

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 811 098**

51) Int. Cl.:

C07D 405/14 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 31/4545 (2006.01)
A61K 31/351 (2006.01)
A61K 31/166 (2006.01)
C07D 201/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2016 PCT/US2016/040728**
 87) Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2017 WO17004537**
 96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2016 E 16818898 (5)**
 97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3317270**

54) Título: **Citrato de (4-((3r,4r)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-((2r, 6s)-6-(p-tolil)tetrahydro-2hpirano-2-il) metilamino)pirimidin-4il) metanona**

30) Prioridad:

02.07.2015 EP 15175066

45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2021

73) Titular/es:

**CENTREXION THERAPEUTICS CORPORATION
(100.0%)
509 South Exeter Street, Suite 202
Baltimore, MD 21202, US**

72) Inventor/es:

**OSTERMEIER, MARKUS;
WERTHMANN, ULRIKE;
EBEL, HEINER;
FRATTINI, SARA;
GIOVANNINI, RICCARDO y
SCHEURER, STEFAN**

74) Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 811 098 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

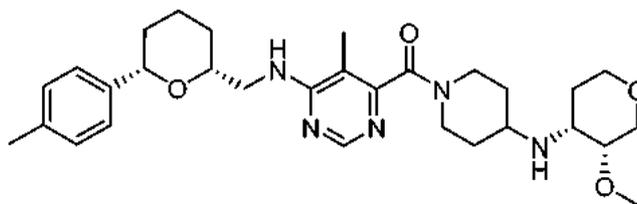
Citrato de 4-((3*r*,4*r*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*r*, 6*s*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2*h*-pirano-2-il) metilamino)pirimidin-4-il) metanona

Campo de la invención

La presente invención proporciona la sal de citrato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona y un proceso para fabricarla. La presente invención también proporciona la misma sal de citrato para usar en el tratamiento de afecciones médicas, tales como dolor musculoesquelético agudo y crónico de leve a moderado, dolor lumbar, dolor lumbar crónico, dolor relacionado con artritis reumatoide, dolor de hombro, dolor dental, signos y síntomas de la osteoartritis, osteoartritis de la rodilla, osteoartritis de la cadera, osteoartritis de la mano, dolor asociado con la osteoartritis, dolor por cáncer, polineuropatía diabética, dolor visceral, dolor agudo, nefropatía diabética, dolor neuropático, así como también a una composición farmacéutica que comprende la misma sal.

Antecedentes

El documento WO 2011/073154 describe una serie de tetrahidropiranyl-metil-amino-(hetero)aryl-amidas sin revelar ninguna forma específica de sal o cristal de los compuestos ejemplificados en el mismo. Entre otros, el documento WO 2011/073154 describe el compuesto I



Los compuestos descritos en el documento WO 2011/073154 son potentes antagonistas del CCR2. Sin embargo, para demostrar que puede desarrollarse para usar como medicamento en un ser humano, una sustancia farmacológica y su forma sólida deben, además de las propiedades farmacocinéticas y farmacológicas *in vitro* e *in vivo* y el perfil de seguridad, cumplir una serie de criterios con respecto a los requisitos de química, fabricación y controles (CMC) tales como características de la forma sólida, la pureza, los tiempos de secado, la capacidad de filtración, la estabilidad, la estabilidad térmica, la higroscopicidad, la reproducibilidad y otras propiedades fisicoquímicas, que incluye la solubilidad y la velocidad de disolución intrínseca.

Uno de los mayores desafíos en el curso del desarrollo de un producto farmacológico para uso médico en humanos es identificar una sustancia farmacológica que sea potente, eficaz, cumpla con los requisitos de seguridad y, al mismo tiempo, tenga una forma sólida adecuada para el desarrollo farmacológico humano, es decir, que cumpla todos los criterios mencionados anteriormente de forma acumulativa. Esto se debe a que todas y cada una de sus formas sólidas, sus sales y sus formas polimórficas tienen propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas que son tan imprevisibles como inesperadas.

Además, debido a la naturaleza impredecible e inesperada de las formas sólidas, salinas y polimórficas, no hay orientación genérica ni específica para la persona experta sobre cómo diseñar una forma sólida con las características deseadas. Por lo tanto, una investigación y experimentación extensa y creativa es esencial para llegar a la forma sólida específica de una sustancia farmacológica seleccionada que cumpla con todos los requisitos. La optimización de un parámetro crucial resulta frecuentemente en el deterioro de otro u otros parámetro(s).

Resumen

La presente invención se presenta en las reivindicaciones adjuntas. El problema técnico objetivo que subyace en la presente invención es proporcionar una sustancia farmacológica con actividad antagonista del CCR2 que pueda desarrollarse para usar como medicamento en humanos, es decir, donde:

a) la sustancia farmacológica se caracteriza por una alta potencia farmacológica, eficacia, farmacocinética *in vitro* e *in vivo* y propiedades de seguridad necesarias; y

b) La sustancia farmacológica y su forma sólida cumplen una serie de criterios con respecto a los requisitos de química, fabricación y controles (CMC), tales como las características de la forma sólida, la pureza, los tiempos de secado, la capacidad de filtración, la estabilidad, la estabilidad térmica, la higroscopicidad, la reproducibilidad y propiedades fisicoquímicas adicionales que incluyen la solubilidad y la velocidad de disolución intrínseca.

Sorprendentemente, se ha descubierto que el compuesto I cumple con la mayoría de los criterios requeridos mencionados anteriormente para usar como medicamento en humanos como se ha demostrado (ver los datos

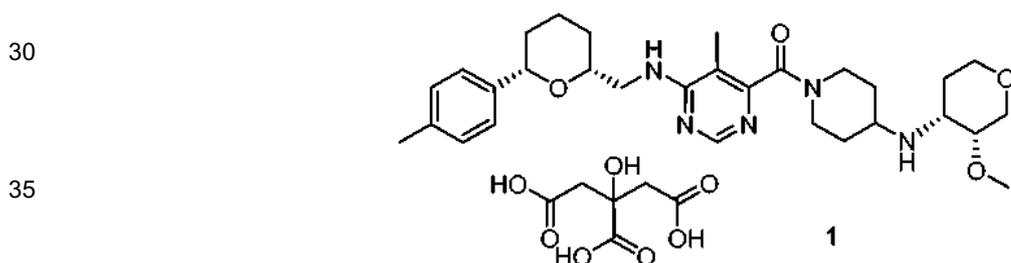
biológicos más abajo). Estos parámetros incluyen la unión a proteínas del plasma (relevante para farmacocinética y farmacodinámica), la estabilidad metabólica *in vitro* (relevante para farmacocinética), la farmacocinética y las propiedades de seguridad (hERG, relevante para seguridad cardiovascular y fosfolipidosis inducida por fármacos).

5 Sin embargo, la base libre del compuesto I resultó ser un material amorfo que estaba en un estado metaestable y, por lo tanto, sujeto a metamorfosis. No era adecuado como sustancia farmacológica para el desarrollo porque no cumplía el requisito de poder fabricarse de forma reproducible.

10 Los intentos de obtener el compuesto I en forma cristalina a partir de soluciones en todos los solventes usados comúnmente tales como etanol, etanol/agua, 2-propanol, 2-propanol/agua, acetona, acetato de etilo, 2-butanona o tetrahidrofurano fracasaron. Tales intentos de obtener el compuesto I en forma cristalina a partir de soluciones en todos los solventes comúnmente usados, tales como etanol, etanol/agua, 2-propanol, 2-propanol/agua, acetona, acetato de etilo, 2-butanona o tetrahidrofurano produjeron solo material amorfo. Debido a estas fallas, se investigaron las formas de sal del compuesto I con varios ácidos.

15 Para garantizar la reproducibilidad de las propiedades fisicoquímicas en el proceso de fabricación farmacéutica, la sustancia farmacológica debe obtenerse invariablemente en una modificación cristalina bien definida. Cuando existe una forma cristalina de una sustancia farmacológica o su sal en diferentes modificaciones polimórficas (polimorfismo), puede ocurrir la conversión espontánea de una forma polimórfica en otra. Tal interconversión espontánea no puede tolerarse y debe evitarse por todos los medios. Por lo tanto, es esencial para asegurar la reproducibilidad del proceso de fabricación farmacéutica para identificar una sal de una sustancia farmacológica que exista en una sola forma cristalina, o que al menos se caracterice por una tendencia reducida al polimorfismo.

20 De acuerdo con la presente invención, el problema técnico descrito anteriormente se ha resuelto mediante experimentación e innovación que dio como resultado la identificación del compuesto específico sal de citrato 1 de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona



40 La sal de citrato 1 es cristalina, es decir, definida por una modificación cristalina específica, lo que permite obtener la sustancia farmacológica con alta pureza y una estabilidad con alta reproducibilidad.

45 Se prepararon y analizaron diversas formas de sal del compuesto I. Por ejemplo, las formas cristalinas de la sal de citrato, bromhidrato, clorhidrato, esilato y metanosulfonato del compuesto I se obtuvieron por cristalización. El análisis de estas formas de sal reveló inesperadamente que las sales de citrato, esilato y metanosulfonato del compuesto I mostraron solo una forma polimórfica. Esto contrasta con las sales de bromhidrato y clorhidrato del compuesto I, que se obtuvieron en diferentes modificaciones polimórficas.

50 Otro parámetro clave de una sustancia farmacológica es la higroscopicidad. La absorción de agua de una sal de una sustancia farmacológica por sorción durante la fabricación conduce a una cantidad reducida de la sustancia farmacológica en el producto farmacológico y, por lo tanto, a una eficacia reducida. Además, la absorción de agua de una sal de una sustancia farmacéutica o un producto farmacéutico puede conducir a la descomposición de la sustancia farmacéutica. Por lo tanto, es esencial identificar una sustancia farmacológica o una sal de la misma que no sea higroscópica o que tenga muy poco carácter higroscópico.

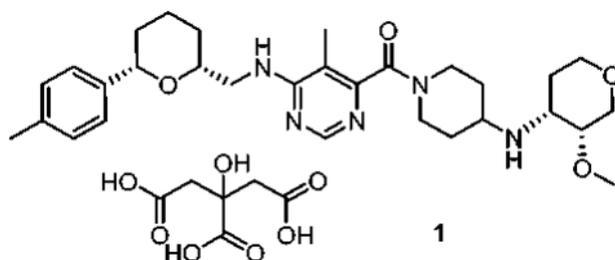
55 Inesperadamente, la forma cristalina de la sal de citrato 1 del compuesto I se caracteriza por una baja y reversible absorción de agua a una humedad relativa de hasta 90 % (2,6 % de absorción de agua a 80 % de humedad relativa y 3,4 % de absorción de agua a 90 % de humedad relativa). Por el contrario, las formas cristalinas del correspondiente bromhidrato, clorhidrato, esilato y metanosulfonato del compuesto I absorben fácilmente cantidades significativas de agua a una humedad relativa tan baja como 80 % y se vuelven irreversiblemente deliquescentes.

60 En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona el compuesto que tiene la siguiente fórmula 1:

65

5

10



1

En ciertas modalidades, el compuesto se proporciona en forma cristalina.

15

Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) un compuesto descrito en la presente descripción, tal como la sal de citrato 1 y (ii) uno o más portadores y/o diluyentes. En ciertas modalidades, la composición farmacéutica está formulada para administración oral.

20

Otro aspecto de la invención proporciona la sal de citrato 1 o una composición farmacéutica que comprende dicha sal de citrato 1 para usar en el tratamiento de una afección médica. Las condiciones médicas ilustrativas incluyen, por ejemplo, tratamiento del dolor (por ejemplo, dolor inflamatorio o dolor neuropático) y osteoartritis.

25

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para tratar una afección médica en un paciente, donde el método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción, tal como la sal de citrato 1, para tratar el afección médica. Las condiciones médicas ilustrativas incluyen, por ejemplo, dolor (por ejemplo, dolor inflamatorio o dolor neuropático) y osteoartritis.

Breve descripción de los dibujos

30

La Figura 1 muestra el difractograma de rayos X en polvo de la base amorfa del compuesto (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

35

La Figura 2 muestra el difractograma de rayos X en polvo del citrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

40

La Figura 3 muestra el termoanálisis y la determinación del punto de fusión (DSC/TG) del citrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

45

La Figura 4 muestra las isotermas de sorción del citrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

50

La Figura 5 muestra el difractograma de rayos X en polvo del bromhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

55

La Figura 6 muestra el termoanálisis y la determinación del punto de fusión (DSC/TG) del bromhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

60

La Figura 7 muestra las isotermas de sorción del bromhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

65

La Figura 8 muestra el difractograma de rayos X en polvo del clorhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

La Figura 12 muestra el termograma y la determinación del punto de fusión (DSC/TG) del esilato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

5 La Figura 13 muestra las isotermas de sorción del esilato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

La Figura 14 muestra el difractograma de rayos X en polvo del metanosulfonato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

La Figura 15 muestra el termograma y la determinación del punto de fusión (DSC/TG) del metanosulfonato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

La Figura 16 muestra las isotermas de sorción del metanosulfonato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

La Figura 17 muestra el espectro FT-RAMAN del citrato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

La Figura 18 muestra el espectro FT-RAMAN del esilato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

25 Descripción detallada

La invención proporciona formas de sal de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona, composiciones farmacéuticas que contienen tales formas de sal, métodos para preparar formas de sal y métodos terapéuticos para usar tales formas de sal, como en el tratamiento de dolor y otras afecciones médicas. Como se describe en la presente descripción, la sal de citrato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona proporciona múltiples beneficios inesperados sobre otras formas de sal de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona. Por ejemplo, la sal de citrato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona muestra una baja y reversible absorción de agua a una humedad relativa de hasta el 90 %, lo que contrasta con las formas de sal del bromhidrato, clorhidrato, esilato y metanosulfonato correspondientes que absorben fácilmente cantidades significativas de agua a una humedad relativa tan baja como 80 % y se vuelven irreversiblemente deliquescentes. Aún más, la sal de citrato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona muestra solo una forma cristalina polimórfica, que contrasta con las sales cristalinas correspondientes formadas a partir de ácido bromhídrico y ácido clorhídrico que mostró diferentes modificaciones polimórficas. En consecuencia, la sal de citrato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahidro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona es sorprendentemente superior para el desarrollo como producto farmacéutico debido a las múltiples propiedades inesperadas que son beneficiosas.

Varios aspectos y modalidades de la invención se describen adicionalmente más abajo en secciones.

Para facilitar la comprensión de la presente invención, se definen más abajo varios términos y frases.

Los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a organismos a tratar por los métodos de la presente invención. Dichos organismos incluyen mamíferos (por ejemplo, murinos, simios, equinos, bovinos, porcinos, caninos, felinos y similares), y con mayor preferencia son los humanos.

El término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad de un compuesto suficiente para efectuar resultados beneficiosos o deseados. Puede administrarse una cantidad efectiva en una o más administraciones, aplicaciones o dosis y no se pretende que se limite a una formulación o ruta de administración particular.

El término "tratar" incluye cualquier efecto, por ejemplo, disminuir, reducir, modular, mejorar o eliminar, que da como resultado la mejora de la afección, enfermedad, trastorno y similares, o mejorar un síntoma del mismo.

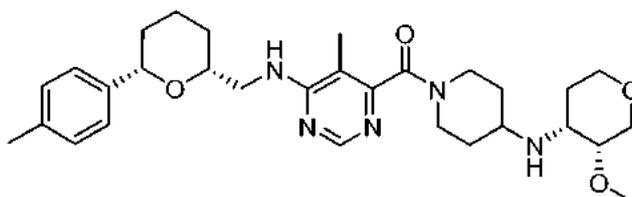
A lo largo de la descripción, donde se describe las composiciones que tienen, que incluyen o que comprenden componentes específicos, o donde se describen procesos y métodos que tienen, que incluyen o que comprenden etapas específicas, se contempla que, adicionalmente, hay composiciones de la presente invención que consisten esencialmente de, o consisten de, los componentes citados, y que existen procesos y métodos de acuerdo con la presente invención que consisten esencialmente de, o consisten de, las etapas de procesamiento mencionadas.

I. Formas de sal de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona

5 Un aspecto de la invención proporciona formas de sal de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona. Como se describe a continuación y en los ejemplos de trabajo, esta descripción describe formas de sal de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona preparada haciendo reaccionar 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona con un ácido seleccionado de ácido cítrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido etanosulfónico y ácido metanosulfónico.

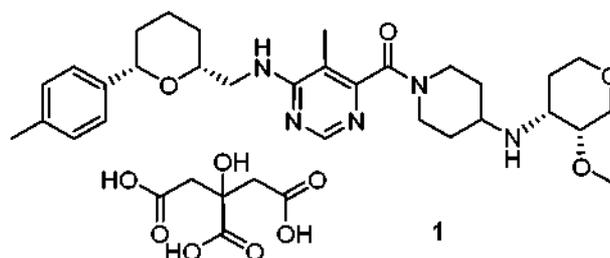
La sal de citrato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona se descubrió sorprendentemente que proporciona múltiples beneficios inesperados sobre otras formas de sal de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona. Por ejemplo, la sal de citrato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona muestra una baja y reversible absorción de agua a una humedad relativa de hasta el 90 %, lo que contrasta con las formas de sal del bromhidrato, clorhidrato, esilato y metanosulfonato correspondientes que absorben fácilmente cantidades significativas de agua a una humedad relativa tan baja como 80 % y se vuelven irreversiblemente deliquescentes. Aún más, la sal de citrato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona muestra solo una forma cristalina polimórfica, que contrasta con las sales cristalinas correspondientes formadas a partir de ácido bromhídrico y ácido clorhídrico que exhibieron diferentes modificaciones polimórficas. En consecuencia, la sal de citrato de 4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona es sorprendentemente superior para el desarrollo como producto farmacéutico debido a las múltiples propiedades inesperadas que son beneficiosas.

En consecuencia, un aspecto de la invención proporciona la sal de citrato del compuesto I:



I

40 que tiene la fórmula



1

En ciertas modalidades, dicha sal de citrato está en forma cristalina.

55 En ciertas modalidades, la forma cristalina se caracteriza por mostrar un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos en los siguientes valores 2-zeta medidos mediante el uso de la radiación monocromática CuK α 1 de $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, 40 kV, 40 mA: 19,1° y 22,4°. En ciertas modalidades, la forma cristalina se caracteriza porque el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a 12,2°. En ciertas modalidades, la forma cristalina se caracteriza porque el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a 13,7°. En ciertas modalidades, la forma cristalina se caracteriza porque el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a 14,6°. En ciertas modalidades, la forma cristalina se caracteriza porque el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a 18,7°. En ciertas modalidades, la forma cristalina se caracteriza porque el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a 24,6°. En ciertas modalidades, la forma cristalina se caracteriza porque el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a 26,3°.

65

ES 2 811 098 T3

5 En ciertas modalidades, la forma cristalina muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos en los siguientes valores de 2-zeta medidos mediante el uso de la radiación monocromática CuK α 1 de $\lambda = 1,54056$ Å, 40 kV, 40 mA: $12,2 \pm 0,2$, $13,7 \pm 0,2$, $14,6 \pm 0,2$, $19,1 \pm 0,2$ y $22,4 \pm 0,2$. En ciertas otras modalidades, la forma cristalina muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos en los siguientes valores 2-zeta medidos mediante el uso de la radiación monocromática CuK α 1 de $\lambda = 1,54056$ Å, 40 kV, 40 mA: $12,2 \pm 0,2$, $13,7 \pm 0,2$, $14,6 \pm 0,2$, $18,7 \pm 0,2$, $19,1 \pm 0,2$, $22,4 \pm 0,2$, $24,6 \pm 0,2$ y $26,3 \pm 0,2$.

10 En ciertas modalidades, la intensidad relativa del pico en dichos ángulos de difracción 2-zeta es al menos 10 %. En ciertas otras modalidades, la intensidad relativa del pico en dichos ángulos de difracción 2-zeta es al menos 15 %.

10 En ciertas modalidades, la forma cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que es sustancialmente como se muestra en la Figura 2.

15 En ciertas modalidades, la forma cristalina se caracteriza por el siguiente patrón de difracción de rayos X en polvo expresado en términos de ángulo de difracción 2θ , distancias d inter-planares e intensidad relativa (expresada como un por ciento con respecto al pico más intenso):

2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I ₀ [%]
4,36	20,24	17
12,17	7,27	41
12,51	7,07	6
13,13	6,74	7
13,66	6,48	39
14,20	6,23	14
14,60	6,06	32
15,03	5,89	5
15,25	5,81	4
15,97	5,54	11
16,51	5,37	13
17,05	5,20	13
17,54	5,05	4
17,88	4,96	5
18,65	4,75	22
19,05	4,66	100
19,68	4,51	11
20,42	4,35	6
20,84	4,26	4
21,25	4,18	3
21,90	4,06	5
22,42	3,96	92
23,19	3,83	9
23,70	3,75	16
24,34	3,65	4
24,56	3,62	23
24,89	3,57	16

2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I ₀ [%]
25,20	3,53	7
25,36	3,51	7
25,67	3,47	6
26,26	3,39	23
26,59	3,35	12
27,51	3,24	6
27,71	3,22	6
28,01	3,18	7
28,23	3,16	5
28,57	3,12	3
29,44	3,03	12
30,15	2,96	4

La forma cristalina puede caracterizarse adicionalmente de acuerdo con su espectro Raman. En consecuencia, en ciertas modalidades, la forma cristalina tiene un espectro Raman que comprende picos en uno cualquiera o todos de los siguientes desplazamientos Raman expresados en números de onda en cm^{-1} : 1718, 1242, 731, 662, 553.

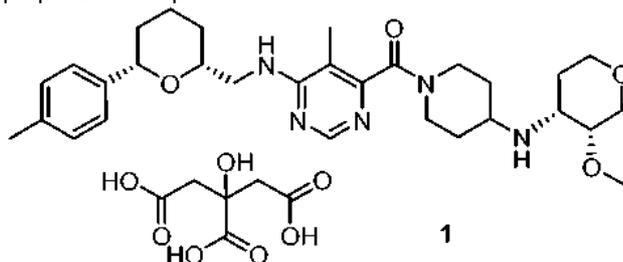
La forma cristalina puede caracterizarse adicionalmente de acuerdo con su punto de fusión. En consecuencia, en ciertas modalidades, la forma cristalina tiene un punto de fusión de 212 ± 5 °C.

La forma cristalina puede caracterizarse adicionalmente de acuerdo con su curva de calorimetría diferencial de barrido. En consecuencia, en ciertas modalidades, la forma cristalina tiene una curva de calorimetría diferencial de barrido sustancialmente igual a la mostrada en la Figura 3.

Convenientemente, la relación molar de ácido cítrico a 4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona es aproximadamente 1:1 en una sal de citrato de 4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona. En ciertas modalidades, la relación molar de ácido cítrico a 4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona está en el intervalo de 1,2:1 a 1:1,2 en una sal de citrato de 4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona. En ciertas otras modalidades, la relación molar de ácido cítrico a 4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona es 1:1 en una sal de citrato de 4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

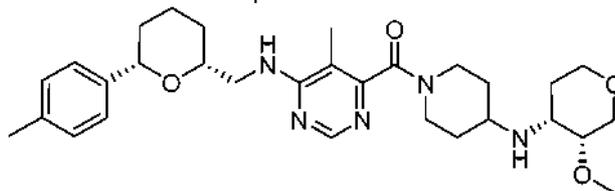
El compuesto (4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona (I) se describe específicamente en el documento WO 2011/073154, así como también un proceso para su preparación. Para obtener detalles sobre un proceso para fabricar este compuesto, se hace referencia al documento WO 2011/073154 (ejemplo 30, página 150).

También se proporcionan métodos para preparar la sal de citrato 1. Por ejemplo, un aspecto de la invención proporciona un método para preparar el compuesto 1



que comprende las siguientes etapas:

a) adición de ácido cítrico a una solución del compuesto I



en un solvente orgánico

b) aislamiento de la sal que resulta 1 en forma pura.

En ciertas modalidades, el método se caracteriza además porque el solvente orgánico en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en acetato de etilo, isopropanol y una mezcla de isopropanol y agua.

II Aplicaciones terapéuticas

Los compuestos como los descritos en la Sección I (por ejemplo, Sal de citrato 1) y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción son útiles como medicamento. El medicamento puede ser para tratar un trastorno en el que la inhibición de la actividad del CCR2 proporciona un beneficio terapéutico.

Se ha informado que el receptor de quimiocina CCR2 está implicado como un mediador importante de los trastornos y enfermedades inflamatorias e inmunorreguladoras, así como también de patologías autoinmunes como la artritis reumatoide y la aterosclerosis. Ver, por ejemplo, el documento WO 2010/070032. Por lo tanto, los agentes que modulan el receptor de quimiocinas CCR2 son útiles en el tratamiento de tales trastornos y enfermedades.

De manera más general, es ampliamente aceptado que numerosas afecciones y enfermedades implican procesos inflamatorios. Dichas inflamaciones son desencadenadas críticamente y/o promovidas por la actividad de los macrófagos, que se forman por diferenciación de los monocitos. Se ha encontrado además que los monocitos se caracterizan por, por ejemplo, una alta expresión de CCR2 residente en membrana, mientras que la expresión de CCR2 en macrófagos es menor. El CCR2 es un regulador crítico del tráfico de monocitos, que puede describirse como el movimiento de los monocitos hacia una inflamación a lo largo de un gradiente de proteínas quimioatrayentes de monocitos (MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4).

Por lo tanto, para reducir la inflamación inducida por los macrófagos, sería conveniente bloquear el CCR2 de monocitos por un antagonista, de manera que los monocitos puedan desencadenarse menos para moverse hacia un área de inflamación para convertirse en macrófagos.

Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona un método para tratar una afección relacionada con el CCR2 en un paciente, donde el método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción (por ejemplo, la sal de citrato 1 o una forma cristalina del mismo) para tratar la afección. En ciertas modalidades, la afección relacionada con el CCR2 es una afección relacionada con MCP-1.

En ciertas modalidades, la afección relacionada con el CCR2 es dolor. Los tipos de dolor ilustrativos contemplados para el tratamiento incluyen, por ejemplo, dolor inflamatorio, dolor neuropático y dolor visceral. En ciertas modalidades, el dolor es dolor crónico. En ciertas modalidades, el dolor es dolor debido a la osteoartritis. Otros tipos de dolor ilustrativos contemplados para el tratamiento incluyen, por ejemplo, dolor lumbar, dolor de cadera, dolor en las piernas, neuralgia no herpética, neuralgia post herpética, neuropatía diabética, dolor inducido por lesión nerviosa, dolor neuropático relacionado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), traumatismo craneal, lesiones nerviosas provocadas por toxinas y quimioterapia, dolor de miembro fantasma, mononeuropatía traumática dolorosa, polineuropatía dolorosa, síndrome de dolor talámico, dolor posterior al accidente cerebrovascular, lesión del sistema nervioso central, dolor posterior a la cirugía, síndrome del túnel carpiano, neuralgia del trigémino, síndrome post mastectomía, síndrome postoracotomía, dolor de muñón, dolor de movimiento repetitivo, dolor neuropático asociado a hiperalgesia y alodinia, alcoholismo y otros dolores inducidos por fármacos.

En ciertas otras modalidades, la afección relacionada con el CCR2 es una enfermedad relacionada con el sistema inmune. Ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inmune incluyen, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide juvenil de inicio sistémico, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías seronegativas, osteoartritis, enfermedad inflamatoria intestinal y colitis ulcerosa.

En ciertas otras modalidades, la afección relacionada con el CCR2 es una afección fibrótica. Las afecciones fibróticas ilustrativas incluyen, por ejemplo, la fibrosis hepática (que incluye pero no se limita a cirrosis inducida por alcohol, cirrosis inducida por virus, hepatitis autoinmune inducida); fibrosis pulmonar (que incluye pero no se limita a esclerodermia, fibrosis pulmonar idiopática); fibrosis renal (que incluye pero no se limita a esclerodermia, nefritis diabética, nefritis glomerular, nefritis lúpica); fibrosis dérmica (que incluye, pero no se limita a, esclerodermia, cicatrices

hipertróficas y queloides, quemaduras); mielofibrosis; neurofibromatosis; fibroma; fibrosis intestinal; y adherencias fibróticas que resultan de procedimientos quirúrgicos.

En ciertas otras modalidades, la afección relacionada con el CCR2 es un trastorno inflamatorio.

Otro aspecto de la invención proporciona un método para tratar una afección seleccionada de dolor, osteoartritis, nefropatía diabética y polineuropatía diabética, donde el método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto descrito en la presente descripción (por ejemplo, la sal de citrato 1 o una forma cristalina de la misma) para tratar la afección.

En ciertas modalidades, la afección es dolor. En ciertas modalidades, la afección es dolor inflamatorio. En ciertas modalidades, la afección es dolor crónico. En ciertas modalidades, la afección es dolor debido a la osteoartritis. En ciertas modalidades, la afección es dolor neuropático o dolor visceral.

En ciertas modalidades, la afección se selecciona del grupo que consiste en dolor musculoesquelético agudo y crónico de leve a moderado, dolor lumbar, dolor lumbar crónico, dolor relacionado con artritis reumatoide, dolor de hombro, dolor dental, signos y síntomas de osteoartritis, osteoartritis de la rodilla, osteoartritis de la cadera, osteoartritis de la mano, dolor asociado con osteoartritis, dolor por cáncer, polineuropatía diabética, dolor visceral, dolor agudo, nefropatía diabética y dolor neuropático. En ciertas modalidades, la afección es dolor seleccionado de (a) neuralgia del trigémino y (b) dolor debido a la lesión nerviosa causada por la quimioterapia.

En ciertas modalidades, la afección es osteoartritis.

En ciertas modalidades, el método comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de sal de citrato 1 para tratar la afección.

En una modalidad más específica, la invención proporciona el uso de un compuesto descrito en la presente descripción para el tratamiento de una enfermedad en la que la inhibición del receptor CCR2 es beneficiosa, tal como: (i) dolor musculoesquelético agudo y crónico de leve a moderado (dolor lumbar, dolor lumbar crónico, dolor relacionado con artritis reumatoide, dolor de hombro, dolor dental); (ii) signos y síntomas de osteoartritis (osteoartritis de rodilla y/o cadera, osteoartritis de la mano, dolor asociado con osteoartritis); (iii) dolor por cáncer; (iv) polineuropatía diabética; (v) dolor visceral, (vi) dolor agudo, (vii) nefropatía diabética; y (viii) dolor neuropático.

III. Composiciones Farmacéuticas

Otro aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en la presente descripción (por ejemplo, sal de citrato 1) junto con uno o más portadores y/o diluyentes inertes. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para la administración a través de una ruta particular, tal como la administración oral.

Más generalmente, las formas adecuadas para la administración son, por ejemplo, tabletas, cápsulas, soluciones, jarabes, emulsiones o polvos o aerosoles inhalables. El contenido del(de los) compuesto(s) farmacéuticamente efectivo(s) en cada caso debe estar en el intervalo de 0,1 a 90 % en peso, preferentemente 0,5 a 50 % en peso de la composición total, es decir, en cantidades que son suficientes para lograr el intervalo de dosificación especificado a continuación.

Las preparaciones pueden administrarse por vía oral en forma de una tableta, como un polvo, como un polvo en una cápsula (por ejemplo, una cápsula de gelatina dura), como una solución o suspensión. Cuando se administra por inhalación, la combinación de la sustancia activa puede administrarse como un polvo, como una solución acuosa o acuosa-etanólica o mediante el uso de una formulación de gas propulsor.

Pueden obtenerse tabletas adecuadas, por ejemplo, al mezclar la(s) sustancia(s) activa(s) con excipientes conocidos, por ejemplo diluyentes inertes tales como carbonato de calcio, fosfato de calcio o lactosa, desintegrantes tales como almidón de maíz o ácido alginico, aglutinantes tales como almidón o gelatina, lubricantes tales como estearato de magnesio o talco y/o agentes para retrasar la liberación, tales como carboximetilcelulosa, ftalato de acetato de celulosa o acetato de polivinilo. Las tabletas también pueden comprender varias capas. Las tabletas recubiertas pueden prepararse en consecuencia recubriendo los núcleos producidos de forma análoga a los comprimidos con sustancias normalmente usadas para recubrimientos de tabletas, por ejemplo colidona o goma laca, goma arábiga, talco, dióxido de titanio o azúcar. Para lograr una liberación retardada o evitar incompatibilidades, el núcleo también puede consistir en varias capas. De manera similar, el recubrimiento de la tableta puede consistir en varias capas para lograr la liberación retardada, posiblemente mediante el uso de los excipientes mencionados anteriormente para las tabletas.

Los jarabes que contienen las sustancias activas o combinaciones de los mismos de acuerdo con la invención pueden contener adicionalmente un edulcorante tal como sacarina, ciclamato, glicerol o azúcar y un potenciador del sabor, por ejemplo, un saborizante tal como vainillina o extracto de naranja. También pueden contener adyuvantes de

suspensión o espesantes como la carboximetilcelulosa de sodio, agentes humectantes como, por ejemplo, productos de condensación de alcoholes grasos con óxido de etileno, o conservantes como *p*-hidroxibenzoatos.

5 Las cápsulas que contienen una o más sustancias activas o combinaciones de sustancias activas pueden prepararse, por ejemplo, al mezclar las sustancias activas con portadores inertes tales como lactosa o sorbitol y empaquetándolos en cápsulas de gelatina.

10 Pueden hacerse supositorios adecuados, por ejemplo, al mezclar con los portadores provistos para este propósito, tales como grasas neutras o polietilenglicol o sus derivados.

15 Los excipientes que pueden usarse incluyen, por ejemplo, agua, solventes orgánicos farmacéuticamente aceptables tales como parafinas (por ejemplo, fracciones de petróleo), aceites vegetales (por ejemplo, aceite de cacahuete o sésamo), alcoholes mono o polifuncionales (por ejemplo, etanol o glicerol), portadores tales como por ejemplo, polvos minerales naturales (por ejemplo, caolínes, arcillas, talco, tiza), polvos minerales sintéticos (por ejemplo, ácido silícico y silicatos altamente dispersos), azúcares (por ejemplo, azúcar de caña, lactosa y glucosa), emulsionantes (por ejemplo, lignina, licores de sulfito usados, metilcelulosa, almidón y polivinilpirrolidona) y lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, ácido esteárico y laurilsulfato de sodio).

20 Para la administración oral, las tabletas pueden, por supuesto, contener, además de los portadores mencionados anteriormente, aditivos tales como citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato dicálcico junto con varios aditivos tales como almidón, preferentemente almidón de patata, gelatina y similares. Además, los lubricantes como el estearato de magnesio, el laurilsulfato de sodio y el talco pueden usarse al mismo tiempo para el proceso de formación de las tabletas. En el caso de suspensiones acuosas, las sustancias activas pueden combinarse con diversos potenciadores del sabor o colorantes además de los excipientes mencionados anteriormente.

25 IV. Kits para usar en aplicaciones médicas

30 Otro aspecto de la invención proporciona un kit para tratar una afección médica. El kit comprende: i) instrucciones para tratar una afección médica, tal como dolor, osteoartritis, nefropatía diabética o polineuropatía diabética (por ejemplo, dolor tal como dolor musculoesquelético agudo y crónico de leve a moderado, dolor lumbar, dolor lumbar crónico, dolor relacionado con artritis reumatoide, dolor de hombro, dolor dental, dolor asociado con osteoartritis, dolor de cáncer, dolor visceral, dolor agudo, nefropatía diabética y dolor neuropático); y ii) un compuesto descrito en la presente descripción, tal como la sal de citrato 1. El kit puede comprender una o más formas de dosificación unitarias que contienen una cantidad de sal de citrato 1 que es eficaz para tratar dicha afección médica, tal como el dolor.

35 Ejemplos

40 La invención, que ahora se describe de manera general, se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen simplemente con fines ilustrativos de ciertos aspectos y modalidades de la presente invención.

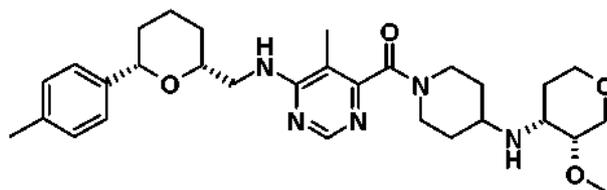
Lista de abreviaciones

45	AUC	área bajo la curva de concentración de plasma-tiempo
	BR	bromhidrato (sal con ácido bromhídrico)
	BS	base (sin sal definida)
	C _{máx}	concentración del pico
	CI	citrato (sal con ácido cítrico)
50	CL	depuración
	CL	clorhidrato (sal con ácido clorhídrico)
	ES	esilato (sal con un mol de ácido etanosulfónico)
	d.b.	(en) base seca
	DSC	Calorímetro diferencial de barrido
55	DMSO	dimetilsulfóxido
	DMSO-d ₆	DMSO deuterado
	DVS	Sorción de vapor dinámico
	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
	EGTA	ácido etilenglicol tetraacético
60	ESI	ionización por electropulverización
	f	hembra
	F	biodisponibilidad oral
	FCS	suero fetal de ternera
	HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazinaetanosulfónico
65	hERG	gen relacionado con el éter-a-go-go humano
	HR	alta resolución

IV, i.v.	intravenoso
me	masculino
M	mol/l
Tampón McIlvaine	tampón citrato/fosfato
5 MRT _{disp}	tiempo medio de residencia después de la dosificación intravenosa
MRT _{tot}	tiempo medio de residencia después de la dosificación oral
MS	espectrometría de masas
MS	metanosulfonato (sal con un mol de ácido metanosulfónico)
m/z	relación masa-carga
10 RMN	resonancia magnética nuclear
PBS	solución salina tamponada con fosfato
PK	farmacocinética
PO, p.o.	peroral
r.h.	humedad relativa
15 RT	temperatura ambiente
Tampón Sörensen	tampón NaOH/NaCl/Glicina
t _{máx}	tiempo de concentración máxima en plasma
TG	Termogravimetría
V _{ss}	volumen de distribución en estado estacionario
20 VLE	muy baja endotoxina
XRPD	Difracción de rayos X en polvo

Ejemplo 1 - Preparación y caracterización fisicoquímica de sales del compuesto I

25 Se prepararon y caracterizaron múltiples sales del compuesto I, incluida la sal de citrato del compuesto I. Los procedimientos y resultados experimentales se proporcionan a continuación. El compuesto I tiene la siguiente fórmula:



35 Parte I: Descripción de los métodos analíticos usados

A continuación se proporciona una descripción de los métodos analíticos usados para caracterizar las sales del compuesto I.

ESI espectrometría de masas (ESI+)

45	Instrumento	QTOF 2 (Micromass, Manchester, Reino Unido)
	Software de control del instrumento	Masslynx 4.1
	Fuente de iones	ESI+ (fuente de electropulverización)
50	Lockspray DXC	Encendido/apagado
	Calibración	0,1 % de ácido fosfórico en acetonitrilo/agua (1:1), calibración de la masa de bloqueo
	Resolución MS1 (LM/HM)	5/5
55	Poder de resolución (FWHM)	16 000 a 491 m/z (modo W)
	Tensión MCP	2200 V
	Tensión del capilar	+ 2,8 kV
60	Tensión del cono	25 V
	Energía de colisión	5 V
	Gas de colisión	Argón
65	Temperatura de la fuente	120 °C

ES 2 811 098 T3

Temperatura de desolvatación	150 °C
Gas cónico	nitrógeno 75 l/h
Gas de desolvatación	nitrógeno 450 l/h
Solvente del spray	acetonitrilo/agua 9:1
Bomba de jeringa	Harvard Apparatus 55-2222
Velocidad de flujo del solvente en spray	5 µl/min
Concentración de la muestra	5 ng/µl de solvente en aerosol
Reactivos	acetonitrilo (ULC/MS, Biosolve) agua (purificada por el sistema Milli-Q)
Intervalo de escaneo	50 - 1000 u (escaneo TOF, datos de perfil)
Tiempo de escaneo	2,9 s
Núm. de escaneos combinados	20
Determinación precisa de masa	Centro 5 puntos/80 %, Np = 0,35, masa de bloqueo: 588,8692
Umbral de datos	1,0 %

Espectroscopía de RMN ¹H

Instrumento	Bruker DRX 400
Frecuencia	400,13 MHz
Software	TopSpin® versión 1.3 PL8
Programa de pulso	zg30
Solvente	DMSO-d ₆
Concentración	10,3 mg / 0,6 ml
Temperatura	30 °C
Calibración	TMS (δ = 0,00 ppm)
Ancho de barrido	8013 Hz
Talla	puntos de datos 64 K
Ancho de pulso	30 grados
Retraso de relajación	10 s
Número de escaneos	32
Escaneos simulados	8
Apodización	Multiplicación gaussiana relleno de ceros de los puntos de datos a 128 K (GB: 0,25, LB: -0,25 Hz)

Espectroscopía NMR ¹³C

Instrumento	Bruker DRX 400
Frecuencia	100,61 MHz
Software	TopSpin® versión 1.3 PL8
Programa de pulso	Zgpg
Solvente	DMSO-d ₆

Concentración	10,3 mg / 0,6 ml
Temperatura	30 °C
Calibración	DMSO-d ₆ (δ = 39,5 ppm)
Ancho de barrido	27 778 Hz
Talla	puntos de datos 64 K
Ancho de pulso	90 grados
Retraso de relajación	4 s
Número de escaneos	4096
Escaneos simulados	32
Apodización	Multiplicación exponencial relleno de ceros de los puntos de datos a 128 K (LB: 2,5 Hz)

Diagrama de rayos X en polvo (XRPD)

Los diagramas de rayos X en polvo se generaron mediante el uso de un difractor STOE - STADI P en modo de transmisión equipado con un detector MYTHEN y un ánodo de Cu como fuente de rayos X con radiación monocromática CuKα1 ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, 40 kV, 40 mA).

Espectroscopía FT-RAMAN

Las muestras se han medido en tubos de punto de ebullición mediante el uso de un instrumento Bruker RAM II FT-Raman Module, resolución 2 cm^{-1} , 64 escaneos, potencia láser 500 mW (láser enfocado). Análisis: escala del vector en intervalo espectral $3500 \text{ cm}^{-1} - 50 \text{ cm}^{-1}$.

Calorimetría diferencial de barrido - punto de fusión

Los compuestos se caracterizan por un punto de fusión determinado por calorimetría diferencial de barrido (DSC), evaluado por el pico máximo o la temperatura de inicio. La velocidad de calentamiento del experimento es de 10 °C/min . Los valores dados se determinaron mediante el uso de un instrumento DSC de la serie Q de TA Instruments.

Termogravimetría (TG)

Los datos de gravimetría térmica se obtuvieron con un instrumento TG de la serie Q de TA Instruments. Este método mide los cambios de peso en un material en función de la temperatura bajo una atmósfera controlada.

Sorción dinámica de vapor (DVS)

Las isotermas de sorción se generaron mediante el uso de un monitor de sorción de agua IGAsorp de Hiden Isochema. Las isotermas de adsorción y desorción se obtuvieron a 25 °C con 10 % de humedad relativa con etapas de intervalos que varían del 10 % al 90 % de humedad relativa.

Solo para la forma de sal BR: las isotermas de sorción se registraron en un monitor de sorción de agua DVS-1 de Surface Measurement Systems.

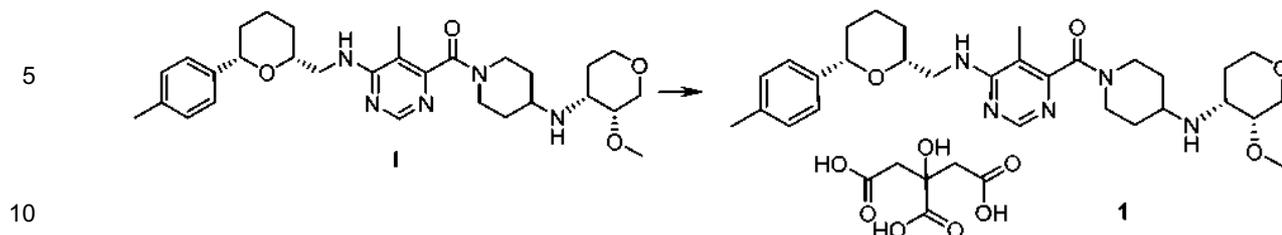
Solubilidad

La solubilidad se determinó mediante el uso de un método de matraz de agitación automatizado (a temperatura ambiente) y la cuantificación de la sustancia farmacológica disuelta se determinó mediante espectroscopía UV dentro de esta configuración automatizada.

Parte II: Preparación citrato de (4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino) piperidin-1-il) (5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona (1)

A continuación se proporcionan procedimientos ilustrativos para preparar el compuesto del título, junto con los datos de caracterización física. Los procedimientos de preparación incluyen dos rutas diferentes para hacer el compuesto del título.

Opción de preparación a) Preparación de sal de citrato a partir de la base libre I:



15 A una solución de la base libre I (200 mg, 0,372 mmol) en acetato de etilo (2 ml) se añade monohidrato de ácido cítrico (78,2 mg; 0,372 mmol). La solución se agita durante la noche (18 horas). La suspensión se filtra y el producto se seca a 40 °C *a vacío* para producir 140 mg de 0,192 mmol (52 %) de cristales incoloros. Los datos de caracterización física para la sal de citrato 1 se proporcionan a continuación.

20 RMN (¹H, 400 MHz, DMSO-d₆): 11,7-8,5 (2H, ancho), 8,34 (1H, s), 7,22 (2H, m), 7,12 (2H, m), 7,08 (1H, t), 4,49 (1H, m), 4,31 (1H, d), 4,09 (1H, m), 3,85 (1H, m), 3,74 (1H, m), 3,57-3,44 (2H, m), 3,48 (1H, m), 3,47 (1H, m), 3,35 (3H, s), 3,35 (1H, m), 3,33 (1H, m), 3,29 (1H, m), 3,27 (1H, m), 3,04 (1H, m), 2,84 (1H, m), 2,58 (2H, d), 2,50 (2H, d), 2,28 (3H, s), 2,12 (1H, m), 1,94 (1H, m), 1,91 (3H, s), 1,88 (1H, m), 1,78 (1H, m), 1,76 (1H, m), 1,70 (1H, m), 1,66 (1H, m), 1,63 (1H, m), 1,40 (1H, m), 1,40 (1H, m), 1,37 (1H, m), 1,24 (1H, m) (incluye rotámeros).

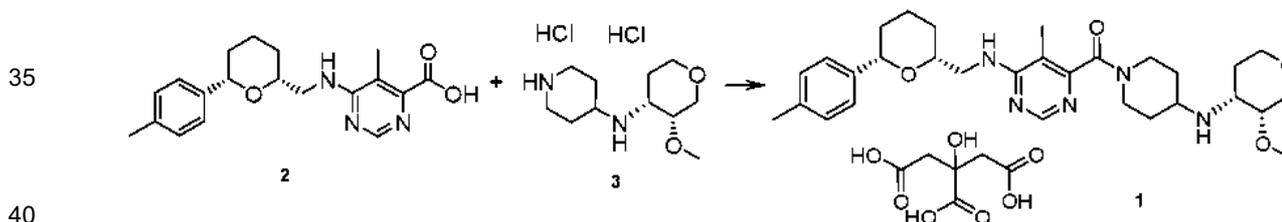
25 RMN (¹³C, 100 MHz, DMSO-d₆): 176,6, 171, 165,4, 161,0, 156,6, 155,4, 140,3, 136,0, 128,5, 125,6, 109,3, 78,5, 75,4, 72,4, 72,2, 71,2, 64,8, 64,4, 64,4, 55,5, 55,5, 51,5, 51,4, 50,2, 45,6, 44,1, 44,1, 38,8, 33,3, 29,6, 28,7, 28,7, 25,1, 23,1, 20,6, 11,7 (incluye rotámeros).

HRMS (ESI): m/z 538,3400 ([M + H]⁺; C₃₀H₄₄N₅O₄).

Espectro FT-RAMAN (bandas características) [cm⁻¹]: 1718, 1242, 731, 662, 553.

Ver la tabla II más abajo y las Figuras 2-4 y 17 para obtener datos de caracterización adicionales.

30 Opción de preparación b) Acoplamiento de amida seguido de preparación de sal de citrato:



45 Se añaden 4,99 kg (30,75 mol) de 1,1'-carbonildiimidazol a una suspensión de 10,0 kg (29,29 mol) de 2 en 75 l de 2-metiltetrahidrofurano a 50 °C. El embudo de polvo se enjuaga con 5 l de 2-metiltetrahidrofurano. La mezcla de reacción se agita durante 70 minutos a 50 °C. Más tarde, se añaden 8,83 kg (30,75 mol) de 3 a la mezcla de reacción y el embudo se enjuaga con 5 l de 2-metiltetrahidrofurano. A continuación, se añaden 7,41 kg (73,23 mol) de trietilamina y 10 l de 2-metiltetrahidrofurano y la mezcla de reacción se agita durante 1 hora a reflujo. Más tarde, la mezcla se enfría a 60 °C y se añade una solución de 6,07 kg (43,94 mol) de carbonato de potasio en 55 l de agua y las fases se separan a 55 °C. La capa orgánica se lava con 60 l de agua y se eliminan 80 l de solvente por destilación *al vacío*. El residuo que resulta se diluye con 80 l de alcohol isopropílico y se eliminan 55 litros de solvente por destilación *al vacío*.

50 A continuación, se añaden 5,85 kg (27,83 mol) de monohidrato de ácido cítrico en 11 l de agua y el embudo cuentagotas se enjuaga con 30 l de alcohol isopropílico. La mezcla de reacción se calienta a 75 °C, se agita hasta que se forma una solución y luego se filtra. El filtro se enjuaga con una mezcla de 2 l de agua y 20 l de alcohol isopropílico. Más tarde, el filtrado se diluye con 30 l de alcohol isopropílico y se siembra con 100 g de 1 como se obtiene en la opción a) a 65 °C. A continuación, la mezcla se enfría a 55 °C en 30 minutos y luego se agita durante 1 hora a 55 °C. La suspensión resultante se diluye con 60 l de alcohol isopropílico dentro de 1 ha 55 °C y luego se enfría a 20 °C dentro de 3 h. Más tarde, la suspensión se agita durante 17 horas a 20 °C y se aísla por filtración. La torta del filtro se lava dos veces con una mezcla de 19 l de alcohol isopropílico y 1 l de agua, cada una. El producto se seca a 50 °C *a vacío* para producir 17,76 kg de compuesto (83 %). Los datos de la caracterización física para la sal de citrato 1 se proporcionan más abajo.

60 RMN (¹H, 400 MHz, DMSO-d₆): 11,7-8,5 (2H, ancho), 8,34 (1H, s), 7,22 (2H, m), 7,12 (2H, m), 7,08 (1H, t), 4,49 (1H, m), 4,31 (1H, d), 4,09 (1H, m), 3,85 (1H, m), 3,74 (1H, m), 3,57-3,44 (2H, m), 3,48 (1H, m), 3,47 (1H, m), 3,35 (3H, s), 3,35 (1H, m), 3,33 (1H, m), 3,29 (1H, m), 3,27 (1H, m), 3,04 (1H, m), 2,84 (1H, m), 2,58 (2H, d), 2,50 (2H, d), 2,28 (3H, s), 2,12 (1H, m), 1,94 (1H, m), 1,91 (3H, s), 1,88 (1H, m), 1,78 (1H, m), 1,76 (1H, m), 1,70 (1H, m), 1,66 (1H, m), 1,63 (1H, m), 1,40 (1H, m), 1,40 (1H, m), 1,37 (1H, m), 1,24 (1H, m) (incluye rotámeros).

65

RMN (^{13}C , 100 MHz, DMSO-d_6): 176,6, 171, 165,4, 161,0, 156,6, 155,4, 140,3, 136,0, 128,5, 125,6, 109,3, 78,5, 75,4, 72,4, 72,2, 71,2, 64,8, 64,4, 64,4, 55,5, 55,5, 51,5, 51,4, 50,2, 45,6, 44,1, 44,1, 38,8, 33,3, 29,6, 28,7, 28,7, 25,1, 23,1, 20,6, 11,7 (incluye rotámeros).

HRMS (ESI): m/z 538,3400 ($[\text{M} + \text{H}]^+$; $\text{C}_{30}\text{H}_{44}\text{N}_5\text{O}_4$).

5 Espectro FT-RAMAN (bandas características) [cm^{-1}]: 1718, 1242, 731, 662, 553.

Ver la tabla II más abajo y las Figuras 2-4 y 17 para obtener datos de caracterización adicionales.

10 Parte III: Preparación de sales adicionales de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino) piperidin-1-il) (5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona

Se prepararon sales adicionales de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona y se caracterizaron como se describe más abajo.

15 Preparación de bromhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino) piperidin-1-il) (5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona

20 Se añaden 1,916 ml (0,1 M) de ácido bromhídrico a una solución de 103 mg (0,1916 mmol) de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona en 2 ml de metanol y se agita durante 2 horas a 50 °C. Más tarde, se elimina el solvente en un secador de vacío a 40 °C. A continuación, se añaden 4 ml de tetrahydrofurano al residuo. La mezcla se somete a ultrasonido, más tarde se agita durante 2 horas a 40 °C, y más tarde se almacena durante 4 horas a temperatura ambiente. Más tarde, se elimina el solvente en un secador de vacío para producir el bromhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

Ver la tabla III más abajo y las Figuras 5-7 para caracterizar los datos.

30 Preparación de clorhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino) piperidin-1-il) (5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona

35 Se añaden 0,558 ml (0,1 M) de ácido clorhídrico a una solución de 30 mg (0,0557 mmol) de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona en 1 ml de metanol y se agitó durante 2 horas a 50 °C. Más tarde, se elimina el solvente en un secador de vacío a 40 °C. A continuación, se añaden 1,2 ml de tetrahydrofurano al residuo. La mezcla se somete a ultrasonido, más tarde se agita durante 2 horas a 40 °C, y más tarde se almacena durante 4 horas a temperatura ambiente. Más tarde, se elimina el solvente en un secador de vacío para producir el clorhidrato (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

40 Ver la tabla IV más abajo y las Figuras 8-10 para caracterizar los datos.

45 Preparación de esilato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino) piperidin-1-il) (5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona

50 Se añaden 1,860 ml (0,1 M) de ácido etanosulfónico a una solución de 100 mg (0,186 mmol) de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona en 2 ml de metanol y se agita durante 2 horas a 50 °C. Más tarde, se elimina el solvente en un secador de vacío a 40 °C. A continuación, se añaden 4 ml de acetona al residuo. La mezcla se somete a ultrasonido, más tarde se agita durante 2 horas a 40 °C, y más tarde se almacena durante 4 horas a temperatura ambiente. Más tarde, se elimina el solvente en un secador de vacío para producir el esilato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

55 Espectro FT-RAMAN (bandas características) [cm^{-1}]: 1637, 1253, 1014, 740, 719, 534, 525, 219.

Ver la tabla V más abajo y las Figuras 11-13 y 18 para caracterizar los datos.

60 Preparación de metanosulfonato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino) piperidin-1-il) (5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona

65 Se añaden 0,558 ml (0,1 M) de ácido metanosulfónico a una solución de 30 mg (0,0557 mmol) de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona en 1 ml de metanol y se agita durante 2 horas a 50 °C. Más tarde, se elimina el solvente en un secador de vacío a 40 °C. A continuación, se añaden 1,2 ml de tolueno al residuo. La mezcla se somete a ultrasonido, más tarde se agita durante 2 horas a 50 °C, y más tarde se almacena durante la noche a temperatura ambiente. Más tarde, se elimina el solvente en un secador de vacío para producir el metanosulfonato de (4-((3*R*,4*R*)-

3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

Ver la tabla VI más abajo y las Figuras 14-16 para caracterizar los datos.

5 Parte IV: Datos de caracterización física para sales de (4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino) piperidin-1-il) (5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona

10 Se proporciona más abajo los datos de caracterización física ilustrativos para sales de (4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

Solubilidad en medios acuosos

15 La tabla I muestra la solubilidad del citrato de (4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona en diferentes medios acuosos a las 2, 4 y 6 horas.
Tabla I.

20

Medio	2 horas [mg/ml]	4 horas [mg/ml]	6 horas [mg/ml]
Agua	>1	>1	>1
HCl 0,1 N	>1	>1	>1
HCl 0,01 N	>1	>1	>1
Tampón Mcllvaine pH 2,2	>1	>1	>1
Tampón Mcllvaine pH 3,0	>1	>1	>1
Tampón Mcllvaine pH 4,0	>1	>1	>1
Tampón Mcllvaine pH 4,5	No determinado	>1	>1
Tampón Mcllvaine pH 5,0	>1	>1	>1
Tampón Mcllvaine pH 6,0	>1	>1	>1
Tampón Mcllvaine pH 6,8	>1	>1	>1
Tampón Mcllvaine pH 7,4	>1	>1	>1
Tampón-KH ₂ PO ₄ pH 7,4	>1	>1	>1
Sorensen pH 10	>1	>1	>1
NaOH 0,1 N	>1	>1	>1
EtOH	9,2	9,8	10

25

30

35

40

45

50 Los datos de la tabla I demuestran que el citrato de (4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona es altamente soluble en medios acuosos ácidos, neutros y básicos.

Propiedades de estado sólido de la sal de citrato 1

55 A continuación se describen varias propiedades en estado sólido de la sal de citrato 1.

Apariencia

60 En estado sólido, el citrato de (4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona es un material microcristalino blanco.

Comportamiento de sorción

65 Solo el citrato de (4-((3R,4R)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona muestra estabilidad contra la humedad relativa de hasta el 80 %. Se observa una absorción de 2,6 % de agua. La absorción de agua es reversible, y después del

experimento de sorción, el compuesto aún permanece como material sólido. Todas las demás sales se convirtieron en fase líquida a una humedad relativa más alta (dependiendo de la forma de la sal a partir del 60-70 % de humedad relativa).

5 Cristalinidad y polimorfismo

Sal de Citrato 1

10 La sal de citrato 1 es altamente cristalina como puede verse en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en la Figura 2. La reflexión y las intensidades del polvo de rayos X (estandarizadas) se muestran en la Tabla II.

Tabla II.

2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I _o [%]
4,36	20,24	17
12,17	7,27	41
12,51	7,07	6
13,13	6,74	7
13,66	6,48	39
14,20	6,23	14
14,60	6,06	32
15,03	5,89	5
15,25	5,81	4
15,97	5,54	11
16,51	5,37	13
17,05	5,20	13
17,54	5,05	4
17,88	4,96	5
18,65	4,75	22
19,05	4,66	100
19,68	4,51	11
20,42	4,35	6
20,84	4,26	4
21,25	4,18	3
21,90	4,06	5
22,42	3,96	92
23,19	3,83	9
23,70	3,75	16
24,34	3,65	4
24,56	3,62	23
24,89	3,57	16
25,20	3,53	7
25,36	3,51	7
25,67	3,47	6

2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I ₀ [%]
26,26	3,39	23
26,59	3,35	12
27,51	3,24	6
27,71	3,22	6
28,01	3,18	7
28,23	3,16	5
28,57	3,12	3
29,44	3,03	12
30,15	2,96	4

5

10

15

20

En la Tabla II anterior, el valor "2-zeta [°]" denota el ángulo de difracción en grados y el valor d [Å] denota las distancias especificadas en Å entre los planos de la red.

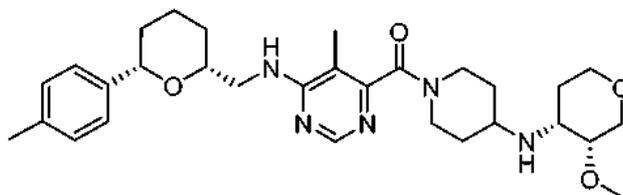
25

La sal de citrato cristalino de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona se caracteriza porque el diagrama de rayos X en polvo tiene, entre otros, los valores característicos 2-zeta = 19,1° (100 % de intensidad relativa), 22,4° (92 % de intensidad relativa), 12,2° (41 % de intensidad relativa), 13,7° (39 % de intensidad relativa) y 14,6° (32 % de intensidad relativa) (que son los picos más destacados en el diagrama de la Figura 2, Tabla II).

30

Por lo tanto, de acuerdo con un primer aspecto, la invención proporciona una sal de citrato del compuesto I

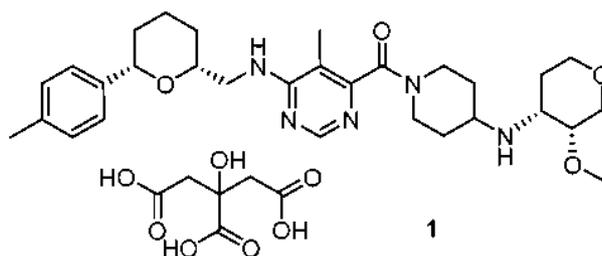
35



I

40 que tiene la fórmula

45



50

1

En una segunda modalidad, la sal 1 está en forma cristalina.

55

En una tercera modalidad, de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, la forma cristalina del compuesto 1 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos en los siguientes valores 2-zeta medidos mediante el uso de radiación monocromática CuK α 1 de $\lambda = 1,54056$ Å, 40 kV, 40 mA: 19,1° y 22,4°.

60

En una modalidad adicional de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, la forma cristalina muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende además un pico a 12,2°.

En una modalidad adicional de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, la forma cristalina muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende además un pico a 13,7°.

65

En una modalidad adicional de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, la forma cristalina muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende además un pico a 14,6°.

En una modalidad adicional de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, la forma cristalina muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende además un pico a 18,7°.

5 En una modalidad adicional de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, la forma cristalina muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende además un pico a 24,6°.

En una modalidad adicional de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, la forma cristalina muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende además un pico a 26,3°.

10 En una modalidad adicional de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, la forma cristalina muestra un espectro Raman que comprende picos en uno cualquiera o en todos de los siguientes desplazamientos Raman expresados en números de onda en cm^{-1} : 1718, 1242, 731, 662, 553.

15 En una modalidad adicional de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, la forma cristalina muestra un punto de fusión de 212 ± 5 °C.

20 La sal de citrato 1 puede proporcionarse en una composición farmacéutica. Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que contiene la sal de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, opcionalmente junto con uno o más portadores y/o diluyentes inertes.

25 Solo se ha obtenido una forma cristalina de varios experimentos para el citrato de (4-((3R,4R)-3-metoxitetrahidropirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2R,6S)-6-(p-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona.

Sal de bromhidrato del Compuesto de la Fórmula (I)

30 La sal de bromhidrato del compuesto de la fórmula (I) es de cristalinidad media como se demuestra en el diagrama de difracción de rayos X en polvo de la Figura 5. La reflexión y las intensidades del polvo de rayos X (estandarizadas) se muestran en la Tabla III.

Tabla III.

2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I ₀ [%]
4,73	18,67	100
7,60	11,62	37
9,48	9,32	15
12,74	6,94	34
14,46	6,12	78
15,25	5,81	62
17,38	5,10	56
18,16	4,88	17
19,36	4,58	62
20,39	4,35	83
22,01	4,03	17
22,72	3,91	25
24,05	3,70	37
24,94	3,57	26
25,23	3,53	41
25,65	3,47	27
26,35	3,38	19
27,25	3,27	19

2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I ₀ [%]
28,00	3,18	15
28,92	3,08	21
29,49	3,02	15
29,59	3,02	16

5

10

En la Tabla III anterior, el valor "2-zeta [°]" denota el ángulo de difracción en grados y el valor d [Å] denota las distancias especificadas en Å entre los planos de la red.

15

El bromhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona se caracteriza porque el diagrama de rayos X en polvo tiene, entre otros, los valores característicos 2-zeta = 4,7° (100 % de intensidad relativa), 20,4° (83 % de intensidad relativa), 14,5° (78 % de intensidad relativa), 15,3° (62 % de intensidad relativa) y 19,4° (62 % de intensidad relativa) (que son los picos más prominentes en el diagrama de la Figura 5, Tabla III).

20

Diferentes modificaciones polimórficas del bromhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona se ha identificado por difracción de rayos X en polvo.

25

Sal de clorhidrato del compuesto de la fórmula (I)

La sal de clorhidrato del compuesto de la fórmula (I) es de cristalinidad media como puede verse en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en la Figura 8. La reflexión y las intensidades de los rayos X en polvo (estandarizadas) se muestran en la Tabla IV.

30

Tabla IV.

2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I ₀ [%]
4,05	21,78	24
4,74	18,63	93
7,68	11,50	28
9,49	9,31	19
10,17	8,69	17
12,27	7,21	16
12,85	6,88	29
13,55	6,53	19
14,05	6,30	22
14,55	6,08	64
15,37	5,76	98
16,09	5,51	23
16,58	5,34	19
17,52	5,06	100
18,14	4,89	25
19,12	4,64	23
19,53	4,54	39
20,46	4,34	77
22,16	4,01	23

2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I ₀ [%]
22,79	3,90	26
23,22	3,83	20
24,13	3,69	44
25,02	3,56	23
25,42	3,50	24
25,87	3,44	18
26,57	3,35	15
27,39	3,25	18
28,06	3,18	16
29,07	3,07	18
29,85	3,00	12

En la Tabla IV anterior, el valor "2-zeta [°]" denota el ángulo de difracción en grados y el valor d [Å] denota las distancias especificadas en Å entre los planos de la red.

El clorhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino) piperidin-1-il)(5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona se caracteriza porque el diagrama de rayos X en polvo tiene, entre otros, los valores característicos 2-zeta = 17,5° (100 % de intensidad relativa), 15,4 (98 % de intensidad relativa), 4,7° (93 % de intensidad relativa), 20,5° (77 % de intensidad relativa) y 14,6° (64 % de intensidad relativa), (que son los picos más prominentes en el diagrama de Figura 8, Tabla IV).

Diferentes modificaciones polimórficas del clorhidrato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino) pirimidin-4-il) metanona se ha identificado por difracción de rayos X en polvo.

Sal de esilato del compuesto de la fórmula (I)

La sal de esilato del compuesto de la fórmula (I) es de alta cristalinidad como puede verse en el diagrama de difracción de rayos X en polvo de la Figura 11. La reflexión e intensidades del polvo de rayos X (estandarizadas) se muestran en la Tabla V.

Tabla V.

2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I ₀ [%]
5,33	16,56	66
7,87	11,23	48
9,14	9,67	7
9,97	8,87	24
10,93	8,09	23
12,23	7,23	9
12,43	7,12	11
13,26	6,67	83
14,55	6,08	48
14,83	5,97	18
15,07	5,88	10
15,29	5,79	17

	2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I ₀ [%]
5	15,77	5,61	51
	16,05	5,52	25
	16,18	5,47	19
	16,46	5,38	12
10	16,88	5,25	10
	17,90	4,95	100
	18,32	4,84	34
15	18,49	4,79	22
	19,29	4,60	36
	19,44	4,56	40
20	20,03	4,43	63
	20,14	4,41	45
	20,85	4,26	66
25	21,08	4,21	11
	21,37	4,15	12
	21,92	4,05	18
30	22,22	4,00	21
	22,49	3,95	16
	22,71	3,91	7
35	23,33	3,81	10
	23,53	3,78	9
	23,79	3,73	8
40	23,98	3,71	20
	24,43	3,64	15
	24,68	3,60	14
45	25,00	3,56	17

En la Tabla V anterior, el valor "2-zeta [°]" denota el ángulo de difracción en grados y el valor d [Å] denota las distancias especificadas en Å entre los planos de la red.

El esilato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino) piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(*p*-tolil)tetrahydro-2H-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona se caracteriza porque el diagrama de rayos X en polvo tiene, entre otros, los valores característicos 2-zeta = 17,9° (100 % de intensidad relativa), 13,3 (83 % de intensidad relativa), 5,3° (66 % de intensidad relativa), 20,9° (66% de intensidad relativa) y 20,0° (63 % de intensidad relativa) (que son los picos más prominentes en el diagrama de la Figura 11, Tabla V).

Sal de metanosulfonato del compuesto de la fórmula (I)

La sal de metanosulfonato del compuesto de la fórmula (I) es de cristalinidad media como puede verse en el diagrama de difracción de rayos X en polvo en la Figura 14. La reflexión y las intensidades del polvo de rayos X (estandarizadas) se muestran en la Tabla VI.

Tabla VI.

65

	2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I ₀ [%]
5	5,36	16,48	30
	5,57	15,85	27
	7,84	11,27	43
	9,91	8,92	51
10	11,05	8,00	21
	12,33	7,17	77
	13,26	6,67	26
15	14,69	6,03	100
	14,95	5,92	50
	15,78	5,61	20
20	16,47	5,38	23
	17,74	4,99	53
	18,42	4,81	38
25	19,09	4,65	33
	19,29	4,60	41
	19,91	4,46	32
30	20,67	4,29	55
	21,23	4,18	21
	22,28	3,99	28
35	23,74	3,74	16
	24,33	3,66	23
	24,84	3,58	15
40	25,60	3,48	21
	29,79	3,00	16
45	17,74	16,48	30
	18,42	15,85	27
	19,09	11,27	43

50 En la Tabla VI anterior, el valor "2-zeta [°]" denota el ángulo de difracción en grados y el valor d [Å] denota las distancias especificadas en Å entre los planos de la red.

55 El metanosulfonato de (4-((3*R*,4*R*)-3-metoxitetrahydro-pirano-4-ilamino)piperidin-1-il)(5-metil-6-(((2*R*,6*S*)-6-(p-tolil)tetrahydro-2*H*-pirano-2-il)metilamino)pirimidin-4-il) metanona se caracteriza porque el diagrama de rayos X en polvo tiene, entre otros, los valores característicos 2-zeta = 14,7° (100 % de intensidad relativa), 12,3 (77 % de intensidad relativa), 20,7° (55 % de intensidad relativa), 17,7° (53 % de intensidad relativa) y 9,9° (51 % de intensidad relativa) (que son los picos más prominentes en el diagrama de la Figura 14, Tabla VI).

60 Termoanálisis

El termoanálisis de la sal 1 de citrato cristalino muestra un punto de fusión = 212 ± 5 °C (inicio, DSC: velocidad de calentamiento 10 K·min⁻¹; el diagrama DSC/TG se muestra en la Figura 3). Se produce una pérdida de peso del 1,6 % con el secado. Como consecuencia, la sal de citrato tiene una baja tendencia a absorber solventes (en caso de agua, lo que significa baja higrscopicidad).

65

El termoanálisis de la sal de bromhidrato cristalino del compuesto I muestra un punto de fusión = 248 ± 5 °C (inicio, DSC: velocidad de calentamiento $10 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$; el diagrama DSC/TG se muestra en la Figura 6). Se produce un efecto endotérmico amplio entre 40 y 110 °C con pérdida de peso concomitante (pérdida de peso del 2,9 % al secarse).

5 El termoanálisis de la sal de clorhidrato cristalino del compuesto I muestra un punto de fusión = 233 ± 5 °C (inicio, DSC: velocidad de calentamiento $10 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$; el diagrama DSC/TG se muestra en la Figura 9). Se produce un efecto endotérmico amplio entre 40 y 80 °C. Se produce un efecto endotérmico débil entre 130 - 150 °C (pérdida de peso del 2,8 % al secarse).

10 El termoanálisis de la sal de esilato cristalino del compuesto I muestra un punto de fusión = 199 ± 5 °C (inicio, DSC: velocidad de calentamiento $10 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$; el diagrama DSC/TG se muestra en la Figura 12). Se produce un efecto endotérmico amplio y débil entre 40 y 100 °C. La pérdida del 2,4 % en el secado se correlaciona con el efecto endotérmico.

15 El termoanálisis de la sal de metanosulfonato cristalino del compuesto I muestra un punto de fusión = 226 ± 5 °C (inicio, DSC: velocidad de calentamiento $10 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$; el diagrama DSC/TG se muestra en la Figura 15). Se produce un efecto endotérmico amplio y débil entre 30 y 110 °C.

Isotermas de sorción

20 La isoterma de sorción de la sal 1 de citrato cristalino muestra una absorción de agua del 2,6 % en el intervalo de humedad del 10-80 % (diagrama que se muestra en la Figura 4).

25 La isoterma de sorción de la sal de hidrobromuro cristalino del compuesto I muestra una absorción de agua del 4,5 % en el intervalo de humedad del 10-80 % (diagrama que se muestra en la Figura 7).

La isoterma de sorción de la sal de hidrocloreuro cristalino del compuesto I muestra una absorción de agua del 15 % en el intervalo de humedad del 10-80 % (diagrama mostrado en la Figura 10).

30 La isoterma de sorción de la sal de esilato cristalino del compuesto I muestra una absorción de agua del 20 % en el intervalo de humedad del 10-80 % (diagrama que se muestra en la Figura 13).

La isoterma de sorción de la sal de metanosulfonato cristalino del compuesto I muestra una absorción de agua del 30 % en el intervalo de humedad del 10-80 % (diagrama que se muestra en la Figura 16).

35 Resumen de las propiedades físicas seleccionadas para sales del compuesto I

Las propiedades seleccionadas de las sales de citrato, bromhidrato, clorhidrato, esilato y metanosulfonato del compuesto I se muestran en la Tabla VII.

40 Tabla VII.

Parámetro	Sal de la Forma del Compuesto I				
	Sal de citrato	Sal bromhidrato	Sal clorhidrato	Sal de esilato	Sal de metanosulfonato
cristalinidad	alto	medio	medio	alto	Medio
punto de fusión [°C] (consenso)	212 ± 5	248 ± 5	233 ± 5	199 ± 5	226 ± 5
comportamiento térmico	sin efecto adicional antes de la fusión	efecto endotérmico amplio 40 - 110 °C	efecto endotérmico amplio 40 - 80 °C efecto endotérmico débil 130 - 150 °C	débil efecto endotérmico amplio 40 - 100 °C	débil efecto endotérmico amplio 30 - 110 °C
pérdida por secado [%]	1,6	2,9	2,8	2,4	
comportamiento higroscópico (hasta 80 % de humedad relativa)	2,6 % de absorción de agua	4,5 % de absorción de agua delicuescente	15 % de absorción de agua delicuescente	20 % de absorción de agua delicuescente	30 % de absorción de agua

Parámetro	Sal de la Forma del Compuesto I				
	Sal de citrato	Sal bromhidrato	Sal clorhidrato	Sal de esilato	Sal de metanosulfonato
comportamiento higroscópico (hasta 90 % de humedad relativa)	3,4 % de absorción de agua	20 % de absorción de agua deliquescente	40 % de absorción de agua deliquescente	45 % de absorción de agua deliquescente	45 % de absorción de agua
indicaciones para polimorfismo	no	Si	si	no	No

Ejemplo 2 - Datos de actividad biológica que caracterizan el compuesto I y su sal de citrato 1

Se realizaron experimentos para evaluar la actividad biológica del compuesto I y su sal de citrato 1. Se proporciona más abajo una descripción de los procedimientos y resultados experimentales.

Parte I: Descripción de los ensayos biológicos

Unión a proteínas del plasma

Se usan celdas de diálisis de Teflón Dianorm (micro 0,2). Cada celda consta de una cámara donante (es decir, una cámara de tampón) y una aceptora (es decir, una cámara de plasma), separadas por una membrana semipermeable ultrafina con un límite de peso molecular de 5 kDa. Las soluciones madre para cada compuesto de prueba se preparan en DMSO a 1 mM y se diluyen a una concentración final de 1,0 µM. Se dispensan alícuotas de 200 µl de tampón de diálisis (fosfato de potasio 100 mM, pH 7,4) en la cámara de tampón. Se dispensan alícuotas de 200 µl de solución de diálisis del compuesto de prueba en las cámaras de plasma. La incubación se lleva a cabo durante 2 horas bajo rotación a 37 °C. Más tarde, el dializado se transfiere a tubos de reacción. Los tubos para la fracción de tampón contienen 0,2 ml de acetonitrilo/agua (80/20 volumen/volumen). Se transfieren alícuotas de 25 µl del dializado de plasma a placas de pocillos profundos y se mezclan con 25 µl de acetonitrilo/agua (80/20 volumen/volumen), 25 µl de tampón, 25 µl de solución de calibración y 25 µl de solución de patrón interno. La precipitación de proteínas se realiza al añadir 200 µl de acetonitrilo. Se transfieren alícuotas de 50 µl del dializado de tampón a placas de pocillos profundos y se mezclan con 25 µl de plasma en blanco, 25 µl de solución de patrón interno y 200 µl de acetonitrilo. El porcentaje de unión se calcula con la fórmula: % de unión = (concentración en plasma - concentración de tampón / concentración en plasma) x 100.

Estabilidad metabólica *in vitro*

La degradación metabólica del compuesto de prueba se analiza en una suspensión de hepatocitos. Los hepatocitos se incuban en un sistema tampón apropiado. Después de una incubación previa (típicamente) de 30 minutos en una incubadora (37 °C, 10 % de CO₂), se añaden 5 µl de solución de compuesto de prueba (1 µM) en 395 µl de suspensión de hepatocitos (densidad celular en el intervalo de 0,25-5 Mio células/ml, típicamente 1 Mio células/ml, concentración final de DMSO 0,05 %). Las células se incuban durante seis horas (incubadora, agitador orbital) y se toman muestras (25 µl) a las 0, 0,5, 1, 2, 4 y 6 horas. Las muestras se transfieren a acetonitrilo y se sedimentan por centrifugación (5 min). El sobrenadante se transfiere a una nueva placa de 96 pocillos, se evapora bajo nitrógeno y se resuspende. La disminución del compuesto original se analiza por HPLC-MS/MS. La CL_{int} se calcula de la siguiente manera $CL_{INTRINSIC} = Dosis/AUC = (C_0/CD) / (AUD + clast \cdot k) \times 1000/60$. C₀: concentración inicial en la incubación [µM], CD: densidad celular de células vitales [10e6 células/ml], AUD: área bajo los datos [µM x h], clast: concentración del último punto de datos [µM], k: pendiente de la línea de regresión para la disminución del compuesto original [h⁻¹]. La depuración intrínseca hepática *in vitro* calculada puede ampliarse hasta la depuración hepática intrínseca *in vivo* y usarse para predecir la depuración hepática de la sangre (CL) *in vivo* mediante el uso de un modelo de hígado (modelo del compartimiento bien agitado).

- $CL_{INTRINSIC_INVIVO} [ml/min/kg] = (CL_{INTRINSIC} [\mu l/min/10e6 \text{ células}] \times \text{hepatocelularidad} [10e6 \text{ células/g hígado}] \times \text{factor hepático} [g/kg \text{ peso corporal}]) / 1000$
- $CL [ml/min/kg] = CL_{INTRINSIC_INVIVO} [ml/min/kg] \times \text{flujo sanguíneo hepático} [ml/min/kg] / (CL_{INTRINSIC_INVIVO} [ml/min/kg] + \text{flujo sanguíneo hepático} [ml/min/kg])$

Farmacocinética (experimentos con animales)

Se examinó la farmacocinética del compuesto de prueba después de dosis únicas intravenosas (IV) u orales (PO) en

- ratones hembra BALB/c (peso promedio: 25 g)
- ratas macho Wistar(Han) (peso medio: 260 g)
- Cerdos pequeños Gottingen macho y hembra (peso medio: 24 kg)
- perros beagle machos (peso promedio: 15 kg)

5 Todas las especies no roedores fueron en ayunas durante la noche antes de la dosificación, mientras que los ratones y las ratas tenían comida y agua disponibles ad libitum. La dosis p.o. del compuesto se administró generalmente como suspensión en 0,5 % de Natrosol o como 0,5 % de Natrosol / 0,015 % de suspensión en Tween 80. Para fines de dosificación i.v., las dosis se aplicaron como una solución en NaCl al 0,9 %, o como una solución que contenía 9,1 % de ciclodextrina HP-beta en agua.

10 La sangre se recogió mediante muestreo venoso y remojo de la sangre en tubos recubiertos con EDTA. Se recogieron muestras hasta 48 horas después de la administración del compuesto de prueba. El plasma se separó luego por centrifugación (5 minutos por aproximadamente 9000 g a 4 °C). Para la determinación del compuesto de prueba, el plasma se transfirió a placas de PCR. Todas las muestras se almacenaron a aproximadamente -20 °C hasta la bioanalítica. Las concentraciones del compuesto de prueba en plasma se determinaron por HPLC MS/MS. El límite inferior de cuantificación fue de entre 0,5 nmol/l y 1 nmol/l.

15 ensayo de canal hERG

20 Células:

25 Las células HEK 293 (de riñón embrionario humano) se transfectaron de manera estable con ADNc de hERG. Las células determinadas para usar en experimentos de fijación de membranas se cultivaron sin antibiótico.

Pipetas y Soluciones

30 Las células se superfundieron con una solución de baño que contenía (mM): NaCl (137), KCl (4,0), MgCl₂ (1,0), CaCl₂ (1,8), Glucosa (10), HEPES (10), pH 7,4 con NaOH. Las pipetas de parche se hicieron de tubos de vidrio de borosilicato (Hilgenberg, Malsfeld, Alemania) mediante el uso de un extractor horizontal (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente, Martinsried, Alemania) y se llenaron con una solución de pipeta que contenía (mM): K-aspartato (130), MgCl₂ (5,0), EGTA (5,0), K₂ATP (4,0), HEPES (10,0), pH 7,2 con KOH. La resistencia de los microelectrodos estaba en el intervalo entre 2 y 5 MΩ.

35 Estimulación y Registro:

40 Las corrientes de membrana se registraron mediante el uso de un amplificador de fijación de membranas EPC-10 (HEKA Electronics, Lambrecht, Alemania) y el software PatchMaster (HEKA). Las señales actuales fueron filtradas por Bessel a 2,5 kHz antes de ser digitalizadas a 5 kHz.

45 Las corrientes de membrana mediadas por hERG se registraron típicamente a 28 °C, mediante el uso de la técnica de fijación de membranas ajustado a la célula completa. Las células HEK293 transfectadas se fijaron a un potencial de retención de -60 mV y se obtuvieron corrientes de cola de inactivación mediadas por hERG mediante el uso de un patrón de pulso con amplitudes fijas (activación/inactivación: 40 mV durante 2000 ms; recuperación: 120 mV durante 2 ms; rampa para 40 mV en 2 ms; corriente de cola de inactivación: 40 mV durante 50 ms) repetido a intervalos de 15 s. Durante cada intervalo entre pulsos, se registraron 4 pulsos reducidos en un factor de 0,2 para un procedimiento de sustracción de fugas P/n. Se empleó una compensación de R_s hasta un nivel que permitió registrar de forma segura sin timbres. Se registraron las R_s no compensadas restantes, así como la temperatura real y la corriente de retención.

50 Preparación y aplicación de compuestos:

55 Las concentraciones del elemento de prueba se aplicaron secuencialmente en cada una de las diferentes celdas investigadas. Se midió un nivel estable de corriente de referencia durante al menos 90 s antes de la aplicación de la concentración del primer artículo de prueba.

60 El ítem de prueba se disolvió en DMSO para producir una solución madre de 1000 veces la concentración final más alta. Esta solución madre se diluyó más en DMSO para almacenar soluciones de 1000 veces las concentraciones finales restantes. Las diluciones finales en tampón extracelular se prepararon en el momento a partir de estas soluciones madre mediante un paso de dilución 1:1000 cada una antes de comenzar los experimentos.

Análisis de los datos:

65 Las amplitudes de corriente pico se midieron 3 ms después de la rampa a +40 mV. Para la línea base y cada concentración, se promediaron las corrientes máximas de los tres últimos barridos antes de la aplicación de la siguiente concentración. Las corrientes residuales (I/I₀) se calcularon para cada celda como la fracción de la corriente pico promedio real y la corriente pico promedio de la línea base. La inhibición actual se expresó como (1 - I/I₀) * 100 %. La

inhibición actual para todas las celdas se informa como media \pm DE. A partir de los datos de inhibición de la corriente media, el IC₅₀ se estima en base a la ecuación de Hill mediante el uso de un procedimiento de mínimos cuadrados.

Ensayo de fosfolipidosis *in vitro*

- 5
1. Cultivo de células:
Línea celular: U937. Densidad celular: 0,5 Mio. células/ml. Cantidad de medio: 3 ml/pocillo.
 - 10 2. Materiales y dispositivos:
 - Frasco de cultivo de tejidos de halcón 175 cm²
 - tubos de ensayo Sarstedt
 - Microplacas de 6 pocillos
 - 15 - flujo laminar
 - centrífuga refrigerada
 - pipetas
 - Citómetro de flujo: Coulter Epics XL/MCL (Beckman Coulter Inc., Bullerton, California, Estados Unidos)
 - 20 3. Medio y aditivos:
 - 3.1 Preparación de RPMI1640 con 10 % de FCS y 0,005 % de gentamicina:
Medios:
 - 25 - VLE RPMI 1640 mediano (1x), almacenar a 2-8 °C
 Aditivos:
 - 30 - suero fetal bovino, almacenar a -20 °C
 - Gentamicina, Gibco® Invitrogen, conc. 10 mg/ml (= solución al 1 %)
 Añada 56 ml de FCS y 2,6 ml de gentamicina a 500 ml de RPMI1640. Almacene el medio listo para usar a 2 - 8 °C.
 - 35 3.2 Preparación de la solución de trabajo de formaldehído (conc. 3,7 %):
Diluir el formaldehído al 37 % en PBS 1 x (relación de dilución 1:10) para obtener una solución de trabajo del 3,7 %, que se almacena a 2-8 °C.
 - 40 3.3 Tampón
PBS-Dulbecco (1x) sin Ca²⁺, Mg²⁺. Almacenar a temperatura ambiente.
 - 45 4. Tintes para tinción celular
 - 4.1 tinción de células vivas:
 - 4.1.1 Yoduro de propidio (PI; Molecular Probes, Eugene, Oregón, Estados Unidos)
50 Solución madre de PI: 1 mg/ml de PBS (almacenado a 4 °C en la oscuridad).
Solución PI lista para usar: solución madre 1:100 diluida con PBS (recién preparada para cada experimento).
 - 4.1.2 Rojo del Nilo (NR; Molecular Probes, Eugene, Oregon)
55 Solución madre NR: 1 mg/ml de DMSO (almacenado a 4 °C en la oscuridad).
Solución NR lista para usar para tinción de células vivas: solución madre NR 1:100 diluida con PBS (recién preparada para cada experimento).
 - 60 4.2 tinción de células fijadas
Preparación de la solución madre de Rojo del Nilo (conc. 1 mg/ml): resuelva 1 mg de Rojo del Nilo en 1 mL 100% DMSO, almacene a 2 - 8 °C.
- 65

Preparación de la solución de trabajo Rojo del Nilo para la tinción de células fijadas (conc. 1 µg/ml): solución madre diluida de Rojo del Nilo en PBS 1 x (relación de dilución 1:1000). La solución de trabajo debe prepararse y usarse inmediatamente antes de teñir las células.

5 5. Siembra celular y tratamiento:

La siembra y el tratamiento celular pueden realizarse de la siguiente manera:

- 10 - resuelva los compuestos de prueba en DMSO al 100 % hasta la concentración final de 100 veces y diluya según el experimento planeado.
- primero llene 30 µl de la solución madre en el pocillo relevante de la placa de 6 pocillos y resuspenda con 3 ml de suspensión celular/pocillo que contiene 0,5 Mio. células/ml (concentración final DMSO = 1 %).
- use un pocillo por compuesto y concentración
- 15 - incube 48 horas sin cambiar el medio a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad relativa

6. Cosecha celular:

La recolección de células puede realizarse de la siguiente manera:

- 20 - transfiera la suspensión celular en tubos Sarstedt (en hielo)
- centrifugación: 4 min a 130 x g, 4 °C; desechar el sobrenadante
- resuspenda en 3 ml de PBS por tubo (helado)
- llene 1 ml de la suspensión celular en un tubo Sarstedt (en hielo) para la determinación citométrica de flujo (0,5 ml para yoduro de propidio y 0,5 ml para tinción de células vivas de rojo del Nilo)
- 25 - centrifugación del residuo: 4 min. a 130 x g, 4 °C; desechar el sobrenadante
- añada 1 ml de solución de formaldehído al 3,7 % por tubo
- fijación durante 30 minutos (células después de la fijación a temperatura ambiente)
- centrifugación: 4 min a 130 x g, RT; desechar el sobrenadante
- resuspenda cada tubo en 1,3 ml de solución de trabajo Rojo del Nilo para la tinción de células fijadas
- 30 - incube el tinte por 5 minutos
- centrifugación: 4 min a 130 x g, RT; desechar el sobrenadante
- resuspenda en 3 ml de PBS
- centrifugación: 4 min a 130 x g, RT; desechar el sobrenadante
- 35 - resuspenda en 0,5 ml de PBS (= fracción de células fijadas teñidas con rojo de Nilo), determinación de fosfolípidosis mediante el uso de un método de citométrico de flujo

7. Tinción de células y medición citométrica de flujo

40 Se preparan 3 x 0,5 ml de suspensiones de células a partir de cada muestra para la medición de citometría de flujo (células no fijadas para la determinación de la viabilidad, células no fijadas y células fijadas para el análisis de fosfolípidosis).

7.1 Tinción de PI y medición citométrica de flujo para la determinación de viabilidad

45 Inmediatamente antes de la medición, se añaden por muestra 12,5 µl de la solución de PI lista para usar (0,5 ml de suspensión celular no fijada), que se mantienen en hielo durante otros 15 minutos antes de la medición.

Por muestra, se analizan diez mil (10 000) células a una velocidad de flujo alta para el siguiente parámetro:

- 50 - tiempo para medir 10 000 células, sin compilar
- dispersión directa (lineal) versus dispersión lateral (lineal), sin compilar
- fluorescencia amarilla ($\lambda = 568 - 590$ nm; logarítmica) versus número de células (lineal), no compilada.

El tiempo para medir 10 000 células se correlaciona con la densidad celular en la muestra.

55 Las puertas de corte para la diferenciación dependiente de fluorescencia entre células vivas y muertas se definen en base al análisis del medio de cultivo celular más las células de control expuestas al vehículo. Las células con una fluorescencia inferior al límite se definen como viables. La viabilidad absoluta de una muestra es la relación de las células viables con el número total de células y se expresa como por ciento.

60 7.2 Tinción de rojo del Nilo y medición citométrica de flujo para la determinación de PL

7.2.1 Tinción de células vivas de Rojo del Nilo

Inmediatamente antes de la medición, se añaden por muestra 50 µl de la solución NR lista para usar para la tinción de células vivas (0,5 ml de suspensión celular no fijada). Las muestras se mantienen en hielo durante otros 5 min. Posteriormente, se lavan una vez con 4 ml de PBS (4 °C, 250xG durante 8 minutos) y finalmente se resuspenden en 400 µl de PBS.

5

7.2.2 Tinción de células fijadas de Rojo del Nilo

Descripción ver arriba (6. Cosecha celular). Tanto las células no fijadas teñidas con rojo del Nilo como las células fijadas teñidas con rojo del Nilo se miden de acuerdo con el siguiente procedimiento.

10

Por muestra, se analizan 10 000 células a un caudal elevado para el siguiente parámetro:

- dispersión directa (lineal) versus dispersión lateral (lineal), sin compilar
- fluorescencia verde ($\lambda = 504 - 541$ nm; logarítmica) versus número de células (lineal), no compilado
- fluorescencia roja lejana ($\lambda = 660 - 680$ nm; logarítmica) versus número de células (lineal), no compilada

15

8. Análisis de la señal

20

Las muestras de viabilidad relativa inferior al 90 % se excluyen del análisis del potencial fosfolipidogénico de un compuesto de prueba. Las muestras con una viabilidad entre 90 y 95 % se seleccionan para la evaluación caso por caso, dependiendo de la consistencia de todos los parámetros analizados y la intensidad de fluorescencia absoluta.

25

Para todas las muestras con una viabilidad relativa al Control de > 90 % (basado en la exclusión de PI), la intensidad de fluorescencia absoluta media después de la tinción NR se calcula para fluorescencia verde así como también para fluorescencia roja lejana.

30

Para cada canal, la intensidad de fluorescencia absoluta de una muestra específica se correlaciona con la intensidad de fluorescencia absoluta media de todo el medio de cultivo celular más las células de control expuestas al vehículo del experimento respectivo. Por canal, la intensidad de fluorescencia relativa de una muestra es la relación de la intensidad de fluorescencia absoluta de esta muestra con la intensidad de fluorescencia absoluta media de los controles, que se establece en 100, y se expresa como por ciento de la intensidad de fluorescencia de las células de control.

35

9. Evaluación de la fosfolipidosis

La evaluación del potencial fosfolipidogénico de un compuesto de prueba se realiza de forma manual en función de las intensidades de señal en ambas longitudes de onda para las células fijadas, así como para las células no fijadas.

40

Parte II: Resultados de los ensayos de actividad biológica para el compuesto I (base libre) y su sal de citrato 1

Las siguientes tablas resumen los datos biológicos sobre el compuesto I y su sal de citrato 1, según se determina en los ensayos como se describe anteriormente.

45

Unión del compuesto I a proteínas del plasma *in vitro*.

Especies	Ratón	Rata	Perro	Cerdo pequeño	Humano
Fracción unida [%]	95,1	68,9	70,4	60,8	84,7
Fracción sin unir[%]	4,9	31,1	29,6	39,2	15,3

Estabilidad metabólica *in vitro* del compuesto I en incubaciones de hepatocitos.

Especies	Ratón	Rata	Perro	Cerdo pequeño	Humano
CL intrínseco, <i>in vitro</i> [µl/min/10e6 células]	16,4	8,77	3,15	2,73	4,11
CL, <i>in vivo</i> [ml/min/kg]	49	26	14	6,8	7,9

Farmacocinética intravenosa del compuesto I en animales.

5	Especies	Ratón	Rata	Perro	Cerdo pequeño
	Número de animal/género	$n=2f$	$n=2m$	$n=3m$	$n=1m/1f$
	Parámetros PK intravenosos (valores medios)				
	Dosis IV ($\mu\text{mol/kg}$)	10	5	5	5
10	AUC(0-inf) ($\text{nM}\cdot\text{h}$)	1990	1490	5990	4310
	CL (ml/min/kg)	86,0	56,1	14,0	20,0
15	V_{ss} (ml/kg)	3,29	5,04	4,94	5,07
	MRT_{disp} (h)	0,623	1,49	6,40	4,15

Farmacocinética oral del compuesto I en animales.

20	Especies	Ratón	Rata	Perro	Cerdo pequeño
	Número de animal/género	$n=3m/0f$	$n=3m/0f$	$n=3m/0f$	$n=3m/0f$
	Parámetros PK orales (valores medios)				
25	Dosis oral ($\mu\text{mol/kg}$)	20	20	5	no hecho
	$C_{\text{máx}}$ (nM)	974	580	317	no hecho
	$t_{\text{máx}}$ (h)	1,00	1,50	0,917	no hecho
30	AUC(0-inf) ($\text{nM}\cdot\text{h}$)	3160	2270	1500	no hecho
	MRT_{tot} (h)	3,99	5,49	5,77	no hecho
	F (%)	79	38	25	No calculado

Farmacocinética oral de la sal de citrato 1 en ratas.

35	Especies	Rata
	Número de animal/género	$n=3m/0f$
	Parámetros PK orales ^c (valores medios)	
40	Dosis oral ($\mu\text{mol/kg}$)	20
	$C_{\text{máx}}$ (nM)	454
	$t_{\text{máx}}$ (h)	1,08
45	AUC(0-inf) ($\text{nM}\cdot\text{h}$)	1710
	MRT_{tot} (h)	3,3

Inhibición de la corriente de potasio mediada por hERG

50 El compuesto I inhibió la corriente de potasio mediada por hERG con $\text{IC}_{50} > 30 \mu\text{M}$ (12 % de inhibición a $10 \mu\text{M}$, 28 % de inhibición a $30 \mu\text{M}$).

Ensayo de fosfolipidosis *in vitro*

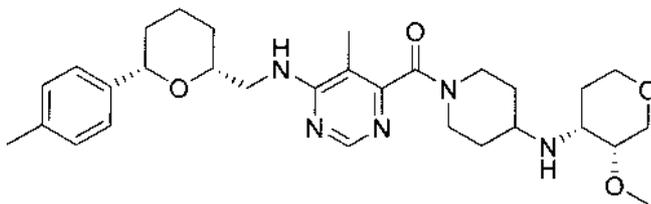
55 El compuesto I muestra la propensión a ser fosfolipidogénico en el ensayo de fosfolipidosis *in vitro*; la concentración fosfolipidogénica más baja del compuesto I en este ensayo *in vitro* es de $200 \mu\text{M}$.

REIVINDICACIONES

1. Sal de citrato del compuesto I:

5

10



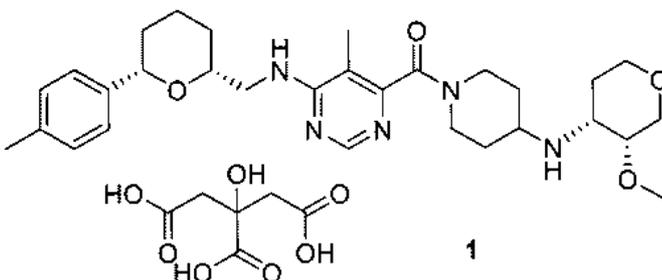
I

que tiene la fórmula

15

20

25



1

30

35

40

45

2. La sal de acuerdo con la reivindicación 1 en forma cristalina.
3. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 2, que muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos en los siguientes valores de 2-zeta medidos mediante el uso de radiación monocromática CuK α 1 de $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, 40 kV, 40 mA: $19,1^\circ$ y $22,4^\circ$.
4. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a $12,2^\circ$.
5. La forma cristalina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a $13,7^\circ$.
6. La forma cristalina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a $14,6^\circ$.
7. La forma cristalina de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a $18,7^\circ$, en donde opcionalmente

(i) el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a $24,6^\circ$ y/o

(ii) el patrón de difracción de rayos X en polvo comprende además un pico a $26,3^\circ$.

50

55

60

65

8. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 2, que exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos en los siguientes valores 2-zeta medidos mediante el uso de radiación monocromática CuK α 1 de $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, 40 kV, 40 mA: $12,2 \pm 0,2$, $13,7 \pm 0,2$, $14,6 \pm 0,2$, $19,1 \pm 0,2$ y $22,4 \pm 0,2$.
9. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 2, que exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo que comprende picos en los siguientes valores 2-zeta medidos mediante el uso de radiación monocromática CuK α 1 de $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$, 40 kV, 40 mA: $12,2 \pm 0,2$, $13,7 \pm 0,2$, $14,6 \pm 0,2$, $18,7 \pm 0,2$, $19,1 \pm 0,2$, $22,4 \pm 0,2$, $24,6 \pm 0,2$ y $26,3 \pm 0,2$.
10. La forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde la intensidad relativa del pico en dichos ángulos de difracción 2-zeta es al menos 10 %.
11. La forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde la intensidad relativa del pico en dichos ángulos de difracción 2-zeta es al menos 15 %.

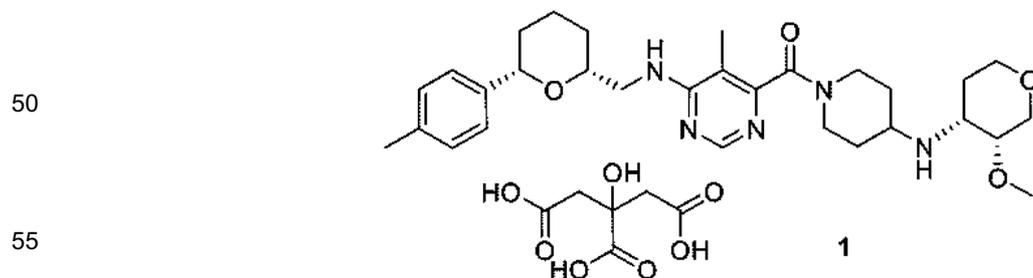
12. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la forma exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente como se muestra en la Figura 2.
13. La forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la forma exhibe el siguiente patrón de difracción de rayos X en polvo expresado en términos de ángulo de difracción 2θ , distancias d inter-planares e intensidad relativa (expresada como un por ciento con respecto al pico más intenso):

5

2-zeta [°]	valor d [Å]	Intensidad I/I _o [%]
4,36	20,24	17
12,17	7,27	41
12,51	7,07	6
13,13	6,74	7
13,66	6,48	39
14,20	6,23	14
14,60	6,06	32
15,03	5,89	5
15,25	5,81	4
15,97	5,54	11
16,51	5,37	13
17,05	5,20	13
17,54	5,05	4
17,88	4,96	5
18,65	4,75	22
19,05	4,66	100
19,68	4,51	11
20,42	4,35	6
20,84	4,26	4
21,25	4,18	3
21,90	4,06	5
22,42	3,96	92
23,19	3,83	9
23,70	3,75	16
24,34	3,65	4
24,56	3,62	23
24,89	3,57	16
25,20	3,53	7
25,36	3,51	7
25,67	3,47	6
26,26	3,39	23
26,59	3,35	12
27,51	3,24	6
27,71	3,22	6
28,01	3,18	7
28,23	3,16	5
28,57	3,12	3
29,44	3,03	12
30,15	2,96	4

14. La forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en donde la forma tiene un espectro Raman que comprende picos en uno cualquiera o todos de los siguientes desplazamientos Raman expresados en números de onda en cm^{-1} : 1718, 1242, 731, 662, 553.
- 5 15. La forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, en donde la forma tiene
- (i) un punto de fusión de $212 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ o
- (ii) una curva de calorimetría diferencial de barrido sustancialmente igual a la mostrada en la Figura 3.
- 10 16. Una composición farmacéutica que comprende la sal de acuerdo con la reivindicación 1 junto con uno o más portadores y/o diluyentes inertes.
- 15 17. Una composición farmacéutica que comprende la forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 o una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 junto con uno o más portadores y/o diluyentes inertes.
18. Una composición farmacéutica que comprende la forma cristalina de acuerdo con la reivindicación 8 junto con uno o más portadores y/o diluyentes inertes.
- 20 19. La sal de acuerdo con la reivindicación 1 o la forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, para usar como un medicamento.
20. La sal de acuerdo con la reivindicación 1 o la forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, para usar en el tratamiento de una afección seleccionada de dolor, osteoartritis, nefropatía diabética y polineuropatía diabética.
- 25 21. La sal de acuerdo con la reivindicación 1 o la forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, para usar en el tratamiento del dolor.
- 30 22. La sal de acuerdo con la reivindicación 1 o la forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, para usar en el tratamiento del dolor inflamatorio, dolor crónico, osteoartritis, dolor neuropático o dolor visceral.
- 35 23. La sal de acuerdo con la reivindicación 1 o la forma cristalina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, para usar en el tratamiento de
- (i) una afección seleccionada del grupo que consiste en dolor del musculoesquelético agudo y crónico de leve a moderado, dolor lumbar, dolor lumbar crónico, dolor relacionado con la artritis reumatoide, dolor de hombro, dolor dental, signos y síntomas de osteoartritis, osteoartritis de rodilla, osteoartritis de la cadera, osteoartritis de la mano, dolor asociado con la osteoartritis, dolor por cáncer, polineuropatía diabética, dolor visceral, dolor agudo, nefropatía diabética y dolor neuropático,
- 40 (ii) neuralgia del trigémino, o
- (iii) El dolor debido a las lesiones nerviosas provocadas por la quimioterapia.

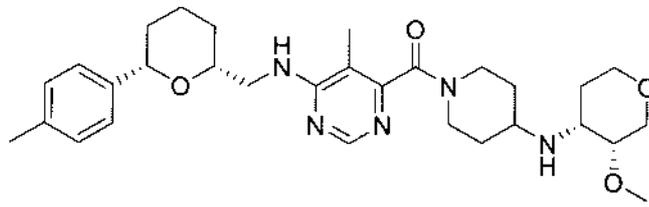
- 45 24. Un método para preparar el compuesto 1



60 que comprende las siguientes etapas:

- a) adición de ácido cítrico a una solución del compuesto I

5



10

I

15

en un solvente orgánico; y

20

b) aislamiento de la sal 1 que resulta en forma pura; en donde opcionalmente el solvente orgánico en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en acetato de etilo, isopropanol y una mezcla de isopropanol y agua.

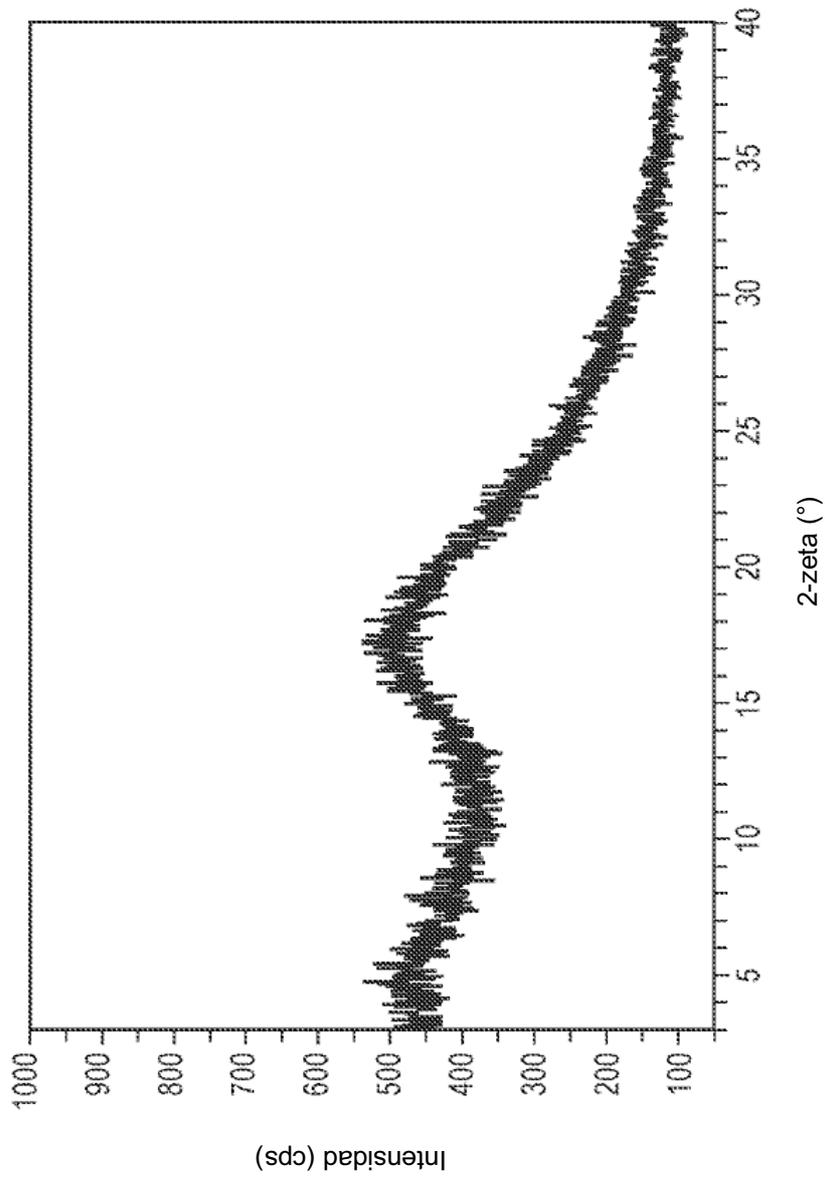


Figura 1

Figura 2

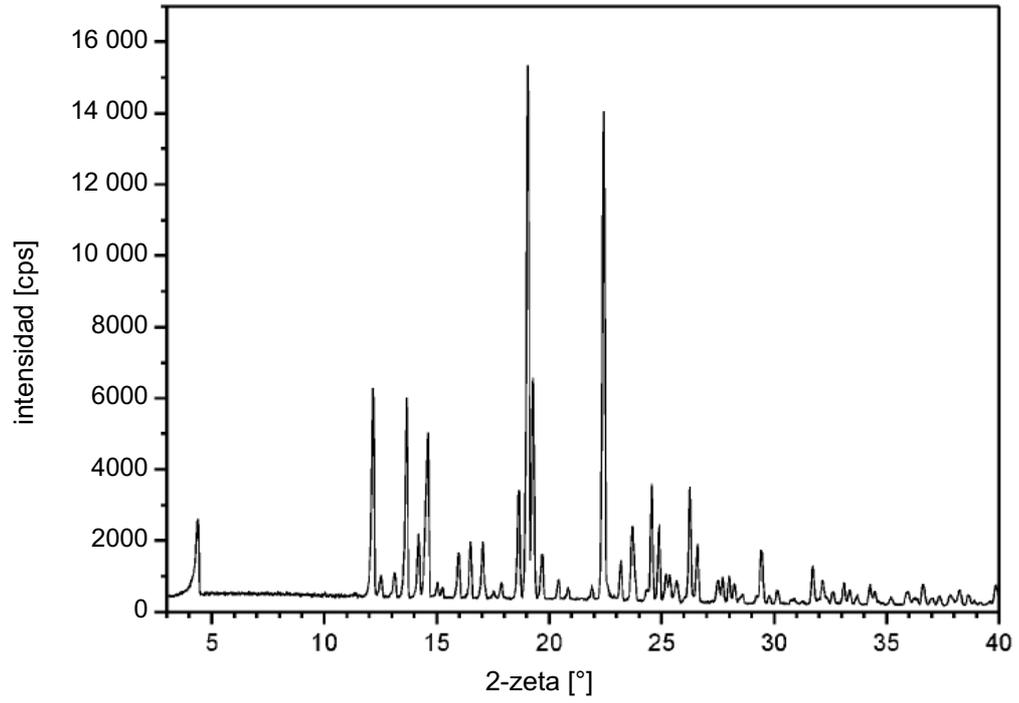


Figura 3

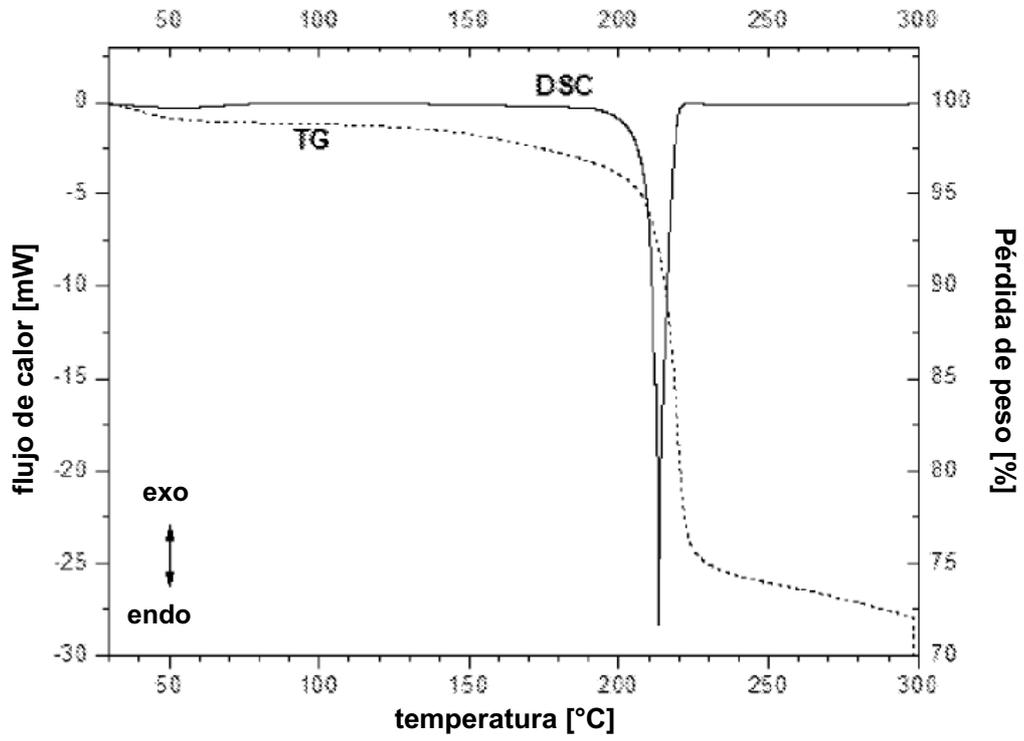


Figura 4

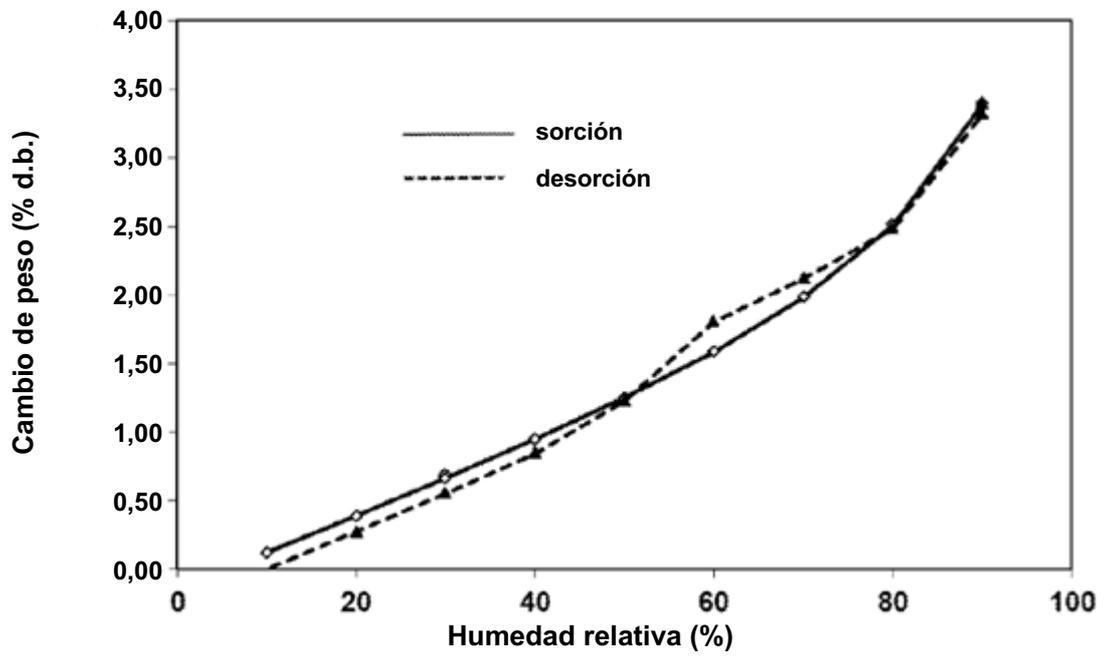


Figura 5

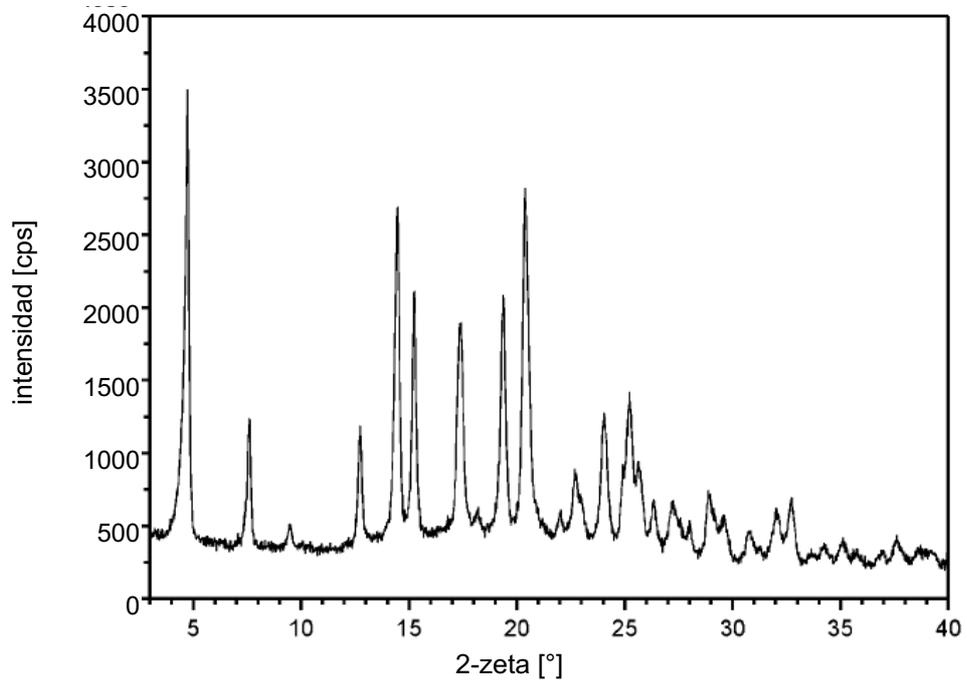


Figura 6

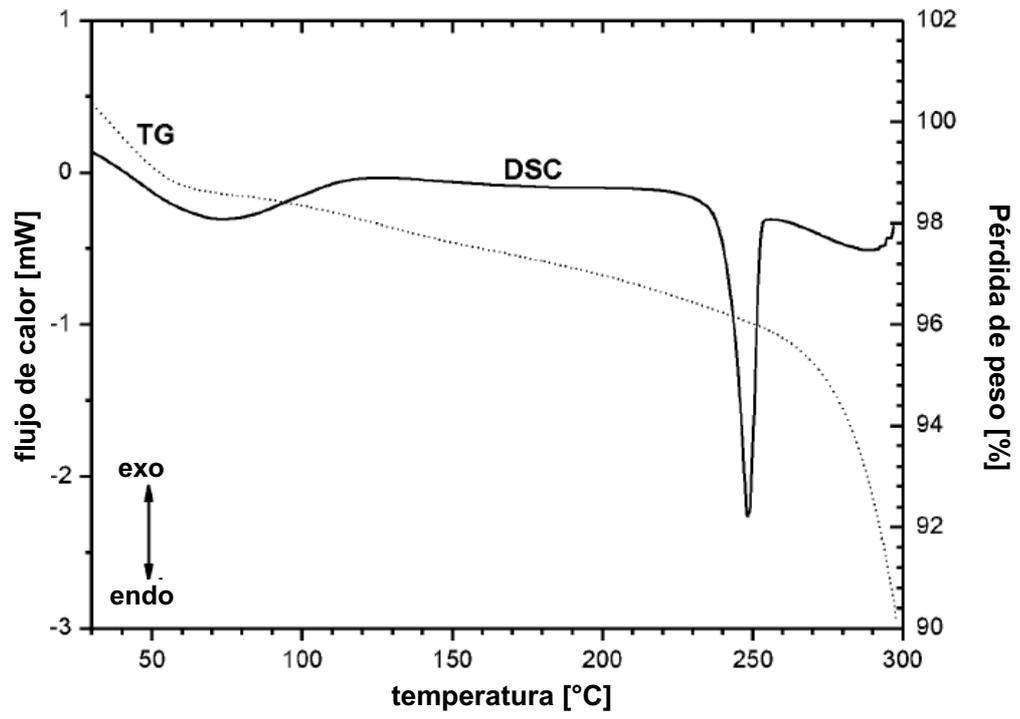


Figura 7

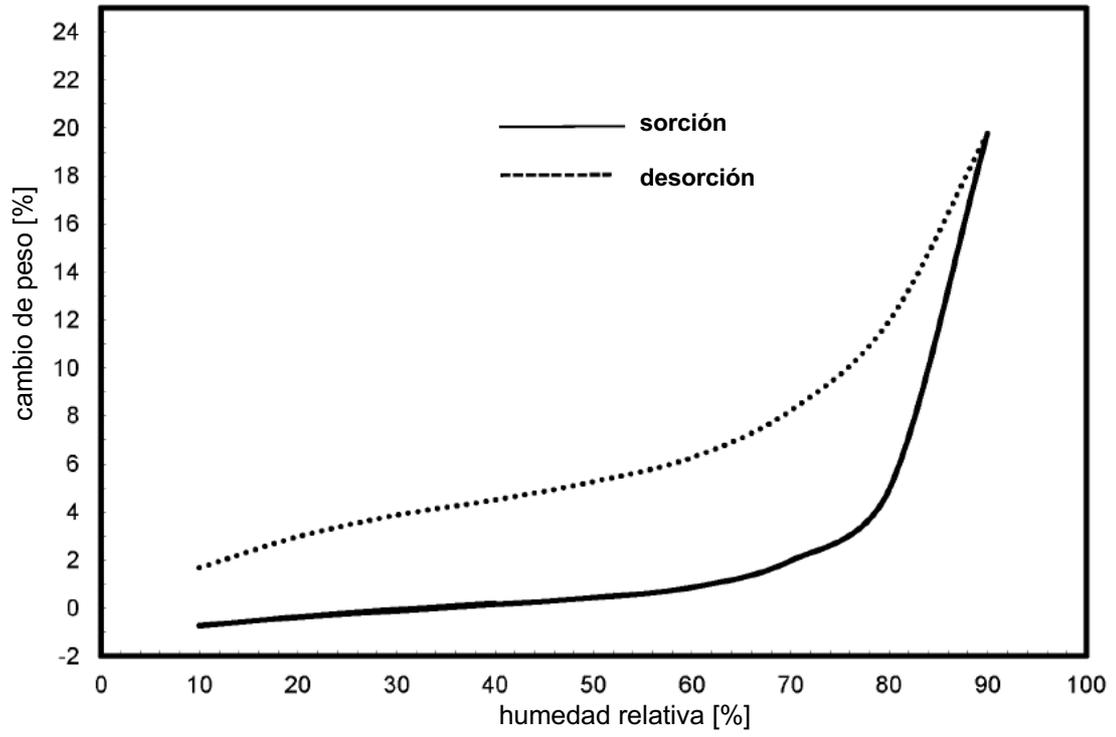


Figura 8

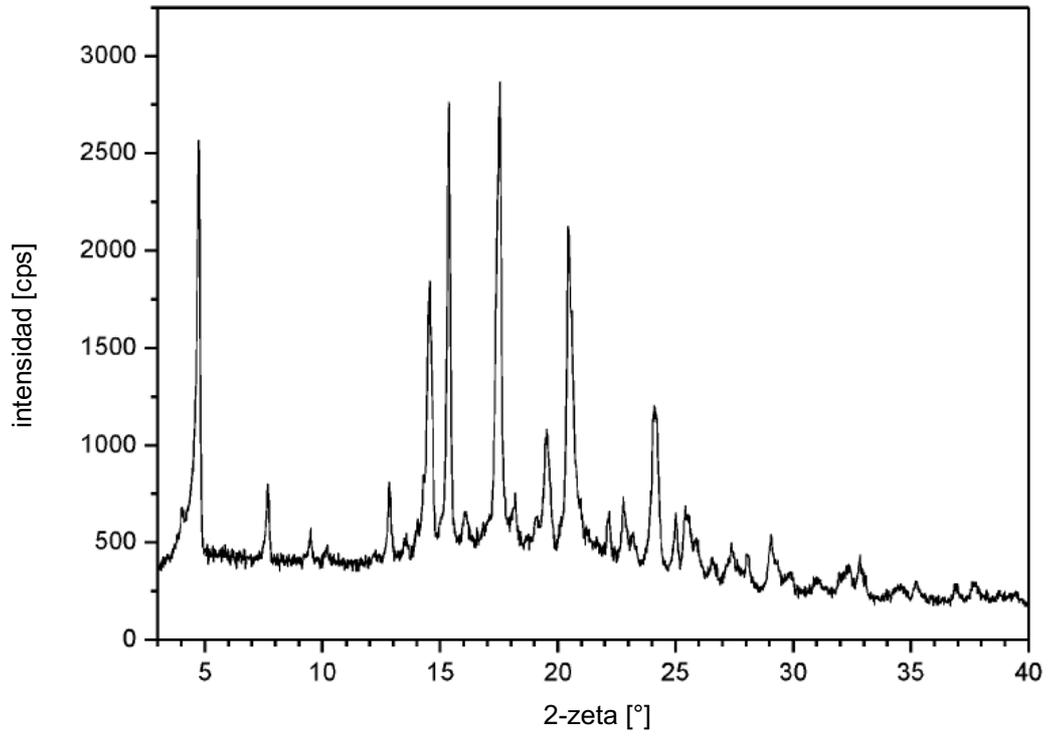


Figura 9

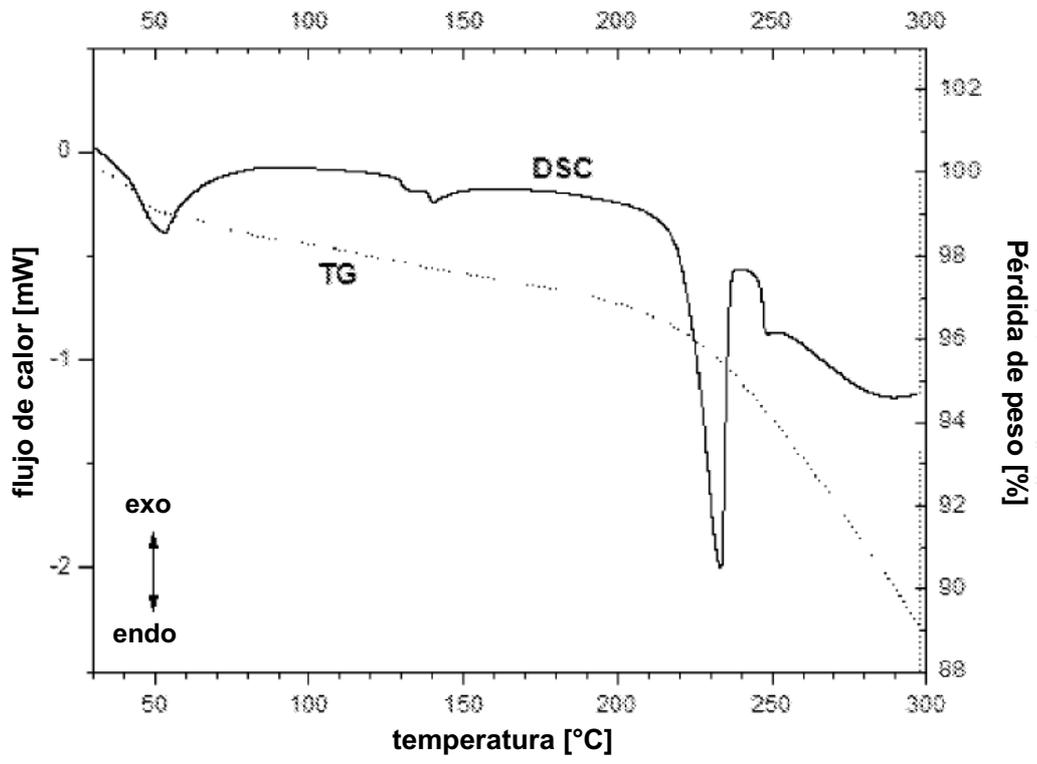


Figura 10

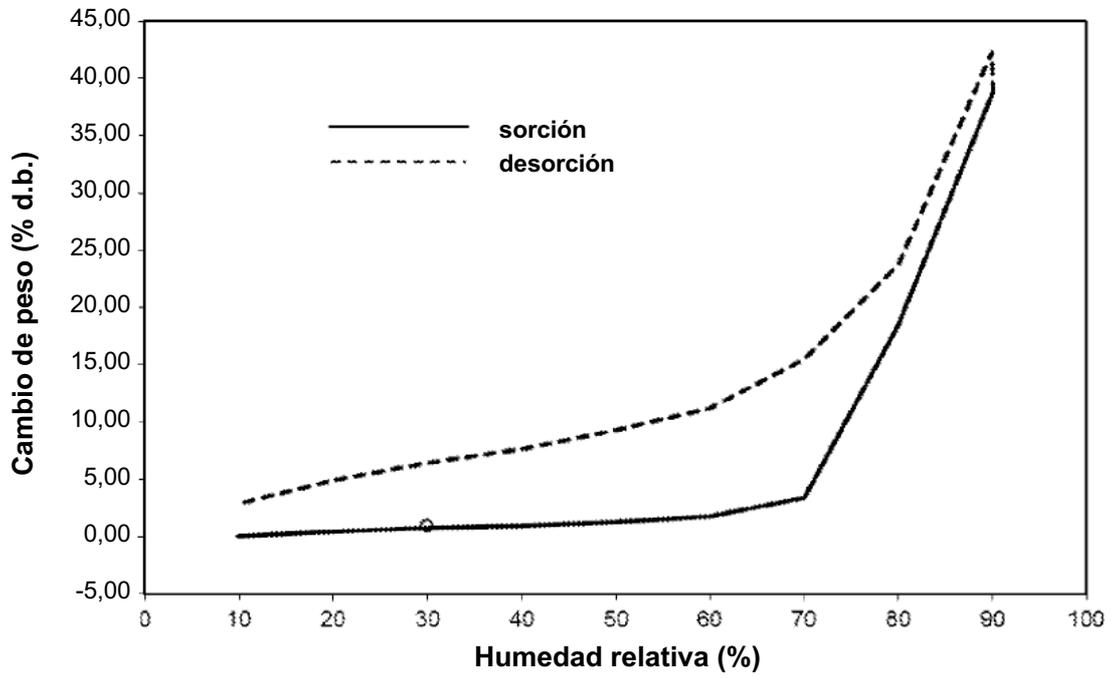


Figura 11

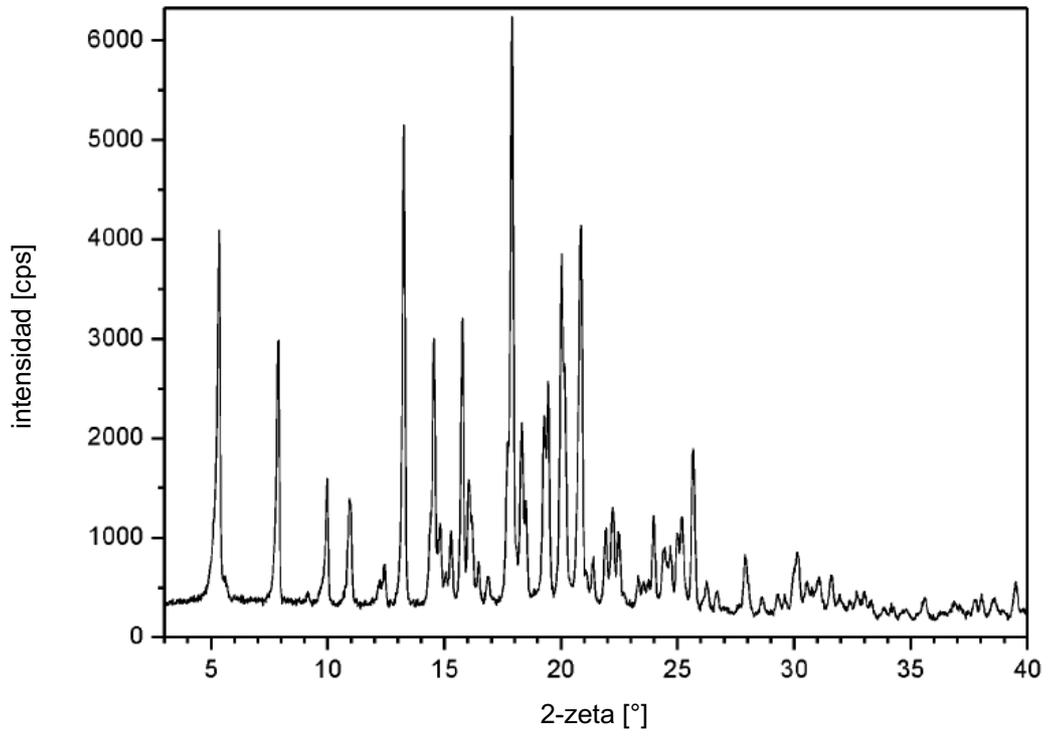


Figura 12

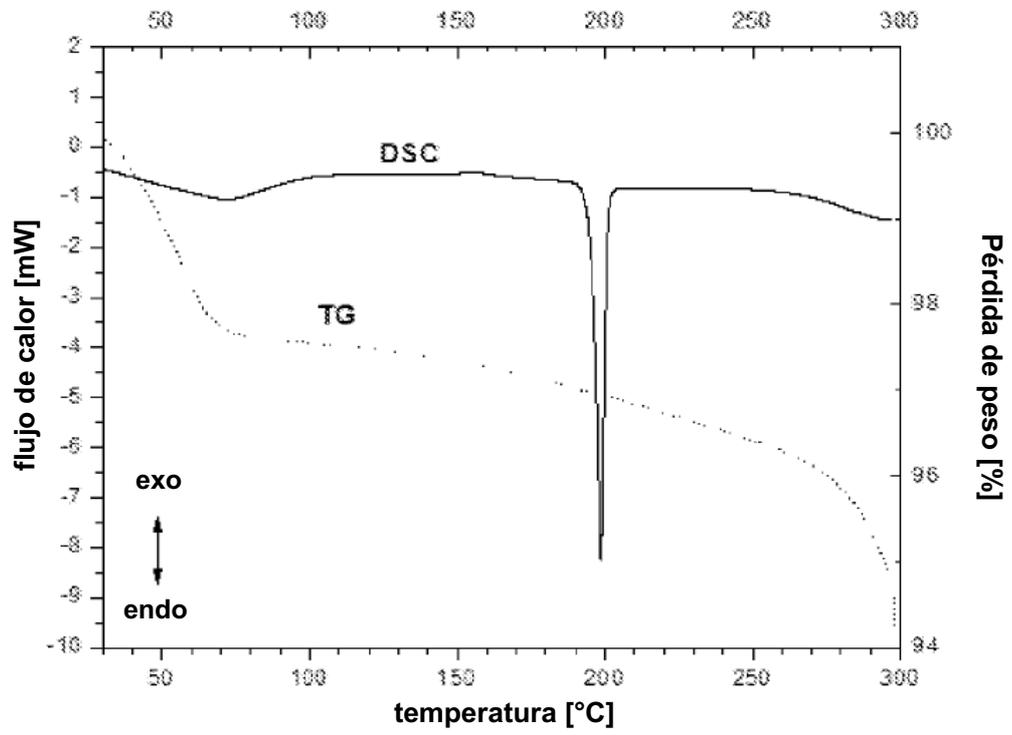


Figura 13

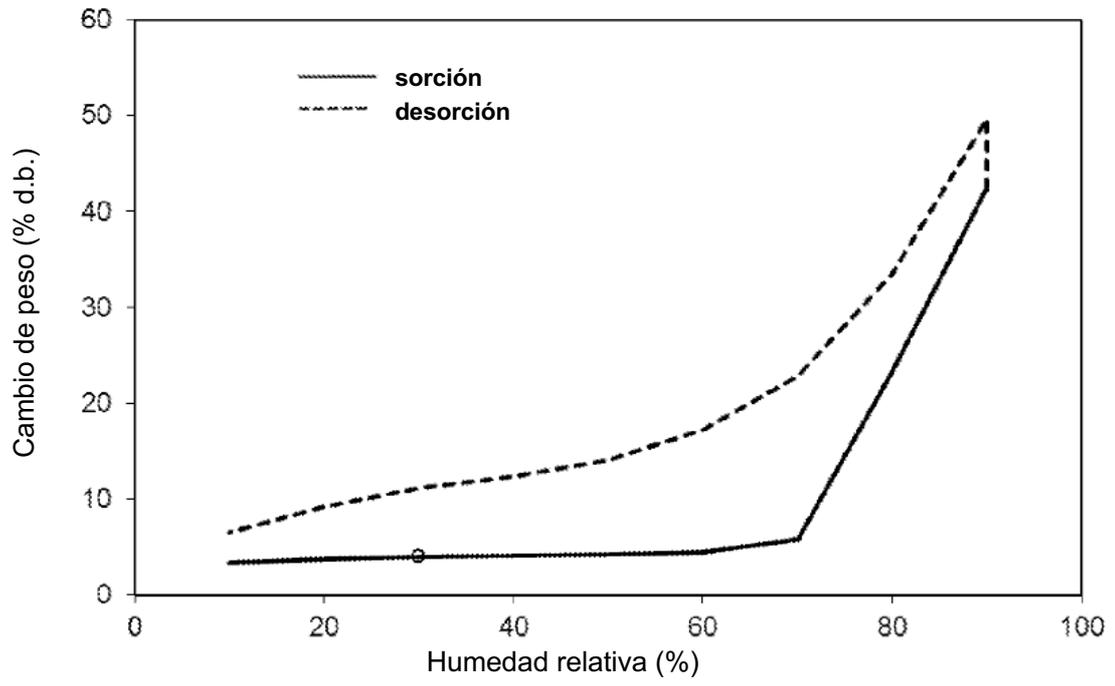


Figura 14

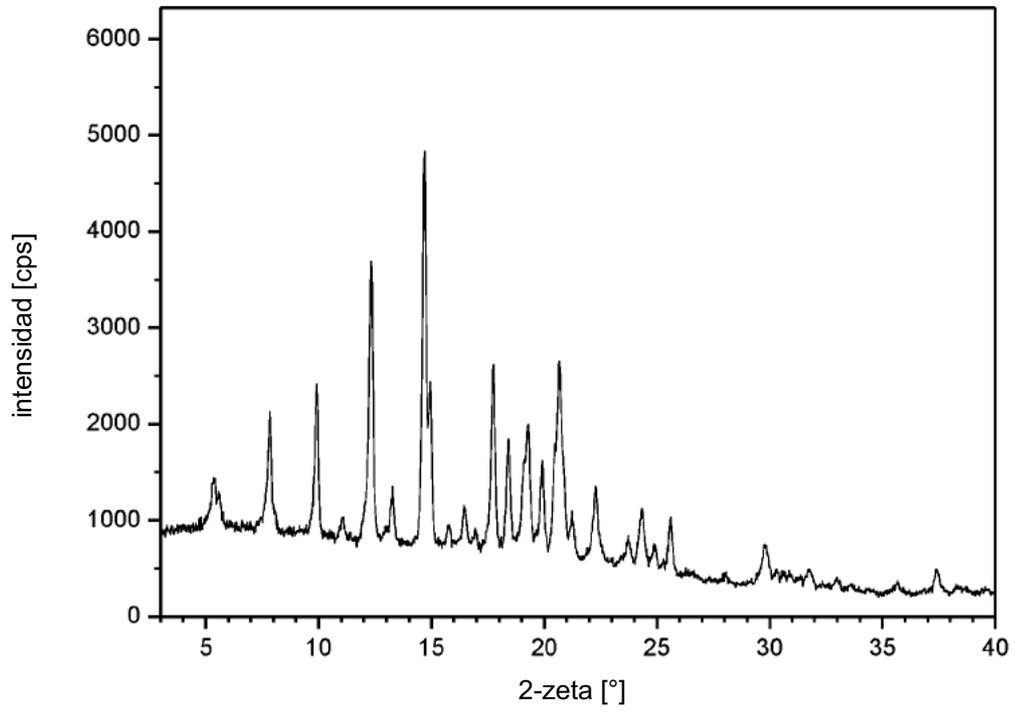


Figura 15

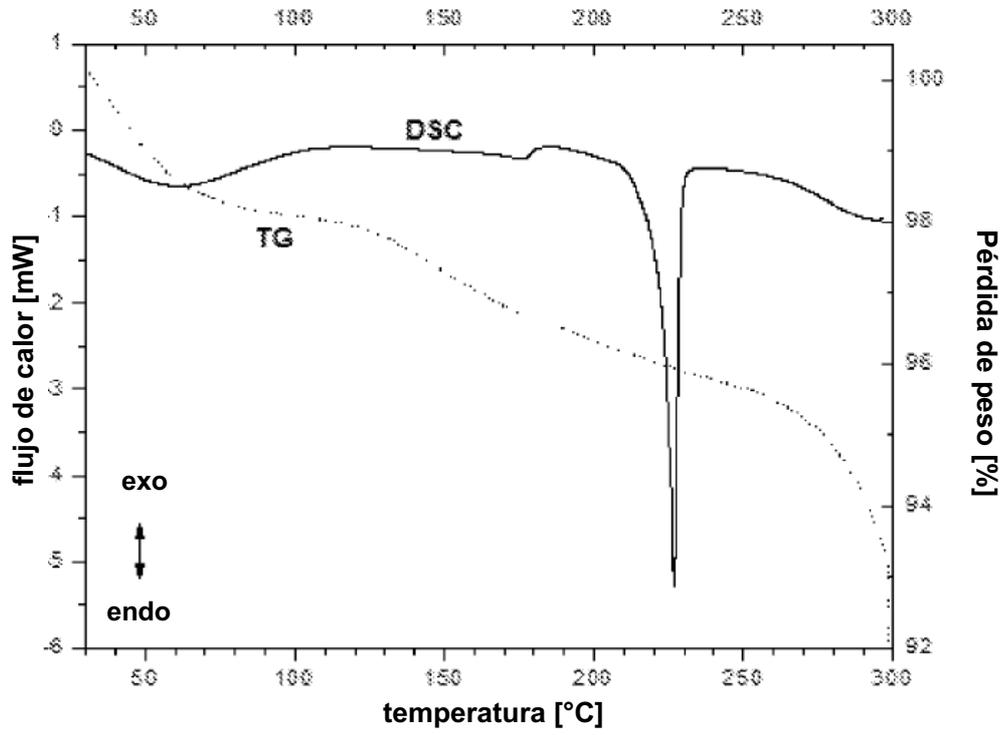
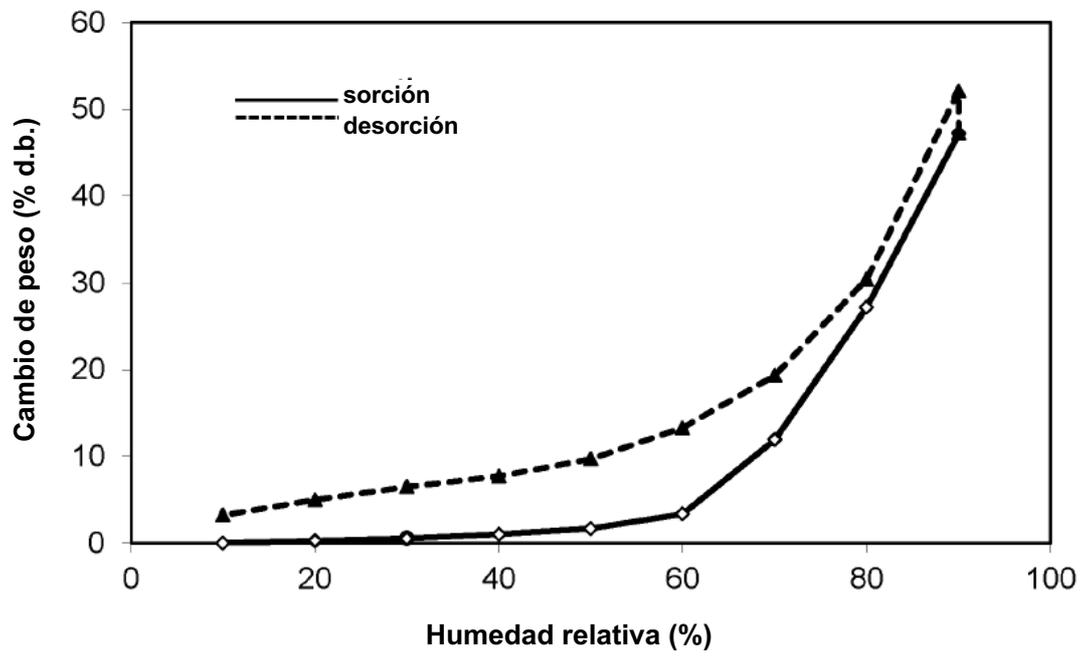


Figura 16



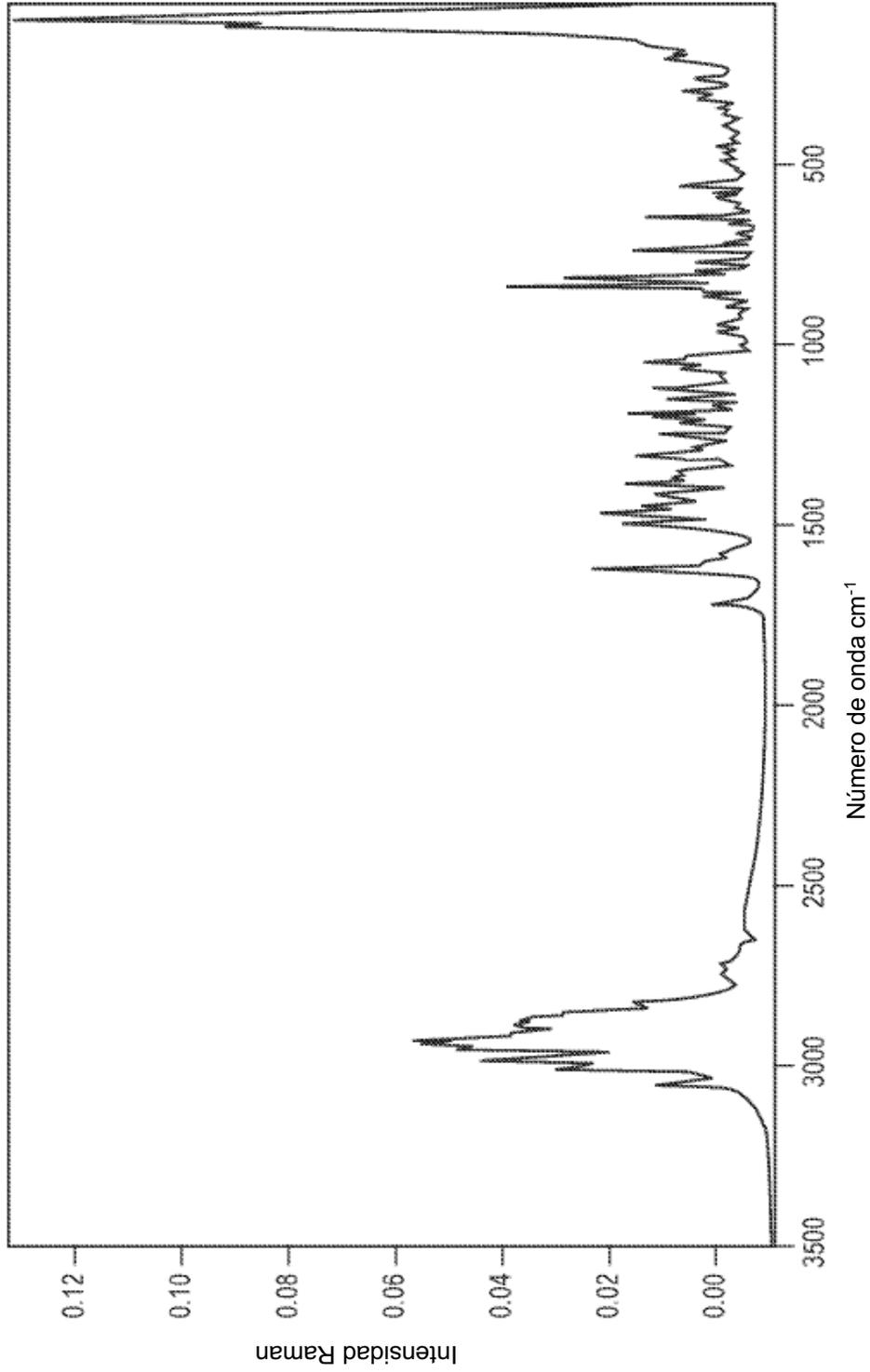


Figura 17

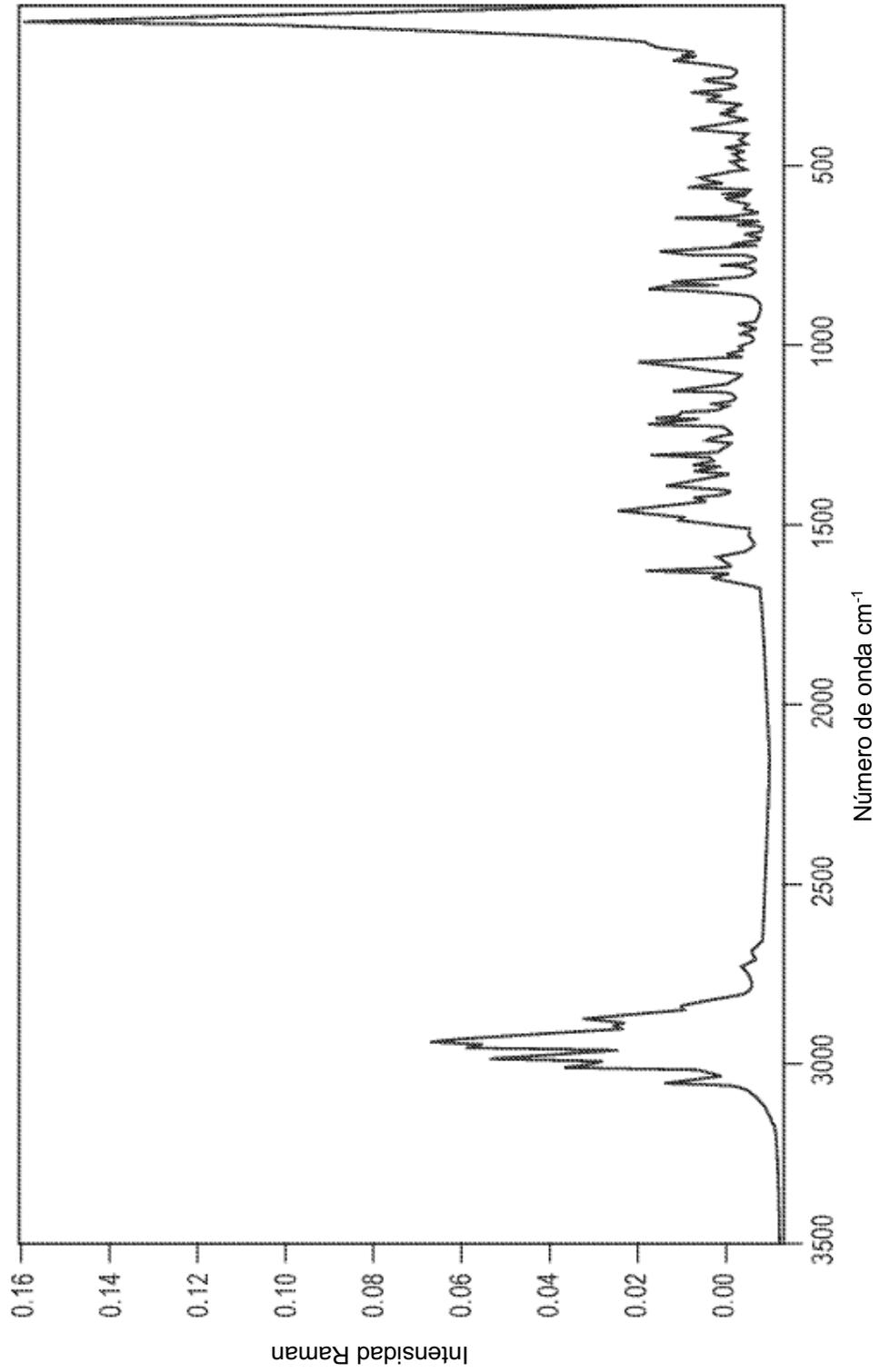


Figura 18