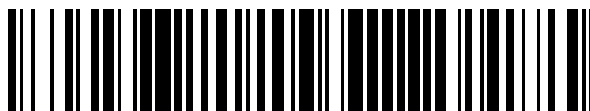


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 977**

51 Int. Cl.:

C07D 403/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2012** **E 18191088 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020** **EP 3461820**

54 Título: **Método para obtener cristales de sal de meglumina de ácido 1-(5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-pirazol-4-carboxílico**

30 Prioridad:

25.10.2011 US 201161551395 P

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

14.04.2021

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE

72 Inventor/es:

SEPASSI, KIA y
RIZZOLIO, MICHELE C.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 818 977 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

Método para obtener cristales de sal de meglumina de ácido 1-(5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-pirazol-4-carboxílico

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención está dirigida a la sal de meglumina de ácido 1-(5,6-dicloro-1H-benzo[d]imidazol-2-il)-1H-pirazol-4-carboxílico y métodos relacionados de fabricación.

ANTECEDENTES

Una familia de enzimas prolil hidroxilasa (PHD) dependientes de oxígeno, hierro y 2-oxoglutarato altamente conservadas median la respuesta de las células a la hipoxia a través de la modificación post-traslacional de factores inducibles de hipoxia (HIF) (Ivan et al., 2001, Science, 292:464-68; Jaakkola et al., 2001, Science, 292:468-72). Bajo condiciones de normoxia, la PHD cataliza la hidroxilación de dos residuos de prolina conservados dentro de HIF. Como la afinidad de la PHD para el oxígeno está dentro del intervalo fisiológico del oxígeno y el oxígeno es un co-factor necesario para modificar HIF hidroxilados, la PHD se inactiva cuando se reduce la tensión de oxígeno. De esta manera, el HIF es degradado rápidamente bajo condiciones de normoxia pero se acumula en células bajo condiciones de hipoxia o cuando se inhibe la PHD.

Se han descrito cuatro isotipos de PHD: PHD1, PHD2, PHD3 y PHD4 (Epstein et al., 2001, Cell, 107:43-54; Kaelin, 2005, Annu Rev Biochem., 74:115-28; Schmid et al., 2004, J Cell Mol Med., 8:423-31). Los diferentes isotipos se expresan ubicuamente pero se regulan diferencialmente y tienen distintos papeles fisiológicos en la respuesta celular a la hipoxia. Hay evidencia de que los varios isotipos tienen diferente selectividad para los tres subtipos diferentes de HIF- α (Epstein et al., anteriormente). En términos de localización celular, la PHD1 es principalmente nuclear, la PHD2 es principalmente citoplásmica y la PHD3 parece ser tanto citoplásmica como nuclear (Metzen E, et al. 2003, J Cell Sci., 116(7):1319-26). La PHD2 parece ser la HIF- α prolil hidroxilasa predominante bajo condiciones de normoxia (Ivan et al., 2002, Proc Natl Acad Sci. USA, 99(21):13459-64; Berra et al., 2003, EMBO J., 22:4082-90). Los tres isotipos tienen un alto grado de homología de aminoácidos y el sitio activo del enzima está altamente conservado.

La disrupción dirigida de la actividad de la enzima PHD por moléculas pequeñas tiene utilidad potencial en el tratamiento de trastornos de detección y distribución de oxígeno. Los ejemplos incluyen, pero no están limitados a: anemia; anemia falciforme; enfermedad vascular periférica; enfermedad de la arteria coronaria; insuficiencia cardíaca; protección del tejido de isquemia en condiciones como la isquemia miocárdica, infarto de miocardio y derrame cerebral; preservación de órganos para trasplante; tratamiento de la isquemia de los tejidos mediante la regulación y/o restauración del flujo sanguíneo, suministro de oxígeno y/o utilización de energía; aceleración de la curación de heridas en particular en pacientes diabéticos y ancianos; tratamiento de quemaduras; tratamiento de infecciones; curación del hueso y crecimiento del hueso. Además, la disrupción dirigida de la PHD se espera que tenga utilidad en el tratamiento de trastornos metabólicos como la diabetes, obesidad, colitis ulcerativa, enfermedad inflamatoria del intestino y trastornos relacionados como enfermedad de Crohn. (Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery, 2009, 3:1-16).

El HIF ha demostrado ser el factor transcripcional principal que lleva a la producción de eritropoyetina aumentada bajo condiciones de hipoxia (Wang et al., 1993, anteriormente). Aunque el tratamiento con eritropoyetina humana recombinante ha demostrado ser un método eficaz para tratar la anemia, la inhibición de PHD mediada por células pequeñas puede esperarse que ofrezca ventajas sobre el tratamiento con eritropoyetina. Específicamente, la función de otros productos de genes de HIF es necesaria para la hematopoyesis y la regulación de estos factores aumenta la eficacia de la hematopoyesis. Ejemplos de productos de genes diana de HIF que son críticos para la hematopoyesis incluyen: transferrina (Rolfs et al., 1997, J Biol Chem., 272(32):20055-62), receptor de transferrina (Lok et al., 1999, J Biol Chem., 274(34):24147-52; Tacchini et al., 1999, J Biol Chem., 274(34):24142-46) y ceruloplasmina (Mukhopadhyay et al., 2000, J Biol Chem., 275(28):21048-54). La expresión de hepcidina también es suprimida por HIF (Peyssonnaud et al., 2007, J Clin Invest., 117(7):1926-32) y los inhibidores de moléculas pequeñas de PHD han demostrado reducir la producción de hepcidina (Braliou et al., 2008, J Hepatol., 48:801-10). La hepcidina es un regulador negativo de la disponibilidad de hierro que es necesario para la hematopoyesis, por lo que una reducción en la producción de hepcidina se espera que sea beneficiosa para el tratamiento de la anemia. La inhibición de PHD puede ser también útil cuando se usa en conjunción con otros tratamientos para la anemia incluyendo suplementos de hierro y/o eritropoyetina exógena. Los estudios de mutaciones en el gen PHD2 que tienen lugar de forma natural en la población humana proporcionan evidencia adicional para el uso de inhibidores de PHD para tratar la anemia. Dos informes recientes han demostrado que los pacientes con mutaciones disfuncionales en el gen PHD2 muestran eritrocitosis aumentada y hemoglobina en sangre elevada (Percy et al., 2007, PNAS, 103(3):654-59; Al-Sheikh et al., 2008, Blood Cells Mol Dis., 40:160-65). Además, se ha evaluado un inhibidor de PHD de moléculas pequeñas en voluntarios sanos y pacientes con enfermedad renal crónica (Solicitud de Patente U.S. N° US2006/0276477, 7 de diciembre del 2006). La eritropoyetina en plasma aumentó de una manera

dependiente de la dosis y las concentraciones de hemoglobina en sangre aumentaron en los pacientes con enfermedad renal crónica.

La acumulación total de HIF bajo condiciones de hipoxia gobierna una sobre-regulación adaptativa de glicolisis, una reducción en la fosforilación oxidante resultando en una reducción en la producción de peróxido y superóxido de hidrógeno, la optimización de la fosforilación oxidativa protegiendo las células contra daño isquémico. Por lo tanto, se espera que los inhibidores de PHD sean útiles en la conservación del trasplante de tejidos y órganos (Bernhardt et al., 2007, *Methods Enzymol.*, 435:221-45). Aunque se puede conseguir beneficio administrando inhibidores de PHD antes de recolectar los órganos para el trasplante, la administración de un inhibidor a un órgano/tejido después de la recolección, ya sea en almacenamiento (por ejemplo solución de cardioplejía) o después del trasplante, puede ser también de beneficio terapéutico.

Se espera que los inhibidores de PHD sean eficaces conservando el tejido de isquemia y/o hipoxia regional. Esto incluye isquemia/hipoxia asociada con entre otros: angina, isquemia de miocardio, derrame cerebral, isquemia del músculo esquelético. Recientemente, el pre-condicionamiento isquémico ha demostrado ser un fenómeno dependiente de HIF (Cai et al., 2008, *Cardiovasc Res.*, 77(3):463-70). Aunque el concepto de pre-condicionamiento es más conocido por sus efectos protectores en el corazón, también se aplica a otros tejidos incluyendo, pero no limitado a: hígado, músculo esquelético, hígado, pulmón, riñón, intestino y cerebro (Pasupathy et al., 2005, *Eur J Vasc Endovasc Surg.*, 29:106-15; Mallick et al., 2004, *Dig Dis Sci.*, 49(9):1359-77). Se ha obtenido evidencia experimental para los efectos protectores del tejido de la inhibición de PHD y la elevación de HIF en una variedad de modelos animales incluyendo: bloqueo de la expresión de la línea germinal de PHD1 que confirió protección del músculo esquelético del ataque isquémico (Aragonés et al., 2008, *Nat Genet.*, 40(2):170-80), silenciamiento de PHD2 a través del uso de ARNsi que protegió el corazón de ataque isquémico (Natarajan et al., 2006, *Circ Res.*, 98(1):133-40), inhibición de PHD por la administración de monóxido de carbono que protegió el miocardio de lesión isquémica (Chin et al., 2007, *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.*, 104(12):5109-14), hipoxia en el cerebro que aumentó la tolerancia a la isquemia (Bernaudin et al., 2002, *J Cereb Blood Flow Metab.*, 22(4):393-403). Además, los inhibidores de moléculas pequeñas de PHD protegen el cerebro en modelos de derrame cerebral (Siddiq et al., 2005, *J Biol Chem.*, 280(50):41732-43). Además, la sobre-regulación de HIF también ha demostrado que protege el corazón de ratones diabéticos, donde los resultados son generalmente peores (Natarajan et al., 2008, *J Cardiovasc Pharmacol.*, 51(2):178-187). Los efectos protectores del tejido también pueden observarse en la enfermedad de Buerger, la enfermedad de Raynaud y en la acrocianosis.

La dependencia reducida en el metabolismo aeróbico a través del ciclo de Krebs en la mitocondria y la dependencia aumentada en la glicólisis anaeróbica producida por la inhibición de PHD puede tener efectos beneficiosos en tejidos de normoxia. Es importante señalar que la inhibición de PHD también ha demostrado que eleva el HIF bajo condiciones de normoxia. Así, la inhibición de PHD produce una pseudohipoxia asociada con la respuesta de hipoxia que se inicia a través del HIF pero con la oxigenación del tejido permaneciendo normal. Puede esperarse también que la alteración del metabolismo producida por la inhibición de PHD proporcione un paradigma de tratamiento para la diabetes, obesidad y trastornos relacionados, incluyendo comorbilidades.

Globalmente, la acumulación de cambios en la expresión de los genes producida por la inhibición de PHD reduce la cantidad de energía generada por unidad de glucosa y estimulará el cuerpo para que queme más grasas para mantener el equilibrio energético. Los mecanismos para el aumento en la glicólisis se tratan con anterioridad. Otras observaciones ligan la respuesta de hipoxia con los efectos que se espera sean beneficiosos para el tratamiento de la diabetes y la obesidad. La hipoxia y los miméticos de hipoxia como la deferroxamina han demostrado que evitan la diferenciación de adipocitos (Lin et al., 2006, *J Biol Chem.*, 281(41):30678-83; Carrière et al., 2004, *J Biol Chem.*, 279(39):40462-69). La inhibición de la actividad de PHD durante las etapas iniciales de la adipogénesis inhibe la formación de nuevos adipocitos (Floyd et al., 2007, *J Cell Biochem.*, 101:1545-57). La hipoxia, el cloruro de cobalto y la deferroxamina elevaron el HIF e inhibieron la transcripción del receptor de la hormona nuclear PPAR gamma 2 (Yun et al., 2002, *Dev Cell.*, 2:331-41). Como la PPAR gamma 2 es una señal importante para la diferenciación de adipocitos, puede esperarse que la inhibición de PHD que inhiba la diferenciación de adipocitos. Se demostró que estos efectos estaban mediados por el gen regulado por HIF DEC1/Stra13 (Yun et al., anteriormente).

Los inhibidores moleculares pequeños de PHD han demostrado que tienen efectos beneficiosos en los modelos animales de diabetes y obesidad (Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO2004/052284, 24 de Junio del 2004; WO2004/052285, 24 de Junio del 2004). Entre los efectos demostrados por los inhibidores de PHD en obesidad inducida por dieta en ratones, modelos de ratón db/db y de rata fa/fa de Zucker estaban la disminución de: concentración de glucosa en sangre, masa de grasa en tanto las bolsas de grasa abdominales como viscerales, hemoglobina A1c, triglicéridos en plasma, peso corporal así como cambios en los biomarcadores de la enfermedad establecida como aumentos en los niveles de adrenomedulina y leptina. La leptina es un producto del gen diana HIF conocido (Grosfeld et al., 2002, *J Biol Chem.*, 277(45):42953-57). Se demostró que los productos de los genes implicados en el metabolismo en células grasas estaban regulados por la inhibición de PHD de una manera dependiente de HIF (Intl. Pat. App. Pub. No. WO2004/052285, anteriormente). Estos incluyen la apolipoproteína A-IV, acilo CoA tioesterasa, carnitina acetil transferasa, y la proteína de enlace del factor de

crecimiento tipo insulina (IGFBP)-1.

Se espera que los inhibidores de PHD sean terapéuticamente útiles como estimulantes de la vasculogénesis, la angiogénesis y la arteriogénesis. Estos procesos establecen o restauran el flujo sanguíneo y la oxigenación a los tejidos con isquemia y/o condiciones de hipoxia (Semenza et al., 2007, *J Cell Biochem.*, 102:840-47; Semenza, 2007, *Exp Physiol.*, 92(6):988-91). Se ha demostrado que el ejercicio físico aumenta el HIF-1 y el factor de crecimiento endotelial vascular en modelos animales experimentales y en humanos (Gustafsson et al. 2001, *Front Biosci.*, 6:D75-89) y consecuentemente el número de vasos sanguíneos en el músculo esquelético. El VEGF es un producto génico diana de HIF bien conocido que es un factor clave de la angiogénesis (Liu et al., anteriormente). La inhibición de PHD ofrece una ventaja potencial sobre las terapias angiogénicas ya que estimula una expresión controlada de múltiples factores de crecimiento angiogénicos de una manera dependiente de HIF incluyendo, pero no limitado a: factor de crecimiento placentario (PLGF), angiopoyetina-1 (ANGPT1), angiopoyetina-2 (ANGPT2), factor de crecimiento beta derivado de plaquetas (PDGFB) (Carmeliet, 2004, *J Intern Med.*, 255:538-61; Kelly et al., 2003, *Circ Res.*, 93:1074-81) y factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1) (Ceradini et al., 2004, *Nat Med.*, 10(8):858-64). La expresión de la angiopoyetina-1 durante la angiogénesis produce vasos sanguíneos resistentes a fugas, al contrario que los vasos producidos por la administración de VEGF solamente (Thurston et al., 1999, *Science*, 286:2511-14; Thurston et al., 2000, *Nat Med.*, 6(4):460-3; Elson et al., 2001, *Genes Dev.*, 15(19):2520-32). El factor 1 derivado de células del estroma (SDF-1) ha demostrado ser crítico para el proceso de reclutamiento de células progenitoras endoteliales en los sitios de lesión del tejido. La expresión de SDF-1 aumentó la adhesión, migración y fijación de las células progenitoras CXCR4-positivas circulantes con el tejido isquémico. Además la inhibición de SDF-1 en tejido isquémico o bloqueo de CXCR4 en células circulantes evita el reclutamiento de células progenitoras a sitios de lesión (Ceradini et al., 2004, *supra*; Ceradini et al., 2005, *Trends Cardiovasc Med.*, 15(2):57-63). De manera importante, el reclutamiento de células progenitoras endoteliales en sitios de lesión se reduce en ratones viejos y esto se corrige por intervenciones que aumentan el HIF en el sitio de la lesión (Chang et al., 2007, *Circulation*, 116(24):2818-29). La inhibición de PHD ofrece la ventaja de no solo aumentar la expresión de una variedad de facciones angiogénicas si no también una coordinación en su expresión a lo largo del proceso de angiogénesis y reclutamiento de células progenitoras endoteliales en tejido isquémico.

Los inhibidores de PHD son útiles en terapias pro-angiogénicas también. Se ha demostrado que la sobreexpresión mediada por adenovirus de HIF induce la angiogénesis en tejido no isquémico de un animal adulto (Kelly et al., 2003, *Circ Res.*, 93(11):1074-81) proporcionando evidencia de que las terapias que elevan el HIF, como la inhibición de PHD, inducirán la angiogénesis. El factor de crecimiento placentario (PLGF), también tiene un gen diana HIF, que ha demostrado que juega un papel crítico en la angiogénesis en tejido isquémico (Carmeliet, 2004, *J Intern Med.*, 255(5):538-61; Luttun et al., 2002, *Ann N Y Acad Sci.*, 979:80-93). Se han demostrado los potentes efectos pro-angiogénicos de terapias que elevan el HIF, a través de la sobreexpresión de HIF, en músculo esquelético (Pajusola et al., 2005, *FASEB J.*, 19(10):1365-7; Vincent et al., 2000, *Circulation*, 102:2255-61) y en el miocardio (Shyu et al., 2002, *Cardiovasc Res.*, 54:576-83). También se ha demostrado el reclutamiento de células progenitoras endoteliales al miocardio isquémico por el gen diana HIF SDF-1 (Abbott et al., 2004, *Circulation*, 110(21):3300-05). Por lo tanto, los inhibidores de PHD serán probablemente eficaces para estimular la angiogénesis en el establecimiento de isquemia del tejido, particularmente isquemia del músculo. La angiogénesis terapéutica producida por inhibidores de PHD llevará probablemente a restaurar el flujo sanguíneo a tejidos y por lo tanto mejorará dichas enfermedades como, pero no limitado a, angina de pecho, isquemia e infarto de miocardio, enfermedad isquémica periférica, claudicación, úlceras gástricas y duodenales, colitis ulcerosa, y enfermedad inflamatoria intestinal.

La PHD y el HIF juegan un papel central en la reparación y regeneración del tejido incluyendo la curación de heridas y úlceras. Estudios recientes han demostrado que una expresión aumentada de los tres PHDs en los sitios de heridas en ratones viejos con una reducción resultante en la acumulación de HIF (Chang et al., anteriormente). Por lo tanto, la elevación de HIF en ratones viejos administrando deferoxamina aumentó el grado de curación de heridas de vuelta a los niveles observado en ratones jóvenes. De manera similar, en un modelo de ratones diabéticos, la elevación de HIF se suprimió en comparación con compañeros de camada no diabéticos (Mace et al., 2007, *Wound Repair Regen.*, 15(5):636-45). La administración tópica de cloruro de cobalto, una mimético de la hipoxia, o sobreexpresión de un HIF murino que carece del dominio de degradación dependiente del oxígeno y por lo tanto proporciona una forma constituyentemente activa de HIF, resultó en HIF aumentado en el sitio de la herida, expresión aumentada de Genes diana HIF como VEGF, Nos2 y Hmox1 y curación de la herida acelerada. El efecto beneficioso de la inhibición de PHD no está restringido a la piel y los inhibidores de moléculas pequeñas de PHD han demostrado recientemente que proporcionan beneficios en un modelo de ratón de colitis (Robinson et al., 2008, *Gastroenterology*, 134(1):145-55).

En resumen, la inhibición de PHD resultante en la acumulación de HIF actúa probablemente por al menos cuatro mecanismos para contribuir a la curación de heridas acelerada y más completa: 1) protección del tejido comprometido por la hipoxia y/o isquemia, 2) estimulación de angiogénesis para establecer o restaurar el flujo sanguíneo apropiado al sitio, 3) reclutamiento de células progenitoras endoteliales a los sitios de herida, 4) estimulación de la liberación de factores de crecimiento que estimulan específicamente la curación y la regeneración.

Como el PDGF es una diana génica HIF (Schultz et al., 2006, Am J Physiol Heart Circ Physiol., 290(6):H2528-34; Yoshida et al., 2006, J Neurooncol., 76(1):13-21), la inhibición de PHD aumenta probablemente la expresión de PDGF endógeno y produce un efecto similar o más beneficiosos que los producidos sólo con PDGF. Los estudios en animales han demostrado que la aplicación tópica de PDGF resulta en cantidades de ADN, proteína e hidroxiprolina en la herida aumentadas; formación de granulación y tejido epidérmico más gruesos; y repoblación celular aumentada de los sitios de heridas. El PDGF ejerce un efecto local en la potenciación de la formación de nuevo tejido conector. La eficacia de la inhibición de PHD es probablemente mayor que la producida por el PDGF debido a los efectos pro-angiogénicos y protectores del tejido adicional mediados por HIF.

Los efectos beneficiosos de la inhibición de PHD se extiende no sólo a la curación de heridas acelerada en la piel y el colon sino también a la curación de otro daño tisular incluyendo pero no limitado a úlceras gastrointestinales, reemplazos de injertos de piel, quemaduras, heridas crónicas y quemaduras por congelación.

Se han encontrado células madre y células progenitoras en nichos de hipoxia dentro del cuerpo y la hipoxia regula su diferenciación y destino celular (Simon et al., 2008, Nat Rev Mol Cell Biol., 9:285-96). Por lo tanto, los inhibidores de PHD pueden ser útiles para mantener las células madre y las células progenitoras en un estado pluripotente y para conducir la diferenciación a los tipos de células deseados. Las células madre pueden ser útiles en el cultivo y expansión de poblaciones de células madre y pueden mantener las células en un estado pluripotente mientras se administran hormonas y otros factores a las células para influir en la diferenciación y el destino celular.

Un uso adicional de los inhibidores de PHD en el área de agentes terapéuticos de células madre y células progenitoras se refiere al uso de inhibidores de PHD para condicionar a estas células para que resistan el proceso de implantación en el cuerpo y para generar una respuesta apropiada del cuerpo para hacer la implantación de células madre y células progenitoras viable (Hu et al., 2008, J Thorac Cardiovasc Surg., 135(4):799-808). Más específicamente los inhibidores de PHD pueden facilitar la integración de células madre y extraerlas en un suministro de sangre apropiado para mantener a las células madre una vez que se han integrado. Esta formación de vasos sanguíneos también funcionará para llevar hormonas y otros factores liberados de estas células al resto del cuerpo.

Los inhibidores de PHD también pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones (Peyssonnaud et al., 2005, J Invest Dermatol., 115(7):1806-15; Peyssonnaud et al., 2008 J Invest Dermatol., 2008 Aug;128(8):1964-8). Se ha demostrado que la elevación de HIF aumenta la respuesta inmune innata a la infección en fagocitos y queratinocitos. Los fagocitos en los que el HIF es elevado muestran actividad bactericida aumentada, producción de óxido nítrico aumentada y expresión aumentada de catelicidina péptida antibacteriana. Estos efectos pueden ser útiles para tratar infecciones de quemaduras.

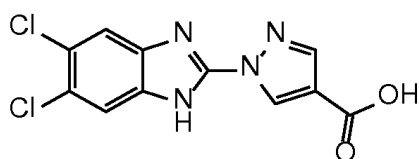
El HIF también ha demostrado estar implicado en el crecimiento y curación óseos (Pfander D et al., 2003 J Cell Sci., 116(Pt 9):1819-26., Wang et al., 2007 J Clin Invest., 117(6):1616-26.) y puede usarse por lo tanto para curar o evitar fracturas. El HIF estimula la glicólisis para proporcionar energía para permitir la síntesis de la matriz extracelular de condrocitos epiteliales bajo un ambiente de hipoxia. El HIF también juega un papel en conducir la liberación de VEGF y angiogénesis en el proceso de curación ósea. El crecimiento de vasos sanguíneos en el crecimiento o curación del hueso puede ser la etapa de limitación de la velocidad en el proceso.

Los inhibidores de moléculas pequeñas de PHD se han descrito en la bibliografía, que incluyen, pero no están limitados a, derivados de imidazo[1,2-a]piridina (Warshakoon et al., 2006, Bioorg Med Chem Lett., 16(21):5598-601), derivados de piridina sustituidos (Warshakoon et al., 2006, Bioorg Med Chem Lett., 16(21):5616-20), pirazolopiridinas (Warshakoon et al., 2006, Bioorg Med Chem Lett., 16(21):5687-90), derivados de clicina N-sustituidos heteroaromáticos bicíclicos (Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO2007/103905, 13 de Septiembre del 2007), compuestos basados en quinolina (Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO2007/070359, 21 de Junio del 2007), derivados de glicina N-sustituidos de pirimidinetrióna (Publicación de Solicitud de Patente Internacional WO2007/150011, 27 de Diciembre del 2007), compuestos de amida de arilo o heteroarilo sustituidos (Publicación de Solicitud de Patente U.S. N° US2007/0299086, 27 de Diciembre del 2007) y 4-hidroxipirimidina-5-carboxamidas sustituidas (Publicación de Solicitud de Patente Internacional, 24 de Septiembre del 2009).

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención está dirigida a las realizaciones generales y preferidas definidas, como se expone en la presente. Las características preferidas y ejemplares de la invención serán aparentes a partir de la descripción detallada siguiente y con referencia a las figuras de los dibujos.

Las realizaciones de la presente invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas. En una realización, la presente invención proporciona un método para obtener cristales de una sal de meglumina de un compuesto de fórmula I



(I),

el método comprendiendo:

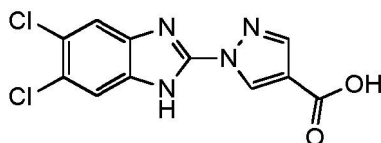
formar una solución que comprende un ácido libre de un compuesto de fórmula I, meglumina, y alcohol acuoso;
calentar la solución; y

- (a) agitar la solución a temperatura ambiente con sembrado, o
- (b) enfriar la solución bajo refrigeración con o sin sembrado,

para obtener cristales de la sal de meglumina de un compuesto de fórmula I;
en donde el alcohol acuoso comprende metanol acuoso o etanol acuoso.

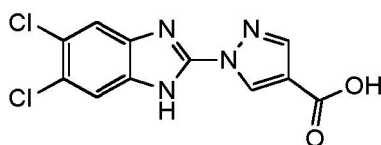
En sus muchos aspectos, la presente divulgación se refiere a una nueva sal de un inhibidor de enzimas de prolilhidroxilasa (PHD) y un método de tratamiento, prevención, inhibición o mejora de uno o más trastornos de enfermedades asociados con las enzimas de PHD.

Más particularmente, la presente divulgación se refiere a la sal de meglumina de un compuesto de la fórmula siguiente:



compuesto (1)

Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos para la preparación o fabricación de la sal de meglumina de un compuesto de la fórmula siguiente:



compuesto (1)

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a forma hidratada de la la sal de meglumina del compuesto (1).

Realizaciones y ventajas adicionales de la invención serán aparentes del análisis detallado, esquemas, ejemplos y reivindicaciones siguientes.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la dependencia del pH de la saturación del compuesto (1) en la solución.

La Figura 2 muestra los datos de PXRD de la sal de meglumina del compuesto (1).

La Figura 3 muestra los datos de DSC, TGA y rayos x de la sal de meglumina del compuesto (1).

La Figura 4 muestra: (A) la estructura de cristal única de la sal de meglumina del compuesto (1); y (B) el patrón de polvo experimental y estimulado de un cristal único para la sal de meglumina del compuesto (1).

La Figura 5 muestra la estimulación del porcentaje de HIF1- α tras la exposición a formulaciones de sal de meglumina del compuesto (1).

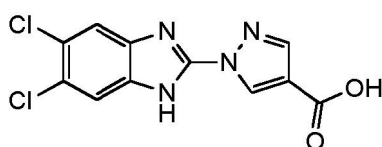
La Figura 6 muestra los niveles de plasma (carga sistémica) en ratones heridos después de la aplicación tópica de formulaciones de la sal de meglumina del compuesto (1).

La Figura 7 muestra la correlación del flujo del compuesto (1) a través de la piel (dermis humana) y una membrana artificial usando una célula de difusión de Franz tras la aplicación de una formulación de sal de meglumina del compuesto (1).

La Figura 8 muestra irritación no muy baja provocada por la aplicación de una formulación de la sal de meglumina del compuesto (1) como se probó en un ensayo HET-CAM.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Esta divulgación se refiere a una nueva sal de un compuesto de la fórmula siguiente:



compuesto (1)

que es un inhibidor de enzimas prolilhidroxilasa (PHD), y composiciones de las mismas para el tratamiento, mejora o inhibición de trastornos y enfermedades relacionadas con la modulación de un enzima prolil hidroxilasa. La presente invención también se refiere a métodos para elaborar dicho compuesto, composiciones farmacéuticas, sales farmacéuticamente aceptables, profármacos farmacéuticamente aceptables, y metabolitos farmacéuticamente activos del mismo.

A) Términos

La presente invención se entiende mejor con referencia a las definiciones siguientes, los dibujos y la divulgación ejemplar proporcionada en la presente.

Los términos "**comprende**", "**contiene**" e "**incluye**", se usan en la presente en su sentido abierto, no limitativo.

"**Administrar**" o "**administración**" significa proporcionar un fármaco a un paciente de una manera que es farmacéuticamente útil.

"**Composición**" significa un producto que contiene un compuesto de la presente divulgación (como un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de dichas combinaciones de los ingredientes especificados en las cantidades especificadas).

"**Compuesto**" o "**fármaco**" significa un compuesto de Fórmula (1) o formas farmacéuticamente aceptables del mismo.

"**Formas**" significa varios isómeros y mezclas de uno o más compuestos de Fórmula (1) y sales o hidratos de los mismos. El término "**isómero**" se refiere a compuestos que tienen la misma composición y peso molecular pero difieren en las propiedades físicas y/o químicas. Dichas sustancias tienen el mismo número y tipo de átomos pero difieren en la estructura. La diferencia estructural puede ser en la constitución (isómeros geométricos) o en la capacidad de rotar el plano de luz polarizada (estereoisómeros). El término "**estereoisómero**" se refiere a isómeros de constitución idéntica que difieren en la disposición de sus átomos en el espacio. Los enantiómeros y diastereómeros son estereoisómeros en los que un átomo de carbono asimétricamente sustituido actúa como un centro quiral. El término "**quiral**" se refiere a una molécula que no es superponible en su imagen espejo, implicando la ausencia de un eje y un plano o centro de simetría.

El término "**hipoxia**" o "**trastorno hipóxico**" se refiere a una afección en la que no hay suficiente nivel de oxígeno proporcionado en la sangre o a los tejidos y órganos. Los trastornos hipóxicos pueden tener lugar a través de una variedad de mecanismos incluyendo cuando no hay suficiente capacidad de la sangre para transportar oxígenos (es decir anemia), cuando hay un flujo inadecuado de sangre al tejido y/o órgano provocado por o fallo cardíaco o por bloqueo de los vasos y/o arterias sanguíneas (es decir isquemia), cuando hay presión barométrica

reducida (es decir, enfermedad de altura a altitudes altas) o cuando las células disfuncionales son incapaces de hacer uso del oxígeno apropiadamente (es decir, condiciones histotóxicas). Por consiguiente, alguien experto en la técnica apreciará fácilmente que la presente invención es útil en el tratamiento de una variedad de condiciones de hipoxia incluyendo anemia, fallo cardíaco, enfermedad arterial coronaria, tromboembolia, derrame cerebral, angina de pecho y similares.

"Paciente" o **"sujeto"** significa un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un humano con necesidad de intervención terapéutica.

"Farmacéuticamente aceptable" significa entidades y composiciones moleculares que son de pureza y calidad suficientes para su uso en la formulación de una composición o medicamento de la presente invención. Como tanto el uso humano (clínico como sin receta) como el veterinario están igualmente incluidos dentro del alcance de la presente invención, una formulación incluirá una composición o medicamento para uso o humano o veterinario.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia que es no tóxica, biológicamente tolerable y por lo demás biológicamente adecuada para su administración a un sujeto, como una sustancia inerte, añadida a una composición farmacéutica o usada de otra manera como un vehículo, portador o diluyente para facilitar la administración de un agente y que es compatible con el mismo. Ejemplos de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales, y polietilenglicoles.

"Sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de ácido o base de los compuestos de la divulgación que es de pureza y calidad suficientes para su uso en la formulación de una composición o medicamento de la presente divulgación y son toleradas y suficientemente no tóxicas para ser usadas en una preparación farmacéutica. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales de adición de ácido que pueden, por ejemplo, formarse haciendo reaccionar el compuesto del fármaco con un ácido farmacéuticamente aceptable adecuado como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico.

El término **"solvatos"** significa aquellos compuestos formados de la interacción o formación de complejos de dichos compuestos con una o más moléculas del solvente, ya sea en solución o en forma sólida o cristalina. El término **"hidratos"** significa solvatos, en los que el solvente es agua.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad de compuesto que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema de tejidos, animal o humano, que se está buscando por un investigador, veterinario, doctor médico u otro clínico, que incluye el alivio terapéutico de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando.

El término **"tratar"** como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de, disminuir la severidad de, o prevenir el trastorno o afección a la que dicho término se aplica, o uno o más síntomas de dicho trastorno o afección. El término **"tratamiento"**, como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, se refiere al acto de tratar.

B) Compuestos

La presente divulgación se refiere a una nueva sal del compuesto de Fórmula (1). En particular, la invención se refiere a la sal de meglumina del compuesto de Fórmula (1). En general, la divulgación se refiere a todos los compuestos que tras su administración a pacientes con necesidad de de tratamiento de trastornos o enfermedades relacionados con la modulación de una enzima prolil hidroxilasa.

Algunos aspectos de la divulgación incluyen hidratos o solvatos de tales compuestos, y mezclas de los mismos, incluso en formas que no se exponen explícitamente en la presente especificación. Preferiblemente, algunas realizaciones de las sales de meglumina de los compuestos de Fórmula (1) incluyen solvatos. Más preferiblemente, algunas realizaciones de las sales de meglumina de los compuestos de Fórmula (1) incluyen hidratos.

Otro aspecto de la divulgación incluye formas cristalinas de los compuestos de Fórmula (1) o sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de Fórmula (1) pueden obtenerse como co-cristales.

En ciertas realizaciones de la invención, los compuestos de Fórmula (1) se obtuvieron en una forma cristalina. En otras realizaciones, las formas cristalinas de los compuestos de Fórmula (1) eran de naturaleza cúbica. En otras realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de Fórmula (1) se obtuvieron en forma cristalina. En otras realizaciones más, los compuestos de Fórmula (1) se obtuvieron en una de varias formas polimórficas, como una mezcla de formas polimórficas, como una forma polimórfica, o como una forma amorfa. En

otras realizaciones, los compuestos de Fórmula (1) se convirtieron en solución entre una o más formas cristalinas y/o formas polimórficas.

Los compuestos de fármacos de la presente divulgación también incluyen una mezcla de estereoisómeros, o de cada isómero puro o sustancialmente puro. Por ejemplo, el presente compuesto puede tener opcionalmente uno o más centros asimétricos en un átomo de carbono que contiene cualquier sustituyente. Por lo tanto, el compuesto puede existir en la forma de enantiómero o diastereómero, o una mezcla de los mismos. Cuando el presente compuesto contiene un enlace doble, el presente compuesto puede existir en la forma de un isomerismo geométrico (compuesto cis, compuesto trans), y cuando el presente compuesto contiene un enlace no saturado como carbonilo, entonces el presente compuesto puede existir en la forma de un tautómero, y el presente compuesto también incluye estos isómeros o una mezcla de los mismos. El compuesto de partida en la forma de una mezcla racémica, enantiómero o diastereómero puede usarse en los procesos para preparar el presente compuesto. Cuando el presente compuesto se obtiene en la forma de un diastereómero o enantiómero, pueden separarse por un método convencional como cromatografía o cristalización fraccional. Además, el presente compuesto incluye una sal intramolecular, hidrato, solvato o polimorfismo del mismo. Los compuestos de fármacos adecuados son aquellos que ejercen un efecto fisiológico local, o un efecto sistémico, ya sea después de penetrar la mucosa, dermis o -en el caso de administración oral- después del transporte al tracto gastrointestinal con la saliva.

La divulgación se refiere además a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de Fórmula (1) y métodos de usar dichas sales. Una sal farmacéuticamente aceptable se refiere a una sal de una base o ácido libre del compuesto que es no tóxica, biológicamente tolerable, o biológicamente adecuada de otra manera para la administración al sujeto. Ver, de forma general, S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 1977, 66:1-19, y Handbook of Pharmaceutical Salts, Properties, Selection, and Use, 2002, Stahl and Wermuth, Eds., Wiley-VCH and VHCA, Zurich. Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas son aquellas que son farmacológicamente eficaces y adecuadas para el contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad, irritación o respuesta alérgica indebidas. Un compuesto puede poseer un grupo suficientemente ácido, un grupo suficientemente básico, o ambos tipos de grupos funcionales, y en consecuencia reaccionar con una serie de bases inorgánicas u orgánicas, y ácidos inorgánicos u orgánicos, para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sulfatos, piro-sulfatos, bisulfatos, sulfitos, bisulfitos, fosfatos, monohidrógeno-fosfatos, dihidrogenofosfatos, metafosfatos, pirofosfatos, cloruros, bromuros, yoduros, acetatos, propionatos, decanoatos, caprilatos, acrilatos, formatos, isobutiratos, caproatos, heptanoatos, propiolatos, oxalatos, malonatos, succinatos, suberatos, sebacatos, fumaratos, maleatos, butino-1,4-dioatos, hexino-1,6-dioatos, benzoatos, clorobenzoatos, metilbenzoatos, dinitrobenzoatos, hidroxibenzoatos, metoxibenzoatos, ftalatos, sulfonatos, xilenosulfonatos, fenilacetatos, fenilpropionatos, fenilbutiratos, citratos, lactatos, γ -hidroxibutiratos, glicolatos, tartratos, metanosulfonatos, propanosulfonatos, naftaleno-1-sulfonatos, naftaleno-2-sulfonatos y mandelatos.

En presencia de un nitrógeno básico, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse por cualquier método adecuado disponible en la técnica, por ejemplo, tratamiento de la base libre con un ácido inorgánico como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido perclórico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido nítrico, ácido bórico, ácido fosfórico y similares, o con un ácido orgánico como ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido fenilacético, ácido propiónico, ácido esteárico, ácido láctico, ácido ascórbico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido málico, ácido pantoico, ácido isetiónico, ácido succínico, ácido valérico, ácido fumárico, ácido sacarínico, ácido malónico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido glicólico, ácido salicílico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido láurico, un ácido piranosidílico como ácido glucurónico o ácido galacturónico, un ácido alfa-hidroxi, como ácido mandélico, ácido cítrico o ácido tartárico, un aminoácido como ácido aspártico o ácido glutámico, un ácido aromático como benzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido naftoico o ácido cinámico, un ácido sulfónico como ácido laurilsulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, hidroxietanosulfónico, un ácido ciclohexanosulfámico, cualquier mezcla compatible de ácidos como los dados como ejemplos en la presente, y cualquier otro ácido y mezcla de los mismos que se considere equivalente o sustituto aceptable a la luz del nivel ordinario de capacidad en esta tecnología.

En presencia de un grupo ácido, como un ácido carboxílico o ácido sulfónico, la sal farmacéuticamente aceptable deseada puede prepararse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, tratamiento del ácido libre con una base inorgánica u orgánica, como una amina (primaria, secundaria o terciaria), un hidróxido de metal alcalino, hidróxido de metal alcalinotérreo, cualquier mezcla compatible de bases como las que se dan como ejemplos en la presente, y cualquier otra base y mezcla de las mismas que se considere equivalente o sustituto aceptable a la luz del nivel de capacidad ordinario en esta tecnología. Ejemplos ilustrativos de sales adecuadas incluyen sales orgánicas derivadas de aminoácidos, como glicina y arginina, amoníaco, carbonatos, bicarbonatos, aminas primarias, secundarias y terciarias, y aminas cíclicas como bencilaminas, pirrolidinas, piperidina, morfina y piperazina, y sales inorgánicas derivadas de sodio, calcio, potasio, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, aluminio y litio. Las bases orgánicas o inorgánicas representativas incluyen además benzatina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina y procaína.

La divulgación también se refiere a profármacos farmacéuticamente aceptables de los compuestos, y a

métodos de tratamiento que emplean dichos profármacos farmacéuticamente aceptables. El término "profármaco" significa un precursor de un compuesto designado que, después de la administración a un sujeto, produce el compuesto in vivo a través de un proceso químico o fisiológico tal como solvolisis o escisión enzimática, o en condiciones fisiológicas. Un "profármaco farmacéuticamente aceptable" es un profármaco que no es tóxico, es biológicamente tolerable y de otro modo biológicamente adecuado para la administración al sujeto. Los procedimientos ilustrativos para la selección y preparación de derivados de profármacos adecuados se describen, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, 1985, Elsevier.

Pueden producirse tipos adicionales de profármacos, por ejemplo, derivando grupos carboxilo libres de estructuras del compuesto como amidas o ésteres de alquilo. Los ejemplos de amidas incluyen los derivados de amoniaco, alquilaminas primarias y di-alquilaminas secundarias. Las aminas secundarias incluyen fracciones de anillo heterocicloalquilo o heteroarilo de 5 o 6 miembros. Los ejemplos de amidas incluyen aquellos que se derivan de amoníaco, alquilaminas primarias y di-alquilaminas. Los ejemplos de ésteres de la divulgación incluyen ésteres de alquilo, cicloalquilo, fenilo y fenil-alquilo. Los ésteres preferidos incluyen ésteres metílicos. Los profármacos también pueden prepararse derivando grupos hidroxilo libres usando grupos que incluyen hemisuccinatos, ésteres de fosfato, dimetilaminoacetatos y fosforiloximetiloxycarbonilos, siguiendo procedimientos como los descritos en Fleisher et al., *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1996, 19:115-130. Los derivados de carbamato de los grupos hidroxilo y amino también pueden producir profármacos. Los derivados de carbonato, los ésteres de sulfonato y los ésteres de sulfato de los grupos hidroxilo también pueden proporcionar profármacos. La derivatización de grupos hidroxilo como ésteres de aciloxi-metilo y aciloxi-etilo, en donde el grupo acilo puede ser un éster alquílico, opcionalmente sustituido con una o más funcionalidades de éter, amina o ácido carboxílico, o donde el grupo acilo es un éster de aminoácido como se ha descrito anteriormente, también es útil para producir profármacos. Los profármacos de este tipo pueden prepararse como se describe en Greenwald, et al., *J. Med. Chem.*, 1996, 39(10):1938-40. Las aminas libres también pueden derivarse como amidas, sulfonamidas o fosfonamidas. Todos estas fracciones de profármacos pueden incorporar grupos que incluyen funcionalidades de éter, amina y ácido carboxílico.

La presente divulgación también se refiere a metabolitos farmacéuticamente activos de los compuestos de Fórmula (1), que también pueden usarse en los métodos de la divulgación. Un "metabolito farmacéuticamente activo" significa un producto farmacológicamente activo del metabolismo en el cuerpo del compuesto o sal del mismo. Los profármacos y los metabolitos activos de un compuesto pueden determinarse usando técnicas de rutina conocidas o disponibles en la técnica. Ver, por ejemplo, Bertolini, et al., *J. Med. Chem.*, 1997, 40:2011-2016; Shan et al., *J. Pharm. Sci.*, 1997, 86(7):765-767; Bagshawe, *Drug Dev. Res.*, 1995, 34:220-230; Bodor, *Adv. Drug Res.*, 1984, 13:224-331; Bundgaard, *Design of Prodrugs*, 1985, Elsevier Press; y Larsen, *Design and Application of Prodrugs*, *Drug Design and Development*, 1991, Krogsgaard-Larsen, et al., eds., Harwood Academic Publishers.

C) Composiciones Farmacéuticas

En aspectos particulares de la divulgación, las sales de los compuestos de Fórmula (1), más particularmente la sal de meglumina, se usan solos o en combinación con uno o más ingredientes adicionales, para formular las composiciones farmacéuticas. Una composición farmacéutica comprende una cantidad efectiva de al menos un compuesto de acuerdo con la divulgación.

La divulgación también proporciona composiciones (incluyendo composiciones farmacéuticas) que comprenden un compuesto o derivados descritos en la presente, y uno o más portadores, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones de la invención, una composición puede también contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de tamponamiento del pH. En una realización específica, la composición farmacéutica es farmacéuticamente aceptable para la administración a un humano. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un compuesto o derivado descrito en la presente. La cantidad de un compuesto o derivado de la invención que será terapéutica o profilácticamente efectivo puede administrarse por técnicas clínicas estándar. Las cantidades efectivas ejemplares se describen con más detalle en las secciones siguientes. En ciertas realizaciones de la invención, una composición puede contener también un estabilizador. Un estabilizador es un compuesto que reduce la tasa de degradación química de la composición del compuesto (1). Los estabilizadores adecuados incluyen, pero no están limitados a, antioxidantes, como ácido ascórbico, tampones de pH, o tampones de sales.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma adecuada para la administración a un sujeto, preferiblemente un sujeto humano. En ciertos aspectos, las composiciones están en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. Las composiciones también pueden estar en formas de dosificación unitaria particulares. Ejemplos de formas de dosificación unitaria incluyen, pero no están limitadas a: comprimidos; caplets; cápsulas, como cápsulas de gelatina elásticas blandas; obleas; trociscos; grageas; dispersiones; supositorios; ungüentos; cataplasmas (emplastos); pastas; polvos; apósitos; cremas; emplastos; soluciones; parches; aerosoles (por ejemplo, espráis nasales o inhaladores); geles; formas de dosificación líquida adecuadas para la administración oral o mucosal a un paciente, incluyendo suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones de aceite en agua

o emulsiones líquidas de agua en aceite), soluciones y elixires; formas de dosificación líquida adecuadas para la administración parenteral a un sujeto; y sólidos estériles (por ejemplo sólidos cristalinos o amorfos) que pueden reconstituirse para proporcionar formas de dosificación líquida adecuadas para la administración parenteral a un sujeto.

En un aspecto específico, el sujeto es un mamífero como una vaca, caballo, oveja, cerdo, ave, gato, perro, ratón, rata, conejo, o cobaya. En una realización preferida, el sujeto es un humano. Preferiblemente, la composición farmacéutica es adecuada para administración veterinaria y/o humana. De acuerdo con esta realización, el término "farmacéuticamente aceptable. Significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o un estado o enumerado en la Farmacopea de los U.S. u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente para su uso en humanos.

Los portadores farmacéuticamente aceptables para su uso en composiciones son líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo los del petróleo, de origen animal, vegetal o sintético. En una realización específica, el aceite es aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral o aceite de sésamo. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra intravenosamente. Las soluciones salinas y la dextrosa acuosa y las soluciones de glicerol pueden emplearse también como portadores líquidos, particularmente como soluciones inyectables. Ejemplos adicionales de portadores farmacéuticos aceptables son conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed. (Mack Publishing, Easton Pa.).

Los excipientes adecuados para su uso en las composiciones incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. Si un excipiente particular es adecuado para su incorporación en una composición farmacéutica depende de una variedad de factores bien conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, la vía de administración y los ingredientes activos específicos en la composición.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos o derivados descritos en la presente se formulan para ser compatibles con la vía pretendida de administración. Las formulaciones son preferiblemente para administración tópica, pero pueden ser para administración por otros medios como por inhalación o insuflación (ya sea a través de la boca o la nariz), intradérmica, oral, subcutánea, bucal, parenteral, vaginal o rectal. Preferiblemente, las composiciones también se formulan para proporcionar estabilidad química aumentada de los compuestos durante el almacenamiento y el transporte. Las formulaciones pueden ser liofilizadas o formulaciones líquidas.

D) Administración

Un compuesto o derivado descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se administra preferiblemente como un componente de una composición que comprende opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. El compuesto o derivado preferiblemente se administra oralmente. Otro método preferido de administración es a través de aplicación tópica del compuesto o derivado.

En ciertos aspectos, el compuesto o derivado se administra por cualquier otra vía conveniente, por ejemplo, por absorción a través de la piel, revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo (epi-)dermis, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal). Los métodos de administración incluyen pero no están limitados a parenteral, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, oral, sublingual, intranasal, intracerebral, intravaginal, transdérmica, rectal, por inhalación, o por vía tópica, particularmente a los oídos, nariz, ojos, o piel. En la mayoría de casos, la administración resultará en la liberación del compuesto o derivado en el torrente sanguíneo. En realizaciones preferidas, el compuesto o derivado se administra por vía oral.

Además, la divulgación se refiere a métodos de usar los compuestos descritos en la presente para tratar sujetos diagnosticados con o que sufren de una enfermedad, trastorno o afección mediada por prolil hidroxilasa, como: anemia, trastornos vasculares, trastornos metabólicos y curación de heridas.

En un aspecto preferido, los compuestos de la presente invención son útiles en tratamiento o prevención de anemia que comprende condiciones anémicas asociadas con enfermedad de riñón crónica, enfermedad poliquística renal, anemia aplásica, anemia hemolítica autoinmune, anemia por trasplante de médula ósea, síndrome de Churg-Strauss, anemia de Diamond Blackfan, anemia de Fanconi, síndrome de Felt, enfermedad injerto contra huésped, trasplante de células madre hematopoyéticas, síndrome urémico hemolítico, síndrome mielodisplásico, hemoglobinuria paroxística nocturna, osteomielifibrosis, pancitopenia, aplasia pura de células rojas, púrpura Schoenlein-Henoch, anemia refractaria con exceso de blastos, artritis reumatoide, síndrome de Shwachman, anemia de células falciformes, talasemia mayor, talasemia menor, trombocitopénica púrpura, pacientes anémicos o no anémicos sometidos a cirugía, anemia asociada con o secundaria a un traumatismo, anemia sideroblástica, anemia secundaria a otros tratamientos que incluyen: inhibidores de la transcriptasa inversa para tratar el VIH, hormonas corticosteroides, quimioterapéuticos que contienen cisplatino o no cíclicos, alcaloides de la vinca, inhibidores de la

mitosis, inhibidores de la topoisomerasa II, antraciclinas, agentes alquilantes, en particular anemia secundaria a inflamatoria, el envejecimiento y/o enfermedades crónicas. La inhibición PHD también se puede utilizar para tratar síntomas de anemia, incluyendo fatiga crónica, palidez y mareos.

En otro aspecto preferido, las moléculas de la presente invención son útiles para el tratamiento o prevención de enfermedades de trastornos metabólicos incluyendo, pero no limitado a, diabetes y obesidad. En otro aspecto preferido, las moléculas de la presente divulgación son útiles para el tratamiento o prevención de trastornos vasculares. Estos incluyen pero no están limitados a enfermedades relacionadas con hipoxia o curación de heridas que requieren mediadores pro-angiogénicos para la vasculogénesis, la angiogénesis y la arteriogénesis.

En los métodos de tratamiento de acuerdo con la divulgación, una cantidad efectiva de un agente farmacéutico de acuerdo con la invención se administra a un sujeto que padece de o está diagnosticado que tiene dicha enfermedad, trastorno o afección. Una "cantidad efectiva" significa una cantidad o dosis suficiente para producir de forma general el beneficio terapéutico o profiláctico deseado en pacientes con necesidad de dicho tratamiento para la enfermedad, trastorno o afección designado. Las cantidades efectivas o dosis de los compuestos de la presente invención pueden averiguarse por métodos rutinarios como modelado, estudios de escalado de dosis o pruebas clínicas, y tomando en consideración factores rutinarios, por ejemplo, el modo o vía de administración o administración del fármaco, las farmacocinéticas del compuesto, la severidad y trayectoria de la enfermedad, trastorno o afección, la terapia anterior o actual del sujeto, el estado de salud del sujeto y respuesta a fármacos, y el juicio del médico tratante. Un ejemplo de una dosis está en el intervalo de desde alrededor de 0,001 a alrededor de 200 mg del compuesto por kg de peso corporal del sujeto por día, preferiblemente alrededor de 0,05 a 100 mg/kg/día, o alrededor de 1 a 35 mg/kg/día, en unidades de dosificación individuales o divididas (por ejemplo, BID, TID, QID). Para un humano de 70 kg, un intervalo ilustrativo para una cantidad de dosificación adecuada es de alrededor de 0,05 a alrededor de 7 g/día, o de alrededor de 0,2 a alrededor de 2,5 g/día.

Los comprimidos orales pueden incluir un compuesto de acuerdo con la invención mezclados con excipientes farmacéuticamente aceptables como diluyentes inertes, agentes disgregantes, agentes aglutinantes, agentes lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes. Los rellenos inertes adecuados incluyen carbonato sódico y cálcico, fosfato de sodio y calcio, lactosa, almidón, azúcar, glucosa, metil celulosa, estearato de magnesio, manitol, sorbitol, y similares. Los excipientes orales líquidos ejemplares incluyen etanol, glicerol, agua y similares. El almidón, polivinil-pirrolidona (PVP), glicolato sódico de almidón, celulosa microcristalina, y ácido alginico son agentes disgregantes adecuados. Los agentes aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina. El agente lubricante, si está presente, puede ser estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden recubrirse con un material como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo para retrasar la absorción en el tracto gastrointestinal, o pueden recubrirse con un recubrimiento entérico.

Las cápsulas para la administración oral incluyen cápsulas de gelatina dura y blanda. Para preparar cápsulas de gelatina dura, los compuestos de la invención pueden mezclarse con un diluyente sólido, semi-sólido o líquido. Las cápsulas de gelatina blanda pueden prepararse mezclando el compuesto de la invención con agua, un aceite como aceite de cacahuete o aceite de oliva, parafina líquida, una mezcla de mono y di-glicéridos de ácidos grasos de cadena corta, polietilenglicol 400, o propilenglicol.

Los líquidos para administración oral pueden estar en la forma de suspensiones, soluciones, emulsiones o jarabes o pueden presentarse como un producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas composiciones líquidas pueden contener opcionalmente: excipientes farmacéuticamente aceptables como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol, metilcelulosa, alginato sódico, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y similares); vehículos no acuosos, por ejemplo aceite (por ejemplo, aceite de almendra o aceite de coco fraccionado), propilenglicol, alcohol etílico, o agua; conservantes (por ejemplo, metil o propil p-hidroxibenzoato o ácido sórbico); agentes humectantes como lecitina; y, si se desea, agentes aromatizantes o colorantes.

Los agentes activos de la divulgación pueden administrarse también por vías no orales. Por ejemplo, las composiciones pueden formularse para administración rectal como un supositorio. Para uso parenteral, incluyendo vías intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea, los compuestos de la invención pueden proporcionarse en soluciones o suspensiones acuosas estériles, tamponadas a un pH apropiado e isotonicidad o en aceite parenteralmente aceptable. Los vehículos acuosos adecuados incluyen solución de Ringer y cloruro sódico isotónico. Dichas formas se presentarán en formas de dosis unitarias como ampollas o dispositivos de inyección desechables, en formas multi-dosis como viales de los que puede extraerse la dosis apropiada, o en una forma sólida o pre-concentrada que puede usarse para preparar una formulación inyectable. Las dosis de infusión ilustrativas pueden variare de alrededor de 1 a 1000 µg/kg/minuto de compuesto, mezclada con un portador farmacéutico durante un periodo que varía de varios minutos a varios días.

Para administración tópica, los compuestos pueden mezclarse con un portador farmacéutico a una concentración de alrededor del 0,1% a alrededor del 10% de fármaco a vehículo. Los ejemplos incluyen lociones,

cremas, ungüentos y similares y pueden formularse por métodos conocidos. Otro modo de administrar los compuestos de la invención puede utilizar una formulación de parche para afectar a la administración transdérmica.

Se llevó a cabo una evaluación de selección de sales para identificar una sal del compuesto (1) con propiedades más adecuadas para el desarrollo. Los criterios considerados esenciales para el proceso de selección fueron la cristalinidad, la reproductibilidad de forma a partir de un proceso de recristalización, la estabilidad química y física bajo condiciones aceleradas y la solubilidad adecuada para soportar tanto la sustancia del fármaco como el desarrollo del producto del fármaco.

En aspectos, el compuesto se formula en formas de dosificación adecuadas para la administración a pacientes con necesidad del mismo. Los procesos y equipo para preparar partículas de fármaco y portados se divulgan en Pharmaceutical Sciences, Remington, 1985, 17ª Ed., 1585-1594; Chemical Engineers Handbook, Perry, 1984, 6th Ed., pp. 21-13 a 21-19 (1984); Parrot et al., 1974, J. Pharm.Sci., 61(6): 813-829; y Hixon et al., 1990, Chem. Engineering, pp. 94-103.

La cantidad de compuesto incorporado en las formas de dosificación de la presente divulgación pueden generalmente variar de alrededor del 10% a alrededor del 90% por peso de la composición dependiendo de la indicación terapéutica y del periodo de administración deseado, por ejemplo cada 12 horas, cada 24 horas y similares. Dependiendo de la dosis del compuesto que se desea administrar, pueden administrarse una o más de las formas de dosificación. Dependiendo de la formulación, el compuesto estará preferiblemente en la forma de una sal de acetato o forma de base libre.

Además, esta divulgación también se refiere a una composición farmacéutica o una forma de dosificación farmacéutica como se describe anteriormente en este documento para su uso en un método de terapia o diagnóstico del cuerpo animal humano o no humano.

Esta divulgación también se refiere a una composición farmacéutica para su uso en la fabricación de una forma de dosificación farmacéutica para la administración oral a un mamífero con necesidad de tratamiento, caracterizada por que dicha forma de dosificación puede administrarse en cualquier momento del día independientemente de la comida ingerida por dicho mamífero.

La divulgación también se refiere a un método de terapia o diagnóstico del cuerpo animal humano o no humano que comprende administrar a dicho cuerpo una dosis terapéutica o diagnósticamente efectiva de una composición farmacéutica descrita en la presente.

Esta divulgación también se refiere a un envase farmacéutico adecuado para la venta comercial que comprende un contenedor, una forma de dosificación como se describe en la presente, y asociada con dicho envase materia escrita no limitada a si la forma de dosificación puede administrarse con o sin comida.

Los siguientes ejemplos de formulaciones son solamente ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de las invenciones de ninguna manera.

EJEMPLOS

Se produjeron cinco versiones del compuesto (1), concretamente las sales de meglumina, trometamina, potasio, sodio y ácido libre y sus propiedades físicas y potencial de fabricación guió la selección de una forma preferida del compuesto.

E) Síntesis de Ejemplo

Para obtener los compuestos descritos en los ejemplos siguientes y sus datos analíticos correspondientes, se siguieron los siguientes protocolos experimentales y analíticos a menos que se indique lo contrario. A menos que se indique lo contrario, las mezclas de la reacción se agitaron magnéticamente a temperatura ambiente (rt), las soluciones se "secaron" generalmente sobre un agente secante como Na₂SO₄ o MgSO₄, y las mezclas, soluciones y extractos se "concentraron" típicamente en un evaporador rotatorio bajo presión reducida.

Configuración de Análisis de Datos

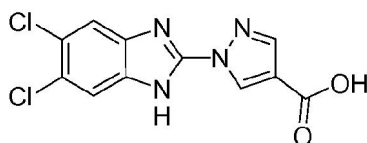
Se realizó cromatografía en capa fina (TLC) usando gel de sílice de Merck 60 F₂₅₄ 2,5 cm x 7,5 cm 250 µm o 5,0 cm x 10,0 cm 250 µm pre-cubierto en placas de gel de sílice. La cromatografía en capa fina preparatoria se realizó usando gel de sílice de EM Science 60 F₂₅₄ 20 cm x 20 cm 0,5 mm en placas pre-cubiertas con una zona de concentración de 20 cm x 4 cm.

Se realizó cromatografía en columna ultrarrápida de fase normal (FCC) en gel de sílice (SiO₂) eluyendo con hexanos/acetato de etilo, a menos que se indique lo contrario, mientras que se realizó HPLC de fase inversa en una

Hewlett Packard HPLC Series 1100, con una columna Phenomenex Luna C₁₈ (5 µm, 4,6x150 mm), y la detección se hizo a λ = 230, 254 y 280 nm con un gradiente del 10 al 99% de acetonitrilo/agua (0,05% de ácido trifluoroacético) durante 5,0 minutos con un caudal de 1 ml/min. Alternativamente, se realizó purificación HPLC preparatoria en una sistema de HPLC automatizado Gilson ejecutando el software Gilson Unipoint LC con detección de picos UV hecha a λ = 220 nm y equipada con una columna YMC-Pack ODS-A de fase inversa (5 µm, 30 x 250 mm) ; gradiente móvil de 10-99% de acetonitrilo/agua (0,05% de ácido trifluoroacético) durante 15-20 minutos y caudales de 10-20 ml/min.

Los espectros de masa (MS) se obtuvieron en un Agilent serie 1100 MSD equipado con una fuente multimodo positiva y negativa ESI/APCI a menos que se indique lo contrario, los espectros de la resonancia magnética nuclear (NMR) se obtuvieron en espectrómetros Bruker modelo DRX con los datos de ¹H NMR mostrando desplazamientos químicos en ppm campo abajo de la referencia de tetrametilsilano (multiplicidad aparente, constante de acoplamiento J en Hz, integración)..

Ejemplo 1: Acido libre de ácido 1-(5,6-Dicloro-1H-benzimidazol-2-il)-1H-pirazol-4-carboxílico (compuesto (1))



Método A

El ácido libre del compuesto (1) se preparó usando 2,5,6-tricloro-1 H-benzimidazol y ácido 1H-pirazol-4-carboxílico. MS (ESI/CI): masa calculada para C₁₁H₆Cl₂N₄O₂, 297.1; m/z encontrado, 296.0 [M-H]⁻. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 14.18-12.52 (br s, 2H), 8.89 (d, J = 0.5 Hz, 1 H), 8.31 (d, J = 0.5 Hz, 1H), 7.80 (s, 2H).

Método B

Paso A: 5,6-Dicloro-1,3-dihidro-benzimidazol-2-ona: A la solución de 4,5-dicloro-benceno-1,2-diamina (25 g, 0.14 mol) en DMF seco (200 ml), se le añadió CDI (23 g, 0.14 mol) como el sólido. La solución de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, después se añadió agua (500 ml). El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua, se secó exhaustivamente para proporcionar el compuesto del título (26,0 g, 90%). El producto bruto se usó en la reacción siguiente sin purificación adicional.

Paso B: 2,5,6-Tricloro-1H-benzimidazol: 5,6-dicloro-1,3-dihidro-benzimidazol-2-ona secada exhaustivamente (28,4 g, 0.14 mol) se suspendió en POCl₃ (75 ml). La solución de la reacción se calentó a temperatura de reflujo durante 3 horas y se enfrió a temperatura ambiente. La solución se vertió en hielo picado/agua (1,5 l) lentamente con agitación suficiente. La solución se neutralizó a pH = 7.0 con NaOH. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua, se secó para proporcionar el compuesto del título (27,9 g, 90%). El producto bruto se usó en la reacción siguiente sin purificación adicional.

Paso C: Éster etílico de ácido 1-(5,6-Dicloro-1-dimetilsulfamoil-1H-benzimidazol-2-il)-1H-pirazol-4-carboxílico. Se disolvió 2,5,6-Tricloro-1H-benzimidazol 2 (27,6 g, 0.125 mol) en DMF seco (200 ml) y después se añadieron K₂CO₃ (20,7 g, 0.15 mol) y cloruro de dimetilsulfamoilo (17,9 g, 0.125 mol). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. El análisis HPLC mostró la formación completa de dimetilamida de ácido 2,5,6-tricloro-benzimidazol-1-sulfónico. En el mismo bote, sin aislamiento de dimetilamida de ácido 2,5,6-tricloro-benzimidazol-1-sulfónico, se añadió éster etílico de ácido 1H-pirazol-4-carboxílico (17,5 g, 0.125 mol) y K₂CO₃ (20,7 g, 0.15 mol). La mezcla de la reacción se agitó a 70° C durante 4 horas y se añadió agua (500 ml) mientras la solución de la reacción estaba todavía caliente. La solución de la reacción se enfrió a temperatura ambiente. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó. El producto bruto se usó en la reacción siguiente sin purificación adicional.

Paso D: ácido 1-(5,6-Dicloro-1H-benzimidazol-2-il)-1H-pirazol-4-carboxílico. Se disolvió éster etílico de ácido 1-(5,6-Dicloro-1-dimetilsulfamoil-1H-benzimidazol-2-il)-1H-pirazol-4-carboxílico en THF (125 ml) y se añadió LiOH.H₂O (21 g, 0.5 mol) en agua (250 ml). La mezcla de la reacción se agitó a temperatura de reflujo durante 2 horas y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió HCl concentrado para ajustar el pH a 2.0. El sólido precipitado se recogió por filtración, se lavó con agua y se secó. El sólido se trituroó en EtOAc caliente (1 l). Después de enfriarse a temperatura ambiente y la filtración, se obtuvo el compuesto de fórmula (I) como un sólido de color tostado (18.5 g, 50%). MS [M+H]⁺ encontrado 297.0. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 13.71 (s, 1H), 12.99 (s, 1H), 8.90 (s, 1H), 8.32 (s, 1H), 7.94 (s, 1H), 7.67 (s, 1H).

Las propiedades térmicas, naturaleza cristalina, pureza aparente y absorción de humedad de un lote de 6.0 g del ácido libre del compuesto (1) se resumen en la Tabla 1. Los datos de saturación para el compuesto (1) se muestran en la Figura 1.

Tabla 1

Pureza Aparente (HPLC)	Cristalinidad (PXRD)	Punto de Fusión (DSC)	Adsorción (40-90% RH)	Desorción (90-0% RH)
99.8%	Débilmente Cristalino	343 °C ^a	+0.59 %	-0.96%
^a descomposición				

Ejemplo de Referencia 2: sal de potasio del compuesto (1)

La sal de potasio del ácido 1-(5,6-Dicloro-1H-benzimidazol-2-il)-1H-pirazol-4-carboxílico se preparó suspendiendo el ácido libre (55 g, 1,7 mol) en EtOH (1,5 l) a temperatura de reflujo con K₂CO₃ (12,79 g, 0,85 mol) en 20 ml de agua añadida gota a gota durante 5 minutos. Se requirió agitación mecánica fuerte para asegurar la agitación apropiada. La suspensión se agitó a temperatura de reflujo durante ocho horas y después se enfrió a temperatura ambiente durante cinco horas. El sólido precipitado se recogió por filtración y se lavó rápidamente con 100 ml de agua seguido por EtOH. La sal de potasio se obtuvo como un sólido blanco (38 g, 65%). Posteriormente, el licor madre se concentró y el proceso anterior se repitió una vez para dar el segundo cultivo de la sal de potasio (13 g, 22%). MS [M+H]⁺ = 297.0. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): 8.65 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.57 (s, 2H).

La sal de potasio como se preparó por la metodología de re-lechada anterior es no-higroscópica y consistente con un hidrato pobremente cristalino como se ve en el PXRD y el análisis térmico. Se vieron dos picos endotérmicos amplios de la sal de potasio del compuesto (1) por DSC que pueden asociarse con un evento de deshidratación y fundición/descomposición, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2

Pureza Aparente (HPLC)	Cristalinidad (PXRD)	Punto de Fusión (DSC)	Adsorción (40-90% RH)	Desorción (90-0% RH)
100.0 %	monohidrato cristalino	277 °C ^d	+0.53%	-0.89%

^ddescomposiciónEjemplo de Referencia 3: Sal de sodio del compuesto (1)

La sal de sodio del compuesto (1) es un sólido hidratado pobremente cristalino como se muestra por PXRD y análisis térmico. El DSC revela dos picos endotérmicos amplios; el primer evento está asociado con una pérdida de agua (~9% por TGA), mientras que el segundo endotérmico está provocado por la fusión/descomposición de la sal. La sal de sodio se preparó en un método similar al usado para preparar la sal de potasio (método de lechada).

Ejemplo de Referencia 4: Procedimiento de cristalización de la sal de trometamina del compuesto (1)

Hasta la fecha se han producido dos formas de sal de trometamina. La primera forma se obtuvo de la lechada del compuesto (1) y trometamina en etanol acuoso (14% de agua). Aunque no es una sal, esta mezcla física no se persiguió. La segunda forma se produjo a partir de un tratamiento acuoso que contenía cantidades en exceso de contraión. Esta forma era una sal hidratada que se observó tenía una solubilidad acuosa aparente más baja que la sal de potasio. Esto compuesto también mostró propiedades a granel pobres.

Ejemplo 5: Procedimiento de cristalización de la sal de meglumina del compuesto (1)

Una solución clara (30 mg/ml) del ácido libre del compuesto (1) y 1.2 equivalente molar de meglumina se produjo en metanol acuoso (12% de agua) seguido por calentamiento ligero. Agitación a temperatura ambiente con siembra o refrigeración con os in siembra llevó consistentemente a la cristalización de la sal de meglumina, que se recogió por filtración. esta metodología se usó para producir un lote de 2 g de la sal. La composición del solvente en el procedimiento anterior se modificó a etanol acuoso y se usó por equipo de desarrollo PDMS API SM para producir 8,7-kg de material de grado GMP en apoyo de los estudios FIS y que permitían el FIH.

Las propiedades térmicas, naturaleza cristalina y pureza aparente de la sal de meglumina del compuesto (1) se resumen en la Tabla 3. Las Figuras 2 y 3 muestran las propiedades a granel de la sal de meglumina del compuesto (1), incluyendo datos de PXRD y datos de DSC, TGA y rayos x, respectivamente. Los datos de cristales individuales confirmaron que la sal de meglumina del compuesto (1) es un dihidrato con el patrón de polvo simulado en excelente concordancia con el patrón de polvo experimental como se muestra en las Figuras 4A y 4B. Se observó

que la sal de meglumina del compuesto (1) tenía propiedades a granel mejoradas, solubilidad y procesabilidad mejorada en comparación con el ácido libre de la sal de potasio del compuesto (1).

Tabla 3

ID de la muestra	Pureza Aparente (HPLC)	Cristalinidad (PXR)	Punto de Fusión (DSC)
Sal de meglumina del compuesto (1)	≥ 99.9 %	dihidrato cristalino	80 °C

Ejemplo 6: Formulaciones tópicas de la sal de meglumina del compuesto (1)

Los materiales y excipientes que se usaron en el desarrollo de formulaciones tópicas de una sal de meglumina del compuesto (1) se enumeran en la Tabla 4

Tabla 4

Materiales	
Sal de meglumina del compuesto (1)	
Hidroxipropil Metilcelulosa (HPMC K15M)	
Poloxamero 407*	
Metilcelulosa (MC)	
PEG4000	
Meglumina (NMDG)	
Vitamina E-TPGS	
Carbómero 941	
Carbómero 934P	
Carboximetilcelulosa (Na-CMC)	
HP-β-CD	
Agua estéril para irrigación	
*solubilización a 5 °C debido a la propiedad termo-reversible del excipiente.	

La Tabla 5 enumera los resultados de estabilidad física y química realizados en las formulaciones seleccionadas de la sal de meglumina del compuesto (1) después de 4 semanas de almacenamiento.

Tabla 5

Sal de Meglumina del compuesto (1) restante (%)				
Experimento	Composición de la Formulación	2 °C	20 °C	40 °C
1	0.5% HPMC K15M (pH 8.33)	99.89	101.14	101.44
2	1.0% HPMC K15M (pH 8.33)	99.59	99.21	99.08
3	2.0% Metilcelulosa (pH 8.32)	98.49	99.71	97.20
4	15% Poloxamero 407 (pH 8.10)	99.19	100.03	87.29*
5	20% Poloxamero 407 (pH 8.03)	97.60	99.57	96.43*
6	VitE-TPGS/PEG4000/agua (20:20:60; pH 8.06)	100.27	100.32	98.87
* Precipitación observada en el vial				

El análisis HPLC mostró que las seis composiciones de la formulación eran químicamente estables durante cuatro semanas bajo las condiciones de almacenaje estudiadas. La pérdida aparente del equilibrio de masa para la formulación basada en poloxámero (experimento 4) se atribuyó a la precipitación del ácido libre del compuesto (1) a 40° Celsius y no a la degradación. A 40° Celsius, los polímeros degradados resultaron en la formación de ácido acético aldehídos y una pérdida concurrente de la viscosidad y caída del pH. El ambiente ácido resultante provocó la precipitación del ácido libre insoluble del compuesto (1) y la descoloración de la formulación. La inestabilidad del poloxámero (o lutrol) es conocida y se ha divulgado en Erlandsson, B., 2002, Polym. Degrad. and Stab., 78:571-575. Dicha degradación no se observó en muestras almacenadas a temperatura ambiente o refrigeradas.

Los resultados de la criba de solubilidad de las formulaciones de la sal de meglumina del compuesto (1) se muestran en la Tabla 6. Cuatro de los diez vehículos investigados, concretamente 1 % Na-CMC (Experimento 1), 1 % Carbómero 941 (Experimento 2), 1 % Carbómero 934P (Experimento 3) and 20% HP-β-CD (Experimento 4), no cumplieron el criterio de solubilidad objetivo de 10 mg/ml (equivalente del ácido libre) o fueron tóxicos para células Hela. el vehículo 1% MC no tuvo ventajas notables sobre el producto que contenía 2% MC. La sal meglumina del compuesto (1) fue suficientemente soluble dentro de un intervalo de pH aceptable (6-8.5) en los Experimentos 5 y 7-11.

Tabla 6

Experimento	Composición de la Formulación	Solubilidad del Compuesto (1)
1	1% Na-CMC	< 10 mg/ml
2	1% Carbómero 941	< 10 mg/ml
3	1 % Carbómero 934P	< 10 mg/ml
4	0.5% HPMC K15M	≥ 10 mg/ml
5	1.0% HPMC K15M	≥ 10 mg/ml
6	1% Metilcelulosa	≥ 10 mg/ml
7	2% Metilcelulosa	≥ 10 mg/ml
8	15% Poloxámero 407	≥ 10 mg/ml
9	20% Poloxámero 407	≥ 10 mg/ml
10	VitE-TPGS/PEG4000/agua (20:20:60)	≥ 10 mg/ml
11	20% HP-β -CD*	≥ 10 mg/ml

* La Formulación era tóxica para las células Hela

F) Ejemplos Biológicos

Ensayo Celular para HIF1-α

Se colocaron en placas células Hela (ATCC, Manassas, VA) en placas de 96 pocillos a 20.000 células por pocillo en 100µl de DMEM que contenía 10% de suero bovino fetal, 1% de aminoácidos no esenciales, 50 IU/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin (todos los reactivos del cultivo celular de Invitrogen, Carlsbad, CA). 24 horas después de la colocación en placas, el medio cambió a 100µl de DMEM sin el 10% de suero bovino fetal, se añadió 1,1 µl de la solución madre para cada compuesto y se incubó durante seis horas. Todos los compuestos se probaron con una concentración de compuesto final de 100 µM. Se retiró el sobrenadante y las células se lisaron en 55 µl de tampón de lisis MSD que contenía inhibidores de proteasa. Se transfirieron después 50 µl del lisado celular a una placa de detección de HIF1-α humano MSD bloqueada (Meso-Scale Discovery, Gaithersburg, MD, según el protocolo del fabricante), y se incubaron a temperatura ambiente en un agitador orbital durante dos horas. Después de tres lavados en PBS, se añadieron 25 µl de anticuerpo de detección HIF-α 20nM y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en un agitador orbital. Después de tres lavados en PBS, se añadieron 150 µl de tampón de lectura 1X y la placa se leyó después en un instrumento MSD SECTOR. Los datos se analizaron determinando el porcentaje de estimulación HIF en presencia de 100 µM del compuesto en relación a un compuesto de control del ensayo, 7-[(4-Cloro-fenil)-(5-metil-isoxazol-3-ilamino)-metil]-quinolin-8-ol. Estos datos biológicos para la sal de meglumina del compuesto (1) se presentan en la Figura 5.

Datos biológicos adicionales para las formulaciones de la sal de meglumina del compuesto (1) se presentan en las Figuras 6 a 8.

5 Aunque la especificación anterior enseña los principios de la presente invención, con ejemplos proporcionados con el propósito de ilustración, se entenderá que la práctica de la invención abarca todas las variaciones, adaptaciones y/o modificaciones habituales como quedan comprendidas dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones y sus equivalentes.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

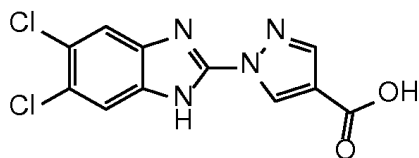
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener cristales de una sal de meglumina de un compuesto de fórmula I



(I),

el método comprendiendo:

formar una solución que comprende un ácido libre de un compuesto de fórmula I, meglumina, y alcohol acuoso;
calentar la solución; y

- (a) agitar la solución a temperatura ambiente con sembrado, o
- (b) enfriar la solución bajo refrigeración con o sin sembrado,

para obtener cristales de la sal de meglumina de un compuesto de fórmula I;
en donde el alcohol acuoso comprende metanol acuoso o etanol acuoso.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la solución comprende 1,2 equivalentes molares de meglumina con respecto al ácido libre del compuesto de fórmula I.

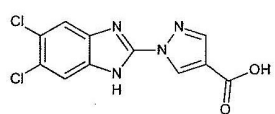
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde los cristales de la sal de meglumina de un compuesto de fórmula I se obtienen agitando la solución a temperatura ambiente con sembrado.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde los cristales de la sal de meglumina de un compuesto de fórmula I se obtienen enfriando la solución bajo refrigeración con sembrado.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde los cristales de la sal de meglumina de un compuesto de fórmula I se obtienen enfriando la solución bajo refrigeración sin sembrado.

6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende además recoger los cristales de la sal de meglumina de un compuesto de fórmula I a través de filtración.

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el alcohol acuoso comprende metanol acuoso y el metanol acuoso comprende un 12% de agua.

Figura 1**Compuesto 1**

Propiedades	Valores
pKa	3.67 and 8.57 (exp.)
log D _{7,4}	0.28 (exp.)
MW	297.10

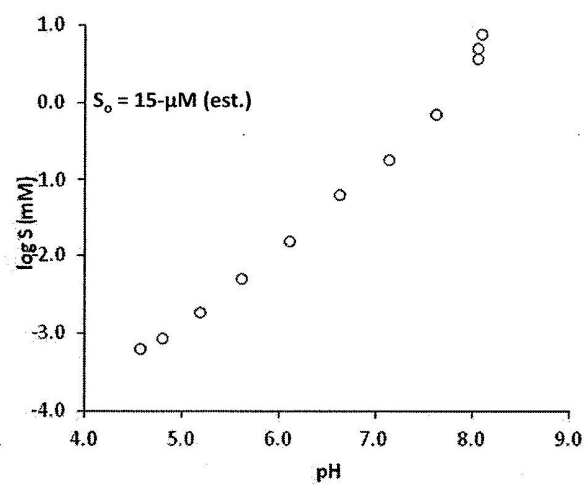


Figura 2

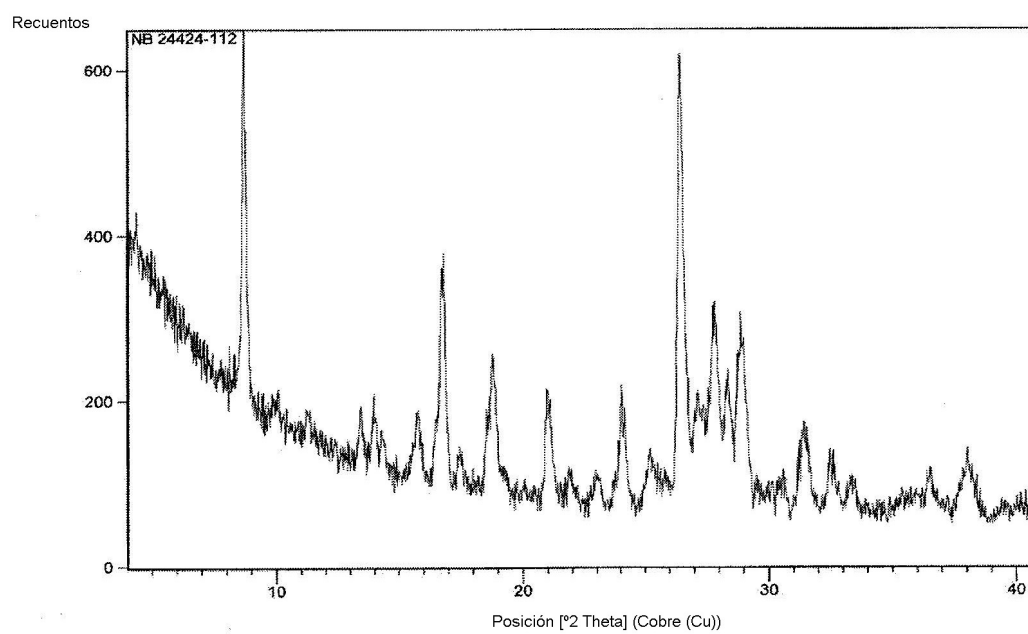


Figura 3

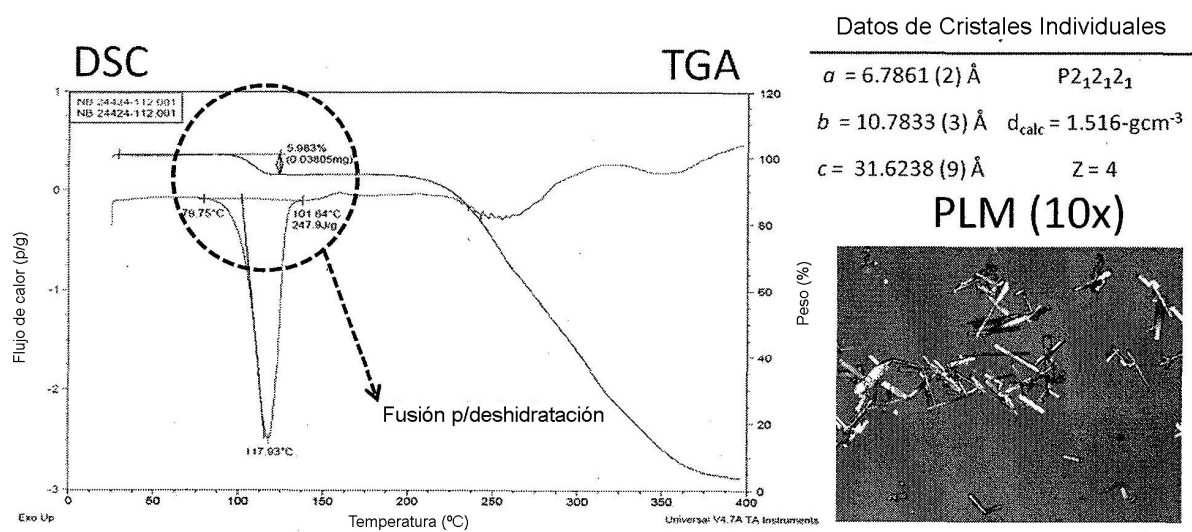
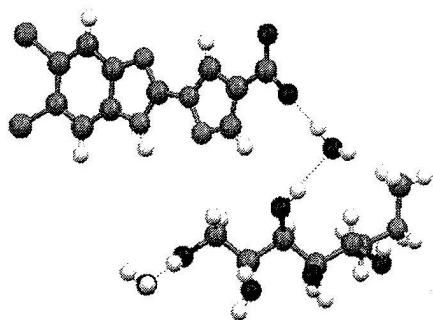


Figura 4

A



B

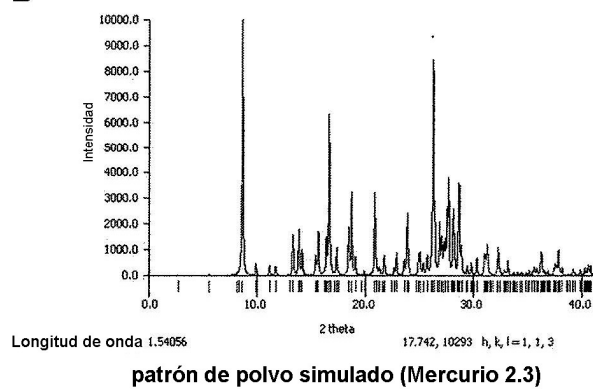


Figura 5

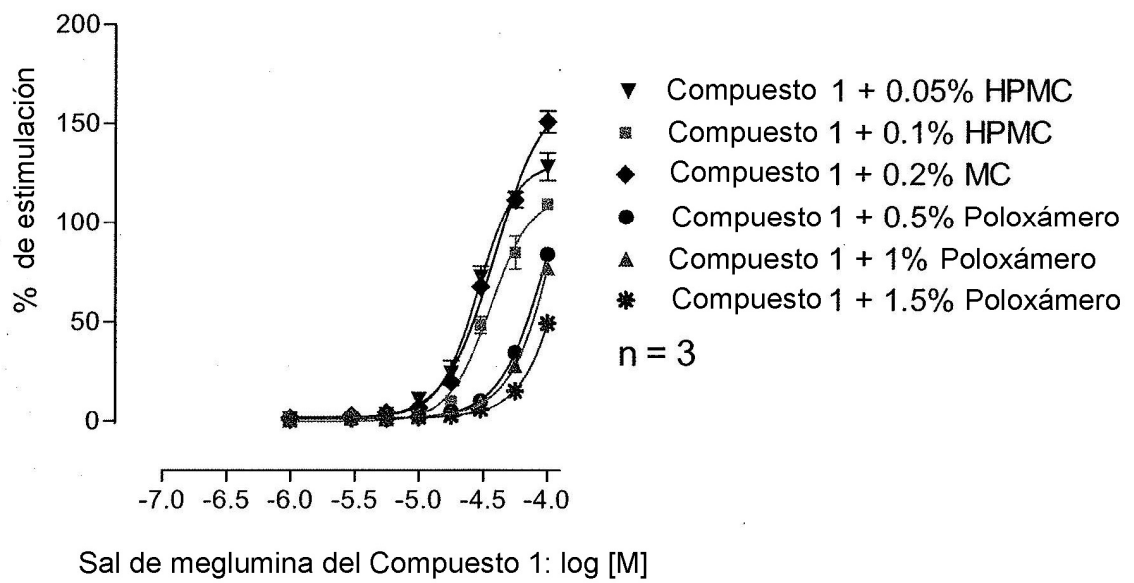


Figura 6

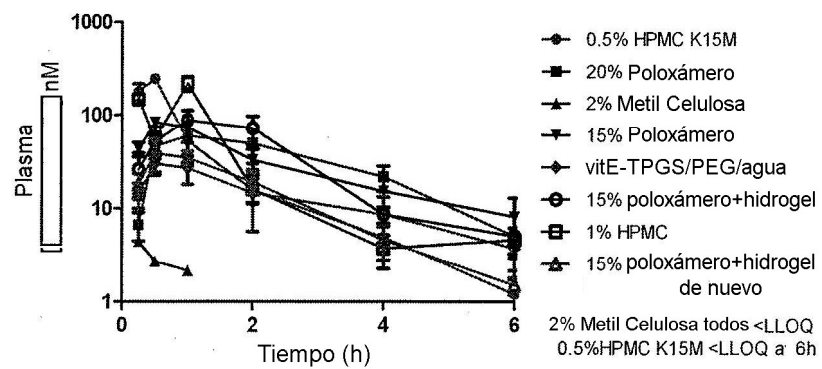


Figura 7

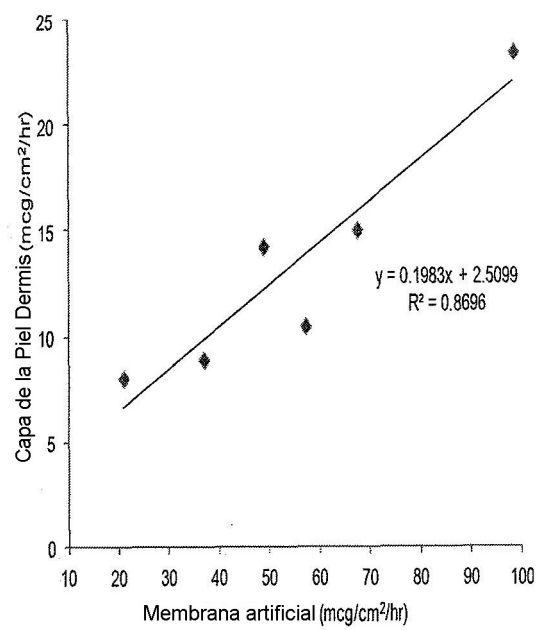
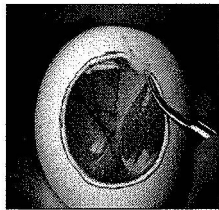
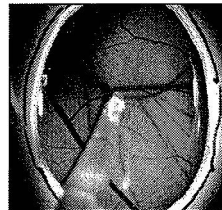


Figura 8



Retirar membrana del Huevo



Tratamiento