prima preparada en el Ejemplo se añadieron 1,8 ml de formiato de butilo. La mezcla resultante se calentó hasta 40 °C, y se suspendió hasta el día siguiente. Después, la mezcla resultante se sometió a una filtración en caliente, y la torta del filtro se secó a 40 °C para obtener la Forma cristalina D del difumarato de azina orbital. El patrón de XRPD del producto obtenido se mostró en la Fig. 36.

15 Ejemplo 30 Análisis de estabilidad de las formas cristalinas del fumarato de azina orbital

1. Análisis de estabilidad de las formas cristalinas en diferentes medios

20 1.1 Estabilidad de diferentes formas cristalinas en tampón de fosfato sódico/ácido clorhídrico pH = 6,8 (37 °C)

Tabla 1 Estabilidad de diferentes formas cristalinas en tampón fosfato sódico/ácido clorhídrico pH = 6,8 (37 °C)

Muestra nº	Cantidad	Forma cristalina de la materia prima	tampón a pH = 6,8	Tiempo	Pureza
14423-04-01	200 mg	Forma A	10 ml	0 h	98,069 %
14437-21-06				4 h	87,153 %
14437-21-06-24h				24 h	84,864 %
14437-06-01	200 mg	Forma B	10 ml	0 h	98,413 %
14437-21-07				4 h	93,112 %
14437-21-07-24h				24 h	90,266 %
14437-18-01	200 mg	Forma C	12 ml	0 h	94,584 %
14437-21-08				4 h	83,292 %
14437-21-08-24h				24 h	82,680 %
14319-68-13	200 mg	Forma D	12 ml	0 h	97,999 %
14437-21-09				4 h	85,418 %
14437-21-09-24h				24 h	84,552 %
14437-13-01	200 mg	Forma amorfa	10 ml	0 h	97,980 %
14437-21-10				4 h	87,266 %
14437-21-10-24h				24 h	85,026 %

25 Todas las formas cristalinas estaban degradadas en el medio con un pH = 6,8, pero la Forma B estaba degradada en un grado un poco menor.

1.2 Estabilidad de diferentes formas cristalinas en una solución de ácido clorhídrico con un pH = 1,2 (37 °C)

Tabla 2 Estabilidad de diferentes formas cristalinas en una solución de ácido clorhídrico a pH = 1,2 (37 °C)

Muestra nº	Cantidad	Forma cristalina de la materia prima	Disolvente	Tiempo	Pureza
14437-06-01	100 mg	Forma B	solución de ácido clorhídrico a pH = 1,2 (5 ml)	0 h	98,413 %
14437-16-03				24 h	79,443 %
14437-16-03-48h				48 h	78,122 %
14437-06-02	100 mg	Forma C	solución de ácido clorhídrico a pH = 1,2 (5 ml)	0 h	97,865 %
14437-16-04				24 h	72,042 %
14437-16-04-48h				48 h	71,017 %

30 Después de agitar en medio con ácido clorhídrico con un pH = 1,2 durante 24 h, la pureza de la Forma B y Forma C se redujo en gran medida, pero la Forma B estaba degradada en un grado un poco menor.

2. Análisis de la solubilidad de formas cristalinas

2.1 Solubilidad de diferentes formas cristalinas en agua (37 °C)

5 Tabla 3 Solubilidad de diferentes formas cristalinas en agua (37 °C)

Muestra nº	Cantidad	Forma cristalina de la materia prima	Disolvente	Tiempo de agitación	Solubilidad
14437-21-01	350-400 mg	Forma A	agua 100 ml	2 h	3,5-4,0 mg/ml
14437-22-01	270-290 mg	Forma B	agua 100 ml	2 h	2,7-2,9 mg/ml
14437-22-02	300-310 mg	Forma C	agua 100 ml	2 h	3,0-3,1 mg/ml
14437-21-04	300-320 mg	Forma D	agua 100 ml	2 h	3,0-3,2 mg/ml
14437-21-05	500-550 mg	Forma amorfa	agua 100 ml	2 h	5,0-5,5 mg/ml

*Nota: en el análisis se aplica un método dinámico, es decir, se añade sólido de forma continua a un disolvente hasta que el sólido no puede disolverse completamente.

2.2 Solubilidad de diferentes formas cristalinas en tampón de fosfato sódico/ácido clorhídrico con un pH = 6,8 (37 °C)

10 Tabla 4 Solubilidad de diferentes formas cristalinas en tampón de fosfato sódico/ácido clorhídrico con un pH = 6,8 (37 °C)

Muestra nº	Cantidad	Forma cristalina de la materia prima	Disolvente a pH = 6,8	Tiempo de agitación	Solubilidad
14437-22-03	10 mg	Forma cristalina A	10 ml	10 min	aceite
14437-22-04	10 mg	Forma cristalina B	10 ml	10 min	aceite
14437-22-05	10 mg	Forma cristalina C	10 ml	10 min	aceite
14437-22-06	10 mg	Forma cristalina D	10 ml	10 min	aceite
14437-22-07	10 mg	Forma amorfa	10 ml	10 min	aceite

*Nota: cuando se añadieron 10 mg de cristal a 10 ml disolvente, la mezcla se volvió rápidamente un aceite.

2.3 Análisis de la solubilidad de la Forma A

15 La Forma cristalina A del monofumarato de azina orbital (30 mg) se colocó en un frasco de vidrio blanco y se añadieron lentamente diferentes disolventes para observar su solubilidad. El análisis se llevó a cabo a una temperatura de 26 °C, y los resultados fueron como sigue.

Tabla 5 Solubilidad de la Forma A en diferentes disolventes

N.º	Cantidad	disolvente/cantidad	Solubilidad (S) mg/ml	N.º	Cantidad	Disolvente/cantidad	Solubilidad (S) mg/ml
1	30 mg	metanol/0,5 ml	60<S<100	16	30 mg	terc-butanol/3 ml	S<10
2	30 mg	etanol/3 ml	10<S<15	17	30 mg	n-pentanol/3 ml	S<10
3	30 mg	n-propanol/3 ml	S<10	18	30 mg	isopentanol/3 ml	S<10
4	30 mg	isopropanol/3 ml	S<10	19	30 mg	acetato de etilo/3 ml	S<10
5	30 mg	n-butanol/3 ml	S<10	20	30 mg	acetato de isopropilo/3 ml	S<10
6	30 mg	sec-butanol/3 ml	S<10	21	30 mg	acetato de terc-butilo/3 ml	S<10
7	30 mg	isobutanol/3 ml	S<10	22	30 mg	DMA/3 ml	S>100
8	30 mg	agua/3 ml	S<10	23	30 mg	diclorometano /3 ml	S<10
9	30 mg	tolueno/3 ml	S<10	24	30 mg	cloroformo/3 ml	S<10
10	30 mg	éter de petróleo/3 ml	S<10	25	30 mg	DMSO/3 ml	S>100
11	30 mg	isopropil éter/3 ml	S<10	26	30 mg	formiato de butilo/ 3 ml	S<10
12	30 mg	metil terc-butil éter/3 ml	S<10	27	30 mg	n-hexano/3 ml	S<10
13	30 mg	acetonitrilo/3 ml	S<10	28	30 mg	ciclohexano/ 3 ml	S<10

(continuación)

N.º	Cantidad	disolvente/cantidad	Solubilidad (S) mg/ml	N.º	Cantidad	Disolvente/cantidad	Solubilidad (S) mg/ml
14	30 mg	dioxano/3 ml	S<10	29	30 mg	n-heptano/3 ml	S<10
15	30 mg	DMF/3 ml	S>100	30	30 mg	NMP/3 ml	S>100

*Nota: un disolvente, en el que una forma cristalina tiene una solubilidad >100 mg/ml, es un disolvente libremente soluble; un disolvente, en el que una forma cristalina tiene una solubilidad como 100 mg/ml < solubilidad > 10 mg/ml, es un disolvente soluble; un disolvente, en el que una forma cristalina tiene una solubilidad < 10 mg/ml, es un disolvente ligeramente soluble.

Como se observa a partir de la tabla anterior, a la temperatura ambiente, metanol, DMF, DMA, DMSO y NMP son buenos disolventes; ésteres, éteres y alcanos son malos disolventes. Además, la materia prima puede disolverse mejor en disolventes tales como alcoholes y cetonas con calentamiento.

5

3. Análisis del factor de afectación de diferentes formas cristalinas

3.1 sustancia relacionada y transformación en forma cristalina (10 días)

10

Tabla 6 Sustancia relacionada y transformación de diferentes formas cristalinas

	Pureza de la materia prima	Alta temperatura (60 °C)	Alta humedad (HR = 92,5 %)	Iluminación (lámpara ultravioleta)	Forma cristalina
Forma A	98,096 %	97,665 %	97,699 %	97,775 %	Forma A
Forma B	98,413 %	97,809 %	98,176 %	98,116 %	Forma B
Forma C	97,865 %	97,244 %	97,733 %	95,696 %	Forma C
Forma amorfa	97,980 %	95,989 %	97,537 %	96,880 %	convertida en la Forma B con una humedad alta

Como se muestra en la tabla anterior, en las condiciones de alta temperatura, alta humedad o iluminación, 10 días después, la pureza de todas las formas cristalinas disminuyó en cierto grado, en donde la Forma A y la Forma B eran relativamente estables y eran sustancialmente coherentes con respecto a la tendencia descendente; excepto por que la forma amorfa se convirtió en la Forma B en las condiciones de alta humedad, no se produjo ningún cambio en la forma cristalina en las otras condiciones.

15

3.2 Cambio en el aspecto y la higroscopicidad (10 días)

20

Tabla 7 Cambio en el aspecto y la higroscopicidad de diferentes formas cristalinas

Forma cristalina \ Condición	Forma A	Forma B	Forma C	Forma amorfa
Alta humedad	sólido de color blanco	sólido de color blanco	sólido de color blanco	Sólido transparente
Alta temperatura	sólido de color blanco	sólido de color blanco	sólido de color blanco	Sólido transparente
Iluminación	sólido de color blanco	sólido de color blanco	sólido de color amarillo claro	Sólido transparente
Higroscopicidad				
	Forma A	Forma B	Forma C	Forma amorfa
muestra/mg	912,35	906,84	908,14	806,4
2014/11/17 frasco+muestra/mg	34052,3	30320,92	33613,2	30259,3
2014/11/24 frasco+muestra/mg	34052,98	30322,03	33618,6	31215,85
aumento en el peso /%	0,075	0,122	0,595	118,620

La higroscopicidad se midió mediante referencia a los métodos del Apéndice X IX J Laboratory Procedure on Determination of Hygroscopicity of Drugs de la Farmacopea de la República Popular de China (2010).

5 Como se observa a partir de la tabla anterior, el color de la Forma C se volvió ligeramente amarillo, y el color de las otras formas cristalinas no cambió; la higroscopicidad de la Forma A, B, C era baja, del 1 %, mientras que el amorfo tuvo un aumento significativo de peso debido a la absorción de humedad en su conversión a la Forma B.

Ejemplo 33 Análisis del efecto inhibitor de las formas cristalinas de los fumaratos de azina orbital sobre la proliferación de las células tumorales

10 Mediante el método MTT se determinaron los efectos de inhibición de la forma cristalina (Forma A) del monofumarato de azina orbital, la forma amorfa del monofumarato de azina orbital, la forma cristalina (Forma B) del monofumarato de azina orbital monohidratado, la forma cristalina I (Forma C) del difumarato de azina orbital, y la forma cristalina II (Forma D) del difumarato de azina orbital de la proliferación de las diferentes células tumorales.

15 Las células tumorales incluían, pero no se limitaban a, las siguientes células: célula cancerosa colorrectal humana SW480, célula de adenocarcinoma gástrico humana MGC-803, célula de adenocarcinoma pulmonar microcítico humano A549, célula de linfoma humano U937, célula cancerosa de hígado humano Hep-G2, célula cancerosa de cuello uterino humana Hela, célula de neuroglioma humano BT-325, célula cancerosa de meduloblastoma humana D341 Med y de vesícula biliar humana GBC-SD.

20 Método experimental: se recogieron células en fase de crecimiento exponencial y se sembraron en una placa de cultivo celular de 96 pocillos, a una concentración final de 5×10^3 células/90 μ l/pocillo. Después de cultivar las células hasta el día siguiente, se añadieron 10 μ l de un compuesto cristalino de fumarato de azina orbital (disuelto en DMSO) a diferentes concentraciones, por lo que el compuesto cristalino de fumarato de azina orbital tenía una concentración final de 30,00 μ M, 10,00 μ M, 3,333 μ M, 1,111 μ M, 0,370 μ M, 0,123 μ M, 0,041 μ M, 0,014 μ M y 0,0046 μ M por tratamiento (9 concentraciones en total), en donde cada concentración se repitió en tres pocillos, y se usó la misma dosis de DMSO como control negativo. Después del tratamiento durante 72 h, se añadieron 10 μ l de solución MTT (5 mg/ml, Sigma) a cada pocillo, y las células se cultivaron adicionalmente durante 4 h. El medio de cultivo se desechó, se añadieron 100 μ l de DMSO a cada pocillo, y la disolución se llevó a cabo con rotación en una mesa de agitación durante 10 min. Se midió el valor de la absorbancia a 570 nm mediante un instrumento de ELISA y se calculó la tasa de inhibición de la proliferación celular de los compuestos cristalinos (concentración inhibitora al 50 %, valor de la CI_{50}). Los resultados se mostraron en la Tabla 8.

35 Tabla 8 Efectos inhibitorios de los compuestos cristalinos de fumarato de azina orbital sobre la proliferación de las células tumorales (Unidad: μ M)

Forma cristalina de la materia prima	SW480	MGC-803	A549	U937	Hep-G2	Hela	BT-325	D341 Med	GBC-SD
Forma A	1,767	1,359	2,989	0,4250	8,408	5,682	2,884	0,4328	6,481
Forma B	1,975	1,390	2,895	0,4954	8,317	5,755	2,311	0,4302	6,164
Forma C	1,925	1,284	3,074	0,3914	8,214	5,490	2,646	0,4108	6,370
Forma D	1,674	1,453	2,874	0,4141	8,180	5,170	2,707	0,4842	6,948
una forma amorfa	1,781	1,597	2,969	0,4177	8,375	5,648	2,518	0,4471	6,579

Los resultados experimentales muestran:

40 (1) Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital tenían un efecto inhibitor significativo sobre las células SW480, y en un intervalo de concentración de desde 0,0046 μ M hasta 30,00 μ M, la tasa de inhibición para las células SW480 aumentó gradualmente al aumentar la concentración. Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital eran comparables con respecto a la capacidad para inhibir la célula SW480 y sus concentraciones inhibitoras al 50 % (es decir, los valores de la CI_{50}) se mostraron en la Tabla 8 y en la Fig. 37.

45 (2) Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital tenían un efecto inhibitor significativo sobre las células MGC-803, y en un intervalo de concentración de desde 0,0046 μ M hasta 30,00 μ M, la tasa de inhibición para las células MGC-803 aumentó gradualmente al aumentar la concentración. Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital eran comparables con respecto a la capacidad para inhibir la célula MGC-803 y sus concentraciones inhibitoras al 50 % (es decir, los valores de la CI_{50}) se mostraron en la Tabla 8 y en la Fig. 38.

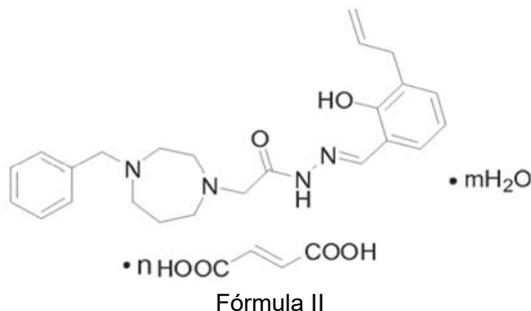
50 (3) Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital tenían un efecto inhibitor significativo sobre las células A549, y en un intervalo de concentración de desde 0,0046 μ M hasta 30,00 μ M, la tasa de inhibición para las células A549 aumentó gradualmente al aumentar la concentración. Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital eran comparables con respecto a la capacidad para inhibir la célula A549 y sus concentraciones inhibitoras al 50 % (es decir, los valores de la CI_{50}) se mostraron en la Tabla 8 y en la Fig. 39.

- 5 (4) Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital tenían un efecto inhibitor significativo sobre las células U937, y en un intervalo de concentración de desde 0,0046 μM hasta 30,00 μM , la tasa de inhibición para las células U937 aumentó gradualmente al aumentar la concentración. Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital eran comparables con respecto a la capacidad para inhibir la célula U937 y sus concentraciones inhibitoras al 50 % (es decir, los valores de la CI_{50}) se mostraron en la Tabla 8 y en la Fig. 40.
- 10 (5) Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital tenían un efecto inhibitor significativo sobre las células Hep-G2 y en un intervalo de concentración de desde 0,0046 μM hasta 30,00 μM , la tasa de inhibición para las células Hep-G2 aumentó gradualmente al aumentar la concentración. Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital eran comparables con respecto a la capacidad para inhibir la célula Hep-G2 y sus concentraciones inhibitoras al 50 % (es decir, los valores de la CI_{50}) se mostraron en la Tabla 8 y en la Fig. 41.
- 15 (6) Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital tenían un efecto inhibitor significativo sobre las células Hela y en un intervalo de concentración de desde 0,0046 μM hasta 30,00 μM , la tasa de inhibición para las células Hela aumentó gradualmente al aumentar la concentración. Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital eran comparables con respecto a la capacidad para inhibir la célula Hela y sus concentraciones inhibitoras al 50 % (es decir, los valores de la CI_{50}) se mostraron en la Tabla 8 y en la Fig. 42.
- 20 (7) Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital tenían un efecto inhibitor significativo sobre las células BT-325, y en un intervalo de concentración de desde 0,0046 μM hasta 30,00 μM , la tasa de inhibición para las células BT-325 aumentó gradualmente al aumentar la concentración. Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital eran comparables con respecto a la capacidad para inhibir la célula BT-325 y sus concentraciones inhibitoras al 50 % (es decir, los valores de la CI_{50}) se mostraron en la Tabla 8 y en la Fig. 43.
- 25 (8) Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital tenían un efecto inhibitor significativo sobre las células D341 Med y en un intervalo de concentración de desde 0,0046 μM hasta 30,00 μM , la tasa de inhibición para las células D341 Med aumentó gradualmente al aumentar la concentración. Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital eran comparables con respecto a la capacidad para inhibir la célula D341 Med y sus concentraciones inhibitoras al 50 % (es decir, los valores de la CI_{50}) se mostraron en la Tabla 8 y en la Fig. 44.
- 30 (9) Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital tenían un efecto inhibitor significativo sobre las células GBC-SD y en un intervalo de concentración de desde 0,0046 μM hasta 30,00 μM , la tasa de supervivencia de las células GBC-SD disminuyó gradualmente, y la tasa de inhibición aumentó gradualmente al aumentar la concentración. Las formas cristalinas de fumarato de azina orbital eran comparables con respecto a la capacidad para inhibir la célula GBC-SD y sus concentraciones inhibitoras al 50 % (es decir, los valores de la CI_{50}) se mostraron en la Tabla 8 y en la Fig. 45.
- 35

REIVINDICACIONES

1. Una forma cristalina de un azina orbital-hidrato de fumarato, en donde, el azina orbital-hidrato de fumarato tiene una estructura como se muestra en la Fórmula II, n es 1 y m es 1;

5



la forma cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos al menos en las siguientes posiciones 2θ : $7,0 \pm 0,2$, $17,3 \pm 0,2$ y $21,3 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α .

10

2. La forma cristalina del azina orbital-hidrato de fumarato de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende adicionalmente al menos un pico en una posición 2θ seleccionada entre: $12,9 \pm 0,2$, $17,9 \pm 0,2$ y $19,7 \pm 0,2$, y opcionalmente al menos un pico en una posición 2θ seleccionada entre: $13,4 \pm 0,2$, $14,7 \pm 0,2$ y $23,5 \pm 0,2$.

15

3. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que tiene dos puntos de fusión, y los dos puntos de fusión son $102,18 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$ y $153,72 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente, como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

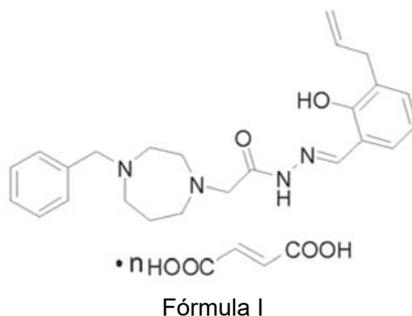
20

4. Un método para preparar la forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una forma cristalina del azina orbital-fumarato de Fórmula I se cristaliza en agua, un disolvente orgánico o un disolvente mixto de un disolvente orgánico y agua, para obtener dicha forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1; y opcionalmente, hay comprendida adicionalmente una filtración o un secado;

25

en donde, la forma cristalina de Fórmula I tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos al menos en las siguientes posiciones 2θ : $5,9 \pm 0,2$, $16,8 \pm 0,2$ y $18,1 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α ;

el azina orbital-fumarato de Fórmula I es como se muestra a continuación:



30

n del azina orbital-fumarato de Fórmula I es 1.

35

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo de la forma cristalina de Fórmula I comprende adicionalmente al menos un pico en una posición 2θ seleccionada entre: $10,1 \pm 0,2$, $14,2 \pm 0,2$ y $22,4 \pm 0,2$, y opcionalmente al menos un pico en una posición 2θ seleccionada entre: $11,4 \pm 0,2$, $20,8 \pm 0,2$ y $23,8 \pm 0,2$.

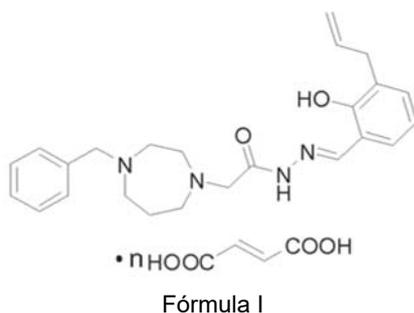
40

6. Un método para preparar la forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una forma cristalina del azina orbital-fumarato de Fórmula I se agita en agua a la temperatura ambiente durante 12-36 h para ser convertida en dicha forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1;

en donde la forma cristalina de Fórmula I tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos al menos en las siguientes posiciones 2θ : $5,7 \pm 0,2$, $9,5 \pm 0,2$ y $10,0 \pm 0,2$, como se determina usando radiación de Cu-K α ;

45

el azina orbital-fumarato de Fórmula I es como se muestra a continuación:

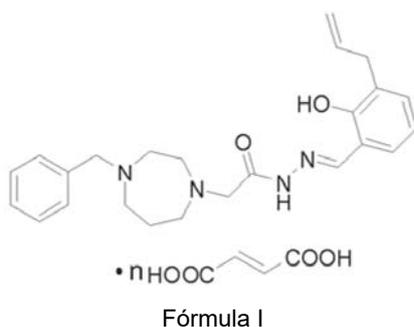


n del azina orbital-fumarato de Fórmula I es 2.

5 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo del azina orbital-fumarato de Fórmula I comprende adicionalmente al menos un pico en una posición 2θ seleccionada entre: $14,7 \pm 0,2$, $19,2 \pm 0,2$ y $26,7 \pm 0,2$, y opcionalmente al menos un pico en una posición 2θ seleccionada entre: $13,3 \pm 0,2$, $22,2 \pm 0,2$ y $23,6 \pm 0,2$.

10 8. Un método para preparar la forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1, en donde una forma amorfa del azina orbital-fumarato de Fórmula I, que tiene una temperatura de transición vítrea de $51,12 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$, como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido, se agita en agua a la temperatura ambiente durante 12-36 h para ser convertida en dicha forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 1;

15 en donde, el azina orbital-fumarato de Fórmula I es como se muestra a continuación:



20 n del azina orbital-fumarato de Fórmula I es 1.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde la forma cristalina del azina orbital-fumarato de Fórmula I tiene un punto de fusión de $156,27 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$, como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

25 10. El método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde la forma cristalina del azina orbital-fumarato de Fórmula I se cristaliza en agua, acetato de etilo o un disolvente mixto de etanol, DMA, NMP o DMSO con agua.

30 11. El método de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde la forma cristalina del azina orbital-fumarato de Fórmula I tiene un punto de fusión de $156,93 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3,0 \text{ }^\circ\text{C}$, como se determina mediante calorimetría diferencial de barrido.

12. Una composición farmacéutica, que comprende la forma cristalina del azina orbital-hidrato de fumarato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 13. La forma cristalina del azina orbital-hidrato de fumarato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de un tumor, preferentemente un tumor asociado con la expresión anormal de la Caspasa-3.

40 14. La forma cristalina del azina orbital-hidrato de fumarato para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el tumor se selecciona entre un grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, linfoma maligno, cáncer de cuello de útero, neuroblastoma, meduloblastoma y cáncer de pulmón.

45 15. La forma cristalina del azina orbital-hidrato de fumarato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en la destrucción o la eliminación de una célula tumoral, preferentemente la célula tumoral es una línea celular tumoral o una célula tumoral de un sujeto; más preferentemente la célula tumoral se selecciona entre un

grupo que consiste en célula cancerosa gástrica, célula cancerosa colorrectal, célula cancerosa de hígado, célula cancerosa de vesícula biliar, célula de linfoma maligno, célula cancerosa de cuello uterino, célula de neuroblastoma, célula de meduloblastoma y célula cancerosa de pulmón.

5

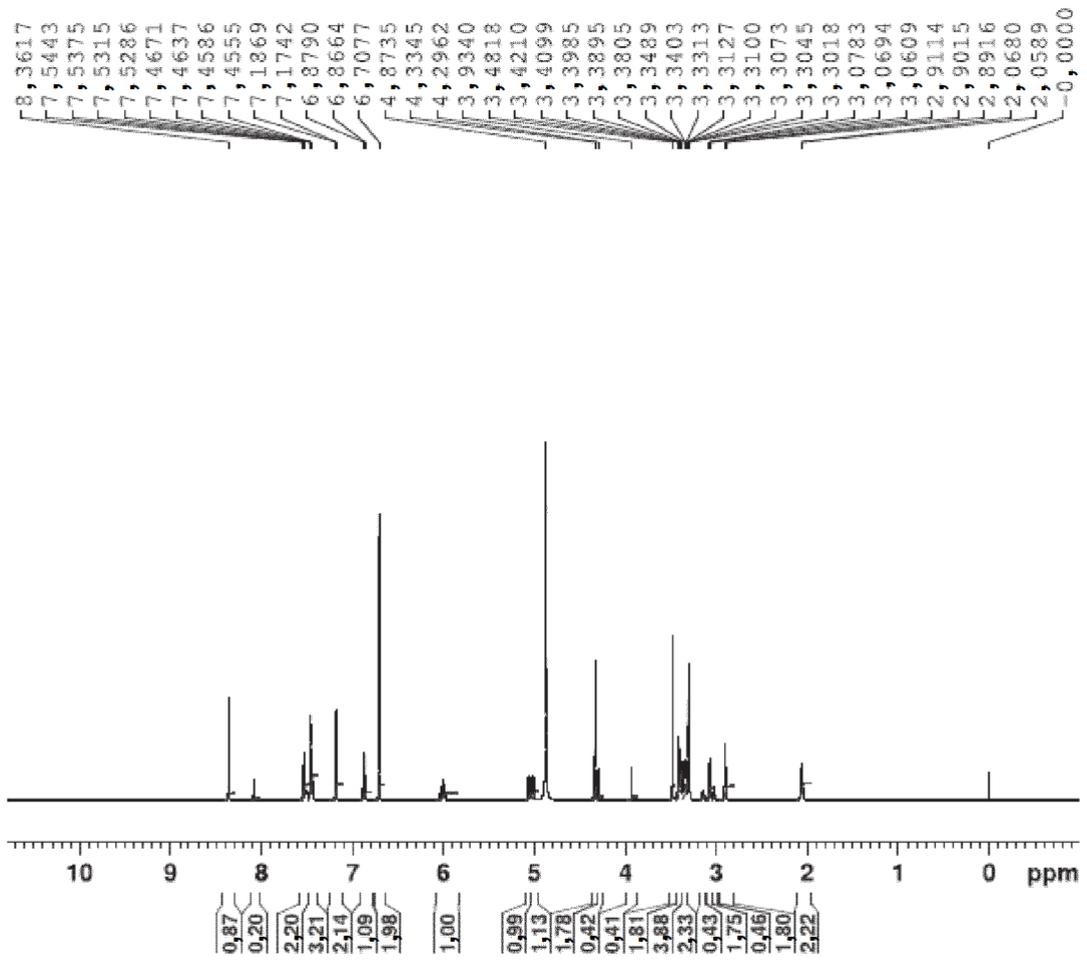
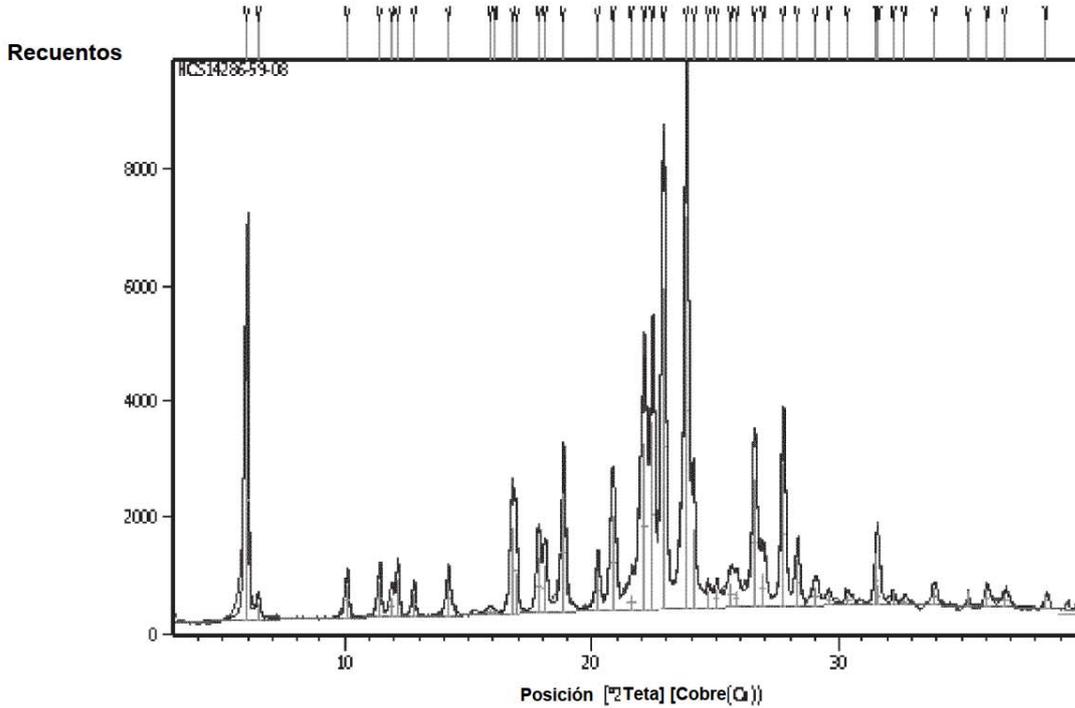


Fig. 1



Lista de picos

Pos. [°2T.]	Altura [cts]	FWHM Izquierda [°2 T.]	espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
5,9324 (4)	4094 (24)	0,178 (1)	14,88590	60,42
6,420 (2)	279 (10)	0,136 (6)	13,75581	4,12
10,082 (1)	571 (11)	0,182 (4)	8,76647	8,43
11,394 (1)	615 (13)	0,173 (4)	7,75953	9,08
11,897 (3)	347 (12)	0,23 (1)	7,43254	5,12
12,138 (2)	661 (17)	0,137 (4)	7,28558	9,76
12,781 (2)	411 (11)	0,162 (5)	6,92054	6,06
14,183 (2)	564 (11)	0,203 (5)	6,23934	8,32
15,87 (1)	83 (5)	0,45 (2)	5,58077	1,23
16,08 (2)	0 (1451)	0 (4350)	5,50908	0,00
16,785 (3)	1467 (21)	0,257 (5)	5,27767	21,65
16,933 (2)	712 (56)	0,084 (3)	5,23187	10,51
17,824 (2)	951 (16)	0,211 (4)	4,97240	14,03
18,082 (2)	834 (17)	0,166 (5)	4,90197	12,30
18,8217 (7)	2033 (21)	0,175 (3)	4,71094	30,01
20,215 (1)	697 (14)	0,200 (5)	4,38930	10,29
20,8224 (9)	1634 (19)	0,251 (3)	4,26259	24,11
21,57 (2)	252 (21)	0,50 (2)	4,11672	3,71
22,090 (1)	2834 (28)	0,318 (4)	4,02074	41,82
22,4420 (7)	3237 (45)	0,165 (3)	3,95850	47,77
22,8681 (4)	5550 (29)	0,204 (1)	3,88569	81,90
23,8014 (4)	6776 (42)	0,194 (2)	3,73539	100,00
24,111 (1)	1350 (36)	0,072 (2)	3,68813	19,92

ES 2 809 556 T3

24,685 (3)	285 (23)	0,069 (7)	3,60359	4,21
25,016 (4)	325 (19)	0,20 (1)	3,55665	4,80
25,592 (7)	427 (21)	0,32 (2)	3,47800	6,30
25,854 (8)	284 (26)	0,21 (2)	3,44335	4,19
26,5550 (9)	2191 (27)	0,195 (4)	3,35397	32,34
26,912 (3)	600 (14)	0,232 (7)	3,31029	8,85
27,7116 (6)	2469 (23)	0,187 (2)	3,21656	36,44
28,288 (1)	811 (16)	0,202 (5)	3,15226	11,97
29,016 (3)	344 (11)	0,29 (1)	3,07488	5,08
29,546 (5)	188 (11)	0,20 (1)	3,02093	2,77
30,385 (6)	173 (8)	0,37 (2)	2,93935	2,55
31,571 (9)	876 (60)	0,20 (1)	2,83156	12,93
31,657 (5)	336 (134)	0,09 (1)	2,82407	4,96
32,244 (3)	246 (18)	0,073 (6)	2,77402	3,62
32,707 (7)	126 (9)	0,23 (2)	2,73581	1,86
33,902 (3)	321 (14)	0,20 (1)	2,64208	4,73
35,290 (2)	275 (31)	0,021 (4)	2,54128	4,06
36,047 (3)	289 (11)	0,22 (1)	2,48958	4,26
36,758 (5)	202 (7)	0,33 (2)	2,44309	2,98
38,432 (4)	237 (17)	0,15 (2)	2,34040	3,49
39,9846	145,37	2,1427	2,25304	2,15

Fig. 2

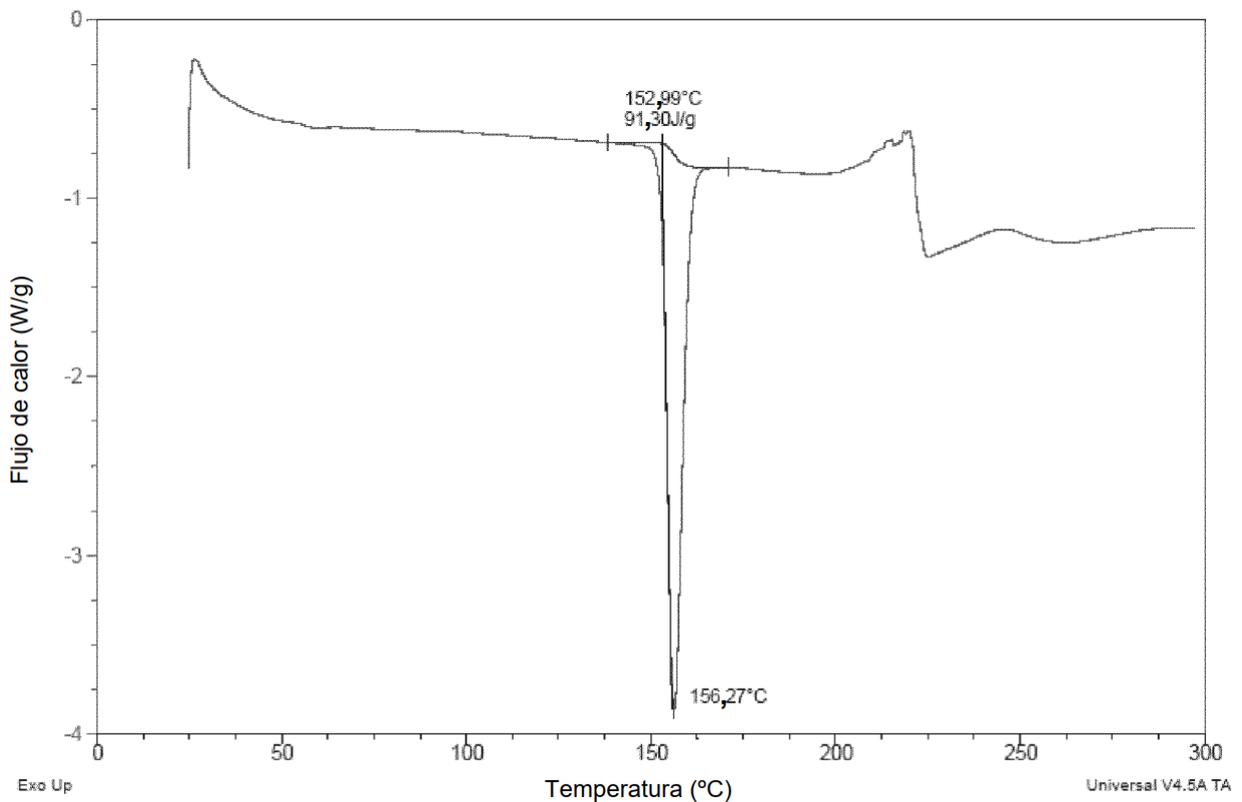


Fig. 3

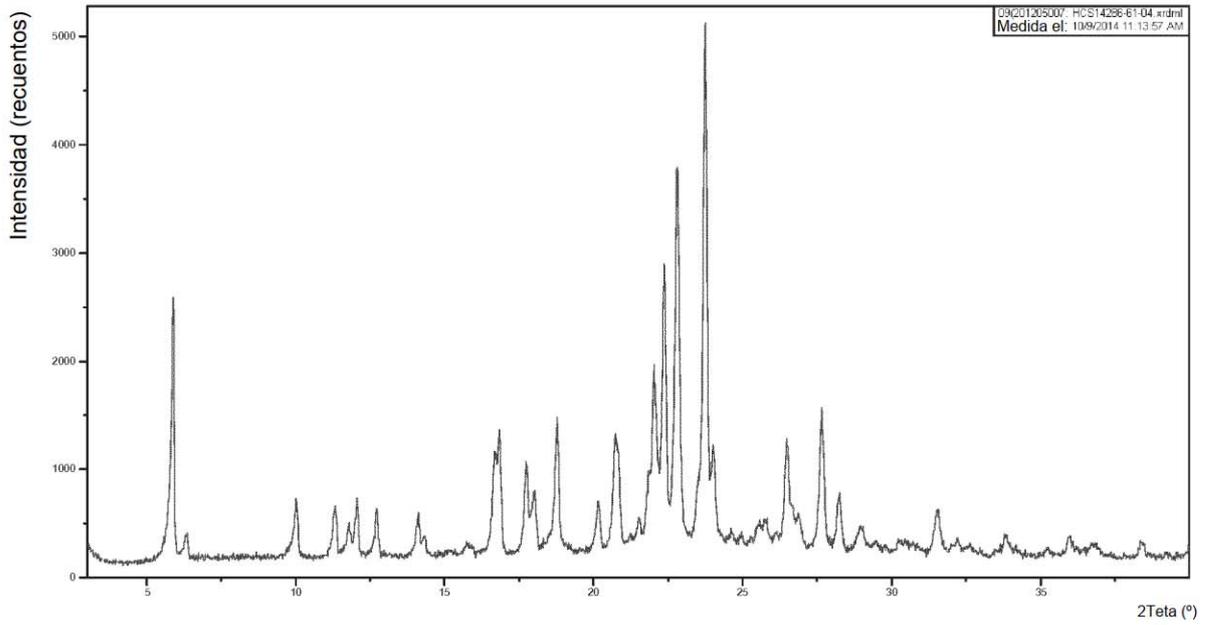


Fig. 4

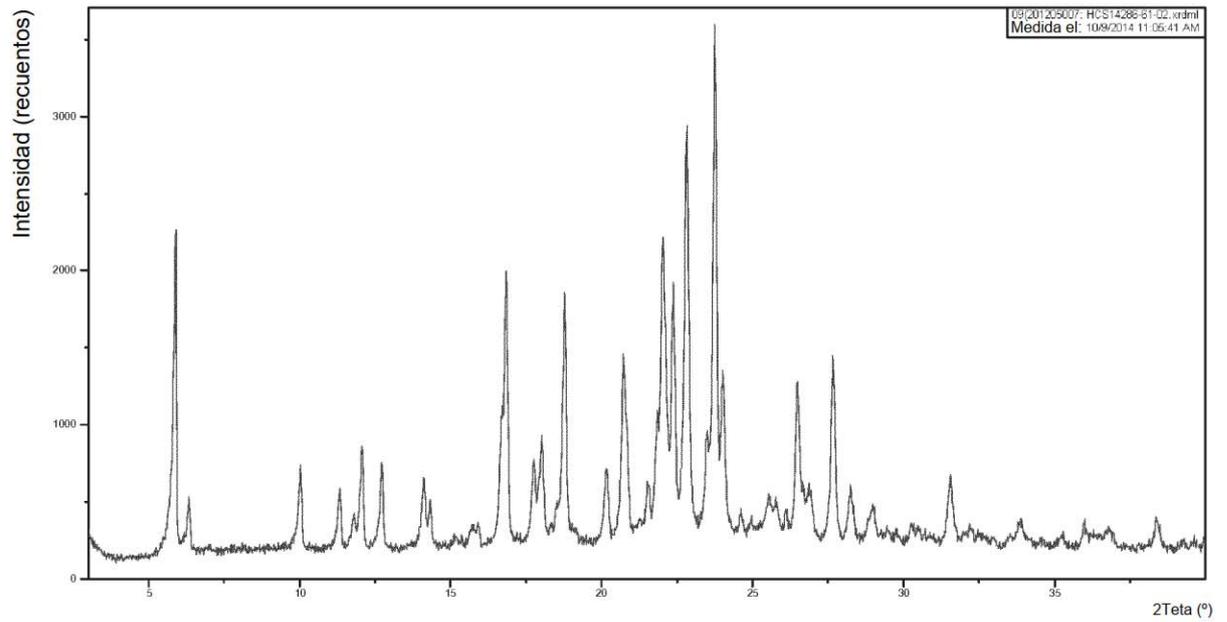


Fig. 5

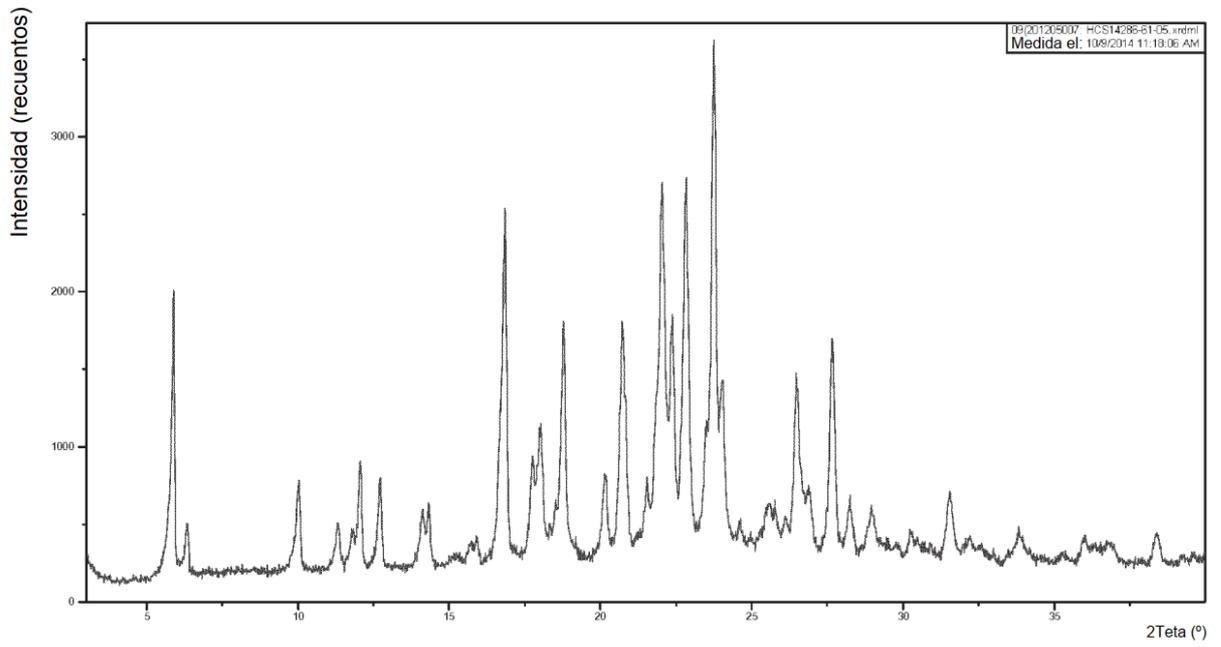


Fig. 6

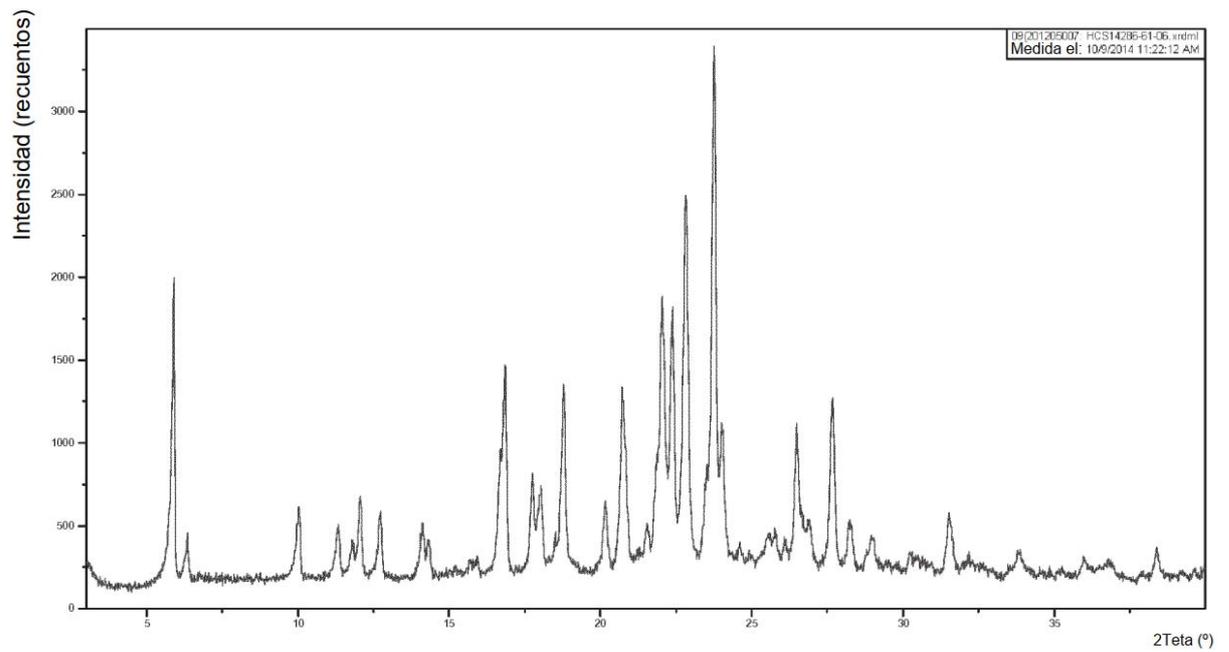


Fig. 7

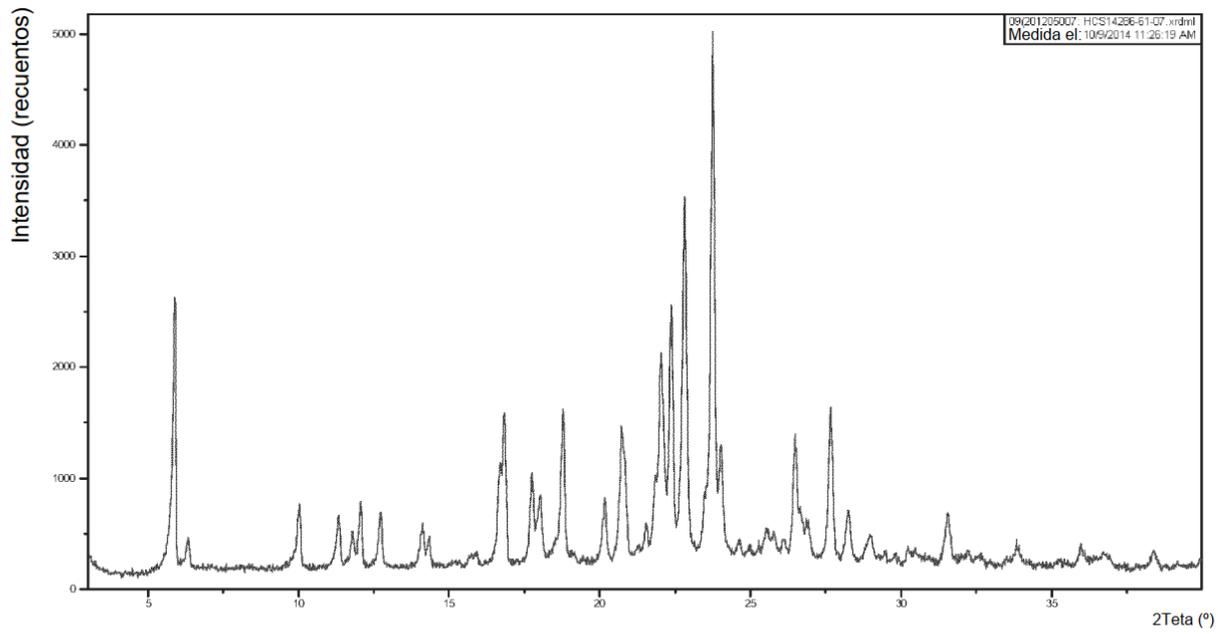


Fig. 8

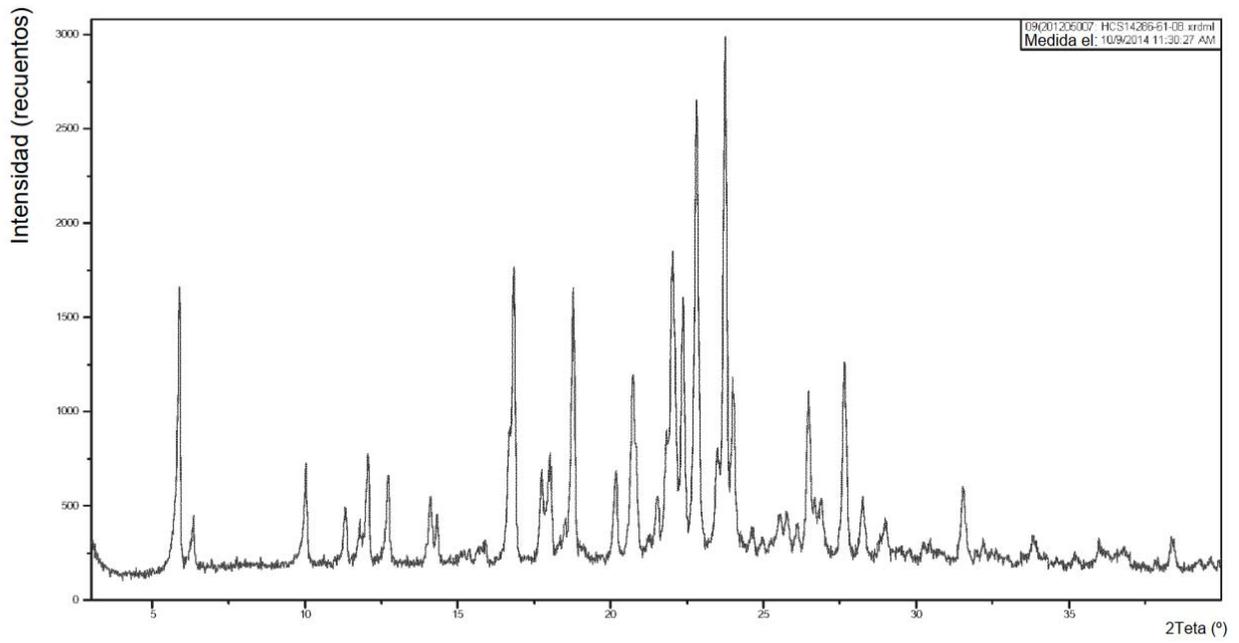


Fig. 9

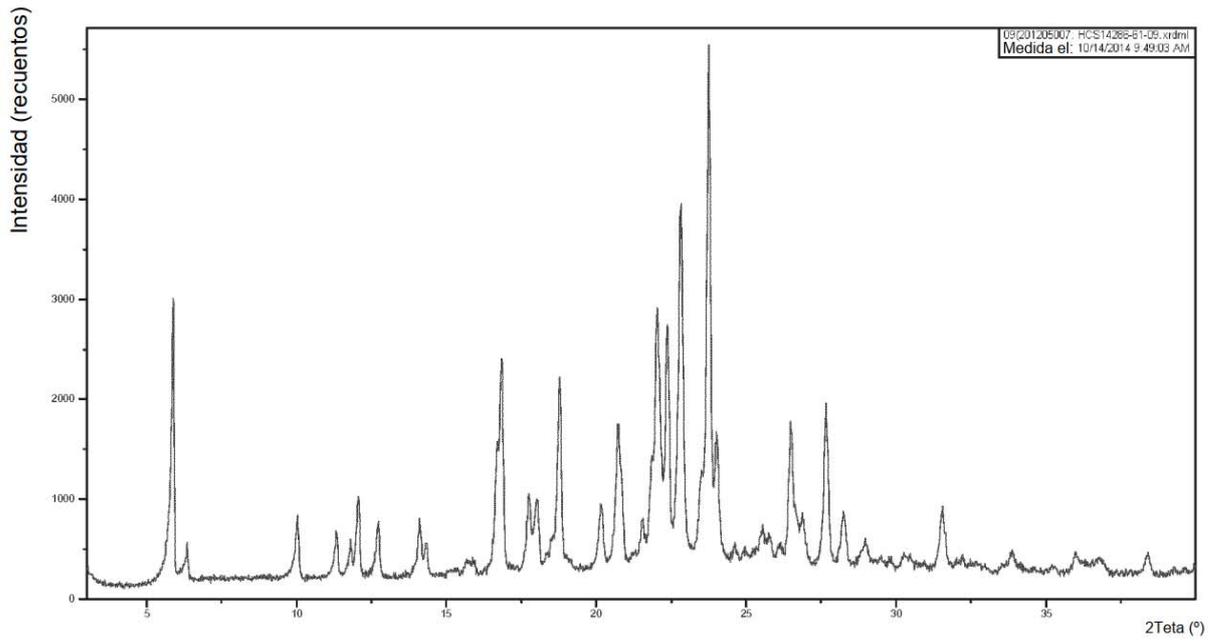


Fig. 10

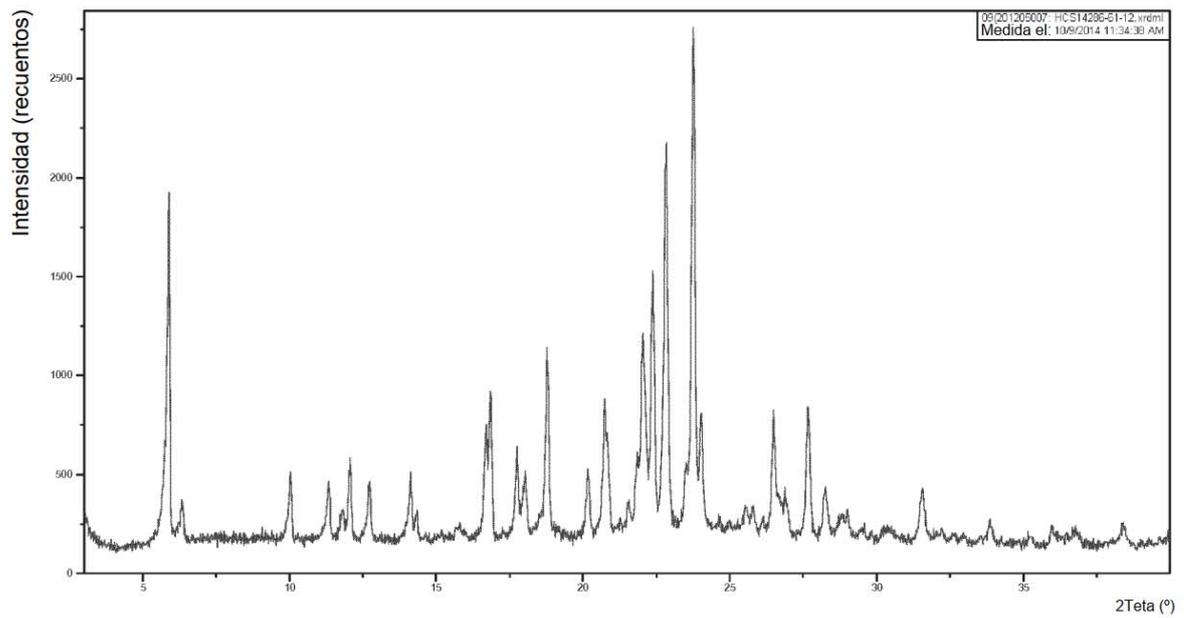


Fig. 11

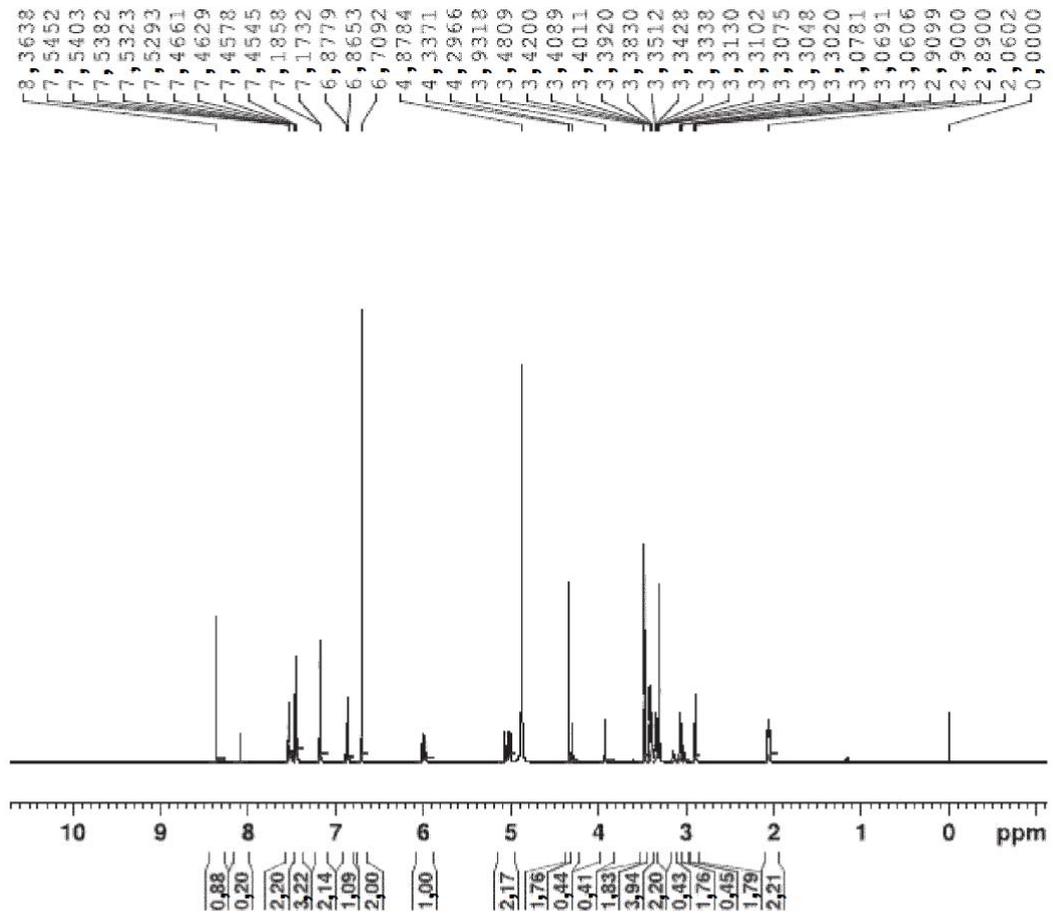


Fig. 12

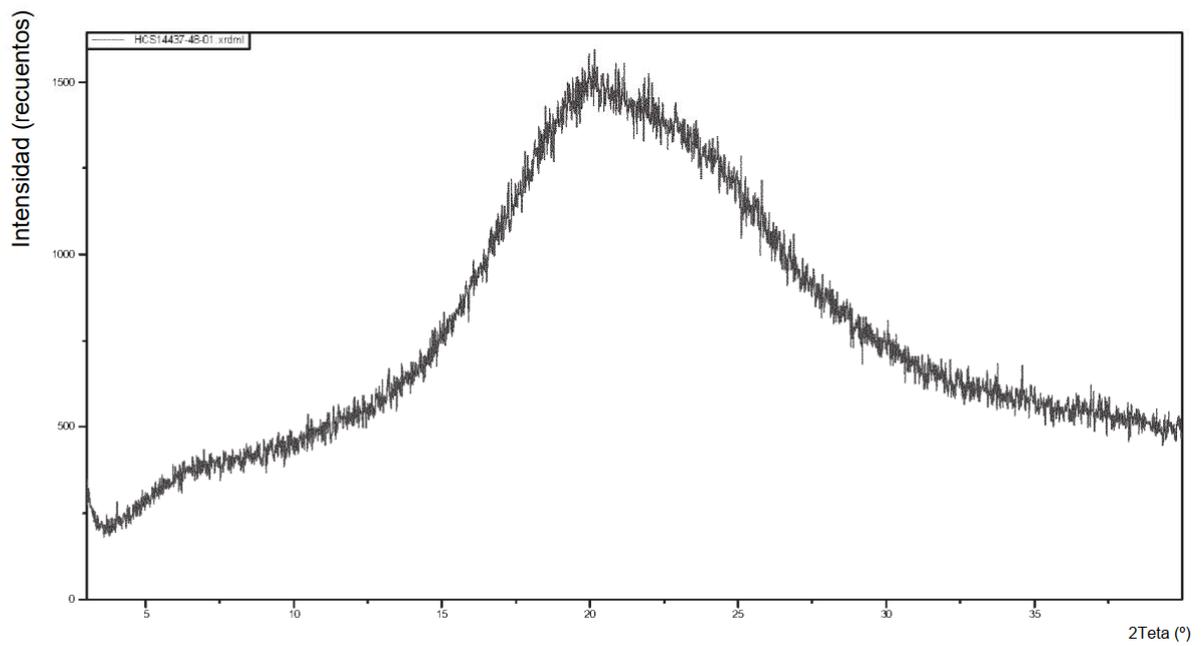


Fig. 13

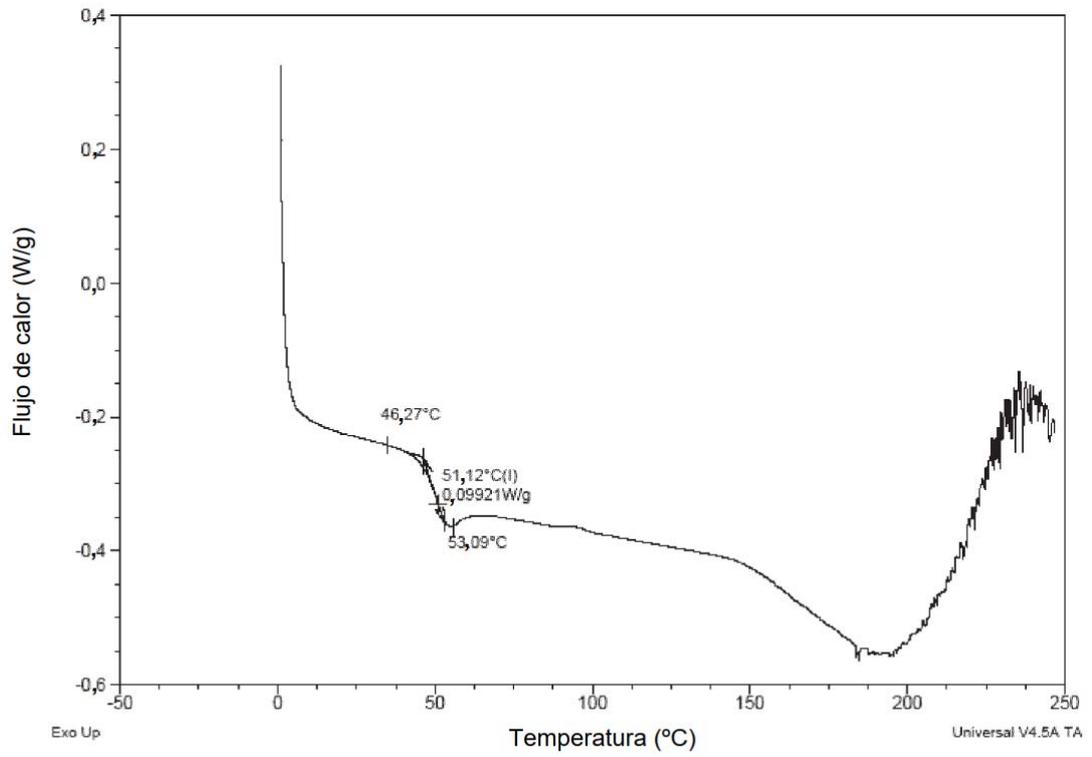


Fig. 14

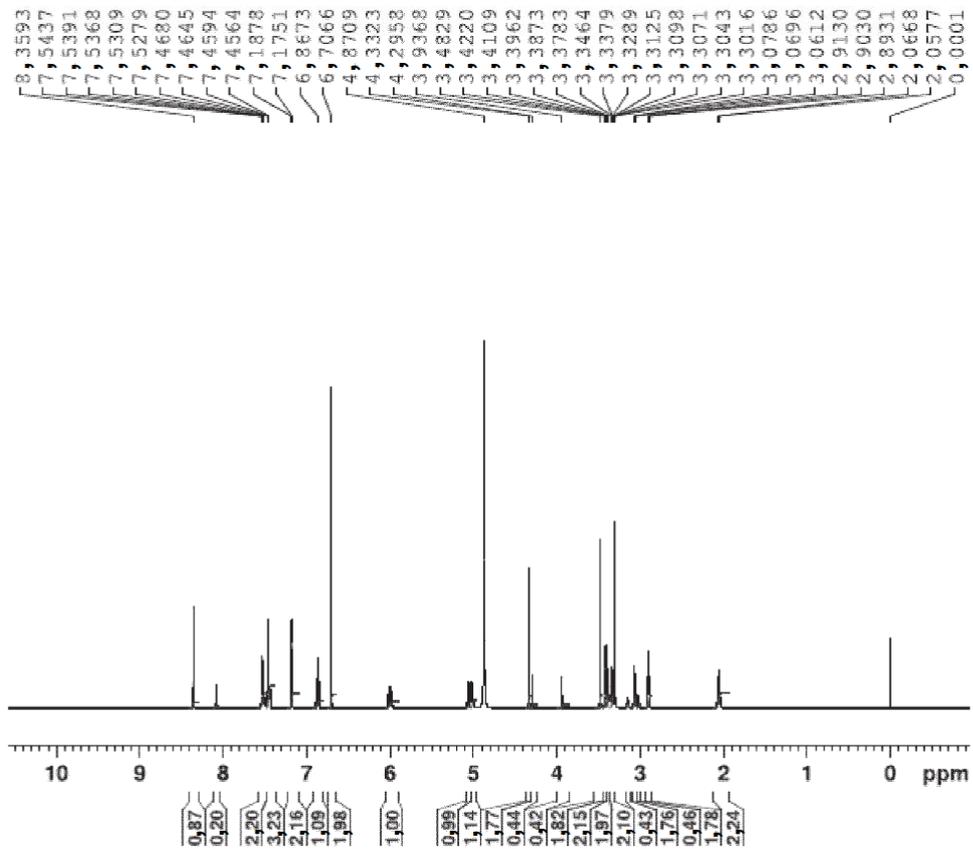
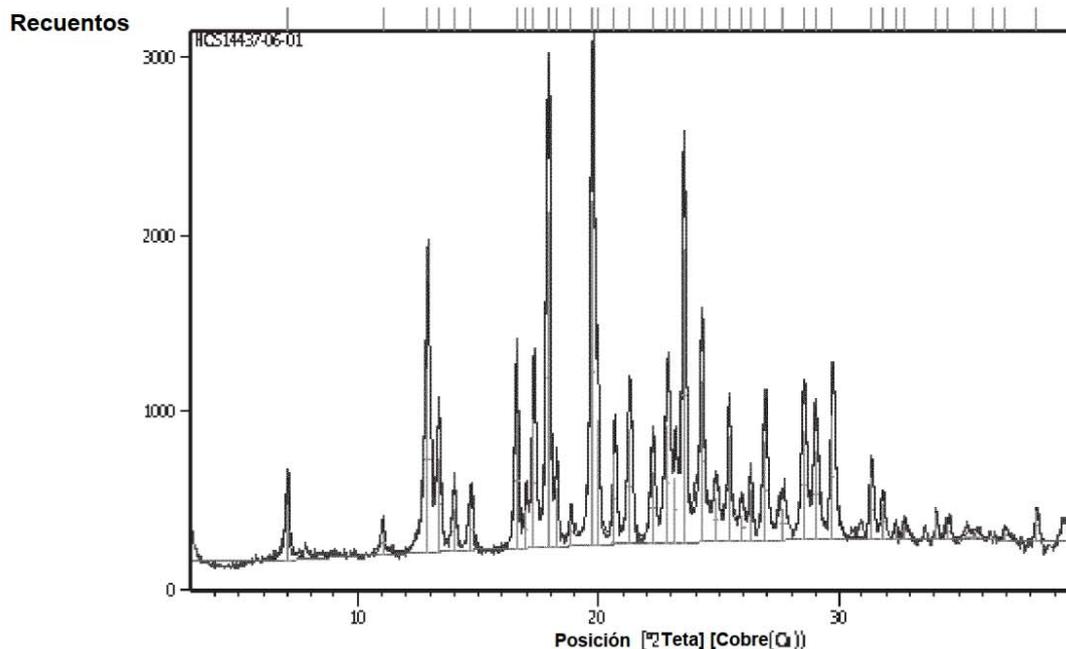


Fig. 15



Lista de picos

Pos. [°2T.]	Altura [cts]	FWHM Izquierda [°2 T.]	espaciado d [Å]	Int. Rel.
6,995 (2)	308 (9)	0,172 (8)	12,62701	15,76
11,026 (4)	132 (7)	0,19 (1)	8,01804	6,73
12,891 (1)	1035 (12)	0,269 (4)	6,86168	52,94
13,355 (1)	535 (11)	0,180 (5)	6,62437	27,38
13,990 (3)	235 (7)	0,207 (7)	6,32527	12,01
14,686 (3)	245 (7)	0,225 (7)	6,02716	12,53
16,582 (1)	760 (13)	0,168 (3)	5,34184	38,85
16,982 (3)	206 (12)	0,14 (1)	5,21693	10,55
17,304 (1)	720 (14)	0,179 (5)	5,12056	36,82
17,8945 (6)	1898 (20)	0,175 (2)	4,95290	97,07
18,253 (2)	331 (14)	0,122 (8)	4,85653	16,95
18,840 (4)	145 (8)	0,143 (8)	4,70646	7,42
19,7383 (9)	1955 (20)	0,194 (3)	4,49419	100,00
19,963 (1)	711 (27)	0,088 (5)	4,44413	36,35
20,663 (1)	506 (13)	0,147 (5)	4,29504	25,86
21,277 (1)	653 (10)	0,233 (4)	4,17260	33,39
22,237 (2)	408 (10)	0,206 (6)	3,99452	20,86
22,848 (2)	665 (12)	0,260 (6)	3,88910	34,03
23,184 (3)	365 (20)	0,15 (1)	3,83348	18,69
23,5247 (9)	1658 (21)	0,168 (3)	3,77870	84,80
24,266 (1)	908 (18)	0,180 (6)	3,66494	46,46
24,850 (4)	246 (9)	0,24 (1)	3,58010	12,57
25,400 (2)	598 (19)	0,148 (8)	3,50379	30,57

25,923 (6)	150 (8)	0,25 (1)	3,43434	7,65
26,294 (3)	288 (15)	0,133 (7)	3,38670	14,75
26,898 (2)	565 (13)	0,206 (6)	3,31200	28,90
27,609 (5)	185 (7)	0,35 (1)	3,22833	9,45
28,509 (2)	616 (12)	0,243 (6)	3,12835	31,52
28,987 (2)	508 (11)	0,245 (7)	3,07791	25,98
29,704 (1)	699 (13)	0,215 (5)	3,00520	35,76
31,392 (2)	346 (13)	0,168 (8)	2,84734	17,71
31,855 (3)	210 (10)	0,16 (1)	2,80700	10,73
32,386 (8)	74 (14)	0,10 (3)	2,76216	3,79
32,778 (8)	87 (8)	0,21 (3)	2,73007	4,44
34,088 (4)	148 (14)	0,10 (1)	2,62806	7,56
34,570 (7)	91 (9)	0,20 (3)	2,59249	4,65
35,59 (3)	39 (4)	0,68 (8)	2,52048	1,98
36,4 (2)	0 (128)	0 (871)	2,46382	0,00
36,94 (1)	63 (5)	0,179 (6)	2,43172	3,24
38,240 (4)	167 (14)	0,13 (2)	2,35170	8,55

Fig. 16

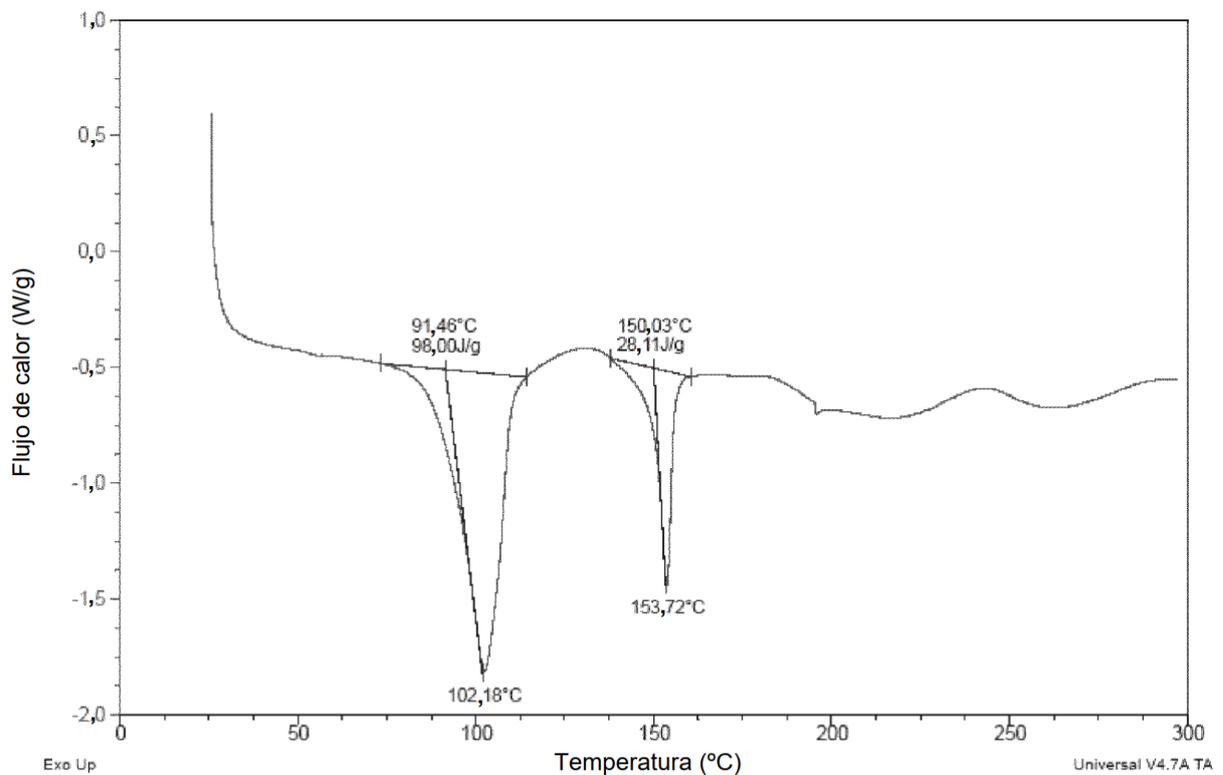


Fig. 17

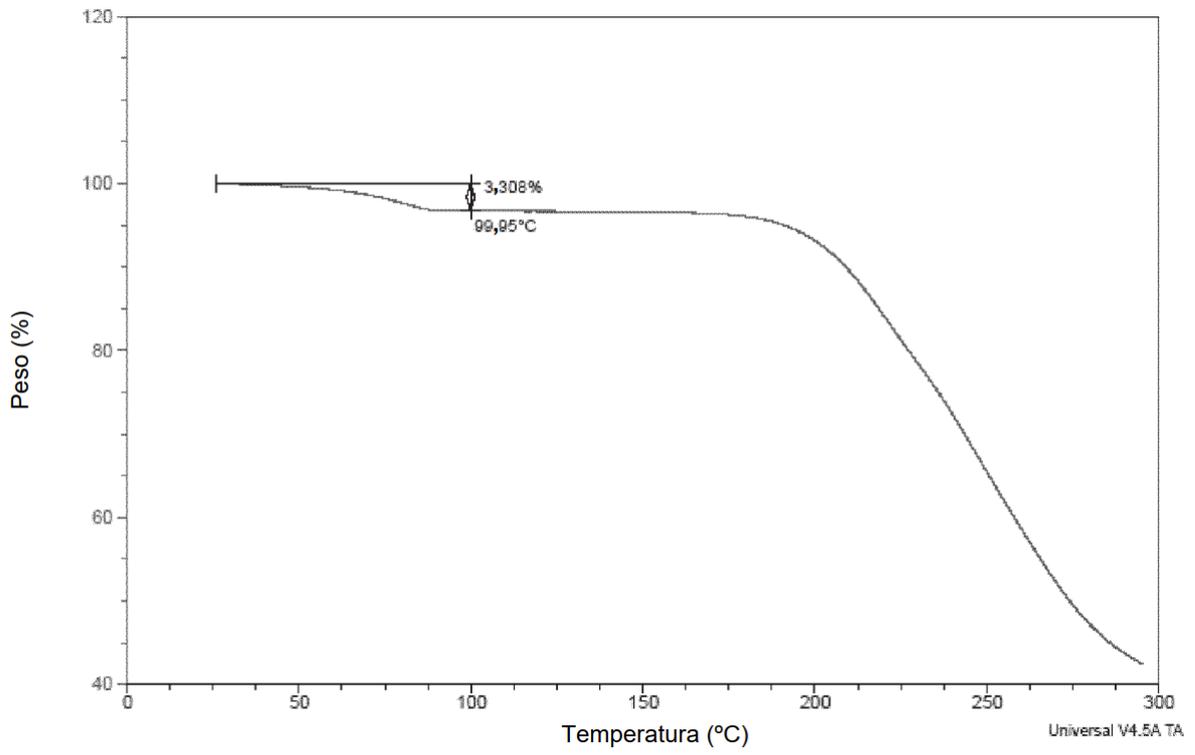


Fig. 18

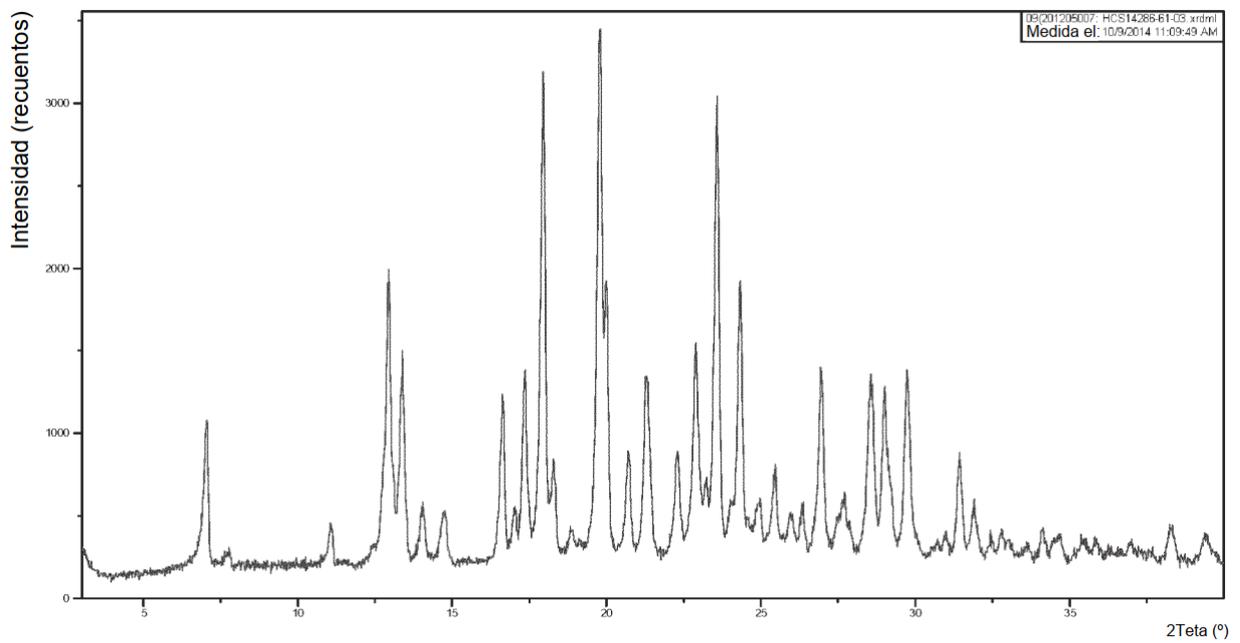


Fig. 19

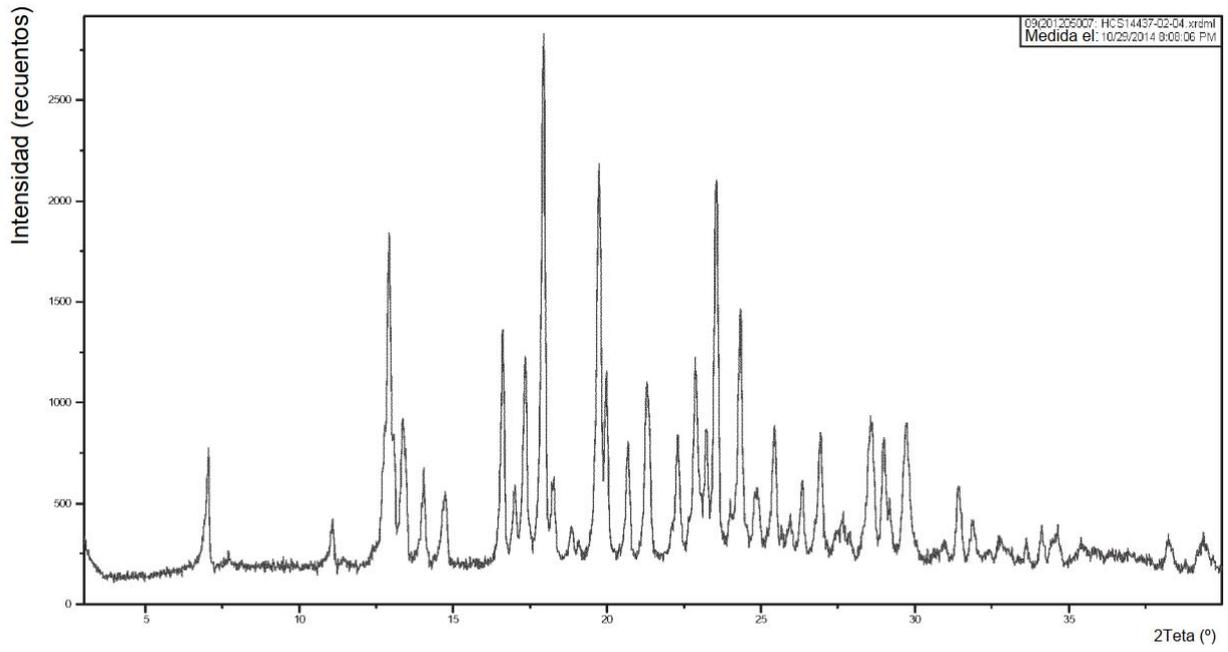


Fig. 20

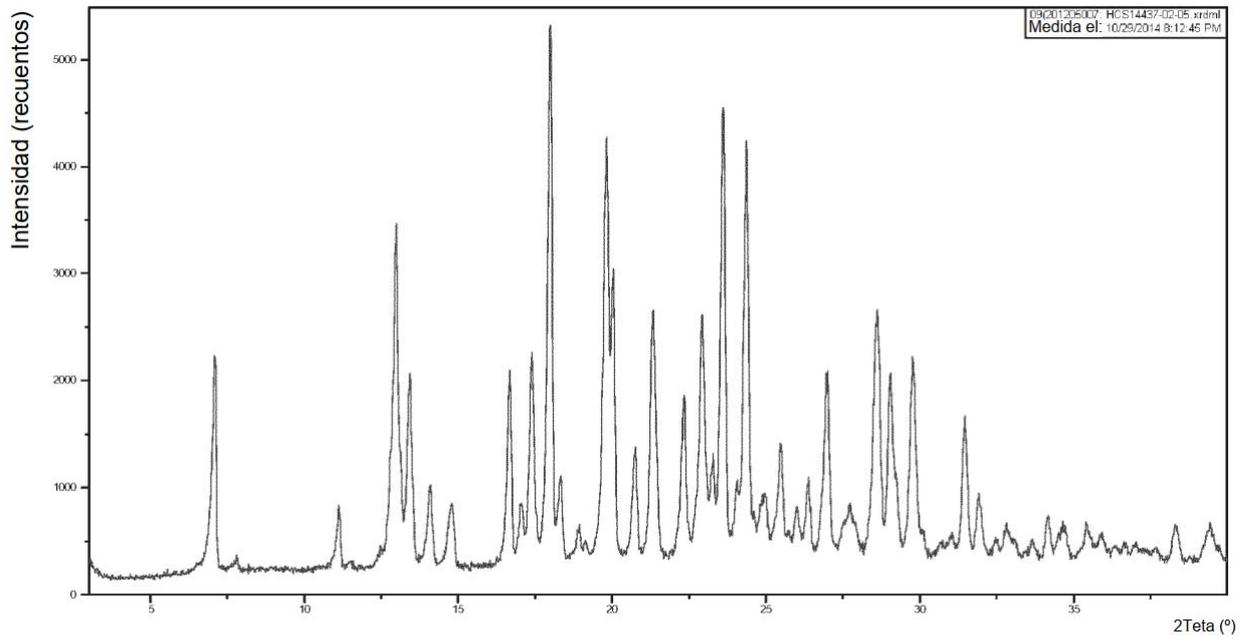


Fig. 21

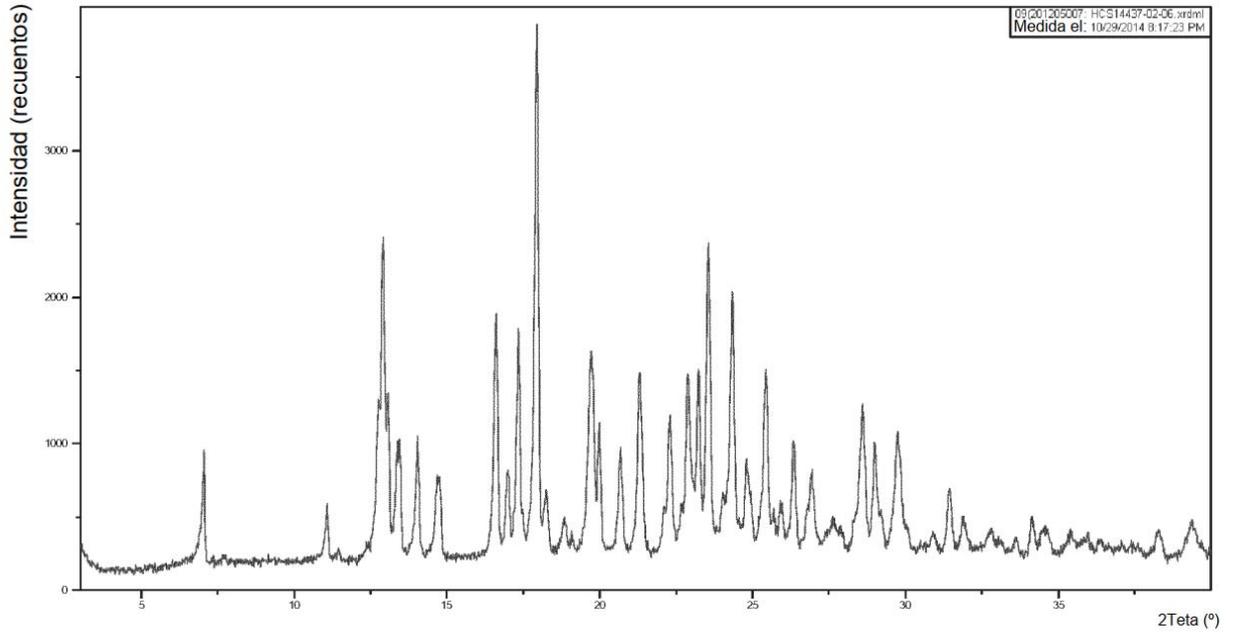


Fig. 22

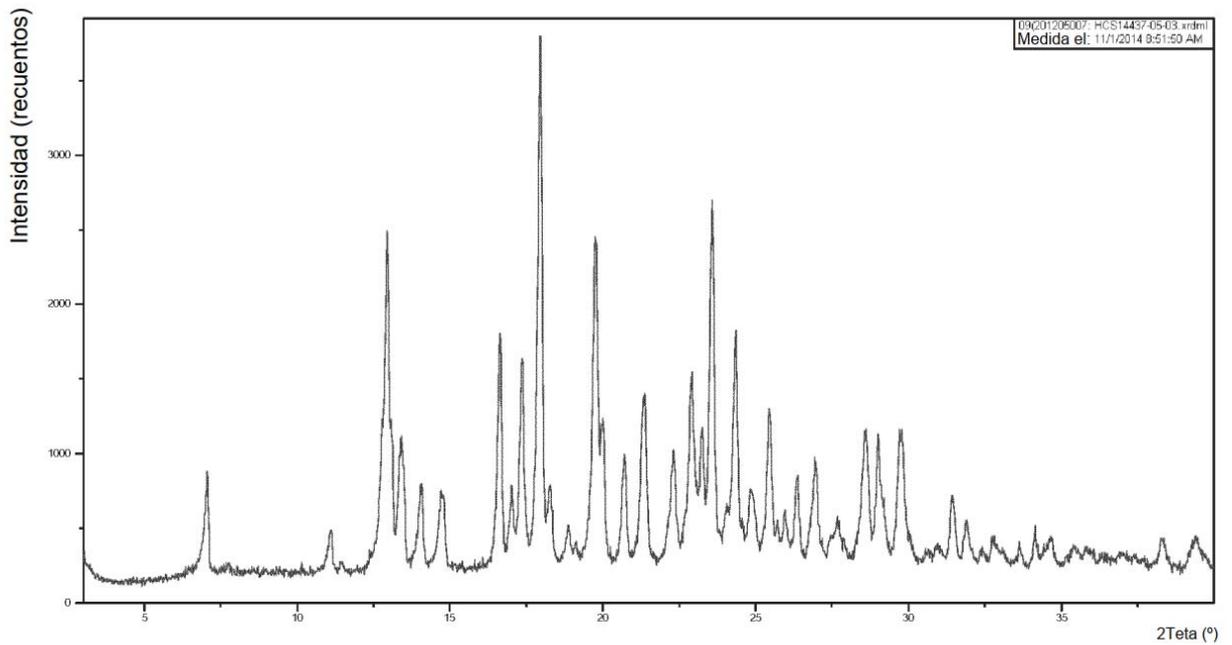


Fig. 23

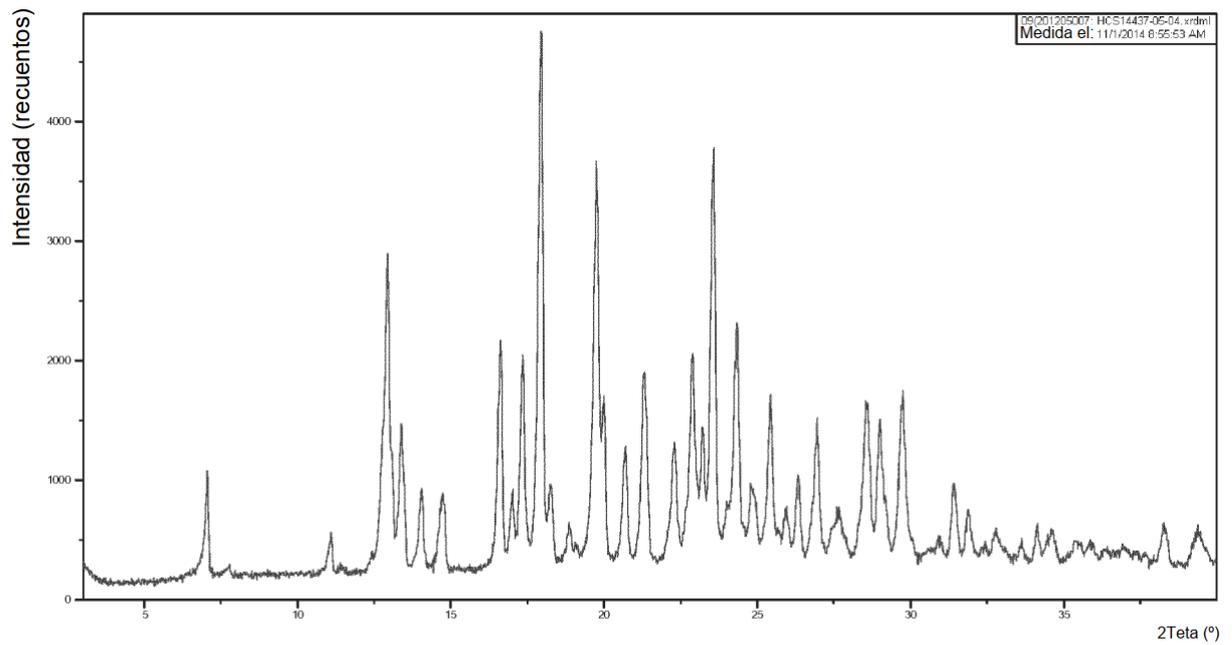


Fig. 24

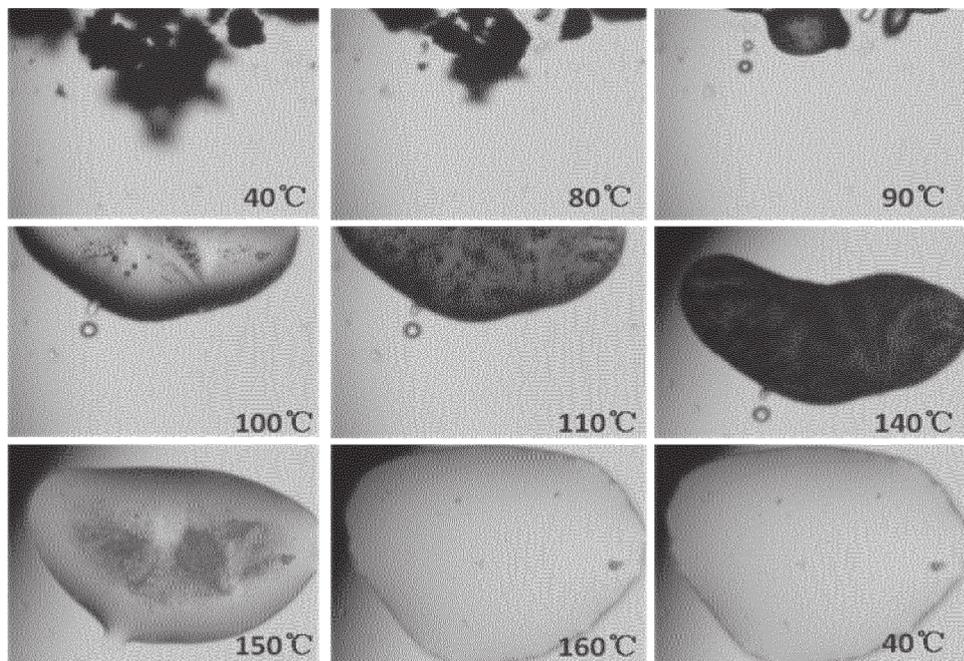


Fig. 25

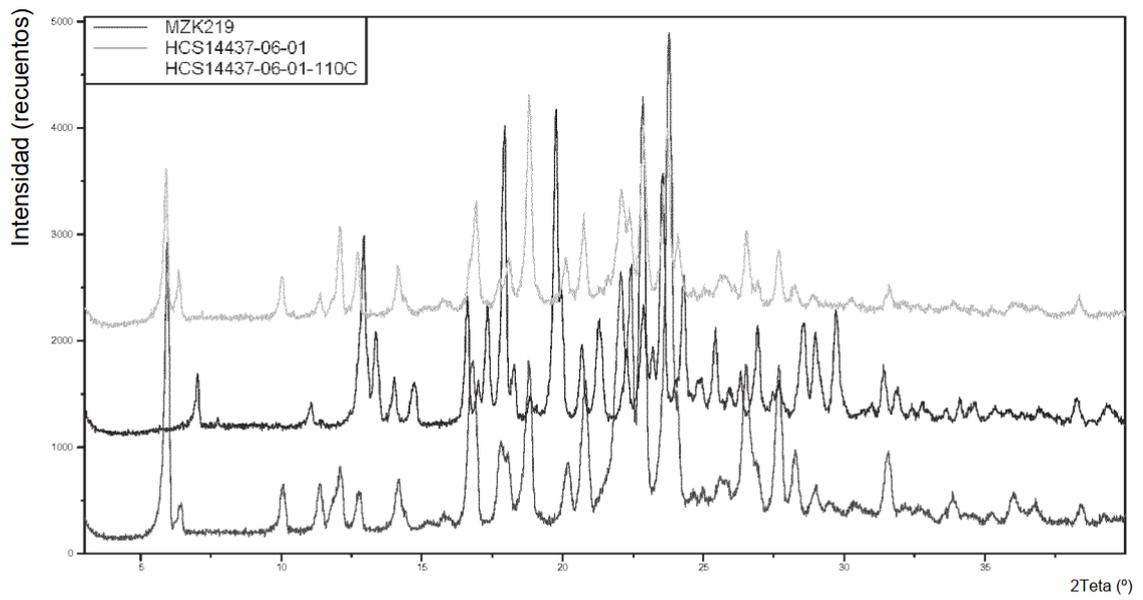


Fig. 26

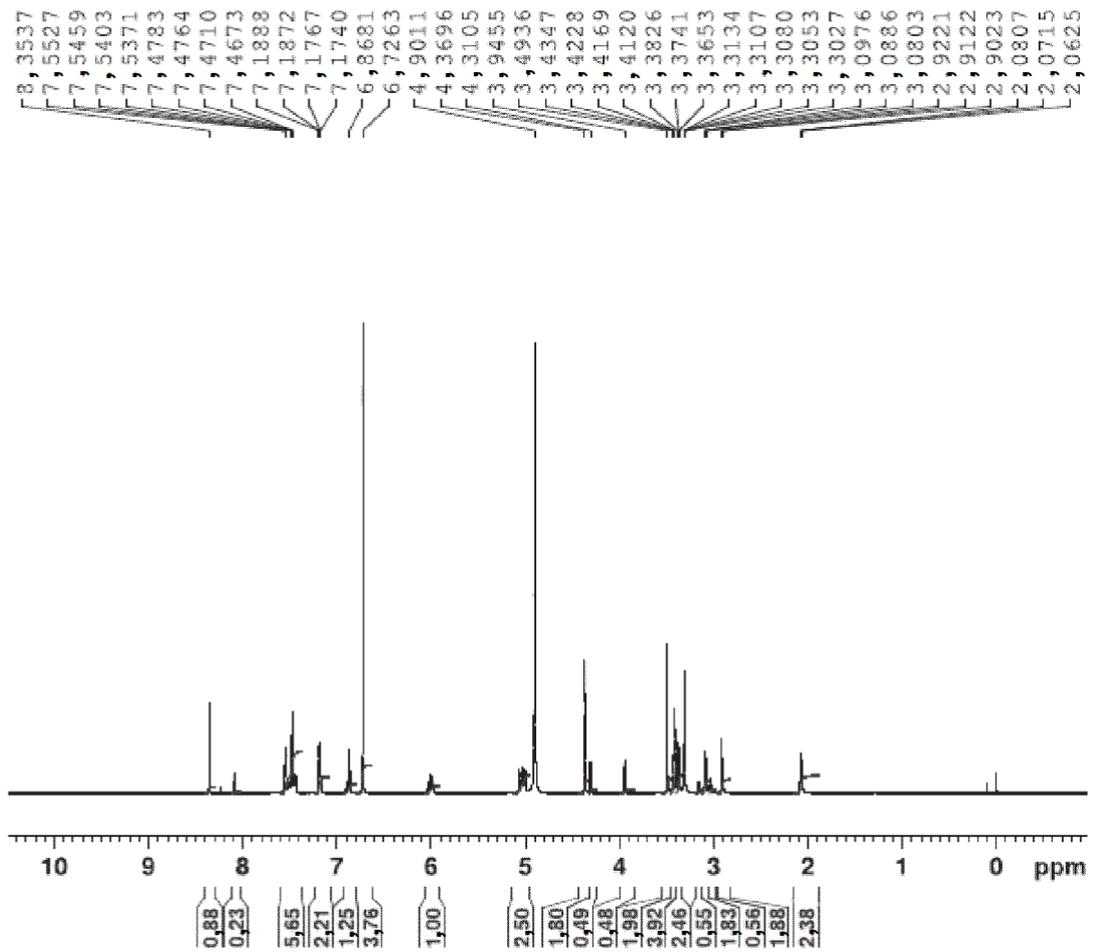
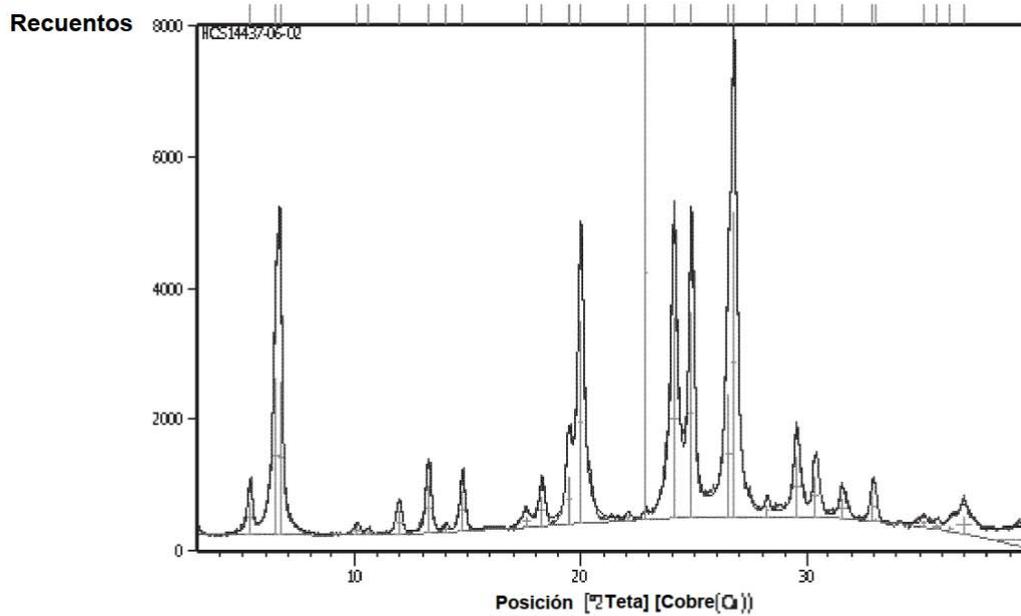


Fig. 27



Lista de picos

Pos. [°2 T.]	Altura [cts]	FWHM Izquierda [°2 T.]	espaciado d[Å]	Int. Rel. [%]
5,296 (2)	512 (9)	0,246 (6)	16,67362	5,84
6,468 (4)	2391 (50)	0,292 (7)	13,65531	27,28
6,643 (2)	2344 (66)	0,183 (5)	13,29433	26,73
10,102 (7)	113 (5)	0,35 (2)	8,74924	1,29
10,61 (1)	55 (5)	0,26 (2)	8,33121	0,62
11,957 (2)	341 (7)	0,297 (8)	7,39568	3,89
13,259 (1)	730 (10)	0,265 (4)	6,67238	8,33
14,040 (9)	65 (6)	0,19 (2)	6,30290	0,74
14,754 (1)	636 (10)	0,262 (5)	5,99943	7,26
17,565 (7)	162 (6)	0,43 (2)	5,04515	1,85
18,261 (2)	479 (9)	0,281 (7)	4,85427	5,47
19,454 (2)	748 (13)	0,255 (6)	4,55931	8,53
19,9619 (8)	3115 (20)	0,311 (3)	4,44435	35,53
22,09 (1)	76 (6)	0,25 (1)	4,02141	0,87
22,83858 (3)	8767 (6995)	0,002 (6)	3,89065	100,00
24,0920 (8)	3055 (20)	0,332 (3)	3,69099	34,85
24,8644 (7)	3157 (23)	0,255 (3)	3,57806	36,01
26,492 (5)	1889 (41)	0,31 (1)	3,36185	21,55
26,737 (2)	4707 (42)	0,255 (5)	3,33156	53,69
28,226 (5)	177 (9)	0,157 (7)	3,15905	2,02
29,509 (2)	925 (12)	0,345 (7)	3,02463	10,55
30,421 (2)	646 (10)	0,372 (7)	2,93600	7,37
31,621 (3)	332 (8)	0,34 (1)	2,82724	3,79
32,96 (2)	443 (29)	0,27 (2)	2,71524	5,05
33,10 (2)	64 (73)	0,08 (7)	2,70442	0,73
35,176 (9)	119 (12)	0,25 (2)	2,54920	1,36
35,77 (2)	73 (10)	0,39 (3)	2,50851	0,83
36,39 (1)	86 (20)	0,23 (4)	2,46724	0,98
36,97 (1)	272 (14)	0,80 (4)	2,42949	3,10
39,57 (3)	200 (12)	2,6 (2)	2,27578	2,28

Fig. 28

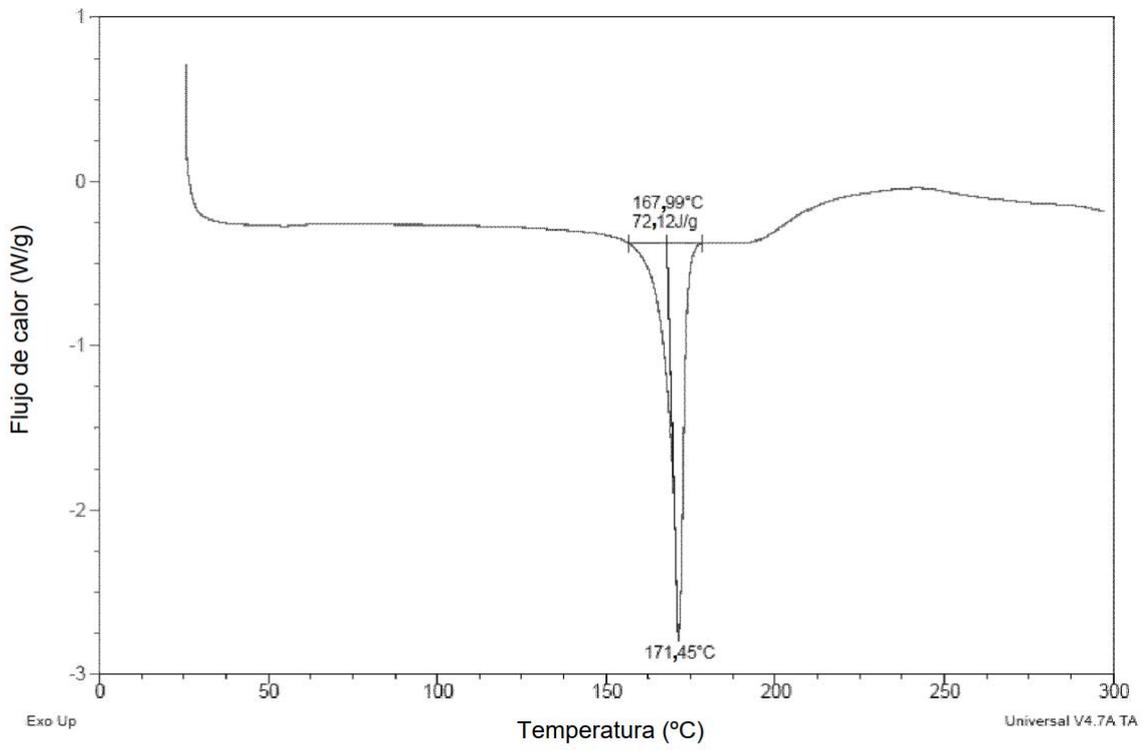


Fig. 29

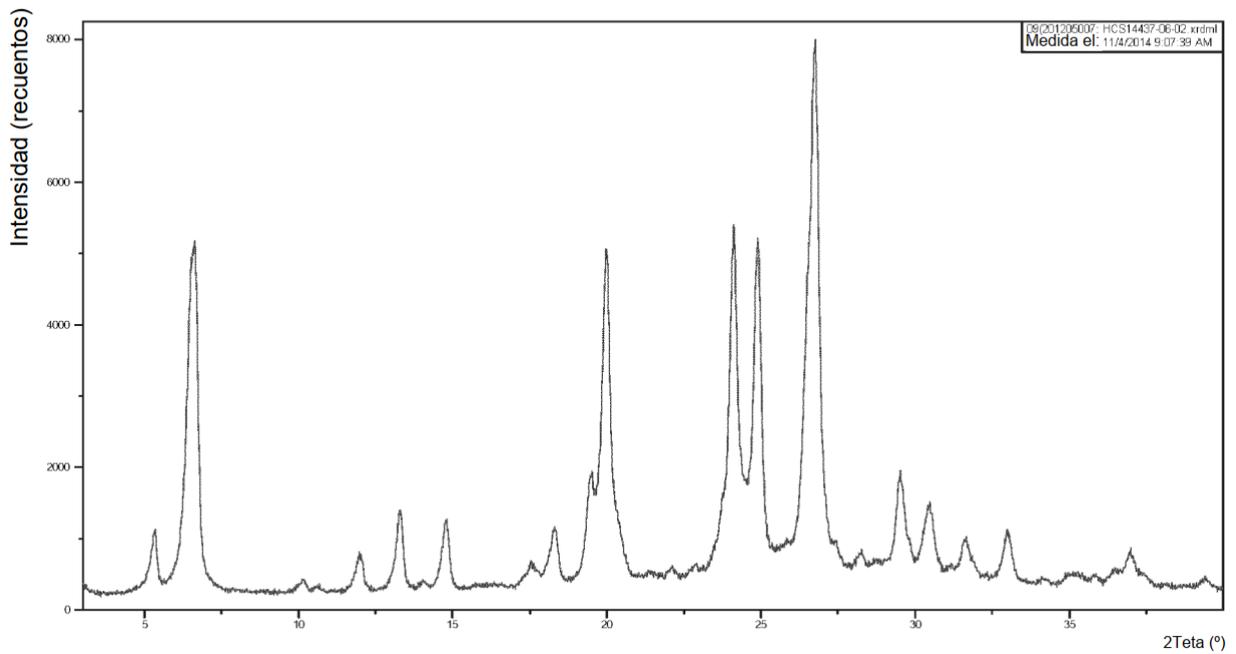


Fig. 30

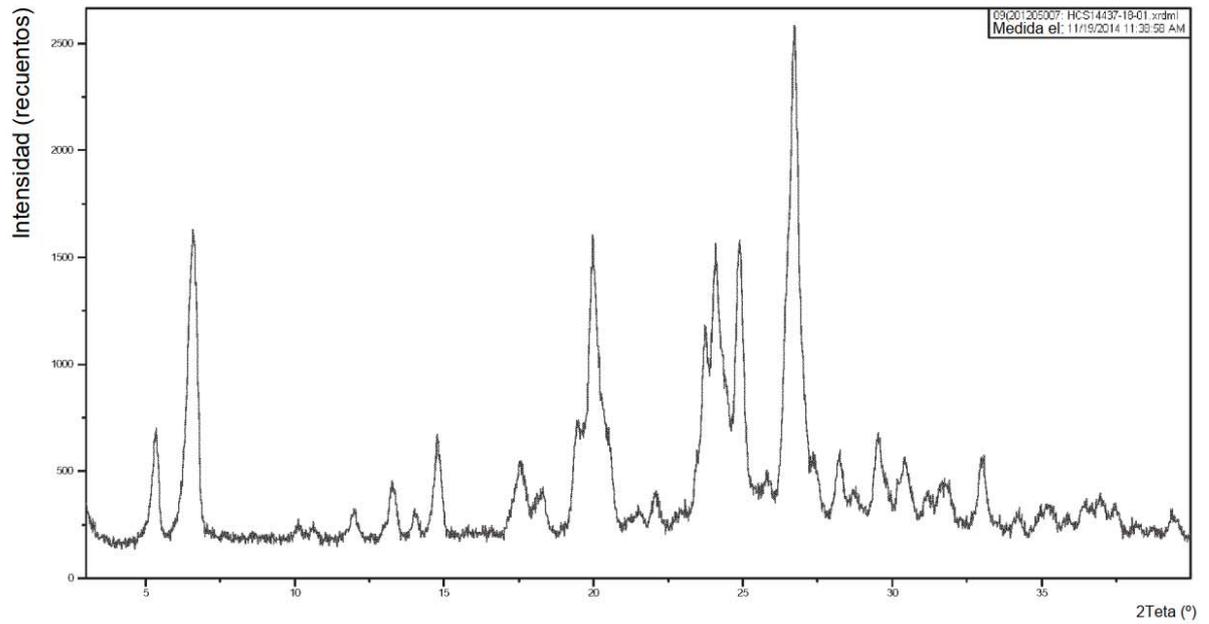


Fig. 31

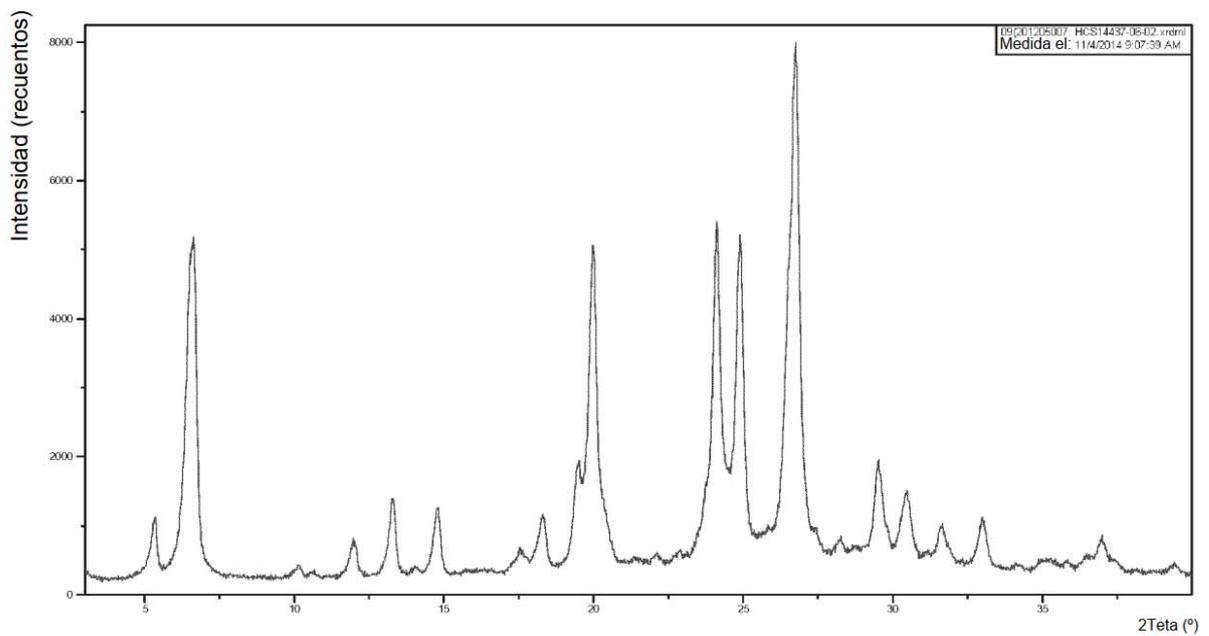


Fig. 32

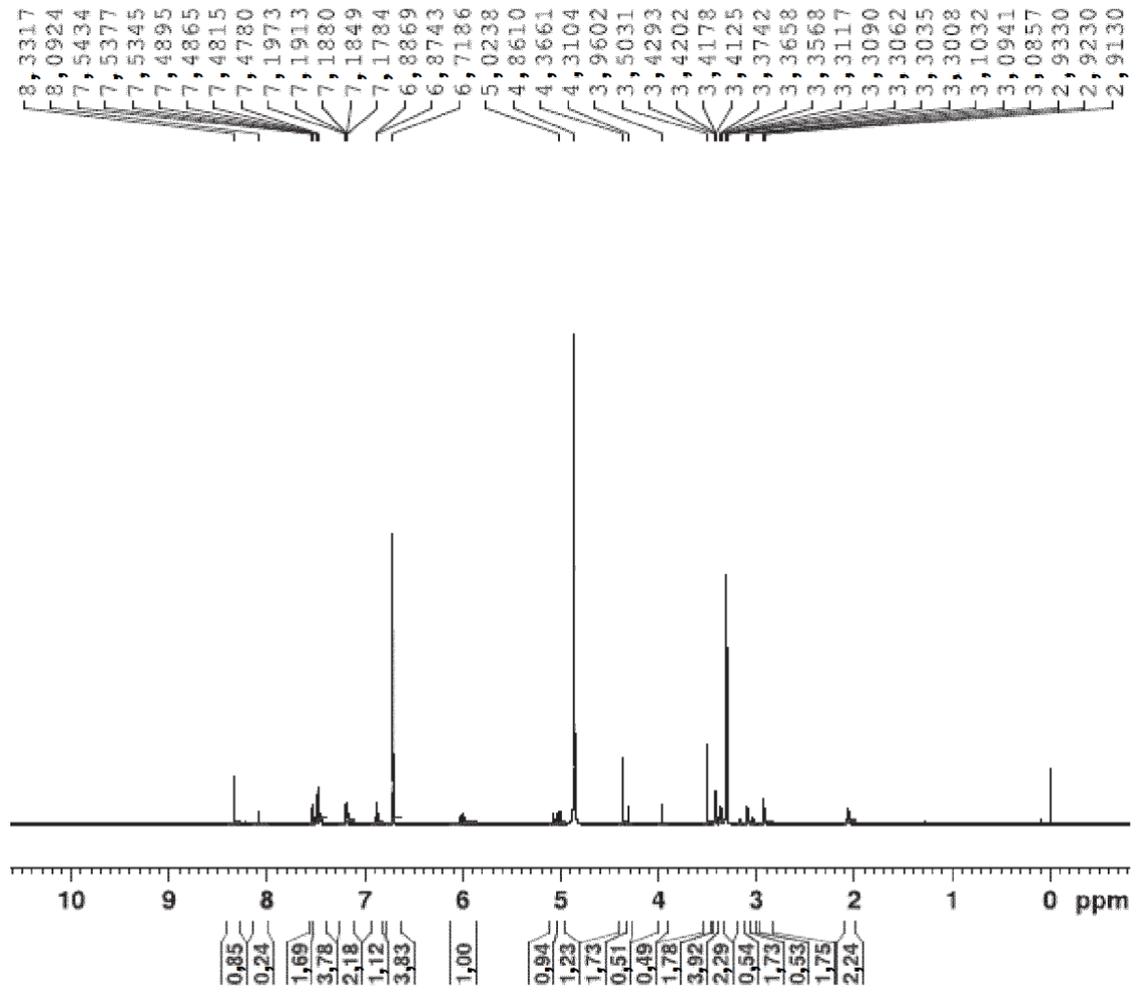
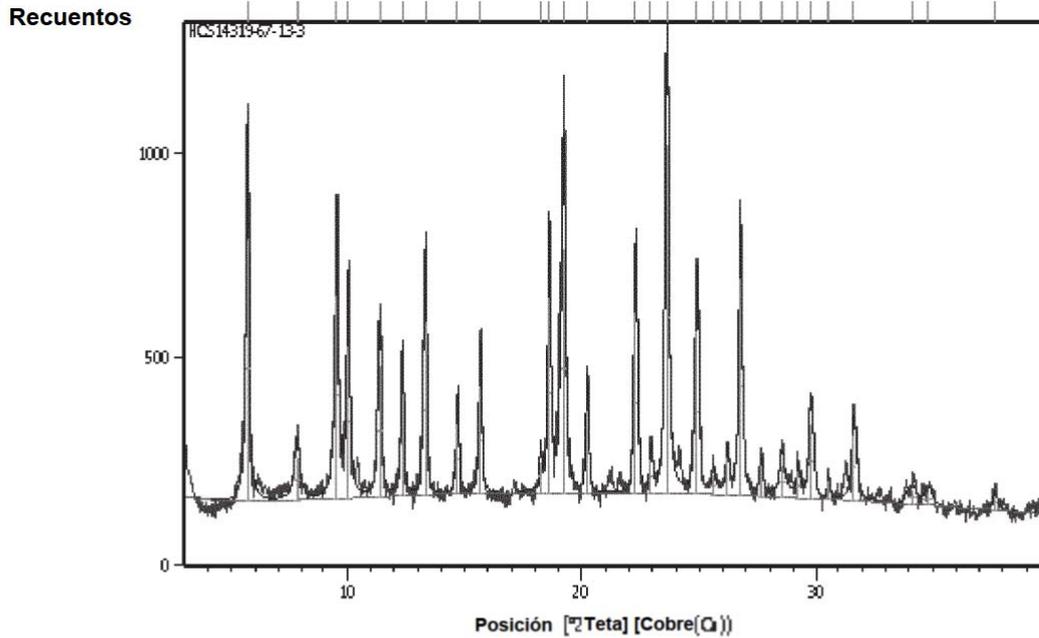


Fig. 33



Lista de picos

Pos. [°2T.]	Altura [cts]	FWHM Izquierda [°2 T.]	espaciado d [Å]	Int. Rel. [%]
5,664 (1)	638 (12)	0,165 (4)	15,59163	75,05
7,770 (6)	101 (5)	0,28 (2)	11,36936	11,85
9,543 (1)	495 (11)	0,164 (6)	9,26055	58,23
10,041 (2)	368 (10)	0,155 (6)	8,80196	43,31
11,373 (2)	315 (9)	0,167 (7)	7,77428	37,09
12,345 (2)	246 (8)	0,153 (7)	7,16429	28,94
13,310 (1)	415 (9)	0,180 (4)	6,64694	48,85
14,697 (3)	168 (7)	0,162 (9)	6,02237	19,78
15,658 (2)	260 (9)	0,154 (7)	5,65493	30,54
18,233 (5)	76 (12)	0,09 (2)	4,86160	9,00
18,593 (1)	478 (13)	0,150 (6)	4,76831	56,22
19,186 (1)	596 (10)	0,233 (5)	4,62242	70,13
20,207 (2)	200 (8)	0,162 (8)	4,39095	23,58
22,280 (1)	433 (10)	0,178 (5)	3,98695	50,91
22,933 (5)	78 (9)	0,12 (2)	3,87483	9,13
23,606 (1)	850 (20)	0,149 (6)	3,76594	100,00
24,873 (2)	396 (9)	0,207 (6)	3,57690	46,59
25,59 (1)	48 (9)	0,17 (6)	3,47823	5,64
26,176 (6)	87 (11)	0,14 (3)	3,40173	10,24
26,735 (1)	529 (14)	0,159 (7)	3,33176	62,21
27,624 (6)	73 (10)	0,14 (3)	3,22661	8,65
28,518 (8)	75 (6)	0,28 (4)	3,12743	8,78
29,193 (8)	64 (12)	0,14 (5)	3,05659	7,54
29,741 (3)	181 (8)	0,21 (1)	3,00150	21,34
30,570 (9)	49 (7)	0,10 (1)	2,92196	5,72
31,652 (4)	159 (11)	0,20 (2)	2,82450	18,67
34,11 (2)	33 (3)	0,49 (5)	2,62666	3,92
34,81 (2)	31 (3)	0,40 (5)	2,57544	3,66
37,66 (1)	35 (8)	0,19 (8)	2,38640	4,09

Fig. 34

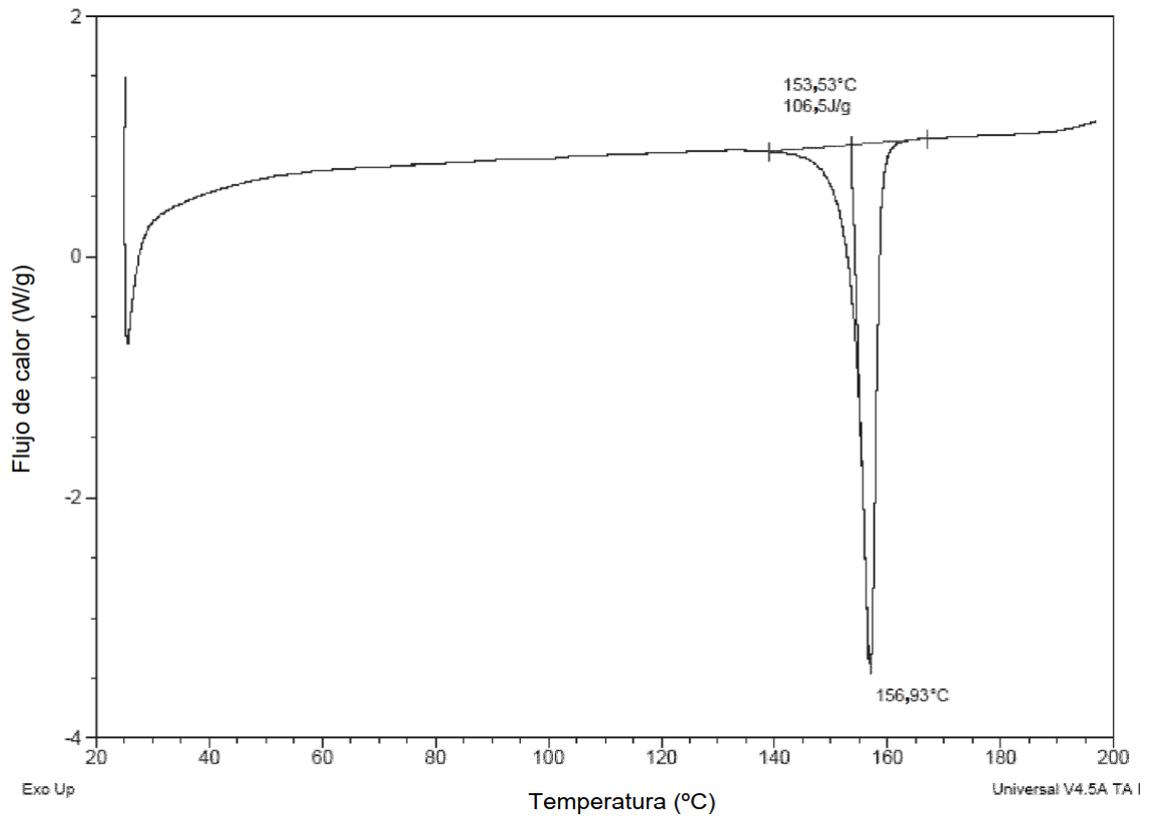


Fig. 35

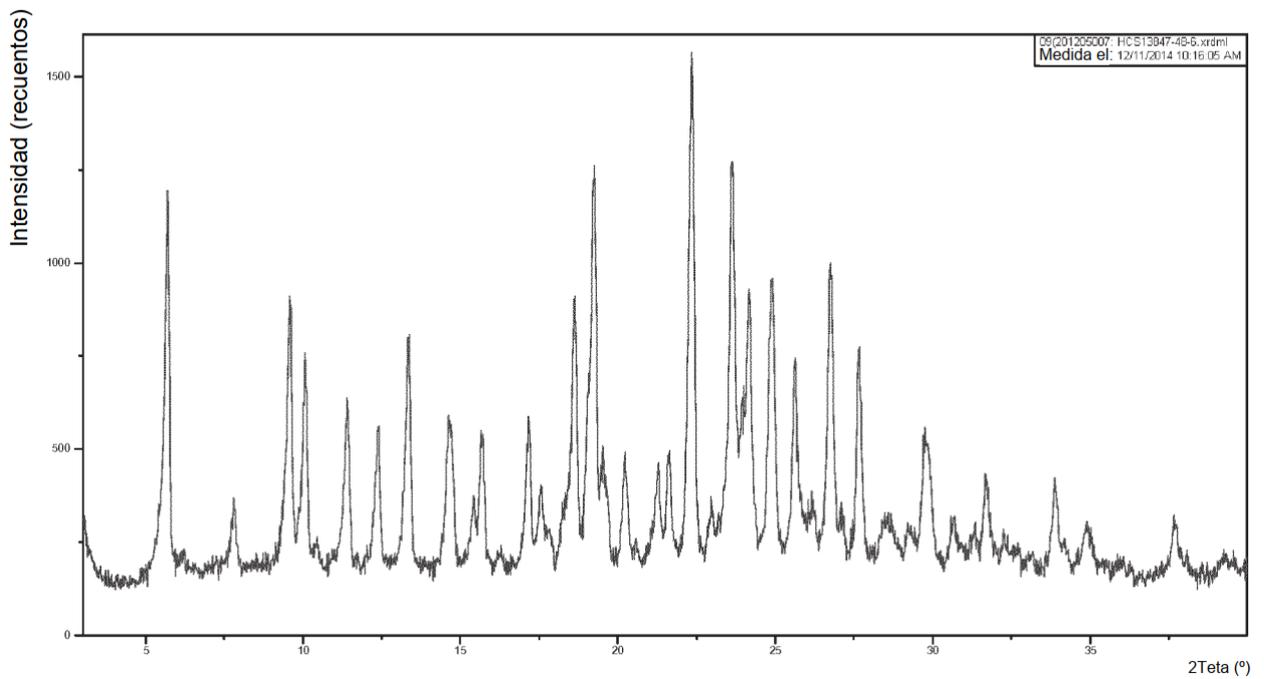


Fig. 36

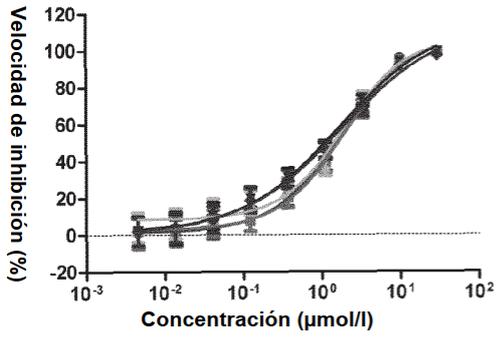


Fig. 37

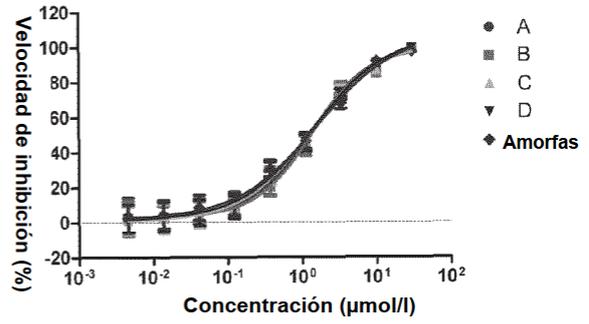


Fig. 38

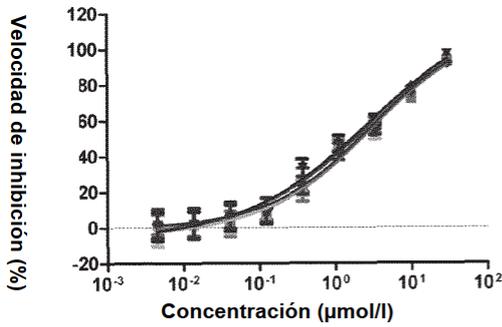


Fig. 39

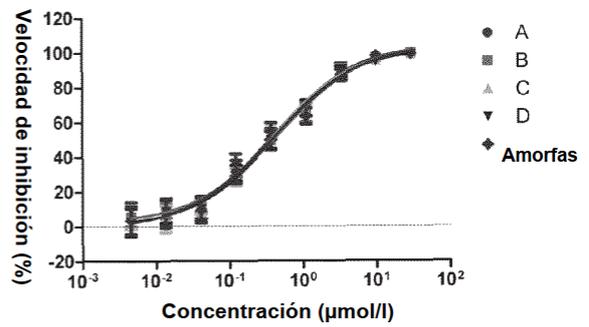


Fig. 40

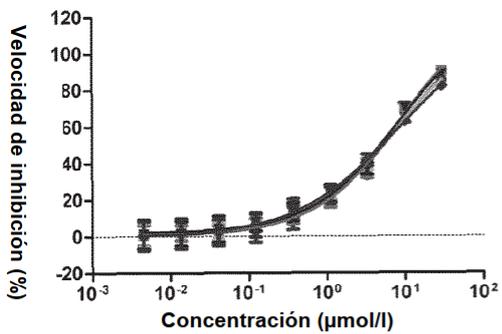


Fig. 41

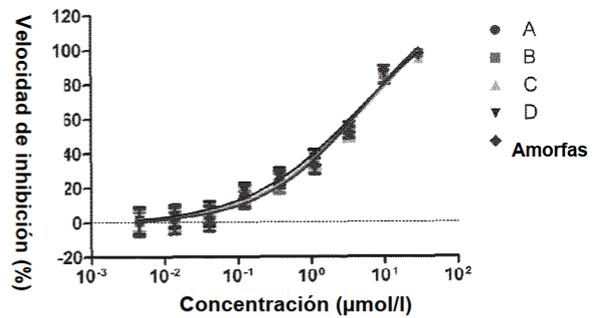


Fig. 42

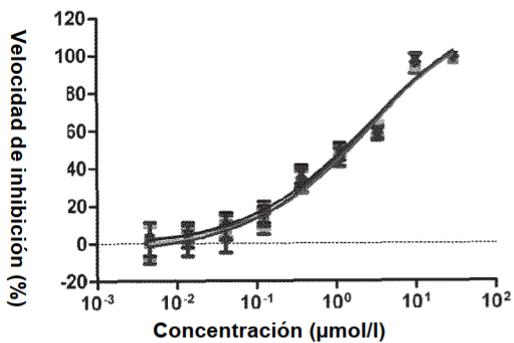


Fig. 43

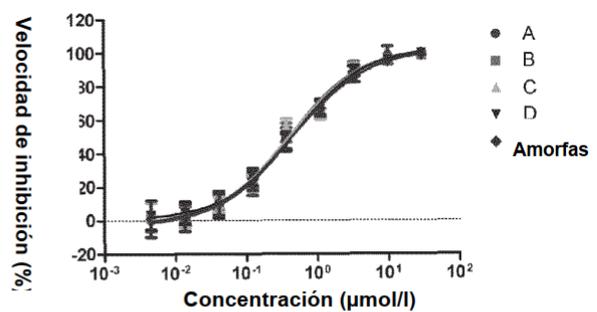


Fig. 44

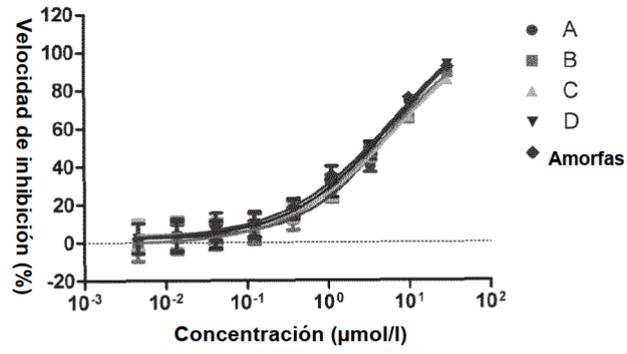


Fig. 45