

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 910 030**

51 Int. Cl.:

**C07D 401/12** (2006.01)

**A61P 25/30** (2006.01)

**A61K 31/497** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.12.2018 PCT/US2018/064512**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2019 WO19118298**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2018 E 18826892 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.01.2022 EP 3724176**

54 Título: **Sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazina-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidina-4-il) urea, métodos de preparación y usos de la misma**

30 Prioridad:

**11.12.2017 US 201762597236 P**

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

**11.05.2022**

73 Titular/es:

**HELSINN HEALTHCARE SA (100.0%)  
Via Pian Scairolo 9  
6912 Lugano-Pazzallo, CH**

72 Inventor/es:

**GARCIA RUBIO, SILVINA;  
PERSEGHINI, MAURO;  
GUAINAZZI, ANGELO;  
PIETRA, CLAUDIO y  
GIULIANO, CLAUDIO**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 910 030 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

Sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazina-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidina-4-il) urea, métodos de preparación y usos de la misma

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de EE. UU. Nº 62/597.236, presentada el 11 de diciembre de 2017.

**CAMPO**

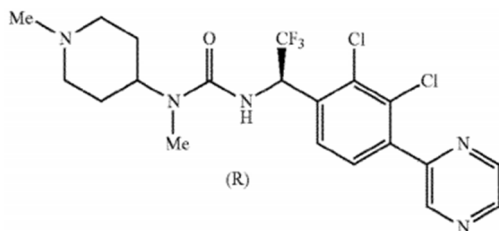
[0002] La presente descripción se refiere a la sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazina-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidina-4-il)urea (también conocida como HM04 o H0900), un potente antagonista del receptor del secretagogo de la hormona del crecimiento/grelina (GHS-R1a) útil en el tratamiento de enfermedades asociadas con un desequilibrio de niveles de grelina, como atracones, adicción al alcohol y otros trastornos (p. ej., síndrome de Prader-Willi). La presente descripción también se refiere a diferentes formas cristalinas de sal de fumarato HM04 y métodos para producirlas.

**ANTECEDENTES**

[0003] Se entiende que la grelina, un péptido liberador de la hormona del crecimiento producido por las células grelinérgicas en el tracto gastrointestinal, funciona como un neuropéptido que regula el metabolismo energético estimulando el apetito. La modulación, p. ej., la inhibición, de la señalización de la grelina, a través del receptor del secretagogo de la hormona del crecimiento/grelina (GHS-R1a), es un objetivo atractivo para el tratamiento farmacológico de los trastornos asociados con un nivel alto de grelina. Los trastornos potenciales para el tratamiento con moduladores de grelina incluyen abuso de alimentos (como atracones, obesidad, hiperfagia (o apetito incontrolable), rebote de peso corporal posterior a la dieta (incluida la hiperfagia posterior a la dieta), adicción al alcohol y enfermedades genéticas asociadas con el aumento del nivel de grelina. (p. ej., síndrome de Prader-Willi (PWS)).

[0004] El PWS ocurre en aproximadamente 1 de cada 10 000 nacimientos y está asociado con la delección o falta de expresión de la región 15q11,2 del cromosoma 15 paterno. Las características del PWS incluyen baja estatura, bajo tono muscular e hiperfagia. El reemplazo de la hormona del crecimiento se usa con frecuencia para tratar las deficiencias del crecimiento y la hipotonía. Sin embargo, falta un tratamiento para el apetito insaciable y los niños con PWS pueden madurar y convertirse en adultos que padecen obesidad y diabetes tipo 2. Los niveles de grelina generalmente están elevados en PWS; sin embargo, la relación con la señalización de grelina y la ingesta de alimentos en PWS sigue sin estar clara. *Consulte* Purtell L., et al., In adults with Prader-Willi syndrome, elevated ghrelin levels are more consistent with hyperphagia than high PYY and GLP-1 levels. *Neuropeptides*. 2011;45(4):301-7; Cummings D.E., et al., Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nature Medicine*. 2002;8(7):643-4; DelParigi A., et al., High circulating ghrelin: a potential cause for hyperphagia and obesity in Prader-Willi syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002;87(12):5461-4.

[0005] Por consiguiente, es deseable encontrar tratamientos que inhiban eficazmente la GHSR1a, que sean tolerables para el paciente y que no interfieran con otras funciones de las hormonas del crecimiento. Moduladores de GHSR1a, incluidos inhibidores como (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazina-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidina-4-il)urea (HM04, H0900) representada a continuación, se informa en la Patente de EE. UU. Nº 9,546,157.



[0006] Sin embargo, las formas salinas estables y las formas cristalinas de las mismas no se describen en el mismo.

**RESUMEN****[0007]**

Forma de realización 1. Forma de realización de la presente invención: Una sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazina-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidina-4-il)urea, estando dicha sal al menos en un 50 % en forma cristalina.

Forma de realización 2. La sal de la forma de realización 1, en donde la sal es sal de fumarato de 1:1(R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazina-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidina-4-il)urea.

Forma de realización 3. La sal de cualquiera de las formas de realización anteriores, en donde la sal es al menos

60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % en la forma cristalina.

Forma de realización 4. La sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 3 que comprende la Forma 1 que tiene el patrón de XRPD de la Figura 12 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa.

Forma de realización 5. La sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 3 que comprende la Forma 2 caracterizada por el patrón de XRPD de la Figura 3 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa.

Forma de realización 6. La sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 3 que comprende la Forma 3 caracterizada por el patrón de XRPD de la Figura 15 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa.

Forma de realización 7. La sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 3 que comprende la Forma 4 caracterizada por el patrón de XRPD de la figura 16 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa.

Forma de realización 8. La sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 3 que comprende la Forma 1 caracterizada por un patrón de XRPD, usando radiación Cu K alfa, que comprende picos en  $7,8 \pm 0,2$ ,  $9,5 \pm 0,2$ ,  $14,3 \pm 0,2$ ,  $16,7 \pm 0,2$ ,  $17,2 \pm 0,2$ ,  $18,5 \pm 0,2$ ,  $18,8 \pm 0,2$ ,  $19,3 \pm 0,2$ ,  $20,0 \pm 0,2$ ,  $20,7 \pm 0,2$ ,  $22,4 \pm 0,2$ ,  $23,2 \pm 0,2$ ,  $25,6 \pm 0,2$ ,  $27,2 \pm 0,2$ ,  $31,7 \pm 0,2$  y  $32,4 \pm 0,2$  grados 2 theta.

Forma de realización 9. La sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 3 que comprende la Forma 3 caracterizada por un patrón de XRPD, usando radiación Cu K alfa, que comprende picos en  $7,2 \pm 0,2$ ,  $9,4 \pm 0,2$ ,  $9,7 \pm 0,2$ ,  $10,8 \pm 0,2$ ,  $14,3 \pm 0,2$ ,  $15,1 \pm 0,2$ ,  $16,2 \pm 0,2$ ,  $17,9 \pm 0,2$ ,  $18,7 \pm 0,2$ ,  $18,9 \pm 0,2$ ,  $19,6 \pm 0,2$ ,  $21,5 \pm 0,2$ ,  $22,7 \pm 0,2$ ,  $23,7 \pm 0,2$ ,  $24,3 \pm 0,2$ ,  $25,1 \pm 0,2$ ,  $27,4 \pm 0,2$ ,  $28,7 \pm 0,2$  y  $34,9 \pm 0,2$  grados 2 theta.

Forma de realización 10. La sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 3 que comprende la Forma 4 caracterizada por un patrón de XRPD, usando radiación Cu K alfa, que comprende picos en  $12,2 \pm 0,2$ ,  $13,2 \pm 0,2$ ,  $15,0 \pm 0,2$ ,  $15,4 \pm 0,2$ ,  $17,6 \pm 0,2$ ,  $18,1 \pm 0,2$ ,  $19,5 \pm 0,2$ ,  $20,2 \pm 0,2$ ,  $20,9 \pm 0,2$ ,  $21,4 \pm 0,2$ ,  $23,0 \pm 0,2$ ,  $23,4 \pm 0,2$ ,  $24,4 \pm 0,2$ ,  $24,8 \pm 0,2$ ,  $25,9 \pm 0,2$ ,  $27,9 \pm 0,2$ ,  $28,9 \pm 0,2$ ,  $29,6 \pm 0,2$ ,  $30,7 \pm 0,2$  grados 2 theta.

Forma de realización 11. La sal de cualquiera de las formas de realización anteriores, que comprende al menos una forma cristalina elegida de dicha Forma 1, Forma 2, Forma 3 y Forma 4.

Forma de realización 12. Un producto farmacéutico que comprende la sal de cualquiera de las formas de realización 1-11, para uso en terapia.

Forma de realización 13. Una composición que comprende la sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Forma de realización 14. Un método para preparar la sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 11 que comprende combinar (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea con ácido fumárico.

Forma de realización 15. El método de la forma de realización 14, en donde el (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-la metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea está en forma sólida o en solución cuando se combina con ácido fumárico.

Forma de realización 16. El método de cualquiera de las formas de realización 14 a 15, en donde el (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea se somete a extracción de ácido/base antes de combinarse con ácido fumárico.

Forma de realización 17. La sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 11, el producto farmacéutico de la forma de realización 12, o la composición de la forma de realización 13, para usar en un método para reducir la actividad de señalización de la grelina en una célula que comprende exponer dicha célula a dicha sal, fármaco producto o composición.

Forma de realización 18. Los productos para el uso de la forma de realización 17, en los que la célula se expone a dicha sal, dicho fármaco o dicha composición *in vitro*.

Forma de realización 19. Los productos para el uso de las formas de realización 17 o la forma de realización 18, en los que la actividad de señalización de la grelina se mide por el nivel de calcio intracelular detectado por el ensayo del lector de placa de imágenes de fluorescencia (FLIPR).

Forma de realización 20. Los productos para el uso de la forma de realización 19, en los que se reduce el nivel de calcio intracelular.

Forma de realización 21. La sal de cualquiera de las formas de realización 1-11, el producto farmacéutico de la forma de realización 12, o la composición de la forma de realización 13, para usar en un método para reducir la actividad de señalización de la grelina en un sujeto que comprende administrar al sujeto dicha sal, fármaco producto o composición.

Forma de realización 22. La sal de cualquiera de las formas de realización 1 a 11, el producto farmacéutico de la forma de realización 12, o la composición de la forma de realización 13, para usar en un método para tratar a un sujeto que tiene una condición o trastorno asociado con un aumento en el nivel de grelina que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha sal, fármaco o composición.

Forma de realización 23. Los productos para el uso de la forma de realización 22, donde la condición o trastorno se elige entre abuso de alimentos, adicción al alcohol, síndrome de Prader-Willi, atracones, obesidad, recuperación del peso corporal después de una dieta e hiperfagia.

Forma de realización 24. Los productos para el uso de cualquiera de las formas de realización 22 a 23 que comprenden la administración oral de la sal, el compuesto cristalino, el fármaco o la composición al sujeto.

Forma de realización 25. Los productos para el uso de cualquiera de las formas de realización 22 a 24, en los que se aplican una o más de las siguientes condiciones: (a) el nivel de hormona de crecimiento circulante del sujeto está modulado y/o reducido; (b) se reduce la ingesta de alimentos del sujeto; (c) el peso corporal del sujeto se reduce y/o estabiliza.

**[0008]** Los objetos y ventajas adicionales se establecerán en parte en la descripción que sigue, y en parte serán obvios a partir de la descripción, o se pueden aprender por la práctica. Los objetos y ventajas se realizarán y alcanzarán mediante los elementos y combinaciones particularmente señalados en las reivindicaciones anexas.

5 **[0009]** Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solo ilustrativas y de ejemplo. El objeto de la invención está determinado por las reivindicaciones.

**[0010]** Los dibujos adjuntos, que se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva, ilustran una (varias) realizaciones y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios aquí descritos.

10

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0011]**

15

La figura 1A y la figura 1B (panel inferior) muestran perfiles de XRPD representativos de la Forma 1 cristalina de base libre de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 1A.

La figura 1B (panel superior) muestra un perfil de XRPD representativo de la Forma 1 cristalina de base libre de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 1B.

20

La figura 1C muestra un perfil de XRPD representativo de la Forma 1 cristalina de la sal de fumarato de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 2.

La figura 2 muestra un perfil representativo de XRPD de la Forma 1 cristalina de la sal de fumarato de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 3.

La figura 3 muestra un perfil representativo de XRPD de la Forma 2 de la sal de fumarato de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 3.

25

La figura 4A muestra el perfil de XRPD observado después de mezclar las Formas 1 y 2 de la sal de fumarato de HM04 en una proporción de 50:50 en acetonitrilo:agua (95:5) durante 48 horas a 60 °C.

La figura 4B muestra el perfil de XRPD observado después de mezclar las Formas 1 y 2 de la sal de fumarato HM04 en una proporción de 50:50 en etanol durante 48 horas a 60 °C.

30

La figura 5 proporciona una descripción general de un método de síntesis ampliado de la Forma 1 de la sal de fumarato de HM04 y se describe con mayor detalle en el Ejemplo 5.

La figura 6 muestra un perfil de XRPD representativo de la Forma 1 cristalina de la sal de fumarato de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 5 (después de secar a 60 °C durante 6 horas).

La figura 7 muestra un perfil de XRPD representativo de la Forma 1 cristalina de la sal de fumarato de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 5 (después de secar a 60 °C durante 15 horas).

35

La figura 8 muestra un perfil de XRPD representativo de la Forma 1 cristalina de la sal de fumarato de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 5 (después de secar a 60 °C durante 72 horas).

La figura 9 muestra un perfil de XRPD representativo de la Forma 1 cristalina de la sal de fumarato de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 5 (después de secar a 65 °C durante 18 horas).

40

La figura 10 proporciona una descripción general del método de síntesis simplificado de la Forma 1 de la sal de fumarato de HM04 y se describe con más detalle en el Ejemplo 6.

La figura 11 proporciona un perfil de XRPD representativo de la Forma 1 cristalina de la sal de fumarato de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 6, Ensayo 1.

La figura 12 proporciona un perfil de XRPD representativo de la Forma 1 cristalina de la sal de fumarato de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 6, Ensayo 2.

45

La figura 13 proporciona un perfil de XRPD representativo de la Forma 1 cristalina de la sal de fumarato de HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 6, escalado mediante el método del Ensayo 2.

La figura 14 proporciona un perfil de XRPD representativo de la Forma 1 cristalina de la sal de fumarato HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 6, Ensayo 3.

50

La figura 15 proporciona un perfil representativo de XRPD de la Forma 3 cristalina de la sal de fumarato HM04 preparada como se establece en Ejemplo 7.

La figura 16 proporciona un perfil de XRPD representativo de la Forma 4 cristalina de la sal de fumarato HM04 preparada como se establece en el Ejemplo 8.

55

La figura 17 proporciona una comparación de la concentración plasmática de HM04 (ng/mL) a lo largo del tiempo en ratas que recibieron una dosis oral de 3 mg/kg de base libre de HM04 y 3 mg/kg de sal de fumarato de HM04 (basado en el peso de la base libre).

La figura 18 proporciona una comparación de la concentración plasmática de HM04 (ng/mL) a lo largo del tiempo en perros que recibieron una dosis oral de 2 mg/kg de base libre de HM04 y 2 mg/kg de sal de fumarato de HM04 (basado en el peso de la base libre).

60

La figura 19 proporciona una comparación de la concentración plasmática de HM04 (ng/ml) en ratas a lo largo del tiempo después de recibir dosis orales de 3, 10 y 30 mg/kg de sal de fumarato de HM04 (basado en el peso de la base libre).

La figura 20 proporciona una comparación de la concentración plasmática de HM04 (ng/ml) en perros a lo largo del tiempo después de recibir dosis orales de 3, 10 y 30 mg/kg de sal de fumarato de HM04 (basado en el peso de la base libre).

65

La figura 21A muestra la curva de concentración-respuesta de HM04 en el ensayo del lector de placa de imágenes de fluorescencia antagonista (FLIPR) usando células HEK293 que expresan el receptor GHSR1a

humano.

La figura 21B muestra la curva de concentración-respuesta de R011 en el ensayo FLIPR antagonista utilizando células HEK293 que expresan el receptor GHSR1a humano.

La figura 21C muestra la curva de concentración-respuesta de HM04 en el ensayo de agonista FLIPR utilizando células HEK293 que expresan el receptor GHSR1a humano.

La figura 21D muestra la curva de concentración-respuesta de R011 en el ensayo de agonista FLIPR utilizando células HEK293 que expresan el receptor GHSR1a humano.

La figura 21E muestra la curva de concentración-respuesta de HM04 en un ensayo de agonista inverso de inositol 1 fosfato (IP-1).

La figura 21F muestra la curva de concentración-respuesta de R011 en un ensayo de agonista inverso de inositol 1 fosfato (IP-1).

La figura 22 muestra la concentración media de hormona del crecimiento en plasma observada en ratas en el tiempo 0 y 15 minutos después de la inyección de grelina en los siguientes cuatro grupos de tratamiento: 1) 1 ml/kg de solución salina más 10 ml/kg de CMC al 0,5 % p.o. (n=6); 2) 15 µg/kg de grelina i.v. más 10 ml/kg de CMC al 0,5 % p.o. (n=6); 3) 30 mg/kg de sal de fumarato HM04 p.o. 2 horas antes de 15 µg/kg de grelina i.v. (n=6); 4) 10 mg/kg de antagonista de grelina R011 i.p. 30 minutos antes de 15 µg/kg de grelina i.v. (n=6).

La figura 23A muestra la ingesta de alimentos en ratones *Snord116*<sup>+/-</sup> (Het) de 7 meses de edad y compañeros de camada de tipo salvaje (WT) de 7 meses de edad medidos 1 hora después de una única administración intraperitoneal de 1) vehículo (n=6); 2) 10 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) (n=6); 3) 0,5 mg/kg de cabergolina (n=6); o 4) 10 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) más 0,5 mg/kg de cabergolina (n=6). Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 16 horas antes de la inyección y se les dio libre acceso a la comida después de la inyección.

La figura 23B muestra la ingesta de alimentos en ratones *Snord116*<sup>+/-</sup> (Het) de 7 meses de edad y compañeros de camada de tipo salvaje (WT) de 7 meses de edad medidos 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas después de una única administración intraperitoneal de 1) vehículo (n=6); 2) 10 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) (n=6); 3) 0,5 mg/kg de cabergolina (n=6); o 4) 10 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) más 0,5 mg/kg de cabergolina (n=6). Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 16 horas antes de la inyección.

La figura 24 muestra la ingesta de alimentos en ratones *Snord116*<sup>+/-</sup> (Het) de 3 meses de edad y compañeros de camada de tipo salvaje (WT) de 3 meses de edad medidos 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas después de una única administración intraperitoneal de 1) vehículo (n=6) o 2) 10 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) (n=6). Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 16 horas antes de la inyección y se les dio libre acceso a la comida después de la inyección.

La figura 25A muestra la ingesta de alimentos en ratones *Snord116*<sup>+/-</sup> (Het) de 12 meses de edad y compañeros de camada de tipo salvaje (WT) de 12 meses de edad medidos 1 hora después de una única administración intraperitoneal de 1) vehículo (Het n=4; WT n=6) o 2) 10 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) (Het n=4; WT n=6). Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 16 horas antes de la inyección y se les dio libre acceso a la comida después de la inyección.

La figura 25B muestra la ingesta de alimentos en ratones *Snord116*<sup>+/-</sup> (Het) de 12 meses de edad y compañeros de camada de tipo salvaje (WT) de 12 meses de edad medidos 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas después de una sola administración intraperitoneal de 1) vehículo (Het n=4; WT n=6) o 2) 10 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) (Het n=4; WT n=6). Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 16 horas antes de la inyección y se les dio libre acceso a la comida después de la inyección.

La figura 26 muestra la ingesta de alimentos en ratones *Snord116*<sup>+/-</sup> (Het) de 7 meses de edad y compañeros de camada de tipo salvaje (WT) de 7 meses de edad medidos 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas y 24 horas después de una única administración intraperitoneal de 1) vehículo (n=5) 30 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) (n=5). Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 16 horas antes de la inyección y se les dio libre acceso a la comida después de la inyección.

La figura 27A muestra la ingesta de alimentos y la figura 27B muestra el peso de ratones *Snord116*<sup>+/-</sup> (Het) de 6 meses de edad y compañeros de camada de tipo salvaje (WT) de 6 meses medidos diariamente después de 10 días consecutivos de administración intraperitoneal a las 07:00 horas de 1) vehículo (n=10) o 2) 10 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) (n=10).

La figura 28A muestra la ingesta de alimentos y la figura 28B muestra el peso de ratones *Snord116*<sup>+/-</sup> (Het) de 8 meses de edad y compañeros de camada de tipo salvaje (WT) de 8 meses medidos diariamente después de 5 días consecutivos de administración oral a las 07:00 horas de 1) vehículo (n=5) o 2) 30 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) (n=5).

La figura 29A muestra la ingesta de alimentos durante el ciclo de luz y la figura 29B muestra la ingesta de alimentos durante el ciclo de oscuridad de ratones *Snord116*<sup>+/-</sup> (Het) de 8 meses de edad y compañeros de camada de tipo salvaje (WT) de 8 meses medidos diariamente después de 5 ratones consecutivos. días de administración oral a las 18.00 horas de 1) vehículo (n=5) o 2) 30 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) (n=5).

## DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN

[0012] Como se resume anteriormente, y como se establece en detalle a continuación, la presente divulgación se refiere a la sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenilo)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea y

formas cristalinas de la misma. La presente descripción también se refiere a métodos para preparar la sal de fumarato y formas cristalinas de la misma, y métodos para usar la misma para la inhibición de GHSR1a.

5 **[0013]** Los detalles de la divulgación se exponen en la descripción adjunta a continuación. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí pueden usarse en la práctica o prueba de la presente descripción, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos. Otras características, objetos y ventajas de la divulgación serán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones. En la especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares también incluyen el plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación.

10 **[0014]** Un aspecto de la presente divulgación se relaciona con sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea. En al menos una forma de realización de la presente divulgación, la sal es 1:1 (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea:sal de fumarato de.

15 **[0015]** La sal está al menos en un 50 % en forma cristalina. En formas de realización adicionales, la sal puede ser al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % y 100 % cristalina.

20 **[0016]** Si la sal es al menos parcialmente cristalina, la forma cristalina puede elegirse entre la Forma 1, la Forma 2, la Forma 3 y la Forma 4.

25 **[0017]** En al menos una forma de realización, la sal comprende la Forma 1 cristalina caracterizada por el patrón de XRPD de la figura 12 como XRPD determinado usando radiación Cu K alfa. En formas de realización adicionales, la sal puede ser al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % y 100 % de Forma 1 cristalina.

30 **[0018]** En algunas formas de realización, la Forma 1 se puede caracterizar por un patrón de XRPD, usando radiación Cu K alfa, que comprende picos en  $7,8 \pm 0,2$ ,  $9,5 \pm 0,2$ ,  $14,3 \pm 0,2$ ,  $16,7 \pm 0,2$ ,  $17,2 \pm 0,2$ ,  $18,5 \pm 0,2$ ,  $18,8 \pm 0,2$ ,  $19,3 \pm 0,2$ ,  $20,0 \pm 0,2$ ,  $20,7 \pm 0,2$ ,  $22,4 \pm 0,2$ ,  $23,2 \pm 0,2$ ,  $25,6 \pm 0,2$ ,  $27,2 \pm 0,2$ ,  $31,7 \pm 0,2$  y  $32,4 \pm 0,2$  grados 2 theta.

35 **[0019]** En al menos una forma de realización, la sal comprende la Forma 2 cristalina caracterizada por el patrón de XRPD de la figura 3 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa. En formas de realización adicionales, la sal puede ser al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % y 100 % de Forma 2 cristalina.

40 **[0020]** En al menos una forma de realización, la sal comprende Forma 3 cristalina caracterizada por el patrón de XRPD de la figura 15 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa. En formas de realización adicionales, la sal puede ser al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % y 100 % de Forma 3 cristalina.

45 **[0021]** En algunas formas de realización, la Forma 3 se puede caracterizar por un patrón de XRPD, utilizando radiación Cu K alfa, que comprende picos en  $7,2 \pm 0,2$ ,  $9,4 \pm 0,2$ ,  $9,7 \pm 0,2$ ,  $10,8 \pm 0,2$ ,  $14,3 \pm 0,2$ ,  $15,1 \pm 0,2$ ,  $16,2 \pm 0,2$ ,  $17,9 \pm 0,2$ ,  $18,7 \pm 0,2$ ,  $18,9 \pm 0,2$ ,  $19,6 \pm 0,2$ ,  $21,5 \pm 0,2$ ,  $22,7 \pm 0,2$ ,  $23,7 \pm 0,2$ ,  $24,3 \pm 0,2$ ,  $25,1 \pm 0,2$ ,  $27,4 \pm 0,2$ ,  $28,7 \pm 0,2$  y  $34,9 \pm 0,2$  grados 2 theta.

50 **[0022]** En al menos una forma de realización, la sal comprende la Forma 4 cristalina caracterizada por el patrón de XRPD de la figura 16 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa. En formas de realización adicionales, la sal puede ser al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % y 100 % de Forma 4 cristalina.

55 **[0023]** En algunas formas de realización, la Forma 4 se puede caracterizar por un patrón de XRPD, utilizando radiación Cu K alfa, que comprende picos en  $12,2 \pm 0,2$ ,  $13,2 \pm 0,2$ ,  $15,0 \pm 0,2$ ,  $15,4 \pm 0,2$ ,  $17,6 \pm 0,2$ ,  $18,1 \pm 0,2$ ,  $19,5 \pm 0,2$ ,  $20,2 \pm 0,2$ ,  $20,9 \pm 0,2$ ,  $21,4 \pm 0,2$ ,  $23,0 \pm 0,2$ ,  $23,4 \pm 0,2$ ,  $24,4 \pm 0,2$ ,  $24,8 \pm 0,2$ ,  $25,9 \pm 0,2$ ,  $27,9 \pm 0,2$ ,  $28,9 \pm 0,2$ ,  $29,6 \pm 0,2$ ,  $30,7 \pm 0,2$  grados 2 theta.

60 **[0024]** Otro aspecto de la presente descripción se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y al menos una entidad elegida de sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea y (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea como se describe en el presente documento. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir además un excipiente, diluyente o tensioactivo.

65 **[0025]** Las composiciones se pueden preparar de acuerdo con métodos convencionales de mezcla, granulación o recubrimiento, respectivamente, y las presentes composiciones farmacéuticas pueden contener de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 90 %, o de aproximadamente 1 % a

aproximadamente 20 % del compuesto descrito en peso o volumen.

**[0026]** Otro aspecto de la presente descripción incluye métodos para preparar sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea, y formas cristalinas de la misma, como se detalla en los ejemplos siguientes.

**[0027]** Otro aspecto de la presente descripción se dirige a sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea para usar en un método para reducir la actividad de señalización de la grelina en una célula, que comprende exponer la célula a dicha sal de fumarato como se describe en el presente documento.

**[0028]** El término "actividad de señalización de la grelina" se refiere a cualquiera de las actividades aguas abajo o a una combinación de las mismas que se produce cuando la grelina se une a su receptor o complejo receptor.

**[0029]** En algunas formas de realización, la célula se expone *in vitro* a sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea como se describe en el presente documento. En algunas formas de realización, la célula es expuesta *in vivo* a sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea como se describe en el presente documento.

**[0030]** Otro aspecto de la presente divulgación está dirigido a sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea para usar en un método para tratar a un sujeto que tiene una condición o trastorno asociado con un aumento en el nivel de grelina que comprende administrar al sujeto dicha sal de fumarato como se describe en este documento. A modo de ejemplo no limitativo, una afección o trastorno asociado con un nivel elevado de grelina puede incluir trastornos por abuso de alimentos, como atracones, obesidad, hiperfagia (apetito incontrolable), rebote de peso corporal posterior a la dieta (incluida la hiperfagia posterior a la dieta, adición y enfermedades genéticas, como el síndrome de Prader-Willi, etc.

**[0031]** "Reducir" o "inhibir" significa disminuir, reducir o detener una actividad, función o cantidad en comparación con una referencia. En algunas formas de realización, por "reducir" o "inhibir" se entiende la capacidad de causar una disminución general del 20 % o más. En algunas formas de realización, por "reducir" o "inhibir" se entiende la capacidad de causar una disminución general del 50 % o más. En algunas formas de realización, por "reducir" o "inhibir" se entiende la capacidad de provocar una disminución general del 75 %, 85 %, 90 %, 95 % o mayor. En algunas formas de realización, la cantidad indicada anteriormente se inhibe o disminuye durante un período de tiempo, en relación con una dosis de control (como un placebo) durante el mismo período de tiempo. Una "referencia", como se usa en este documento, se refiere a cualquier muestra, estándar o nivel que se use con fines de comparación. Se puede obtener una referencia de una muestra sana o no enferma. En algunos ejemplos, se obtiene una referencia de uno o más sujetos sanos, que no son el sujeto que está siendo probado o tratado.

**[0032]** El término "sustancialmente reducido" indica un grado suficientemente alto de reducción entre un valor numérico y un valor numérico de referencia, de modo que un experto en la técnica consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene importancia estadística en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores. En algunas formas de realización, los valores numéricos sustancialmente reducidos se reducen en más de aproximadamente cualquiera de 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % en comparación con el valor de referencia.

**[0033]** En algunas formas de realización, la exposición de una célula o un sujeto a al menos una entidad elegida de sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea como se describe aquí da como resultado una reducción de la actividad de señalización de la grelina. En algunas formas de realización, la actividad de señalización de la grelina en una célula o en un sujeto se reduce en al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o el 100 % en comparación con la actividad de señalización de la grelina en ausencia de sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea o (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea.

**[0034]** En algunas formas de realización, la actividad de señalización de la grelina se mide por el nivel de calcio intracelular detectado por el ensayo del lector de placa de formación de imágenes de fluorescencia (FLIPR). En algunas formas de realización, la exposición a la sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea, como se describe aquí, da como resultado una reducción en el nivel de calcio intracelular.

**[0035]** El ensayo FLIPR se refiere a una técnica para detectar la activación del receptor acoplado a proteína G (p. ej., GHS-R1a entre otros) y la estimulación del flujo de calcio intracelular. Los niveles de calcio intracelular se pueden medir utilizando colorantes sensibles al calcio y un lector de placas de fluorescencia. Para descripciones adicionales, véase Arkin, Michelle R., et al. (2012). FLIPR™ Assays for GPCR and Ion Channel Targets. In Assay Guidance Manual [Internet] Sittampalam G.S., et al. (Eds).

**[0036]** En algunas formas de realización, la actividad de señalización de grelina se mide por el nivel de hormona de crecimiento circulante. En algunas formas de realización, la exposición de un sujeto a la sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea, como se describe aquí, da como resultado una reducción en el nivel de hormona de crecimiento circulante.

**[0037]** En algunas formas de realización, la actividad de señalización de la grelina se mide mediante la ingesta de alimentos. En algunas formas de realización, la exposición de un sujeto a la sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea como se describe aquí da como resultado una reducción en la ingesta de alimentos.

**[0038]** En algunas formas de realización, la actividad de señalización de la grelina se mide por el peso corporal. En algunas formas de realización, la exposición de un sujeto a la sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea como se describe en el presente documento da como resultado una reducción del peso corporal o una estabilización del peso corporal.

**[0039]** "Tratamiento" o "tratar" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. "Tratamiento" o "tratar" cubre cualquier administración o aplicación de un agente terapéutico para una enfermedad en un mamífero, incluidos los seres humanos. Para los fines de esta divulgación, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, uno o más de los siguientes: alivio de uno o más síntomas, disminución de la extensión de la afección, prevención o retraso de la recurrencia de la afección, retraso o ralentización de la progresión de la afección, mejora del estado de la afección, inhibición de la afección o progresión de la afección, detención del desarrollo de la afección y remisión (ya sea parcial o total) de la afección. También abarcado por "tratar" o "tratamiento" está una reducción de la consecuencia patológica de una condición. De acuerdo con lo anterior, el término tratamiento no requiere la eliminación al cien por cien de todos los aspectos de una afección o trastorno.

**[0040]** Otro aspecto de la presente descripción es la administración oral de una composición como se describe aquí para el tratamiento de una condición o trastorno asociado con un nivel aumentado de grelina circulante.

**[0041]** Las cantidades terapéuticamente efectivas y los regímenes de dosificación para la dosificación oral usando las sales como se describe en el presente documento variarán dependiendo de una variedad de factores que incluyen la afección o el trastorno a tratar, así como la edad, el peso, posiblemente el sexo y otros factores de salud del paciente, que pueden determinarse en el momento del tratamiento. Las cantidades terapéuticamente eficaces pueden oscilar entre 1 mg y 500 mg. Las composiciones de dosificación oral pueden contener, a modo de ejemplo no limitativo, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 mg de ingrediente activo como se describe en este documento.

**Tabla 1. Las abreviaturas y los nombres utilizados en los siguientes ejemplos y en otras partes del presente incluyen:**

Abreviatura/Nombre químico	Nombre
atm	atmósferas
ACN	acetónitrilo
boc	t-butoxicarbonilo
CDCl <sub>3</sub>	cloroformo deuterado
CDI	1,1'-Carbonildiimidazol
D-CSA	Ácido D-canforsulfónico
DCM	diclorometano
DME	dimetoxietano
CO (g)	gas de monóxido de carbono
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano
DCM	diclorometano
DIBAL-H	Hidruro de diisobutilaluminio
DMA	N,N-dimetilacetamida
DMF	N,N-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
ec.	equivalentes
Et <sub>3</sub> N	trietilamina
Et <sub>2</sub> O	éter dietílico
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
GVS	Sorción gravimétrica de vapor
h	horas
H <sub>2</sub> O	agua

(Continuación)

	Abreviatura/Nombre químico	Nombre
5	HCl	ácido clorhídrico
	HPLC	cromatografía líquida de alta presión
	LC-MS/MS	cromatografía líquida espectrometría de masas en tándem (alta presión)
	IPA	isopropanol
	IPC	Control en proceso
10	i.v.	intravenoso
	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de potasio
	MeOH	metanol
	MEK	metiletilcetona
	MgSO <sub>4</sub>	sulfato de magnesio
15	MIBK	metil isobutil cetona
	min	minutos
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	carbonato de sodio
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sulfato de sodio
	NaH	hidruro de sodio
20	NaHCO <sub>3</sub>	bicarbonato de sodio
	NaOH	hidróxido de sodio
	NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	bicarbonato de amonio
	NH <sub>4</sub> OH	hidróxido de amonio
25	NMP	N-metil-2-pirrolidona
	RMN	Resonancia magnética nuclear
	p.o.	oral
	Pd/C	paladio sobre carbono
	Pd(dppf)Cl <sub>2</sub>	[1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno] dicloropaladio(II)
30	TA	temperatura ambiente
	RH	humedad relativa
	STA	Análisis térmico simultáneo
	t-BuOH	terc-butanol
	TBAA	acetoacetato de terc-butilo
35	TBME	éter metílico de terc-butilo
	THF	tetrahidrofurano
	XRPD	Difracción de rayos X en polvo

**EJEMPLOS**

40

**Ejemplo 1. Preparación y caracterización de la base libre Forma 1 cristalina de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazina-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea (HM04)**

45

**[0042] Ejemplo 1A: Preparación de HM04 Semilla de base libre Forma 1 cristalina**

50

[0043] Una primera muestra de 15 mg de base libre amorfa de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazina-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetilo)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il) urea, también denominada HM04 o H0900, se disolvió en acetonitrilo y una segunda muestra de 15 mg de base libre amorfa HM04 se disolvió en acetona. Las soluciones se dejaron evaporar lentamente en un desecador bajo flujo de nitrógeno. La cristalinidad se confirmó por difracción de rayos X en polvo (XRPD). El perfil de XRPD (Forma 1) de las muestras de HM04 de base libre cristalizadas a partir de la solución de acetonitrilo y de la solución de acetona se muestran en las figuras 1A y 1B (panel inferior), respectivamente.

55

**[0044] Ejemplo 1B: Aumento de escala de la Forma 1 cristalina de base libre de HM04**

60

[0045] Se disolvió una muestra de base libre amorfa de HM04 en 0,5 ml de acetona y se dejó que la solución se evaporara lentamente en un desecador bajo flujo de nitrógeno. Después de 24 horas, se obtuvo un residuo aceitoso pardo, que se sembró con unos pocos cristales de la base libre Forma 1 cristalizada a partir de la solución de acetona (ver Ejemplo 1A) y se rascó con una espátula. El aceite solidificó y el producto resultante se secó en un horno de vacío a 50°C durante 24 horas para producir un rendimiento de 95 mg de base libre cristalina.

65

[0046] La cristalinidad se confirmó mediante difracción de rayos X en polvo (XRPD), véase la figura 1B, panel superior. El análisis térmico simultáneo (STA) sugirió que la base libre cristalina no estaba hidratada ni solvatada. La base libre cristalina tenía un inicio de fusión estimado de aproximadamente 155 °C, según lo determinado por DSC). El análisis GVS indicó que el producto era ligeramente higroscópico con una ganancia de peso reversible de aproximadamente 1,5 % hasta 70 % de humedad relativa (HR) y aproximadamente 2 % hasta 80 % de HR. Se estimó que la solubilidad acuosa de la base libre cristalina era inferior a 2 mg/ml. Ejemplo 2.

**Ejemplo 2. Preparación a pequeña escala de la Forma 1 de la sal de fumarato de HM04**

[0047] Se suspendió la base libre amorfa de HM04 (100 mg) en acetonitrilo (2 mL). Se añadió ácido fumárico (27 mg), se lavó el ácido residual en la mezcla de reacción con acetonitrilo adicional (0,2 mL) y se mezcló bien. La mezcla se calentó suavemente y precipitó rápidamente un sólido. La suspensión resultante se sometió a ciclos de temperatura entre 40°C y temperatura ambiente durante la noche (18-24 horas). El producto se filtró, se lavó con acetonitrilo (0,2 mL) y se secó en un horno de vacío a 50 °C durante 24 horas para producir 86 mg del producto de sal de fumarato.

[0048] Se demostró que el producto de sal de fumarato era una sal 1:1 por análisis de resonancia magnética nuclear (RMN). La cristalinidad fue confirmada por XRPD y designada como Forma 1 (Figura 1C). STA no mostró pérdida de peso antes de la fusión, lo que sugiere que el producto no estaba hidratado ni solvatado. DSC mostró una única endotermy correspondiente a un inicio de fusión de aproximadamente 172 °C. GVS mostró que la sal de fumarato era higroscópica con una ganancia de peso de aproximadamente 2,8 % hasta 70 % de humedad relativa (HR) y aproximadamente 4,5 % hasta 80 % de HR. La solubilidad acuosa estimada de la sal de fumarato fue superior a 200 mg/ml.

**Ejemplo 3. Formas cristalinas de la sal de fumarato de HM04 (formas 1 y 2)**

[0049] Se suspendió la base libre de HM04 (1,5 mg) en acetonitrilo (6 mL) y se añadió ácido fumárico (0,4 g). La mezcla se calentó suavemente y precipitó rápidamente un sólido. La suspensión resultante se sometió a ciclos de temperatura entre 40 °C y la temperatura ambiente durante 72 horas. Se añadió más acetonitrilo (1 mL) y el producto se filtró, se lavó con acetonitrilo (5 x 0,2 mL) y se secó en un horno de vacío a 50 °C durante al menos 24 horas hasta peso constante para producir 1,6 g de sal de fumarato. Esta sal de fumarato HM04 cristalina se caracterizó por análisis XRPD como Forma 1 (Figura 2).

[0050] La figura 3 muestra un patrón de XRPD representativo de una muestra de Forma 2 de sal de fumarato de HM04 obtenida después de disolver la sal de fumarato de HM04 en etanol y evaporar el disolvente a temperatura ambiente bajo nitrógeno.

[0051] La Forma 2 de la sal de fumarato de HM04 se amplió disolviendo 150 mg del material de partida (forma 1 de la sal de fumarato de HM04) en 0,45 ml de una mezcla 90/10 de etanol/agua con calor. La solución se evaporó en un desecador bajo flujo de nitrógeno durante 96 horas y se recuperó un producto sólido. El patrón de XRPD del producto ampliado de la Forma 2 fue generalmente consistente con el producto a menor escala, aunque no se pudo descartar la posibilidad de una mezcla con una pequeña cantidad de la Forma 1. El análisis de RMN mostró que el producto era consistente con una monosal estequiométrica. Los datos de STA mostraron una pérdida de peso de aproximadamente 1,9 % entre 70 °C y 150 °C, lo que sugirió que la muestra posiblemente era un hidrato. Los datos de DSC mostraron una endotermy amplia con inicio a aproximadamente 164,5 °C, que correspondía a la fusión. GVS mostró un aumento de peso del 3,5 % hasta el 70 % de HR y un aumento de peso del 4,9 % hasta el 80 % de HR. No se observó ningún cambio en el patrón de XRPD después de GVS o después de colocar la muestra en un desecador a 40 °C/75 % de HR durante 7 días.

[0052] Se llevaron a cabo experimentos de suspensión competitivos mezclando el material de partida de la Forma 1 y el material ampliado de la Forma 2 en una proporción de aproximadamente 50:50 (10 mg:10 mg). Las mezclas se agitaron en 100 mL de diferentes solventes o mezclas de solventes a temperatura ambiente durante 48 horas. Se tomó una muestra del sólido de cada una de las suspensiones después de 48 horas, después de la evaporación del (de los) solvente(s), y se analizó por XRPD para determinar si se había producido la conversión a una forma. Las suspensiones se repitieron a 60 °C y se volvieron a tomar muestras después de 48 horas. Los resultados del estudio a temperatura ambiente y a 60 °C se muestran en la Tabla 2, a continuación.

Tabla 2.

Disolvente(s)	48 horas/TA	48 horas/60°C
Acetonitrilo	Forma 1	Forma 1
Acetonitrilo:agua (95:5)	Forma 1	Desconocido
Etanol	Formas 1 y 2	Desconocido
Etanol:agua (95:5)	Forma 2	Aceite

[0053] Las suspensiones competitivas en acetonitrilo a temperatura ambiente dieron como resultado una conversión completa a la Forma 1. Las suspensiones en etanol dieron como resultado una mezcla de formas y etanol/agua a temperatura ambiente dieron como resultado la conversión a la Forma 2. Las suspensiones competitivas en acetonitrilo a 60 °C dieron como resultado en conversión completa a la Forma 1. Se observó un patrón de XRPD no asignado a 60 °C con suspensiones en acetonitrilo/agua y en etanol (Figuras 4A y 4B, respectivamente). No se realizaron investigaciones adicionales sobre los resultados de las suspensiones competitivas.

**Ejemplo 4. Métodos analíticos para los Ejemplos 1-3**

[0054] Los métodos analíticos usados para caracterizar los productos descritos en los Ejemplos 1-3 se exponen a

continuación.

5 [0055] La STA se llevó a cabo usando un analizador Perkin-Elmer STA 600 TGA/DTA. La muestra (5 mg) se calentó de 25 °C a 300 °C a una velocidad de 10 °C/min, tiempo durante el cual se controló el cambio de peso. Se utilizó nitrógeno como gas de purga a un caudal de 20 cm<sup>3</sup>/min.

10 [0056] Para el análisis DSC, se pesaron 5 mg de muestra en una bandeja DSC de aluminio y se selló de forma no hermética con una tapa de aluminio. A continuación, la muestra se cargó en un Perkin-Elmer Jade DSC y se mantuvo a 25 °C hasta que se obtuvo una respuesta de flujo de calor estable. A continuación, la muestra se calentó a 300 °C a una velocidad de exploración de 10 °C/min y se controló la respuesta del flujo de calor resultante. Se utilizó una purga de helio de 20 cm<sup>3</sup>/min. Antes del análisis, se verificó la temperatura y el flujo de calor del instrumento usando un estándar de indio.

15 [0057] Para el análisis GVS, se cargaron 15-20 mg de muestra en una balanza de sorción de vapor IgaSorp (Hiden Analytical Instruments). A continuación, la muestra se secó manteniendo un entorno con una humedad del 0 % hasta que no se registraron más cambios de peso. Luego, la muestra se sometió a un perfil de rampa de 0 a 90 % de HR en incrementos de 10 % de HR, manteniendo la muestra en cada paso hasta que se logró el equilibrio (99 % de finalización del paso). Al alcanzar el equilibrio, el % de HR dentro del aparato se elevó al siguiente paso y se repitió el procedimiento de equilibrio. Después de completar el ciclo de sorción, la muestra se secó utilizando el mismo procedimiento. A  
20 continuación se controló el cambio de peso durante los ciclos de sorción/desorción, lo que permitió determinar la naturaleza higroscópica de la muestra.

[0058] El análisis de RMN se realizó en DMSO-d<sup>6</sup> utilizando un instrumento Bruker Avance III 400.

25 [0059] Los análisis de XRPD se realizaron comprimiendo suavemente una muestra (aproximadamente 2 mg) en el portamuestras de sílice de fondo cero de XRPD, único, de corte oblicuo. Luego, la muestra se cargó en un difractómetro Philips X-Pert MPD y se usaron las siguientes condiciones experimentales:

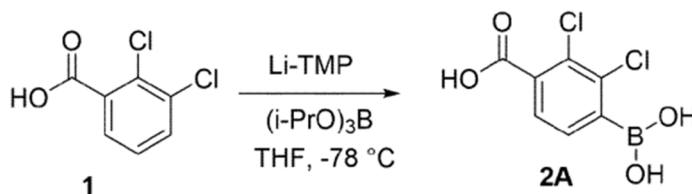
30           Ánodo del tubo: Cu  
Tensión del generador: 40 kV  
Corriente del tubo: 40 mA  
Longitud de onda alfa1: 1,5406 Å  
Longitud de onda alfa2: 1,5444 Å  
35           Ángulo de inicio (2 theta): 4  
Ángulo final (2 theta): 40  
Exploración continua

#### Ejemplo 5. Síntesis ampliada de la Forma 1 de la sal de fumarato HM04

40 [0060] La descripción general de la síntesis de la Forma 1 de la sal de fumarato HM04 tal como se establece en este ejemplo se muestra en la figura 5.

##### Paso 1: Síntesis del compuesto 2A

45 [0061]



55 [0062] Se añadió 2,2,6,6-tetrametilpiperidina (7,20 kg, 51,1 mol, 3,0 ec., KF = 0,30 %) a un reactor de 100 L equipado con una sonda de temperatura y agitador superior y se mezcló a temperatura ambiente bajo protección con nitrógeno. Se añadió THF (50 L) al reactor y se agitó. El recipiente se purgó con nitrógeno tres veces y se enfrió a 0 °C. Se añadió gota a gota a la mezcla n-BuLi (20,4 l, 3,0 ec.; solución de hexano 2,5 M) mientras se mantenía la temperatura entre  
60 aproximadamente 0 °C y aproximadamente 5 °C durante más de una hora. El color de la solución se volvió amarillo. La mezcla se agitó de alrededor de 0 °C a alrededor de 5 °C durante 30 minutos. La mezcla se enfrió hasta alrededor de -78 °C a alrededor de -70 °C para formar la Solución A.

[0063] El compuesto 1 (3,25 kg, 17,0 mol, 1,0 ec., KF = 0,03 %) se disolvió en 15 L de THF para formar la solución B.

65 [0064] Se añadió la solución B a la solución A gota a gota a una temperatura de aproximadamente -70 °C a

aproximadamente -78 °C durante una hora y luego se agitó durante 30 minutos para formar la solución C. Borato de triisopropilo ((i-PrO)<sub>3</sub>B) (3,52 kg, 18,7 mol., 1,1 ec.) se añadió gota a gota a la solución C durante 10 minutos. La mezcla de reacción se agitó a una temperatura de aproximadamente -70 °C a aproximadamente -78 °C durante una hora. Se añadió HCl (40 L, 3 M, 7,0 ec.) durante 30 minutos para extinguir la reacción. Se notó un aumento de 10 grados en la temperatura.

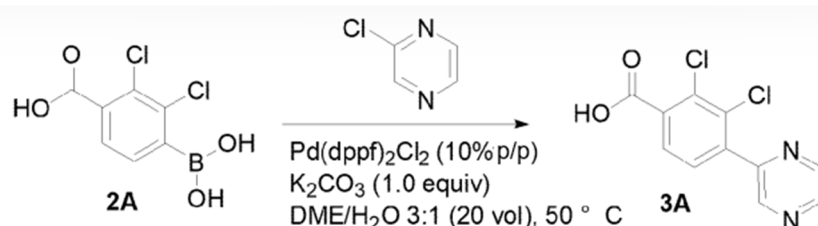
**[0065]** La capa acuosa resultante se separó y se extrajo con EtOAc (40 l). La capa acuosa se separó y se extrajo dos veces de nuevo con EtOAc

**[0066]** (35 L, 30 L). Las capas orgánicas se combinaron dando como resultado aproximadamente 160 L de líquido. La capa orgánica combinada se lavó dos veces con 50 L de una solución acuosa de HCl 1M saturada con NaCl. La capa orgánica se concentró a alrededor de 5 L en un rotavapor de 50 L a una temperatura de alrededor de 50 °C a alrededor de 55 °C bajo 30-40 mmHg durante alrededor de 8 horas.

**[0067]** El EtOAc residual se intercambió con DME 3 veces (10 L X 3). La capa orgánica se concentró en el rotavapor de 50 L a una temperatura de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 55 °C bajo 30-40 mmHg durante aproximadamente 6 horas. Cada vez quedaron aproximadamente 5 L de residuo. Se añadió DME (20 L) al residuo para obtener una solución marrón oscura del compuesto 2A al 14,2 % (3,55 kg en 25 kg de solución; 88,8 % de rendimiento; 97,4 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 1,6 minutos); 0,24 % de acetato de etilo residual). 1H-RMN (400 MHz, DMSO): δ=8,55 (s, 2H), 7,36 (d, 1H), 7,69 (d, 1H). Se preparó un segundo lote del compuesto 2A por el mismo método para producir 3,29 kg (95,4 % de pureza, 82,3 % de rendimiento, 0,11 % de acetato de etilo residual).

#### Paso 2: Síntesis del compuesto 3A

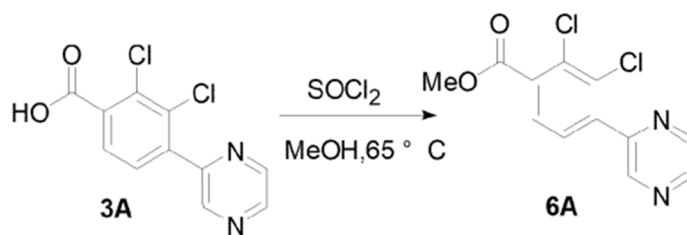
**[0068]**



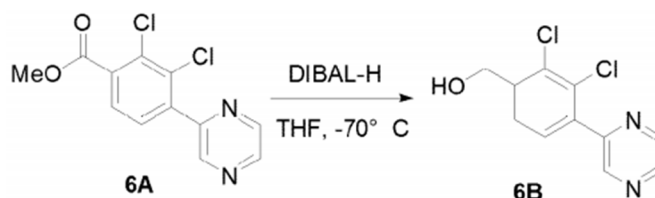
**[0069]** Se añadió el compuesto 2A (2,91 kg en 20,5 kg de solución) a un reactor de 100 L a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se añadieron secuencialmente DME (45 mL), 2-cloropirazina (1,42 kg, 12,4 mol., 1,0 ec.) y Pd(dppf)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 % p/p, 291 g), y cada uno se mezcló a temperatura ambiente bajo nitrógeno. Se burbujeó nitrógeno en la mezcla durante 20 minutos y la mezcla resultante se purgó y se relleno con nitrógeno (3 veces). La mezcla se calentó a 48-52°C durante 60 minutos. Se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,57 kg, 18,6 mol, 1,5 ec.) a 22 L de agua en otro reactor a temperatura ambiente y luego se añadió gota a gota a la mezcla del compuesto 2A durante 10 minutos. La mezcla se agitó a 48-52°C durante 16 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. Este procedimiento se repitió dos veces y se combinaron los tres lotes.

**[0070]** Se disolvió una solución acuosa de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1,0 kg) en 22 L de agua y se añadió a la mezcla combinada para ajustar el pH a 9. Se añadió TBME (50 L) a la mezcla y se filtró (filtro PET, 3-5 µm, 205 g/m<sup>2</sup>) para eliminar aproximadamente 50 g de material sólido marrón pegajoso (análogo de catalizador). La capa acuosa se separó dos veces y se extrajo con TBME (40 L, 40 L).

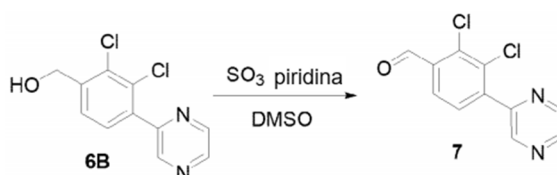
**[0071]** La capa acuosa se combinó con la capa acuosa de un cuarto lote preparado según el método anterior. El pH de las capas acuosas combinadas se ajustó a pH<3 con HCl (2N, 48 L). El sólido precipitó lentamente mientras la mezcla se agitaba a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se filtró (filtro PET, 3-5 µm, 205 g/m<sup>2</sup>) durante 30 minutos para obtener 20 kg de producto húmedo. Se añadió ACN (40 L) a un reactor de 100 L equipado con un agitador superior a temperatura ambiente. Los 20 kg de producto húmedo se añadieron al reactor y la mezcla de reacción se calentó a reflujo y se agitó a reflujo durante 4 horas. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente durante 3 horas (alrededor de 15 °C/hora) y se filtró para obtener 8,5 kg de sólido húmedo. El sólido húmedo se secó al vacío (20-30 mmHg) a 50-55 °C durante 15 horas para obtener el compuesto 3A como un sólido blanco pálido (6,1 kg; 97,4 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 3,7 minutos); 83,8 % de rendimiento). 1H-RMN (400 MHz, DMSO): δ =7,67 (d, 1H), 7,82 (d, 1H), 8,75 (d, 1H), 8,82 (t, 1H), 8,98 (d, 1H), 13,89 (bs, 1H).

Paso 3: Síntesis del compuesto 6A**[0072]**

**[0073]** Se añadió el compuesto 3A (6,1 kg, 22,7 mol, 1,0 ec.) a un reactor de 100 L equipado con una sonda de temperatura, agitador superior y condensador. Se añadió metanol (92 L) al reactor a temperatura ambiente. La mezcla se enfrió a 0-10 °C y se le añadió gota a gota  $\text{SOCl}_2$  (5,4 kg, 45,3 mol, 2,0 ec.) a 0-10 °C durante 30 minutos. La mezcla de reacción se calentó a reflujo (65 °C) y se agitó a reflujo durante 15 horas. Se formó una suspensión. La mayor parte del disolvente y  $\text{SOCl}_2$  se eliminó mediante destilación al vacío hasta que quedaron aproximadamente 30 L. La mezcla se concentró al vacío (30-40 mmHg) a 50-55 °C durante aproximadamente 6 horas. Se añadió agua (10 L) al residuo a una temperatura de -5 a 15 °C. El pH se ajustó a 8-9 con una solución acuosa de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (200 g, disueltos en 2L de agua) a una temperatura de -5 a 15 °C. La capa acuosa resultante se extrajo dos veces con acetato de isopropilo (25 L, 25 L). La combinación de capas orgánicas (alrededor de 50 kg) se lavó con 20 L de capa acuosa de  $\text{NaHCO}_3$ . La capa orgánica se separó y se lavó con 10 L de una solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3$ . Se combinaron todas las capas acuosas (55,8 kg). La capa orgánica se filtró a través de una capa de sílice (30 cm) y la capa se lavó con acetato de isopropilo extra hasta que el compuesto 6A se filtró del gel de sílice (alrededor de 3 horas). La capa orgánica se concentró hasta aproximadamente 5 L. Se añadió THF (10 L) al residuo y se concentró hasta aproximadamente 5 L (3 veces) al vacío (30-40 mmHg) a 50-55 °C durante aproximadamente 3 horas. Se añadieron otros 10 L de THF al concentrado residual, dando una solución concentrada del compuesto 6A (15,8 kg; 32,83 %, 5,19 kg de Compuesto 6A en solución; 97,9 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 8,5 min); 80,8 % producir). 1H-RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 3,98 (s, 3H), 7,54 (d, 1H), 7,78 (d, 1H), 8,63 (d, 1H), 8,72 (t, 1H), 8,94 (d, 1H).

Paso 4: Síntesis del compuesto 6B**[0074]**

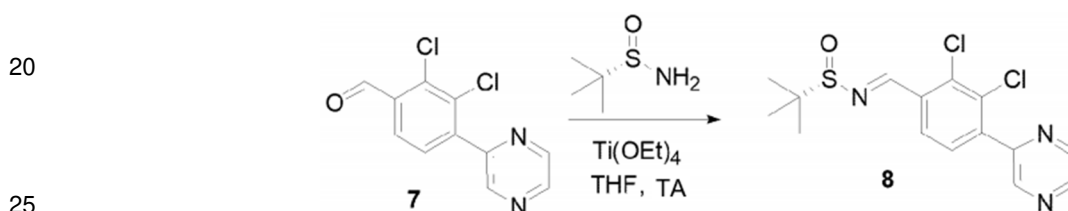
**[0075]** Se añadió THF (26 L) a un reactor de 100 L equipado con una sonda de temperatura y un agitador superior bajo nitrógeno. Se añadió DIBAL-H (26 kg, 46 mol, 5,0 ec.) y el sistema se purgó y se llenó con nitrógeno tres veces. La mezcla se enfrió a -78 a -70 °C para formar la solución A. Se añadió gota a gota una solución a temperatura ambiente del compuesto 6A (2,6 kg, 9,2 mol, 1,0 ec.) en 52 L de THF a -78 a -70 °C durante 30 minutos bajo nitrógeno. La mezcla se calentó a -30 °C durante aproximadamente 5-6 horas. La mezcla de reacción se agitó de -40 a -30 °C durante 30 minutos. La mezcla se añadió lentamente a 42 L de HCL 2N durante 1 hora alcanzando una temperatura máxima de 35 °C. La mezcla se extrajo con 26 L de acetato de isopropilo. La capa orgánica se separó y se lavó con 30 L de salmuera. Este procedimiento se repitió y ambos lotes de la capa orgánica se combinaron y concentraron desde alrededor de 100 L hasta alrededor de 5-10 L al vacío. Un sólido se formó lentamente durante la concentración. La mezcla se enfrió a 5-15 °C y se agitó durante 1 hora. La mezcla se filtró (30-50  $\mu\text{m}$ ) durante 30 minutos. El sólido se secó al vacío a 50 °C durante 6 horas para obtener el compuesto 6B como un sólido pardo (2,1 kg; 97,5 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 8,6 min); 45,7 % de rendimiento). 1H-RMN (400 MHz, DMSO):  $\delta$  = 4,65 (d, 2H), 5,68 (t, 1H), 7,62 (d, 1H), 7,68 (d, 1H), 8,72 (d, 1H), 8,80 (t, 1H), 8,94 (d, 1H).

Paso 5: Síntesis del compuesto 7**[0076]**

5 **[0077]** Se añadió DMSO (10 L) a un matraz de 50 L equipado con una sonda de temperatura y agitador superior bajo nitrógeno a temperatura ambiente. Se añadió el compuesto 6B (2,05 kg, 8,04 mol, 1,0 ec.) bajo nitrógeno a temperatura ambiente. Se añadió Et<sub>3</sub>N (8 L) bajo nitrógeno a temperatura ambiente y luego la mezcla se enfrió a 15-20 °C. Se disolvió SO<sub>3</sub>.piridina (5,1 kg, 32,08 mol, 4,0 ec.) en 10 L de DMSO a 5-15 °C en un matraz separado y se añadió a la mezcla gota a gota durante 3,5 horas a aproximadamente 20 °C. La mezcla de reacción se transfirió a 70 L de hielo-agua. La mezcla en suspensión se agitó a 0-10 °C durante 1 hora y se filtró (PET, 3-5 mm, 205 g/m<sup>2</sup>) por centrifugación durante 1,5 horas para obtener el compuesto 7 como un sólido pardo. El sólido se disolvió en 35 L de DCM a temperatura ambiente. La capa de DCM resultante se lavó con 5 L de salmuera. La capa orgánica se separó y se concentró al vacío a 40-45 °C hasta sequedad para obtener el compuesto 7 como un sólido pardo (2,33 kg; 96,3 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 9,2 minutos); 93,5 % de rendimiento). 1H-RMN (400 MHz, DMSO): δ = 7,67 (d, 1H), 7,99 (d, 1H), 8,67 (d, 1H), 8,75 (s, 1H), 8,99 (d, 1H), 10,56 (s, 1H).

#### Paso 6: Síntesis del compuesto 8

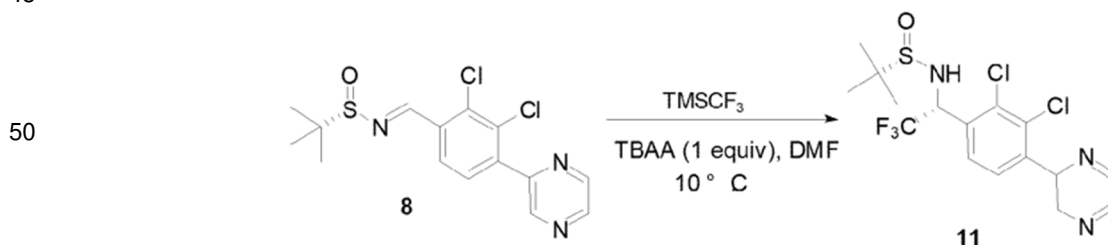
15 **[0078]**



30 **[0079]** Se añadió THF (23 L) a un matraz de 50 L equipado con una sonda de temperatura y un agitador superior bajo nitrógeno a temperatura ambiente. El compuesto 7 (2,3 kg, 9,1 mol, 1,0 ec.) y (S)-2-metilpropano-2-sulfonamida (1,21 kg, 10 mol, 1,1 ec.) se añadieron secuencialmente al matraz bajo nitrógeno. Se añadió gota a gota Ti(OEt)<sub>4</sub> (6,22 kg, 27,3 mol, 3,0 ec.) al matraz durante 1 hora a 30-35 °C bajo nitrógeno. El sistema se purgó con nitrógeno tres veces y luego la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadió acetato de isopropilo (40 L) a la mezcla de reacción. A continuación, la mezcla de reacción completa se cargó en 20 L de salmuera mientras se agitaba lentamente a temperatura ambiente. Se formó mucho sólido y no se observó liberación de calor. El sólido (alrededor de 18 kg) se filtró usando una centrífuga, y luego el sólido se suspendió con 20 L de acetato de isopropilo de nuevo durante 20 minutos y se filtró de nuevo, dando como resultado un sólido ligeramente menos (17,3 kg). A continuación, los filtrados se combinaron y lavaron con 20 L de salmuera. La capa orgánica se separó y se concentró en un rotavapor al vacío (30-40 mmHg) a 40-50 °C durante unas 4 horas para eliminar los disolventes y obtener un aceite marrón (compuesto 8). El aceite se disolvió en DMF para obtener una solución negra (7,36 kg; 40,1 %; 3,0 kg de Compuesto 8 en solución; 92,1 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 9,7 minutos); >100 % de rendimiento). 1H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,30 (s, 9H), 7,59 (d, 1H), 8,11 (d, 1H), 8,64 (s, 1H), 8,73 (m, 1H), 8,97 (s, 1H), 9,10 (s, 1H).

#### Paso 7: Síntesis del compuesto 11

45 **[0080]**

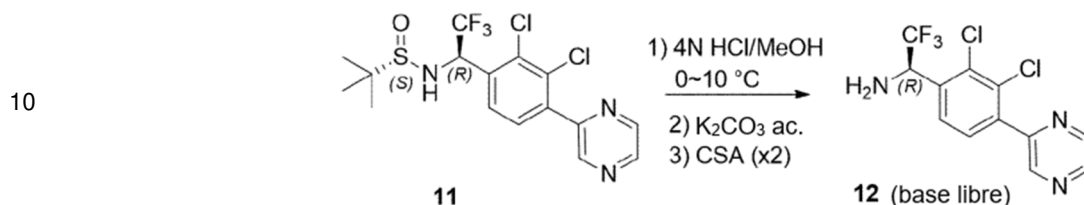


60 **[0081]** Se añadió DMF (26 L, 10 v/p) a un matraz de 50 L equipado con una sonda de temperatura y un agitador superior bajo nitrógeno a 15°C. El compuesto 8 (7,3 kg de solución de DMF, que contenía 2,9 kg, 8,1 mol, 1,0 ec.) y TBAAs (2,44 kg, 8,1 mol, 1,0 ec.) se añadieron secuencialmente al matraz bajo nitrógeno. La mezcla se enfrió a 0-10 °C. A continuación se añadió TMSCF<sub>3</sub> (2,88 kg, 20,3 mol, 2,5 ec.) al matraz durante 60 min a 0-10 °C. La mezcla de reacción se agitó a 0-5 °C bajo protección con nitrógeno durante 3 horas. Se añadió acetato de isopropilo (60 L) a la mezcla, seguido de la adición de 45 L de NaHCO<sub>3</sub> con agitación a 5-25 °C. La capa orgánica se separó, se lavó tres veces con NaHCO<sub>3</sub> (30 L X 3) y se concentró de 60 kg a 2,5 kg de aceite pardo. El producto oleoso se disolvió en 20 L de TBME y se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice (alrededor de 40 cm de alto, 30 cm de diámetro) durante 2 horas para obtener 2,14 kg del compuesto 11 en solución de TBME. La solución se concentró a 45-50 °C hasta sequedad para obtener el compuesto 11 como un aceite negro (1,85 kg; 85,2 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 9,1 minutos, 9,6 minutos para diastereoisómero); 53,6 % de rendimiento). 1H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,33 (s, 9H), 3,82-3,85 (d, 1H), 5,61-5,66 (m,

1H), 7,53-7,60 (m, 2H), 8,63-8,64 (d, 1H), 8,71-8,72 (m, 1H), 8,95 (s, 1H).

Paso 8: Síntesis del compuesto 12 (base libre)

5 **[0082]**



15 **[0083]** El compuesto 11 (1,8 kg, 4,23 mol, 1,0 ec., bruto) se añadió a un reactor de 50 L equipado con una sonda de temperatura y un agitador superior bajo nitrógeno a 25 °C. Se añadió MeOH anhidro (18 L) para disolver el compuesto 11. A continuación se añadió gota a gota MeOH/HCl (18 L, 1 N) a 25-30 °C durante 10 minutos y la mezcla se agitó a 25-30 °C durante 1 hora. Se añadió agua (15 L) a la reacción y la mezcla se concentró en un rotavapor al vacío (30-40 mmHg) a 45-50 °C durante aproximadamente 4 horas para eliminar el disolvente. El pH de la mezcla se ajustó a 10 con 5 L de solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. A continuación se añadieron 20 L de EtOAc a la mezcla y la capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc (15 L X 2). Las capas orgánicas se combinaron y lavaron con 10 L de salmuera. Las capas orgánicas combinadas contenían 996 g del compuesto 12 en 40 kg de solución de EtOAc (84 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 2,8 minutos). Las capas orgánicas se concentraron en un rotavapor al vacío (30-40 mmHg) a 45°C-50 °C durante aproximadamente 3 horas a un volumen de 7,5 kg del compuesto 12 en solución de EtOAc (83 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 2,7 minutos).

20

25

30 **[0084]** En un reactor separado de 50 L equipado con una sonda de temperatura y agitador superior, se añadió D-CSA (930 g, 4,0 mol, 1,0 ec. a 1,26 kg del compuesto 12) y se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno, EtOAc (10 L) y luego la solución de EtOAc del compuesto 12 (1,26 kg, 3,9 mol, 1,0 ec.) cada uno secuencialmente al reactor. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y lentamente se convirtió en una suspensión. La mezcla se filtró por centrífuga y se lavó con EtOAc para producir 2,3 kg del compuesto 12 como un sólido blanquecino (96,0 % de pureza).

35 **[0085]** El producto sólido, 20 L de EtOAc y 10 L de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso al 10 % se añadieron seguidamente gradualmente a un matraz de 50 L y se agitó a temperatura ambiente hasta que no quedó ningún sólido (pH = 9-10). La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc (10 L X 2). Las capas orgánicas se combinaron (alrededor de 32 kg) y se lavaron con 10 L de salmuera. La capa orgánica contenía 716 g del compuesto 12 en 31,8 kg de solución.

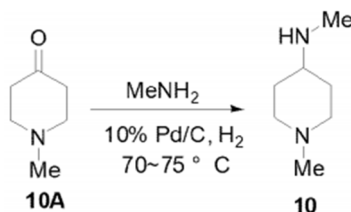
40 **[0086]** La capa orgánica se concentró al vacío a 45-50 °C hasta aproximadamente 8 L. Se añadió carbón activado (200 g) a la capa orgánica y la mezcla se agitó a 60-70 °C durante 1 hora, se enfrió a temperatura ambiente y se filtró usando un embudo Buchner y papel de filtro (tamaño de poro: 30-50 µm) durante 30 minutos para eliminar el carbón activado. La mezcla se concentró en un rotavapor al vacío (30-40 mmHg) a 45-50 °C durante aproximadamente 3 horas para producir 710 g del compuesto 12 como un sólido amarillo (99,4 % de pureza).

45 **[0087]** Se añadieron secuencialmente D-CSA (410 g, 1,77 mol, 1,0 ec. a 680 g del compuesto 12), 3,4 L de iPrOH y 68 ml de agua a un reactor de 10 L equipado con una sonda de temperatura y un agitador superior y se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla se calentó a reflujo (84 °C) para formar la solución A después de 1 hora. El compuesto 12 (680 g) se disolvió en 3,4 L de iPrOH y se añadió a la solución A para una partición. Se formó una solución clara y la temperatura disminuyó a 65 °C. La mezcla se agitó a 65 °C durante aproximadamente 15 minutos, después de lo cual apareció un sólido. La mezcla se enfrió a 10 °C durante 2 horas, se agitó a 10 °C durante 30 minutos más y se filtró a través de un embudo Buchner y papel de filtro (tamaño de poro: 30-50 µm) durante 30 minutos para recoger los 1,1 kg de Blanco sólido.

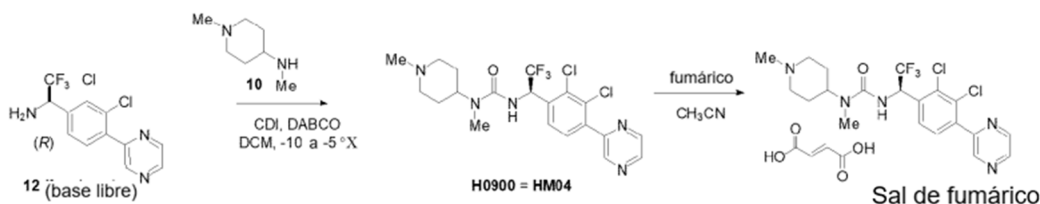
50 **[0088]** Se añadieron secuencialmente EtOAc (10 L), 1,1 kg de producto sólido blanco y 5 L de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10 % a un matraz de 20 L y se mezclaron durante 5 minutos. El sólido se disolvió (pH = 9-10). La capa de EtOAc se separó y la capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc (5 L cada vez). Las capas orgánicas se combinaron (unos 20 L), se lavaron con 5 L de salmuera y se concentraron en un rotavapor al vacío (30-40 mmHg) a 45-55 °C durante unas 3 horas para eliminar la mayor parte de la solución y hasta que el peso del residuo alcanzó 1 kg. Se añadieron heptanos (1 L) a la mezcla y se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se filtró usando un embudo Buchner y papel de filtro (tamaño de poro: 30-50 mm) durante 30 minutos para obtener 419 g del compuesto 12 base como un sólido blanco (99,7 % de pureza). El filtrado se concentró hasta 135 g del compuesto 12 como un sólido amarillo (98,7 % de pureza). 1H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1,85 (bs, 2H), 5,17 (m, 1H), 7,56 (d, 1H), 7,68 (d, 1H), 8,62 (d, 1H), 8,70-8,71 (m, 1H), 8,93 (s, 1H). Combinados, los productos dieron como resultado un rendimiento del compuesto 12 del 40,7 %.

55

60

Paso 9: Síntesis del compuesto 10**[0089]**

**[0090]** Se añadió Pd/C (40 g, 5 % p/p) a un reactor de autoclave de 10 L a temperatura bajo nitrógeno. Se añadieron secuencialmente al reactor THF (2 L), 2 L de metilamina (solución alcohólica al 27 %-30 %, 2,1 ec.) y 800 g del compuesto 10A (7 mol, 1,0 ec.). El sistema se purgó tres veces con hidrógeno. La mezcla se agitó a presión de hidrógeno (50 psi) a 70-75 °C durante la noche y luego se filtró usando un embudo Büchner y papel de filtro (tamaño de poro: 30-50 mm) durante 10 minutos para eliminar el Pd/C. El filtrado se concentró en un rotavapor al vacío (30-40 mmHg) a 45-50 °C durante aproximadamente 3 horas para obtener 933 g de aceite amarillo. La mezcla se destiló sin columna a presión atmosférica y la parte de 140-170 °C se recogió para obtener 763 g del compuesto 10 como un aceite incoloro (98,6 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 4,8 minutos); 84,2 % de rendimiento; 8000 ppm de etanol residual). Se destiló una parte del aceite (563 g) utilizando una columna de 3 cm a presión atmosférica y se recogió la parte a 140-170 °C para obtener 510 g del compuesto 10 (75,8 % de rendimiento; 134 ppm de etanol residual). 1H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 0,82 (bs, 1H), 1,10-1,12 (q, 2H), 1,66 (d, 2H), 1,73-1,81 (t, 2H), 2,05 (s, 3H), 2,08-2,19 (m, 1H), 2,22 (s, 3H), 2,60 (d, 2H).

Paso 10: Síntesis de la sal de fumarato HM04**[0091]**

**[0092]** DCM (1 L), 200 g de CDI (1,23 mol, 2,0 ec.) y 35 g de DABCO (0,31 mol, 0,5 ec.) se añadieron secuencialmente en un reactor de 3 L equipado con una sonda de temperatura y un agitador superior, y se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La mezcla se enfrió de -10 a -5 °C. El compuesto 12 (200 g) se disolvió en 1 L de DCM y se añadió a la mezcla gota a gota durante 1 hora, seguido de agitación durante 16 horas de -10 a -5 °C. Se añadió el compuesto 10 (159 g, 1,24 mol, 2,0 ec.) de -10 a 0 °C durante 10 minutos. A continuación, la mezcla se calentó de 0 a 5 °C y se mantuvo durante 2 horas. La mezcla se concentró al vacío a 40-45 °C hasta aproximadamente 1 L. Se añadió HCl (1 L de 1 N) al residuo y se concentró en un rotavapor al vacío (30-40 mmHg) a 45-50 °C durante alrededor de 2 horas para eliminar el DCM. Se añadieron otros 3 L de HCl IN al residuo y se extrajo tres veces con TBME (4 L, 2 L, 2 L). La capa acuosa se ajustó lentamente a pH = 9-10 con K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso al 20 % (alrededor de 1,5 L) y se extrajo con DCM (2 L X 3). Las capas orgánicas se combinaron (alrededor de 4 L) y se lavaron tres veces con KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,25 N (1,2 L X 3). La capa orgánica se lavó con 2 L de salmuera para llevar el pH a neutro y se concentró en un rotavapor al vacío (30-40 mmHg) a 45-50 °C durante aproximadamente 2 horas hasta 450 g (335 mL). Se añadió MTBE (1,5 L) al residuo y se destiló hasta que se recogieron 500 mL de líquido. Este paso se repitió cuatro veces con la adición de 500 mL de TBME y la recolección de 500 mL de destilado, con la excepción de que se recolectaron 330 mL de líquido en la destilación final. Aproximadamente 1 a 1,2 L de residuo permanecieron en el matraz. El residuo se enfrió lentamente a temperatura ambiente y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se filtró, se lavó dos veces con TBME (400 mL X 2) y se secó para obtener 192 g de HM04 base libre, un sólido amarillo claro (99,3 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 11,0 minutos). El producto en el pared se disolvió en DCM y se concentró al vacío para obtener 22 g de base libre HM04 como un aceite marrón pegajoso (97,6 % de pureza). El filtrado se concentró al vacío para obtener 22,5 g de un sólido amarillo (94,0 % de pureza).

**[0093]** La base libre HM04 (187 g, 0,39 mol, 1,0 ec., 99,3 % de pureza) y 1,9 L de ACN se agregaron secuencialmente a un matraz de 3 L equipado con una sonda de temperatura y un agitador superior y se agitó a 15 °C bajo nitrógeno para obtener una suspensión de color amarillo claro. Se añadió ácido fumárico (45,6 g, 0,39 mol, 1,0 ec.) al matraz y se generó una suspensión blanca después de 1 minuto. La suspensión de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente, se filtró (15-20 mm, ceniza <0,15), se lava dos veces con ACN (50 mL X 2) y se seca al vacío a 50 °C durante 6 horas para obtener 207 g de sal de fumarato HM04 como un sólido amarillo claro (99,4 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 11,1 minutos); 57,8 % de rendimiento; 3100 ppm de ACN residual). El filtrado se concentró al vacío para obtener 20,1 g de sal de fumarato HM04 como un sólido amarillo claro (97,3 % de pureza).

**[0094]** Una parte del producto (117 g) se secó adicionalmente en un horno de vacío (20-40 mmHg) para reducir el

contenido de acetonitrilo residual. Después de secar a 60 °C durante 6 horas, 15 horas y 72 horas; y a 65 °C durante 18 horas, el contenido de acetonitrilo residual se midió como 3100 ppm, 2570 ppm, 1300 ppm y 256 ppm, respectivamente. Después del proceso de secado, se aislaron 98 g de sal de fumarato HM04 (99,4 % de pureza (AUC por HPLC, tiempo de retención = 11,0 minutos); <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO): δ = 1,49-1,58 (m, 2H), 1,81-1,92 (m, 2H), 2,44-2,53 (m, 5H), 2,78 (s, 3H), 3,12 (m, 2H), 4,06-4,13 (m, 1H), 6,36-6,41 (m, 1H), 6,55 (s, 2H), 7,47 (d, 1H), 7,73 (d, 1H), 8,11 (d, 1H), 8,75 (d, 1H), 8,81-8,82 (m, 1H), 8,99 (d, 1H). El rendimiento de 98 g de sal de fumarato HM04 aislado después de secar el lote parcial se extrapola sobre el lote completo para calcular un rendimiento aproximado del 48 % para el paso 10.

[0095] El análisis XRPD de productos de sal de fumarato HM04 obtenidos después de secar a 60 °C durante 6 horas, 15 horas y 72 horas, y se realizó a 65 °C durante 18 horas (véanse las figuras 6-9, respectivamente). El perfil de XRPD mostró que el producto de sal de fumarato HM04 era consistente con la Forma 1.

#### Ejemplo 6. Síntesis racionalizada de la Forma 1 de la sal de fumarato de HM04

[0096] El rendimiento total de la sal de fumarato de HM04 producida utilizando el Paso 10 del Ejemplo 5 se calculó como aproximadamente el 48 %. Para aumentar el rendimiento general, se investigó una síntesis optimizada que eliminó el paso de aislar la base libre de HM04. En particular, se cambió el paso 10 del método del Ejemplo 5 mostrado en la figura 5. En la figura 10 se muestra una descripción general de la síntesis optimizada que comienza después del paso 9 del Ejemplo 5.

[0097] Ensayo 1 de sal de fumarato HM04 optimizada: DCM (121,4 g), CDI (20,0 g, 123 mmol, 2 ec.) y DABCO (Se añadieron secuencialmente 3,5 g, 31 mmol) a un reactor inertizado de 1 L. La mezcla se enfrió a -10 °C. Por separado, se cargaron en un recipiente una solución de DCM (132,5 g) y el compuesto 12 (20,0 g, 62,1 mmol) y se agitó hasta obtener una solución. Esta solución se vertió en el reactor de 1 L durante 33 minutos manteniendo la temperatura interna entre -10 y -5 °C. Al final de la adición, el recipiente se enjuagó con DCM (7,0 g), que luego se añadió a la mezcla de reacción. Después de agitar durante la noche (19 horas) y una IPC positiva, se añadió el compuesto 10 (15,9 g, 124 mmol, 2 ec.) durante 15 minutos y el recipiente se enjuagó con DCM (9,0 g). Después de calentar a 0 °C, 1 hora de agitación, IPC positivo y 1,5 horas más de agitación, la mezcla se calentó a temperatura ambiente y se cargó con agua (200,1 g). La capa acuosa se separó y la capa orgánica se extrajo dos veces con 1N HCl (201, 200 g). Las capas acuosas combinadas que contenían el producto se lavaron con TBME (148 g). Después de eliminar la capa orgánica, la capa acuosa se cargó con DCM (265,0 g) y solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 50 % (alrededor de 240 mL) hasta alcanzar un pH de 9,61.

[0098] Mientras tanto, se preparó una solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (8,2 g) en agua (240 g). La capa orgánica que contenía el producto se cargó con la solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hasta alcanzar un pH de 7,12 (142,2 g). Después de la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se lavó con agua (200 g). Después de la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se evaporó a 50 °C. Se añadió ACN (314,4 g) y el disolvente se destiló de nuevo a 70-75 °C al vacío. Se añadió ACN (235,8 g) y el disolvente se destiló de nuevo al vacío. Se añadió ACN (141,5 g), la solución resultante se filtró y el filtro se lavó con ACN (16 g). Después de calentar a 60 °C, se añadió ácido fumárico (7,2 g, 62 mmol) a la solución, provocando un precipitado blanco. Después de enfriar a 20 °C durante 1 hora, la suspensión se filtró y se lavó dos veces con TBME (2 x 30 g). Después del secado sobre el filtro con flujo de nitrógeno, se obtuvieron 70,7 g de producto bruto húmedo. Esto se suspendió con TBME (177,0 g) durante 1 hora, se filtró y se lavó con TBME (70 g). Después de secar sobre el filtro bajo flujo de nitrógeno, se obtuvieron 33,0 g de producto húmedo. El calentamiento a 50 °C al vacío proporcionó el producto seco como un polvo blanco de sal de fumarato HM04 (21,1 g; 99,8 % de pureza por HPLC; 57 % de rendimiento). El análisis XRPD confirmó que el producto era la Forma 1 (consulte la figura 11).

[0099] Los análisis XRPD descritos en los Ejemplos 6, 7 y 8 se realizaron usando un difractómetro X'Pert PRO PANalytical y las siguientes condiciones experimentales:

Ánodo del tubo: Cu  
 Voltaje del tubo: 40 kV  
 Corriente del tubo: 40 mA  
 Longitud de onda alfa1: 1,5406 Å  
 Longitud de onda alfa2: 1,5444 Å  
 Ángulo inicial (2 theta): 3  
 Ángulo final (2 theta): 40  
 Tiempo de conteo: 12.700 segundos  
 Modo de exploración: Exploración continua

[0100] Ensayo 2 de sal de fumarato HM04 optimizada: el proceso simplificado descrito anteriormente se optimizó aún más para aprovechar las buenas propiedades de cristalización de la sal de fumarato HM04. Además de omitir el aislamiento de la base libre y aislar el producto de sal de fumarato HM04 directamente después de la adición de ACN y ácido fumárico, en este ensayo también se omitió el tratamiento extractivo ácido/base de la base libre. El exceso de ácido fumárico se eliminó con una suspensión en TBME

[0101] DCM (120 g), CDI (20,1 g, 124 mmol, 2 ec.) y DABCO (3,5 g, 31 mmol) se agregaron secuencialmente en un reactor inertizado de 1 L. La mezcla se enfrió a -10 °C. Por separado, se cargaron en un recipiente una solución de DCM

(133,8 g) y el compuesto 12 (20,1 g, 62,4 mmol) y se agitó hasta que se obtuvo una solución. Esta solución se vertió en el reactor de 1 L durante 39 minutos manteniendo la temperatura interna entre -10 y -5 °C. Al final de la adición, el recipiente se enjuagó con DCM (7 g), que luego se añadió a la mezcla de reacción. Después de agitar durante la noche (18 horas) y una IPC positiva, se añadió el compuesto 10 (15,9 g, 124 mmol, 2 ec.) durante 15 minutos y el recipiente se enjuagó con DCM (7 g). Después de calentar a 0 °C, 1 hora de agitación e IPC positivo, la mezcla se cargó con agua (200 g) y se calentó a temperatura ambiente.

**[0102]** Mientras tanto, se preparó una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (13,8 g) en agua (402 g). La capa acuosa se separó y la capa orgánica que contenía el producto se cargó con la solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  hasta alcanzar un pH de 7. Después de la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se lavó con agua (200 g). Después de la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se filtró y el filtro se lavó con ACN (64 g). Se añadió ácido fumárico (7,2 g, 62 mmol) a la solución, provocando un precipitado blanco, que se filtró y se lavó dos veces con ACN (2 x 31,5 g). Después del secado sobre el filtro con flujo de nitrógeno, se obtuvieron 44,5 g de producto bruto húmedo. Esto se suspendió con TBME (266,8 g) durante 1 hora, se filtró y se lavó dos veces con TBME (2X30 g). Después de secar sobre el filtro bajo flujo de nitrógeno, se obtuvieron 45,0 g de producto húmedo. El secado a 60 °C al vacío proporcionó el producto seco como un polvo blanco de sal de fumarato HM04 (25,2 g; 99,6 % de pureza por HPLC; 68 % de rendimiento). El análisis XRPD confirmó que el producto era de Forma 1 (consulte la figura 12).

**[0103]** Aumento de escala de la sal de fumarato HM por el método del ensayo 2: DCM (418 g), CDI (70,5 g, 435 mmol, 2 ec.) y DABCO (12,4 g, 111 mmol) se agregaron secuencialmente en un reactor 2 L inertizado. La mezcla se enfrió a -10 °C. Por separado, se cargaron en un recipiente una solución de DCM (465 g) y el compuesto 12 (70,0 g, 217 mmol) y se agitó hasta que se obtuvo una solución. Esta solución se vertió en el reactor de 2 L durante 24 minutos manteniendo la temperatura interna entre -10 y -5 °C. Al final de la adición, el recipiente se enjuagó con DCM (25 g), que luego se añadió a la mezcla de reacción. Después de agitar durante la noche (20 horas) y una IPC positiva, se añadió el compuesto 10 (55,7 g, 434 mmol, 2 ec.) durante 15 minutos y el recipiente se enjuagó con DCM (24 g). Después de calentar a 0 °C, 1,5 horas de agitación e IPC positivo, la mezcla se cargó con agua (700 g) y se calentó a temperatura ambiente.

**[0104]** Mientras tanto, se preparó una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (48,3 g) en agua (1401 g). La capa acuosa se separó y la capa orgánica que contenía el producto se cargó con la solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  hasta alcanzar un pH de 7,03. Después de la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se lavó con agua (700 g). Después de la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se filtró y el filtro se lavó con ACN (220,5 g). Se añadió ácido fumárico (25,3 g, 218 mmol) a la solución, provocando un precipitado blanco, que se filtró y se lavó con ACN (111 g). Después de secar en el filtro con flujo de nitrógeno, el producto se suspendió con TBME (933 g) durante 80 minutos, se filtró y se lavó dos veces con TBME (2X104 g). Después de secar sobre el filtro bajo flujo de nitrógeno, se obtuvieron 80,8 g de producto húmedo. El secado a 60 °C al vacío proporcionó el producto seco como un polvo blanco de sal de fumarato HM04 (78,0 g; 99,5 % de pureza por HPLC; 61 % de rendimiento). El análisis XRPD confirmó que el producto era de Forma 1 (consulte la figura 13).

**[0105]** Ensayo 3 de sal de fumarato HM04 racionalizada: DCM (120 g), CDI (20,2 g, 125 mmol, 2 ec.) y DABCO (3,5 g, 31 mmol) se añadieron secuencialmente a un reactor inertizado de 1 L. La mezcla se enfrió a -20 °C. Por separado, una solución de DCM (133 g) y el compuesto 12 (20,0 g, 62,1 mmol) se cargaron en un recipiente y se agitó hasta que se obtuvo una solución. Esta solución se dejó caer en el reactor de 1 L durante 35 min. manteniendo la temperatura interna entre -20 y -15 °C. Al final de la adición, el recipiente se enjuagó con DCM (7,2 g), que luego se añadió a la mezcla de reacción. Después de agitar durante la noche (24 horas) y una IPC positiva, se añadió el compuesto 10 (15,9 g, 124 mmol, 2 ec.) durante 10 minutos y el recipiente se enjuagó con DCM (7,0 g). Después de calentar a 0 °C, 1 hora de agitación e IPC positivo, la mezcla se cargó con agua (200 g) y se calentó a temperatura ambiente.

**[0106]** Mientras tanto, se preparó una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (13,7 g) en agua (402 g). La capa acuosa se separó y la capa orgánica que contenía el producto se cargó con la solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (311,1 g) hasta alcanzar un pH de 7. Después de la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se lavó con agua (200 g). Después de la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se filtró y el filtro se lavó con ACN (63 g). Se añadió ácido fumárico (7,2 g, 62 mmol) a la solución, provocando un precipitado blanco, que se filtró y se lavó con ACN (32 g). Después del secado sobre el filtro con flujo de nitrógeno, se obtuvieron 53,7 g de producto bruto húmedo. Esto se suspendió con TBME (267,0 g) durante 40 minutos, se filtró y se lavó dos veces con TBME (2 x 30 g). Después de secar sobre el filtro bajo flujo de nitrógeno, se obtuvieron 41,8 g de producto húmedo. El secado a 60 °C al vacío proporcionó el producto seco como un polvo blanco de sal de fumarato HM04 (28,1 g; 99,7 % de pureza por HPLC; 76 % de rendimiento). El análisis XRPD confirmó que el producto era de Forma 1 (consulte la figura 14).

#### **Ejemplo 7. Síntesis de la Forma 3 de la sal de fumarato de HM04**

**[0107]** Se disolvió la base libre de HM04 (16,0 g, 33,6 mmol) en ACN (251 g) en un reactor inertizado de 1 litro. Después de calentar a 60 °C, se añadieron a la solución ácido fumárico (3,9 g, 33,6 mmol) y un enjuague con ACN (2,6 g), provocando un precipitado blanco. Después de enfriar a 20 °C durante 2 horas, se filtró el producto. Después de secar sobre el filtro con flujo de nitrógeno, se obtuvieron 6,4 g de producto húmedo. El secado a 60 °C al vacío proporcionó el producto seco como un polvo blanco de sal de fumarato HM04. Se identificó una forma cristalina diferente, la Forma 3, mediante análisis XRPD (ver Figura 15).

**Ejemplo 8. Síntesis de la Forma 4 de la sal de fumarato HM04**

[0108] Se añadieron secuencialmente DCM (120 g), CDI (20,0 g, 123 mmol, 2 ec.) y DABCO (3,5 g, 31 mmol) a un reactor inertizado de 1 L. La mezcla se enfrió a -10 °C. Por separado, se cargaron en un recipiente una solución de DCM (133 g) y el compuesto 12 (20,0 g, 62,1 mmol) y se agitó hasta que se obtuvo una solución. Esta solución se vertió en el reactor de 1 L durante 35 minutos manteniendo la temperatura interna entre -10 y -5 °C. Al final de la adición, el recipiente se enjuagó con DCM (7,0 g), que luego se añadió a la mezcla de reacción. Después de agitar durante la noche (18,5 horas) y una IPC positiva, se añadió el compuesto 10 (15,8 g, 123 mmol, 2 ec.) durante 10 minutos y el recipiente se enjuagó con DCM (6,8 g). Después de calentar a 0 °C, 1 hora de agitación, IPC positivo y otros 20 minutos de agitación, la mezcla se calentó a temperatura ambiente y se cargó con agua (200 g). La capa acuosa se separó y la capa orgánica se extrajo dos veces con 1N HCl (2 x 200 g). Las capas acuosas combinadas que contenían el producto se lavaron con TBME (148 g). Después de eliminar la capa orgánica, la capa acuosa se cargó con DCM (265,0 g) y solución de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 50 % (alrededor de 240 mL) hasta alcanzar un pH de 9,66.

[0109] Mientras tanto, se preparó una solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (8,2 g) en agua (240 g). La capa orgánica que contenía el producto se cargó con la solución de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (138,2 g) hasta alcanzar un pH de 7,10. Después de la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se lavó con agua (200 g). Después de la separación de la capa acuosa, la capa orgánica se evaporó a 40 °C. Se añadió TBME (370 g) y se destiló nuevamente a 65 °C al vacío hasta dejar 10 volúmenes (se recogieron 218,5 g de disolvente). Se añadió ácido fumárico (7,2 g, 62 mmol) a la solución, provocando un precipitado blanco. Después de enfriar a 20 °C durante 2 horas y 15 horas a esta temperatura, la suspensión se filtró, las aguas madres se recircularon una vez y el producto se lavó con TBME (33 g). Después del secado sobre el filtro con flujo de nitrógeno, se obtuvieron 26,5 g de producto húmedo. El secado a 50-60 °C al vacío proporcionó el producto seco como un polvo blanco de sal de fumarato HM04 (22,3 g; 99,9 % de pureza por HPLC; 61 % de rendimiento). Se identificó una forma cristalina diferente, la Forma 4, mediante análisis XRPD (ver Figura 16).

**Ejemplo 9. Comparación de la farmacocinética de la administración oral de la base libre de HM04 y la sal de fumarato de HM04 en ratas y perros**

[0110] La farmacocinética de HM04 en plasma de ratas macho Sprague Dawley dosificadas con una administración oral única de 3 mg/kg de HM04 (basado en el peso de la base libre) formulada en una solución de DMAC al 10 %, Solutol al 6 % y PBS al 84 % utilizando la base libre HM04 o la sal de fumarato HM04. Se extrajeron muestras de sangre a intervalos de tiempo establecidos y se midió la concentración plasmática de HM04 mediante LC-MS/MS. En la figura 17 se proporciona una comparación de la concentración plasmática de HM04 (ng/mL) a lo largo del tiempo en ratas dosificadas por vía oral con base libre de HM04 y sal de fumarato de HM04.

[0111] En la Tabla 3, a continuación, se proporciona un resumen del análisis farmacocinético. La biodisponibilidad a 3 mg/kg de base libre de HM04 se calculó a partir de la relación entre el AUC medio oral y el AUC medio de 990,3 ± 24,6 ng·h/mL determinado después de la administración intravenosa de 3 mg/kg de base libre de HM04 a tres ratas macho Sprague Dawley. Biodisponibilidad a 3 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basada en el peso de la base libre) se calculó a partir de la relación entre el AUC medio oral y el AUC medio de 2103,3 ± 357,7 ng·h/mL determinado después de la administración intravenosa de 3 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) a tres ratas macho Sprague Dawley.

Tabla 3.

<b>Estudio farmacocinético en ratas (3 mg/kg HM04 oral)</b>		
Parám (media ± D.E.)	Base libre HM04 (n=3)	Sal de fumarato HM04 (n=3)
<b>Concentración plasmática de HM04 (ng/mL)</b>		
0,08 horas	no probado	no probado
0,25 horas	24,2 ± 6,6	107,8 ± 27,8
0,50 horas	39,0 ± 5,2	325,9 ± 187,8
1 hora	44,4 ± 6,0	201,0 ± 38,7
2 horas	35,7 ± 11,3	173,9 ± 12,2
4 horas	25,0 ± 13,0	108,3 ± 38,3
8 horas	7,9 ± 5,8	42,3 ± 2,5
24 horas	2,4*	no probado
<b>AUC (0-t) (ng·h/mL)</b>	220,0 ± 57,2	970,2 ± 147,0
<b>Tmax (h)</b>	1 ± 0	0,83 ± 0,29
<b>Cmax (ng/mL)</b>	44,4 ± 6,0	329,2 ± 184,6
<b>Biodisponibilidad (%)**</b>	22,2 ± 5,8	46,13 ± 6,99

\* N=1; La concentración de dos de los tres animales estuvo por debajo del nivel de cuantificación.

[0112] La farmacocinética de HM04 en plasma de perros Beagle macho dosificados con una administración oral única de 2 mg/kg de HM04 formulada en una solución de DMAC al 10 %, Solutol al 6 % y PBS al 84 % usando la base libre de HM04 o HM04 se compararon las sales de fumarato. En la figura 18 se proporciona una comparación de la concentración

plasmática de HM04 (ng/ml) a lo largo del tiempo en perros que recibieron dosis orales de base libre de HM04 y sal de fumarato de HM04.

[0113] En la Tabla 4, a continuación, se proporciona un resumen del análisis farmacocinético. La biodisponibilidad se calculó a partir de una proporción normalizada de dosis del AUC medio oral al AUC medio intravenoso ( $AUC_{po}/AUC_{iv} \times Dosis_{iv}/Dosis_{po}$ ). La biodisponibilidad a 2 mg/kg de base libre de HM04 se calculó a partir de una proporción normalizada de la dosis del AUC medio oral al AUC medio de  $782,1 \pm 363,5$  ng·h/mL determinada después de la administración intravenosa de 1 mg/kg de base libre de HM04 a tres perros Beagle machos. La biodisponibilidad a 2 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basada en el peso de la base libre) se calculó a partir de una relación de dosis normalizada del AUC medio oral al AUC medio de  $1126,1 \pm 363,6$  ng·h/mL determinada después de la administración intravenosa de 1 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basada en el peso de la base libre) a tres perros Beagle machos.

Tabla 4.

Estudio farmacocinético en perros (2 mg/kg HM04 oral)		
Parámetro (media ± D.E.)	Base libre HM04 (n=3)	Sal de fumarato HM04 (n=3)
<b>Concentración plasmática de HM04 (ng/mL)</b>		
0,08 horas	no probado	no probado
0,25 horas	8,94 ± 5,56	86,6 ± 32,2
0,50 horas	49,40 ± 7,72	182,4 ± 24,1
1 hora	66,33 ± 4,25	227,4 ± 52,2
2 horas	74,05 ± 3,77	219,0 ± 63,6
4 horas	67,34 ± 6,27	152,9 ± 56,9
8 horas	49,23 ± 10,21	70,2 ± 41,0
24 horas	6,61 ± 4,38	13,1 ± 13,2
<b>AUC (0-t)(ng·h/mL)</b>	928,8 ± 142,5	1854,4 ± 828,1
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	2 ± 0	1,33 ± 0,58
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	74,05 ± 3,77	230,47 ± 57,13
<b>Biodisponibilidad (%)</b>	59,38 ± 9,11	82,34 ± 36,77

**Ejemplo 10. Farmacocinética de la administración oral única de sal de fumarato HM04 en rata y perro**

[0114] La farmacocinética de HM04 en plasma después de la administración oral única de sal de fumarato HM04 a ratas Sprague Dawley macho de 6 semanas de edad y perros Beagle macho (1-5 años de edad). Se prepararon formulaciones de prueba de 0,6 mg/ml, 2 mg/ml y 6 mg/ml de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) en solución de glucosa al 5 %. Se administraron dosis de 3, 10 y 30 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basadas en el peso de la base libre) mediante sonda gástrica como un volumen de dosis de 5 ml/kg de cada una de las tres formulaciones de prueba. Cuatro animales estaban en cada grupo de dosis. La formulación se administró a los perros en ayunas con alimento proporcionado tres horas después de la dosificación.

[0115] En la figura 19 se proporciona una comparación de la concentración plasmática de HM04 (ng/mL) en ratas a lo largo del tiempo y en la Tabla 5, a continuación, se proporciona un resumen del análisis farmacocinético. La biodisponibilidad a 3 mg/kg se calculó a partir de la relación entre el AUC medio oral y el AUC medio de  $1760 \pm 196$  ng·h/mL determinado después de la administración intravenosa de 3 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) a cuatro ratas macho Sprague Dawley. AUC media intravenosa de 3 mg/kg (n=4). La biodisponibilidad a 10 mg/kg se calculó a partir de la relación entre el AUC medio oral y el AUC medio de  $6170 \pm 1770$  ng·h/mL determinada después de la administración intravenosa de 10 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) a cuatro ratas macho Sprague Dawley. La desviación estándar asociada a la biodisponibilidad oral media se calculó según la fórmula:

$$SDq = \left[ \sqrt{(my^2 \cdot SDx^2 + mx^2 \cdot SDy^2)} \right] / my^2$$

donde q = biodisponibilidad media; mx = AUC media normalizada por dosis oral, y my = AUC media normalizada por dosis IV.

Tabla 5

Estudio farmacocinético en ratas			
Parámetro (media ± DE)	3mg/kg (n=4)	10 mg/kg (n=4)	30 mg/kg (n=4)
<b>Concentración plasmática de HM04 (ng/mL)</b>			
0,25 horas	34,7 ± 5,42	150 ± 28,5	950 ± 465
0,50 horas	64,2 ± 35,0	548 ± 603	1400 ± 961
1 hora	82,4 ± 30,8	456 ± 100	2290 ± 537

(Continuación)

<b>Estudio farmacocinético en ratas</b>			
Parámetro (media ± DE)	3mg/kg (n=4)	10 mg/kg (n=4)	30 mg/kg (n=4)
<b>Concentración plasmática de HM04 (ng/mL)</b>			
2 horas	150 ± 53,5	652 ± 62,1	2560 ± 530
4 horas	116 ± 24,0	387 ± 134	2120 ± 422
8 horas	47,0 ± 10,9	215 ± 97,3	1350 ± 179
24 horas	BLQ	8,73 ± 17,5*	14,6 ± 6,8
<b>AUC<sub>(0-último)</sub> (ng*h/mL)</b>	762 ± 164	3360 ± 685 <sup>§</sup>	26200 ± 3970
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	3,00 ± 1,15	1,38 ± 0,750	1,75 ± 0,500
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	2,82 ± 0,354+	4,88 ± 2,07 <sup>§</sup>	2,65 ± 0,193
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	156 ± 47,3	769 ± 458	2590 ± 524
<b>Biodisponibilidad (%)</b>	43,3 ± 10,5	54,4 ± 15,2	
último = hora en la que se midió la última concentración detectable. BLQ = por debajo del límite de cuantificación. *N=1; La concentración de tres de cuatro animales estuvo por debajo del nivel de cuantificación. + N=2; § N=3.			

[0116] La exposición a HM04 aumentó con la dosis con un aumento más que proporcional a 30 mg/kg. Después de la administración oral única de 3, 10 y 30 mg/kg a ratas, HM04 alcanzó su C<sub>max</sub> en 4 horas. Después de la dosificación oral, el compuesto se absorbió con una biodisponibilidad de alrededor del 40-50 % a las dosis de 3 y 10 mg/kg.

[0117] En la figura 20 se proporciona una comparación de la concentración plasmática de HM04 (ng/mL) en perros a lo largo del tiempo y en la Tabla 6, a continuación, se proporciona un resumen del análisis farmacocinético.

Tabla 6

<b>Estudio farmacocinético canino</b>			
Parámetro (media ± D.E.)	3 mg/kg (n=4)	10 mg/kg (n=4)	30 mg/kg (n=4)
<b>Concentración plasmática de HM04 (ng/mL)</b>			
0 horas*	5,34 ± 3,83	2,15 ± 4,30	BLQ
0,25 horas	66,0 ± 26,8	307 ± 246	1940 ± 1330
0,50 horas	360 ± 238	862 ± 460	3730 ± 1560
1 hora	300 ± 127	1510 ± 435	5720 ± 1200
2 horas	287 ± 158 **	1170 ± 260	5030 ± 710
4 horas	185 ± 115	789 ± 150	3780 ± 577
8 horas	95,6 ± 83,3	468 ± 171	2440 ± 176
24 horas	8,83 ± 14,7	65,1 ± 65,2	560 ± 147
<b>AUC<sub>(0-último)</sub> (ng*h/mL)</b>	2160 ± 1720	10900 ± 3500	54000 ± 6010
<b>T<sub>max</sub> (h)</b>	0,875 ± 0,250	1 ± 0	1 ± 0
<b>C<sub>max</sub> (ng/mL)</b>	425 ± 222	1510 ± 435	5720 ± 1200
<b>t<sub>1/2</sub> (h)</b>	4,02 ± 1,21	4,93 ± 1,31	6,97 ± 0,613
<b>Biodisponibilidad (%)</b>	55,6 ± 18,8	68,0 ± 10,0	
BLQ = por debajo del límite de cuantificación. *Se determinó la concentración previa a la dosis. La dosificación se realizó con al menos 4 días de diferencia en los mismos animales. ** N=3; Perro 3 excluido de las estadísticas como valor atípico.			

[0118] A 3 mg/kg, tres de las cuatro concentraciones previas a la dosis de HM04 fueron detectables (rango 5,15 - 8,31 ng/mL). Las muestras se volvieron a analizar por duplicado y se confirmó que eran positivas. Además, con 10 mg/kg por vía oral, el Perro 2 mostró una concentración predosis detectable (8,60 ng/ml). Es poco probable que esta concentración sea una concentración residual de la dosis anterior de 3 mg/kg porque esa concentración estaba por debajo del límite de cuantificación a las 24 horas. Estos valores, próximos al límite inferior de cuantificación del método analítico (2,5 ng/mL), fueron excluidos de los cálculos sustituidos por el valor cero.

[0119] Para administraciones orales únicas de sal de fumarato de HM04, las concentraciones máximas de HM04 se alcanzaron rápidamente dentro de 1 hora después de la dosificación. Se midieron concentraciones detectables del compuesto hasta 24 horas después de la dosificación en todos los perros excepto en dos. Después de alcanzar la concentración máxima, los niveles plasmáticos de HM04 disminuyeron con una vida media terminal aparente (rango de 4 a 7 horas) similar a la vida media después de la administración intravenosa (rango de 4 a 5 horas). En el rango de dosis oral de 3 a 30 mg/kg, mientras que la C<sub>max</sub> aumentó aproximadamente proporcionalmente con la dosis, el AUC aumentó más que en proporción directa con la dosis. La biodisponibilidad oral de HM04 fue alta de acuerdo con la baja depuración

del compuesto.

5 [0120] La biodisponibilidad oral absoluta a 3 mg/kg se calculó a partir de la relación de los valores de AUC<sub>∞</sub> oral individual a los valores de AUC<sub>∞</sub> individuales determinados después de la administración intravenosa de 3 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) a los mismos cuatro perros Beagle machos. Se determinaron los siguientes valores individuales orales e IV AUC<sub>∞</sub>: Perro 1: 4930 y 6190 ng·h/mL, respectivamente; Perro 2: 1440 y 3100 ng·h/mL, respectivamente; Perro 3: 1160 y 3210 ng·h/mL, respectivamente; y Perro 4: 1850 y 3070 ng·h/mL, respectivamente.

10 [0121] La biodisponibilidad oral absoluta a 10 mg/kg se calculó a partir de la relación de los valores de AUC<sub>∞</sub> oral individual a los valores de AUC<sub>∞</sub> individuales determinados después de la administración intravenosa de 10 mg/kg de sal de fumarato HM04 (basado en el peso de la base libre) a los mismos cuatro perros Beagle machos. Se determinaron los siguientes valores individuales orales e IV AUC<sub>∞</sub>: Perro 1: 17500 y 22500 ng·h/mL, respectivamente; Perro 2: 8780 y 13200 ng·h/mL, respectivamente; Perro 3: 8470 y 15500 ng·h/mL, respectivamente; y Perro 4: 10900 y 14900 ng·h/mL, respectivamente.

15 [0122] Las concentraciones de HM04 en plasma se midieron mediante LC-MS/MS después de la precipitación de proteínas en el formato de placa de 96 pocillos. En el momento del análisis, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Alícuotas de 25 µL de plasma K3EDTA de rata o perro se enriquecieron con 300 µL de estándar interno (25 ng/ml de HM04-d8 en acetonitrilo). Después de mezclar suavemente en vórtex durante 5 minutos y centrifugar a 2010 g durante 15 minutos a 4 °C, se transfirió una alícuota de 100 µL de la fase orgánica a una placa de polipropileno nueva de 20 96 pocillos, usando un sistema robótico P3-Evolution (Perkin Elmer). Después de la dilución con 100 µL de formiato de amonio 10 nM, pH 3,5, se inyectó una alícuota de 10 µL en el sistema LC-MS/MS. Las condiciones de LC-MS/MS se proporcionan en la Tabla 7, a continuación.

25 Tabla 7

	<b>Sistema HPLC:</b>	<b>Serie Hewlett Packard 1100</b>					
	<i>Fase móvil:</i>	Canal A: formiato de amonio 10 mM pH 3,5 Canal B: acetonitrilo					
	<i>Modo de elución:</i>	Gradiente					
30	Tiempo (min)	0,0	1,0	1,1	2,5	2,6	4,0
	%A	75	75	10	10	75	75
	%B	25	25	90	90	25	25
	<i>Tiempo total de ejecución:</i>	4,0 minutos					
	<i>Tasa de flujo:</i>	0,3 mL/min					
35	<i>Tiempos de retención aproximados:</i>	2,18 minutos					
	<i>Temperatura del horno de columna:</i>	40 °C					
	<b>Columna analítica:</b>	<b>Zorbax SB-C18 (2,1 X 50 mm, 3,5 µm)</b>					
	<b>Tipo de inyector automático:</b>	<b>CTC Analytics CTC PAL</b>					
40	<i>Volumen de inyección:</i>	10 µL					
	<i>Temperatura del inyector automático:</i>	4°C					
	<b>Instrumento de EM:</b>	<b>Biosistema aplicado SCIEX API 3000</b>					
	<i>Ionización:</i>	Turbo Ion Spray en modo de iones positivos					
45	<i>Transición MRM: HM04</i>	m/z	476,08	>	129,19		
	<i>Transición MRM: HM04-d8</i>	m/z	484,24	>	137,41		
	<i>Resolución:</i>	Unidad Q1					
		Unidad Q3					
50	<i>Límite inferior de cuantificación:</i>	5,0 ng/ml (rata); 2,5 ng/mL (perro)					
	<i>Límite superior de cuantificación:</i>	5000 ng/ml (rata); 1250 ng/ml (perro)					
	<b>Software utilizado:</b>	<b>Analista 1,4,1 y Watson 7,4</b>					

#### 55 Ejemplo 11. Actividad antagonista de HM04 con el receptor de grelina (GHSR1a)

56 [0123] Las propiedades de unión de HM04 al receptor de grelina GHSR1a se estudiaron utilizando la sal de fumarato de HM04 en un ensayo de lector de placa de imágenes de fluorescencia (FLIPR) por duplicado. HM04 mostró una actividad antagonista significativa en GHSR1a con un valor CI<sub>50</sub> de 7,308 nM. (Figura 21A). También se realizaron pruebas comparativas con el antagonista de GHSR1a de referencia R011 (WO2005/048916, Ejemplo 30). R011 mostró actividad antagonista sobre GHSR1a con un valor CI<sub>50</sub> de 343 nM (Figura 21B).

65 [0124] No se observó actividad agonista con HM04 y R011 a concentraciones de hasta 10 µM (Figuras 21C y 21D). Tanto HM04 como R011 no mostraron una actividad agonista inversa significativa clara (Figuras 21E y 21F) en un estudio de actividad agonista inversa de Inositol 1 fosfato (IP-1). Los datos *in vitro* sugieren que HM04 es un potente antagonista de la grelina sin actividad agonista o una clara actividad agonista inversa.

5 [0125] Los compuestos se diluyeron con DMSO al 100 % para obtener una solución madre 30 mM. El día de la prueba, se prepararon diluciones en serie a partir de la solución madre. Para el ensayo FLIPR: 1) se añadieron 8 µl de DMSO a 2 µl de solución madre del compuesto (30 mM) para producir 10 µl de solución 6 mM; se produjeron diluciones seriadas a la mitad de la solución 6 mM para generar diez dosis; 2) las soluciones de prueba se obtuvieron diluyendo las soluciones madre 1/40 en tampón de ensayo (concentración de DMSO 2,5 %). Para el ensayo de IP-1:1) se añadieron 29 µl de DMSO a 1 µl de solución madre del compuesto (30 mM) para producir 30 µl de solución 1 mM; se produjeron diluciones seriadas a la mitad de la solución 1 mM para generar 10 dosis; 2) las soluciones de prueba se obtuvieron diluyendo las soluciones madre 1/100 en tampón de ensayo (concentración final de DMSO al 1 %).

10 [0126] Para el estudio de la actividad agonista y antagonista, se usaron células HEK293 que expresan de forma estable el receptor GHSR1a humano en un ensayo (FLIPR). Un día antes de la prueba, las células se sembraron a una densidad de  $1,5 \times 10^4$  células/pocillo en una placa de 384 pocillos recubierta con Matrigel® con 30 µl de medio DMEM completo y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 22-26 horas. El día de la prueba, se añadió colorante de carga 4x en cada pocillo (10 µl por pocillo para placas de 384 pocillos). Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C en la oscuridad durante 15 30 minutos. El contenido de colorante se eliminó por centrifugación a 300 rpm durante 30 segundos. Se añadió HBSS/Hepes (30 µl) con probenecid 1mM con PlateMate Matrix (configuración de baja velocidad, Thermo Fisher Scientific). A continuación, la placa se colocó en FLIPR Tetra (Molecular Devices) y se añadieron 10 µl de concentraciones de trabajo 4x de HM04 o R011 mediante FLIPR (modo agonista). La señal de fluorescencia se detectó con FLIPR a temperatura ambiente de acuerdo con la configuración estándar durante 10 minutos antes de que las células se 20 expusieran a 10 µl de concentraciones de trabajo 5x de agonistas (compuesto agregado por FLIPR). La señal de fluorescencia se detectó en los siguientes 3 minutos (modo antagonista).

25 [0127] Para el estudio de la actividad del agonista inverso, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente hasta el día de la prueba. El día de la prueba, se eliminó el medio mediante centrifugación a 700 rpm durante 30 segundos y se agregaron 20 µl/pocillo de tampón de ensayo que contenía HM04 o R011. Las placas de ensayo se incubaron a 37 °C en la oscuridad durante 1 hora. Se añadieron secuencialmente IP1-d2 (5 µl) y AB-Cryp (5 µl) a todos los pocillos utilizando Combi multigota. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y se leyó en EnVision a 620 nm y 665 nm.

30 [0128] Los datos se informaron como unidades relativas de luz (RLU) y se analizaron utilizando GraphPad Software Inc. versión 6. La mitad de la concentración inhibitoria máxima (C<sub>150</sub>) medida para HM04 y R011 se calculó mediante análisis de regresión no lineal.

### 35 Ejemplo 12. Efecto de la sal de fumarato HM04 sobre el aumento de la hormona del crecimiento inducido por grelina en ratas

[0129] Las ratas se dividieron en cuatro grupos: 1) 1 ml/kg de solución salina más 10 ml/kg de CMC p.o. al 0,5 % (n=6); 2) 15 µg/kg de grelina i.v. más 10 ml/kg de CMC al 0,5 % p.o. (n=6); 3) 30 mg/kg de sal de fumarato HM04 p.o. 2 horas antes de 15 µg/kg de grelina i.v. (n=6); 4) 10 mg/kg de antagonista de grelina R011 i.p. 30 minutos antes de 15 µg/kg de grelina i.v. (n=6). La sangre se recogió como muestras de 100 µl en el tiempo 0 y 15 minutos después de la inyección de 40 grelina. Las ratas se anestesiaron con 64,8 mg/kg de pentobarbital sódico. Se insertó un catéter lleno de solución salina heparinizada en la arteria femoral izquierda para la extracción de sangre y se equipó con un tubo de extensión, una jeringa de muestreo de 1 ml y un grifo de 3 vías para permitir el retorno del exceso de sangre.

45 [0130] Los niveles de plasma de la hormona del crecimiento (GH) se determinaron utilizando Rat GH ELISA (Millipore, N° de catálogo EZRMGH-45K). Las mediciones se realizaron por duplicado. GH AUC 0-15 min se calculó utilizando el método trapezoidal. Se utilizó la prueba ANOVA de una y dos vías para comparar las diferencias entre los grupos. Todos los valores se presentan como media ± SEM. Se realizó ANOVA unidireccional seguido de la prueba post hoc de Turquía, donde la significación se indicó mediante valores de  $p < 0,05$  o valores de  $p < 0,01$ .

50 [0131] La inyección de solución salina dio como resultado un ligero aumento de la GH en plasma. La propia grelina indujo un fuerte aumento de GH después de 15 minutos de la inyección. La concentración plasmática media de GH osciló entre 90 y 120 ng/ml después de administrar 15 µg/kg de grelina por vía iv. Tanto HM04 como R011 inhibieron el aumento de GH inducido por grelina en un 35 % y un 78 %, respectivamente. La concentración media de la hormona del crecimiento en plasma observada para cada uno de los cuatro grupos en el momento 0 y 15 minutos después de la inyección de 55 grelina se muestra en la figura 22 (\*\*\*)  $p < 0,01$  frente al vehículo; ###  $p < 0,05$  en comparación con la grelina sola.

### Ejemplo 13. Efecto de la sal de fumarato HM04 en un modelo de ratón Prader-Willi

60 [0132] Se investigó el efecto de la sal de fumarato HM04 sobre el comportamiento de ingesta de alimentos y la tolerancia a la glucosa en el modelo genético de ratón *Snord 116*<sup>+/-</sup> (Het) del síndrome de Prader-Willi (ratón Het) en comparación con compañeros de camada de tipo salvaje (WT). Dado que los agonistas de D2R suprimen la ingesta de alimentos, se usó cabergolina, un agonista de D2R aprobado por la FDA, como control experimental. Las características fenotípicas de este modelo de ratón PWS incluyen hiperfagia, retraso del crecimiento posnatal, grelina alta y hormona de crecimiento baja. Ding F., et al. *SnoRNA Snord116 (Pwcr1/MBII-85) deletion causes growth deficiency and hyperphagia in mice*. *PLoS one*. 2008; 3(3): e1709. Estos ratones PWS comen con más frecuencia que los compañeros de camada WT, particularmente durante el ciclo de luz y están más motivados para trabajar por comida (presiones más niveladas) (datos

no mostrados).

5 **[0133]** HM04 dosificado a 10 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) no redujo la ingesta de alimentos en ratones WT de 3, 7 o 12 meses de edad (véanse las figuras 25-27). HM04 (10 mg/kg, i.p.) suprimió la ingesta de alimentos 12 y 24 horas después de la dosificación en ratones Het de 3 meses (Figura 26). HM04 (10 mg/kg, i.p.) suprimió la ingesta de alimentos 1 hora después de la dosificación en ratones Het de 12 meses (Figura 25A), pero ese nivel de supresión no se mantuvo (Figura 25B). HM04 dosificado a 30 mg/kg i.p. inhibía la ingesta de alimentos hasta 8 horas después de la dosificación en ratones Het de 7 meses, pero no en ratones WT (Figura 26). Cuando se administró HM04 a 30 mg/kg por vía oral a ratones 10 Het de 8 meses de edad a las 07:00 horas diariamente durante cinco días, la ingesta de alimentos se redujo hasta 2 días sin afectar el peso corporal (Figuras 30A y 30B). Cuando se administró HM04 a 30 mg/kg por vía oral a ratones Het de 8 meses de edad a las 18:00 horas durante el ciclo de oscuridad, la ingesta de alimentos fue menor durante el ciclo de luz posterior en los días 2, 3, 4 y 5 y alcanzó significación el día 5 (Figura 31A).

15 **[0134]** En contraste con el efecto de la ingesta de alimentos, HM04 no mostró una mejora en la tolerancia a la glucosa en los ratones Het, mientras que se observó un efecto en los ratones WT. Estos resultados sugieren que HM04 puede mejorar la hiperfagia asociada con PWS, aunque los factores relacionados con la edad, los ritmos circadianos, el estado energético y el metabolismo pueden afectar la respuesta farmacológica.

20 **[0135]** Administración aguda: los ratones (de 3, 7 y 12 meses de edad) se mantuvieron en ayunas durante 16 horas y luego se les administró una única inyección intraperitoneal de vehículo o vehículo que contenía HM04, cabergolina o HM04 y cabergolina de acuerdo con la Tabla 8, abajo.

Tabla 8.

Tensión	Edad (meses)	Número de animales	Compuesto y dosis (mg/kg)
Het	7	6	HM04 (10)
Het	7	6	cabergolina (0,5)
Het	7	6	vehículo
Het	7	6	HM04 (10) + cabergolina (0,5)
WT	7	6	HM04 (10)
WT	7	6	cabergolina (0,5)
WT	7	6	vehículo
WT	7	6	HM04 (10) + cabergolina (0,5)
Het	3	6	HM04 (10)
Het	3	6	vehículo
WT	3	6	HM04 (10)
WT	3	6	vehículo
Het	12	4	HM04 (10)
Het	12	4	vehículo
WT	12	6	HM04 (10)
WT	12	6	vehículo
Het	7	5	HM04 (30)
Het	7	5	vehículo
WT	7	5	HM04 (30)
WT	7	5	vehículo

50 **[0136]** Se disolvió HM04 en agua para inyección y se disolvió cabergolina en DMSO para proporcionar una solución al 5 % de DMSO/agua para inyección. A continuación, a los ratones se les dio libre acceso a la comida, y se midió la ingesta acumulada de comida 1, 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de la dosificación. Dado que los ratones Het son significativamente más pequeños que sus compañeros de camada de control WT, la ingesta de alimentos se expresó como ingesta por g de peso corporal. Se analizó la significancia de los datos usando ANOVA de 2 vías, prueba *post hoc* de Bonferroni (Graphpad Prism, Prism 5.0, San Diego, CA).

55 **[0137]** Para la cohorte de 7 meses de edad, la ingesta acumulada de alimentos fue significativamente elevada en los ratones Het tratados con vehículo en comparación con los ratones WT tratados con vehículo. La cabergolina inhibió la ingesta de alimentos en ambos genotipos. Por el contrario, HM04 (10 mg/kg) no inhibió la ingesta de alimentos en ratones WT o Het y no mejoró el efecto supresor de la cabergolina sobre el consumo de alimentos (Figuras 23A y 23B).

60 **[0138]** Para el grupo de 3 meses de edad, la ingesta acumulada de alimentos no fue significativamente diferente en los ratones tratados con vehículo durante las primeras 8 horas. A las 12 y 24 horas, los ratones Het habían consumido más alimento que los ratones WT. El tratamiento con HM04 (10 mg/kg) suprimió significativamente la ingesta de alimentos a las 12 y 24 horas posteriores a la dosificación en ratones Het (ver Figura 24). HM04 no logró inhibir la ingesta de alimentos 65 en ratones WT.

[0139] En ratones de 12 meses de edad, la ingesta de alimentos fue significativamente mayor en los ratones Het tratados con vehículo que en los ratones WT. HM04 (10 mg/kg) suprimió la ingesta de alimentos en ratones Het 1 hora después de la dosificación (Figura 25A); sin embargo, ese nivel de inhibición no se mantuvo (Figura 25B).

5 [0140] También se evaluó el grupo de ratones Het y WT de 7 meses de edad a los que se administró vehículo o HM04 a una dosis mayor de 30 mg/kg. HM04 (30 mg/kg) no tuvo ningún efecto aparente sobre la ingesta de alimentos en ratones WT, pero inhibió la ingesta de alimentos durante hasta 8 horas en ratones Het (Figura 26).

10 [0141] Administración diaria: para probar si HM04 puede ser más eficaz si se administra diariamente, se inyectaron ratones de 6 meses de edad una vez al día a las 07:00 horas durante 10 días con vehículo, o vehículo que contenía HM04 (10 mg/kg i.p.), y se trataron ratones de 8 meses de edad diariamente a las 07.00 horas o a las 18.00 horas durante 5 días mediante sonda oral con vehículo o vehículo que contenía HM04 a una dosis mayor de 30 mg/kg. En la Tabla 9, a continuación, se proporciona un resumen. La ingesta de alimentos y el peso corporal se midieron diariamente.

15 Tabla 9.

Cepa	Edad (meses)	Nº de animales	Hora de administración	Ruta de administración	Días consecutivos de administración	Compuesto y dosis (mg/kg)
Het	6	10	07:00	ip	10	HM04 (10)
Het	6	10	07:00	ip	10	vehículo
WT	6	10	07:00	ip	10	HM04 (10)
WT	6	10	07:00	ip	10	vehículo
Het	8	5	07:00	oral	5	HM04 (30)
Het	8	5	07:00	oral	5	vehículo
WT	8	5	07:00	oral	5	HM04 (30)
WT	8	5	07:00	oral	5	vehículo
Het	8	5	18:00	oral	5	HM04 (30)
Het	8	5	18:00	oral	5	vehículo
WT	8	5	18:00	oral	5	HM04 (30)
WT	8	5	18:00	oral	5	vehículo

35 [0142] En el grupo de 6 meses de edad, el consumo de alimentos no fue significativamente diferente en los ratones WT y Het tratados con vehículo. El tratamiento diario con HM04 (10 mg/kg i.p.) no tuvo ningún efecto aparente sobre la ingesta de alimentos (Figura 27A) o el peso corporal (Figura 27B) en ratones WT y Het.

40 [0143] En el grupo de 8 meses de edad tratado a las 07:00 horas durante el ciclo de luz, se observó una disminución significativa en la ingesta de alimentos el día 2, pero no en los días posteriores (Figura 28A). El peso corporal no se vio afectado (Figura 28B). No se observó reducción en la ingesta de alimentos ni en el peso corporal en ratones HM04 WT (Figuras 28A y 28B).

45 [0144] Para el grupo de 8 meses de edad tratado a las 18:00 horas durante el ciclo de oscuridad, se midió la ingesta de alimentos durante los ciclos de luz y oscuridad. A pesar de tratar a los ratones con HM04 al comienzo del ciclo de oscuridad, no se observó supresión del consumo de alimentos durante el ciclo de oscuridad en los ratones WT o Het (Figura 29B). Durante el ciclo de luz posterior (06:00-18:00), la ingesta de alimentos fue menor en los ratones Het tratados con HM04, pero no en los ratones WT en los días 2, 3, 4 y 5 y alcanzó significación en el día 5 (Figura 29A).

50 [0145] La especificación escrita anterior se considera suficiente para permitir que un experto en la técnica practique las formas de realización. La descripción y los ejemplos anteriores detallan ciertas formas de realización y describen el mejor modo contemplado por los inventores. Se apreciará, sin embargo, que no importa lo detallado que pueda aparecer lo anterior en el texto, la forma de realización puede practicarse de muchas maneras y debe interpretarse de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

55 [0146] Como se usa en el presente documento, el término aproximadamente se refiere a un valor numérico, que incluye, p. ej., números enteros, fracciones y porcentajes, ya sea que se indique explícitamente o no. El término aproximadamente generalmente se refiere a un rango de valores numéricos (p. ej., +/-5-10 % del rango indicado) que un experto en la materia consideraría equivalente al valor indicado (p. ej., tener la misma función o resultado). Cuando términos como al menos y aproximadamente preceden a una lista de valores numéricos o rangos, los términos modifican todos los valores o rangos proporcionados en la lista. En algunos casos, el término aproximadamente puede incluir valores numéricos que se redondean a la cifra significativa más cercana.

65

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sal de fumarato de (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea, estando dicha sal al menos en un 50 % en forma cristalina.
2. La sal de la reivindicación 1, en donde la sal es 1:1 (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetilo)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea:sal de fumarato.
- 10 3. La sal de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sal es al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % en forma cristalina.
- 15 4. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende la Forma 1 que tiene el patrón de XRPD de la figura 12 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa.
5. La sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende la Forma 2 **caracterizada por** el patrón de XRPD de la figura 3 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa.
- 20 6. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende la Forma 3 **caracterizada por** el patrón de XRPD de la figura 15 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa.
7. La sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende la Forma 4 **caracterizada por** el patrón de XRPD de la figura 16 determinado por XRPD usando radiación Cu K alfa.
- 25 8. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende la Forma 1 **caracterizada por** un patrón de XRPD, usando radiación Cu K alfa, que comprende picos en  $7,8 \pm 0,2$ ,  $9,5 \pm 0,2$ ,  $14,3 \pm 0,2$ ,  $16,7 \pm 0,2$ ,  $17,2 \pm 0,2$ ,  $18,5 \pm 0,2$ ,  $18,8 \pm 0,2$ ,  $19,3 \pm 0,2$ ,  $20,0 \pm 0,2$ ,  $20,7 \pm 0,2$ ,  $22,4 \pm 0,2$ ,  $23,2 \pm 0,2$ ,  $25,6 \pm 0,2$ ,  $27,2 \pm 0,2$ ,  $31,7 \pm 0,2$ , y  $32,4$  grados 2 theta.
- 30 9. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende la Forma 3 **caracterizada por** un patrón de XRPD, usando radiación Cu K alfa, que comprende picos en  $7,2 \pm 0,2$ ,  $9,4 \pm 0,2$ ,  $9,7 \pm 0,2$ ,  $10,8 \pm 0,2$ ,  $14,3 \pm 0,2$ ,  $15,1 \pm 0,2$ ,  $16,2 \pm 0,2$ ,  $17,9 \pm 0,2$ ,  $18,7 \pm 0,2$ ,  $18,9 \pm 0,2$ ,  $19,6 \pm 0,2$ ,  $21,5 \pm 0,2$ ,  $22,7 \pm 0,2$ ,  $23,7 \pm 0,2$ ,  $24,3 \pm 0,2$ ,  $25,1 \pm 0,2$ ,  $27,4 \pm 0,2$ ,  $28,7 \pm 0,2$  y  $34,9 \pm 0,2$  grados 2 theta.
- 35 10. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende la Forma 4 **caracterizada por** un patrón de XRPD, usando radiación Cu K alfa, que comprende picos en  $12,2 \pm 0,2$ ,  $13,2 \pm 0,2$ ,  $15,0 \pm 0,2$ ,  $15,4 \pm 0,2$ ,  $17,6 \pm 0,2$ ,  $18,1 \pm 0,2$ ,  $19,5 \pm 0,2$ ,  $20,2 \pm 0,2$ ,  $20,9 \pm 0,2$ ,  $21,4 \pm 0,2$ ,  $23,0 \pm 0,2$ ,  $23,4 \pm 0,2$ ,  $24,4 \pm 0,2$ ,  $24,8 \pm 0,2$ ,  $25,9 \pm 0,2$ ,  $27,9 \pm 0,2$ ,  $28,9 \pm 0,2$ ,  $29,6 \pm 0,2$ ,  $30,7 \pm 0,2$  grados 2 theta.
- 40 11. La sal de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos una forma cristalina elegida de dicha Forma 1, Forma 2, Forma 3 y Forma 4.
12. Un medicamento que comprende la sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, para uso en terapia.
- 45 13. Una composición que comprende la sal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Un método para preparar la sal de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende combinar (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazina-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea con ácido fumárico.
- 50 15. El método de la reivindicación 14, en el que la (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea se encuentra en forma sólida o en solución cuando se combina con ácido fumárico.
16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, en el que el (R)-3-(1-(2,3-dicloro-4-(pirazin-2-il)fenil)-2,2,2-trifluoroetil)-1-metil-1-(1-metilpiperidin-4-il)urea se somete a extracción ácido/base antes de combinarse con ácido fumárico.
- 55 17. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, el producto farmacéutico de la reivindicación 12, o la composición de la reivindicación 13, para usar en un método para reducir la actividad de señalización de la grelina en una célula que comprende exponer dicha célula a dicha sal, producto farmacéutico o composición.
- 60 18. Los productos para el uso de la reivindicación 17, en los que la célula se expone a dicha sal, dicho medicamento o dicha composición *in vitro*.
- 65 19. Los productos para el uso de las reivindicaciones 17 o 18, en los que la actividad de señalización de la grelina se mide por el nivel de calcio intracelular detectado por el ensayo del lector de placas de imágenes de fluorescencia (FLIPR).

20. Los productos para el uso de la reivindicación 19, en los que se reduce el nivel de calcio intracelular.

5 21. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, el producto farmacéutico de la reivindicación 12, o la composición de la reivindicación 13, para usar en un método para reducir la actividad de señalización de la grelina en un sujeto que comprende administrar al sujeto dicha sal, producto farmacéutico o composición.

10 22. La sal de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, el producto farmacéutico de la reivindicación 12, o la composición de la reivindicación 13, para usar en un método para tratar a un sujeto que tiene una condición o trastorno asociado con un aumento en el nivel de grelina, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha sal, fármaco o composición.

15 23. Los productos para el uso de la reivindicación 22, en los que la condición o trastorno se elige entre abuso de alimentos, adicción al alcohol, síndrome de Prader-Willi, atracones, obesidad, rebote de peso corporal después de la dieta e hiperfagia.

24. Los productos para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 23 que comprenden la administración oral de la sal, el compuesto cristalino, el producto farmacológico o la composición al sujeto.

20 25. Los productos para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en los que se aplica una o más de las siguientes condiciones: (a) el nivel de hormona de crecimiento circulante del sujeto está modulado y/o reducido; (b) se reduce la ingesta de alimentos del sujeto; (c) el peso corporal del sujeto se reduce y/o estabiliza.

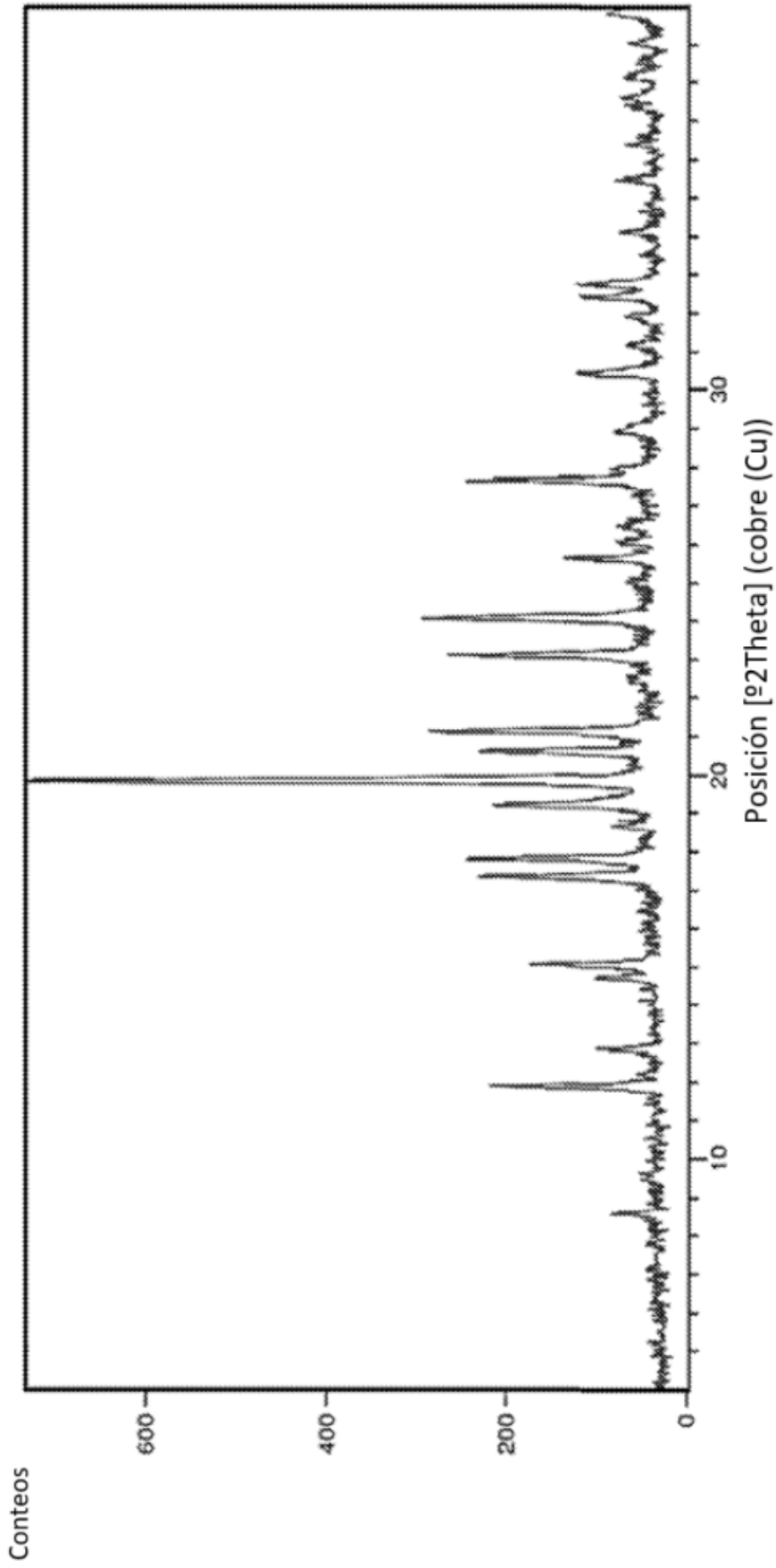
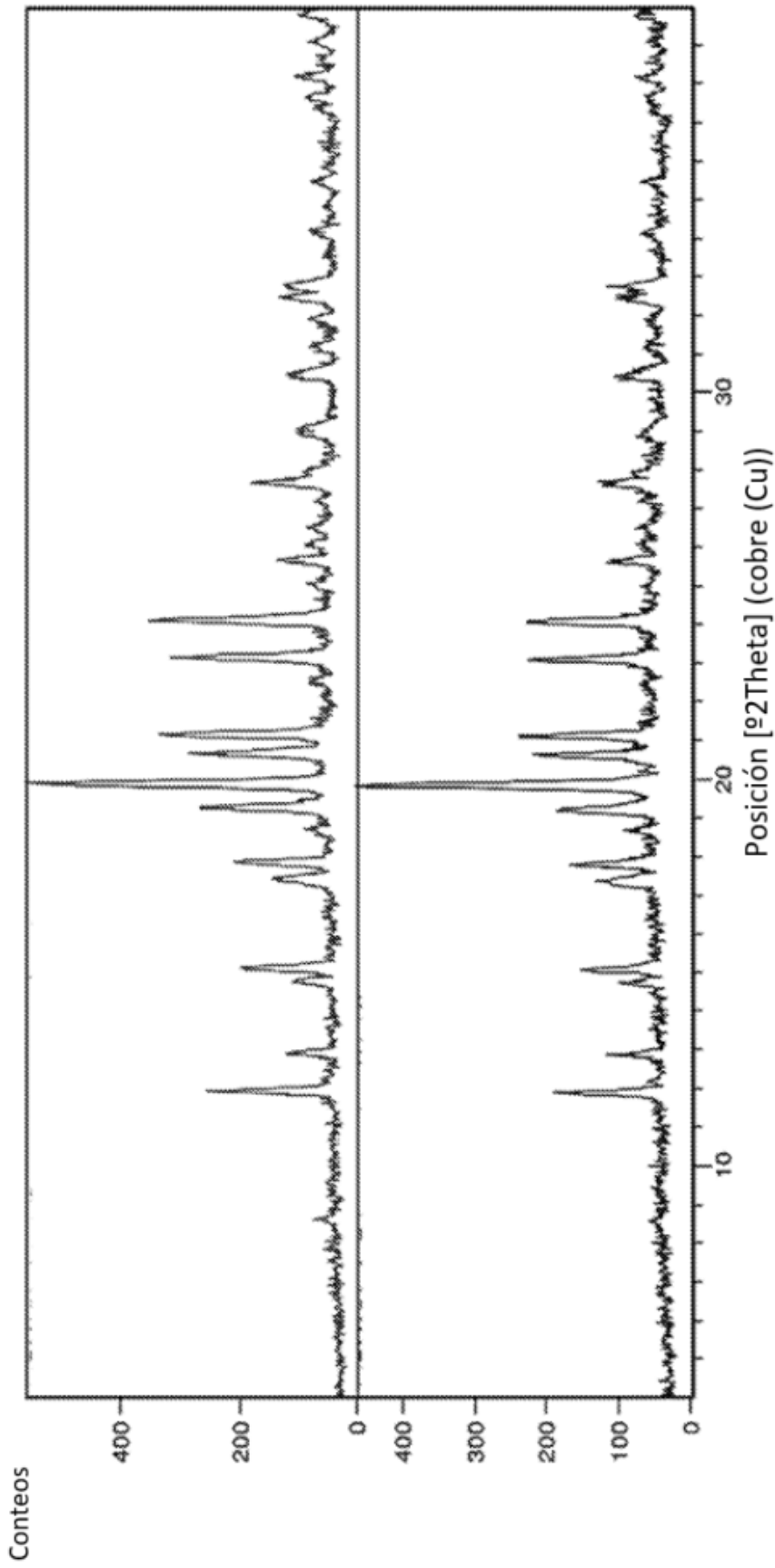


Figura. 1A



**Figura 1B**

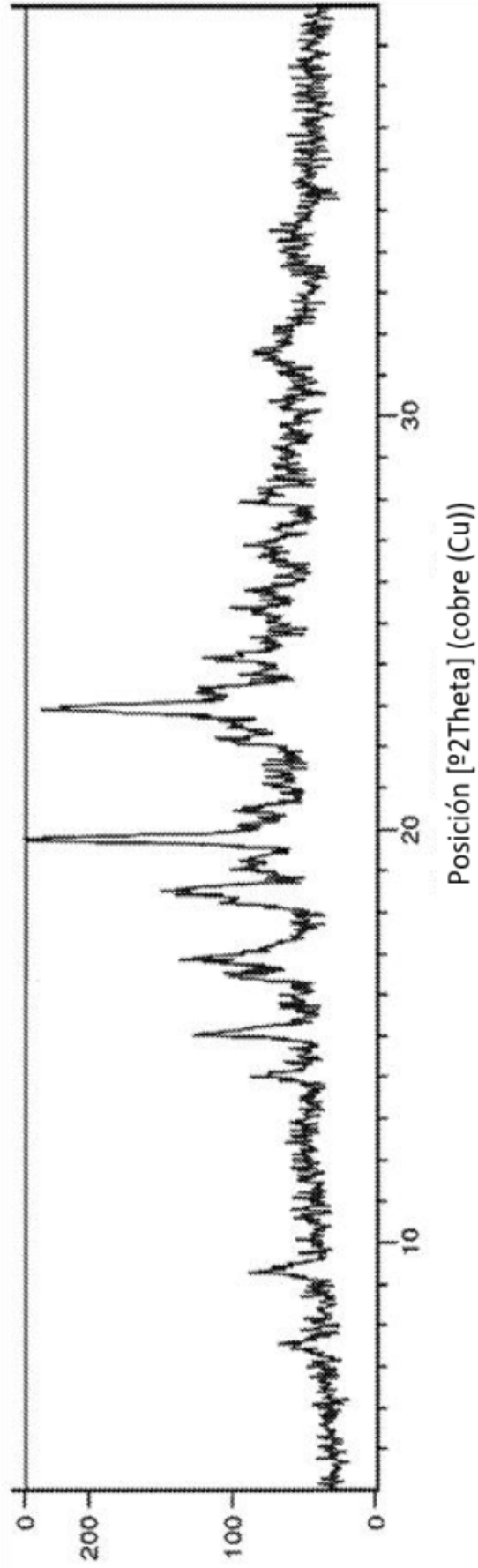
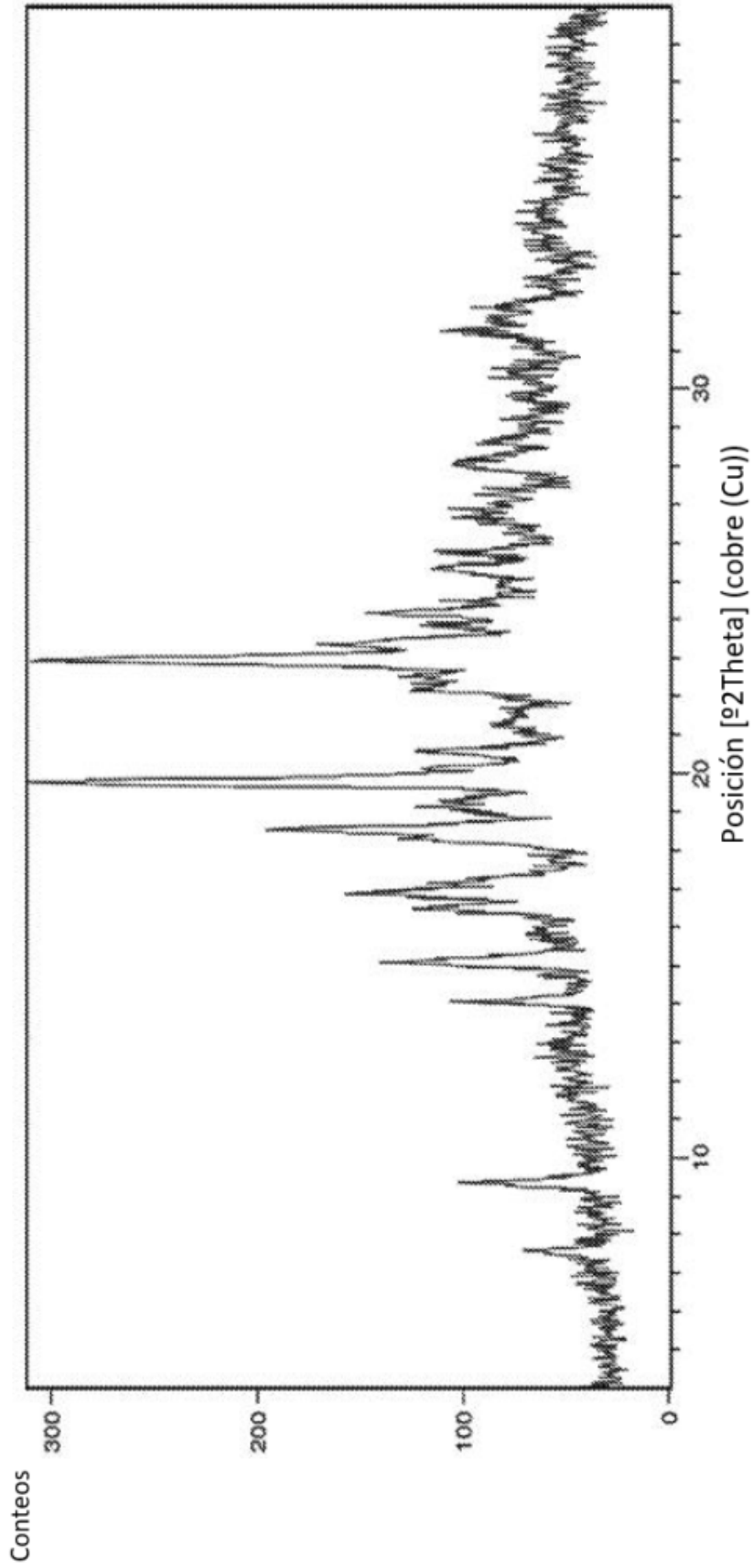


Figura 1C



**Figura 2**

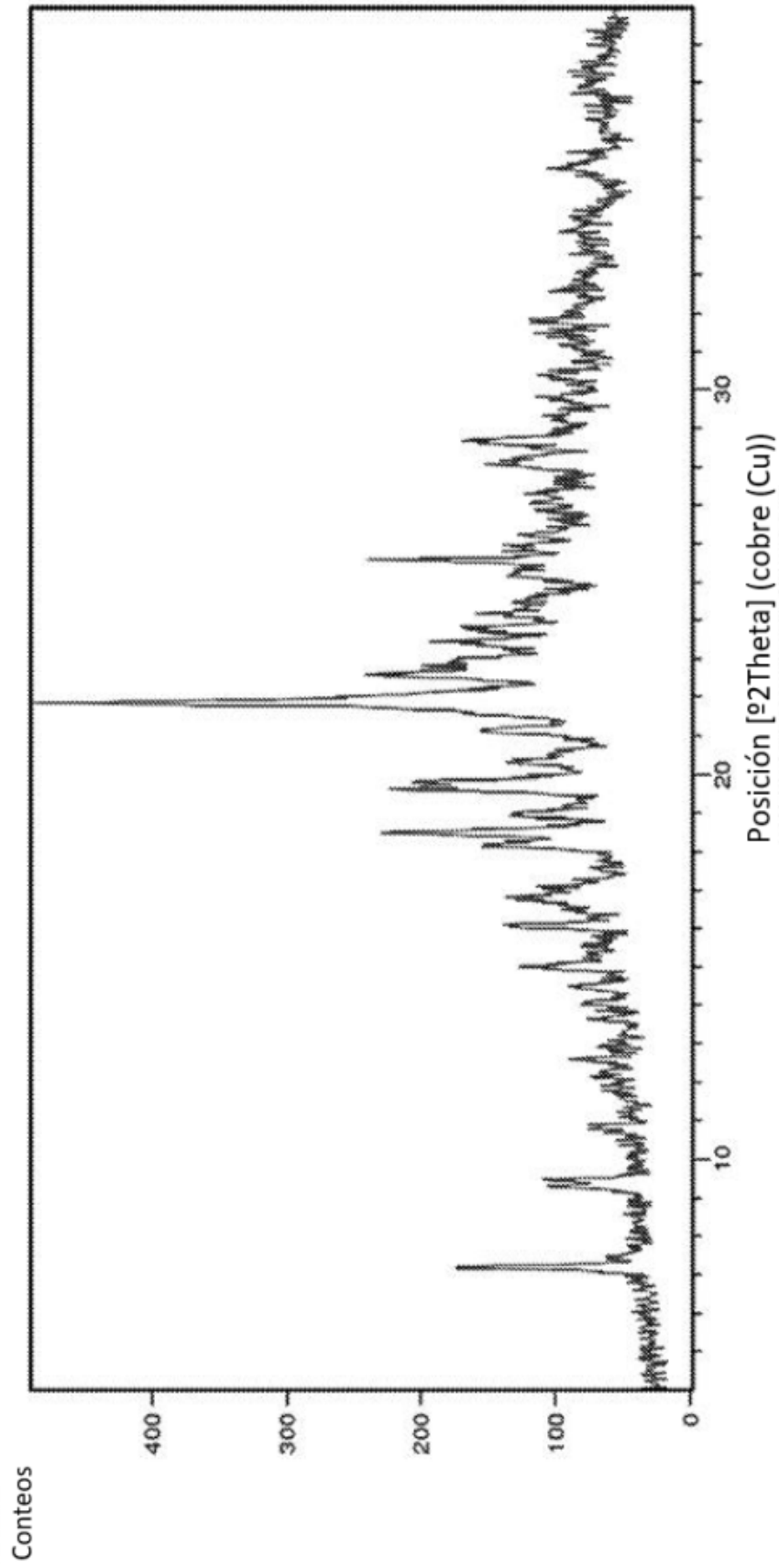
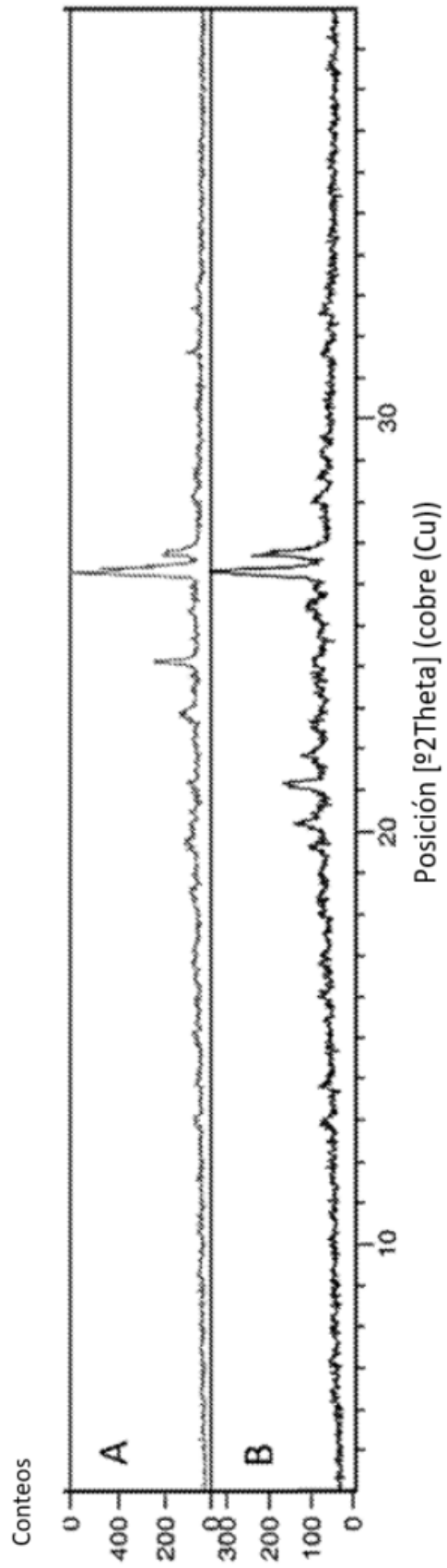


Figura 3



**Figura 4**

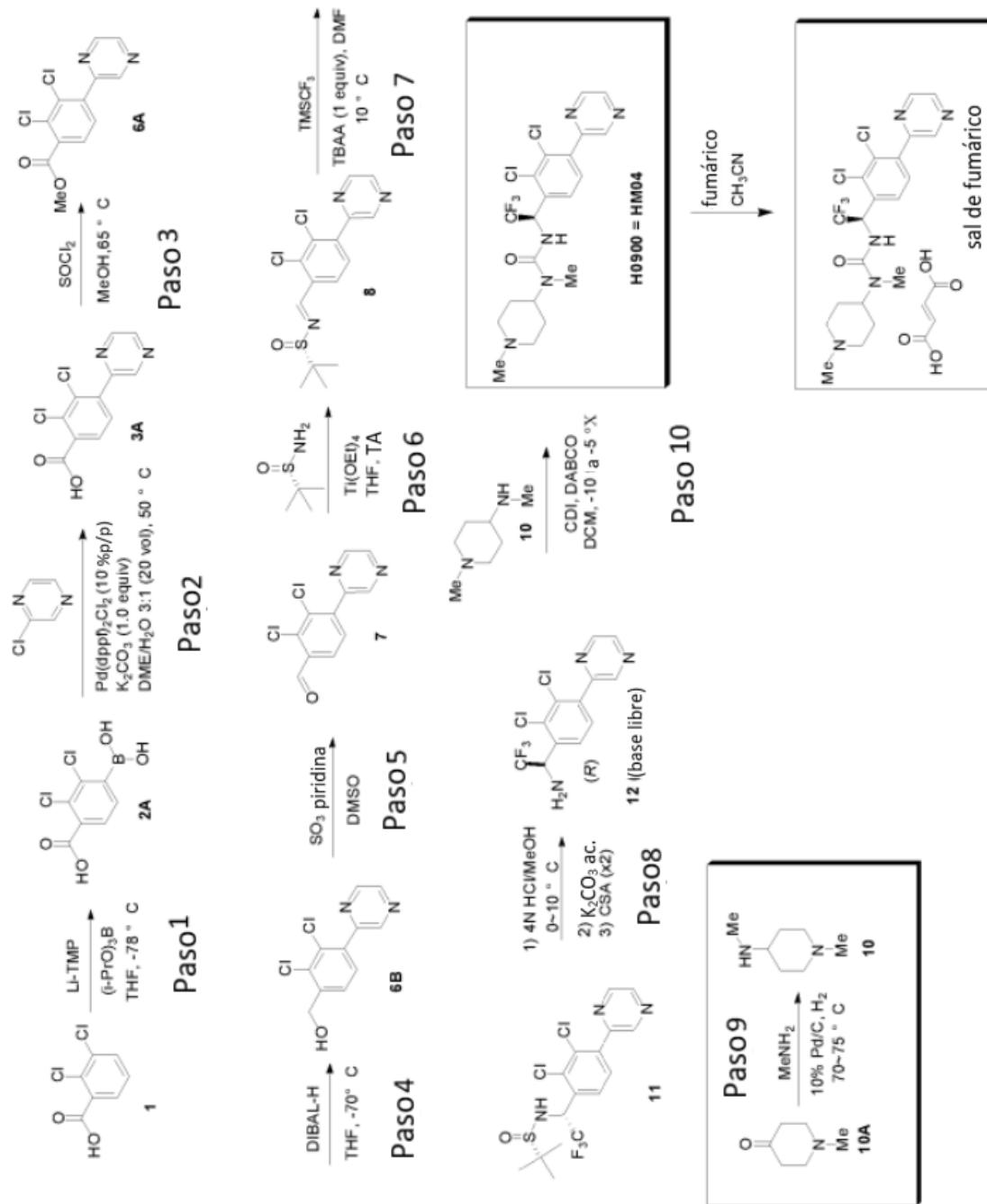


Figura 5

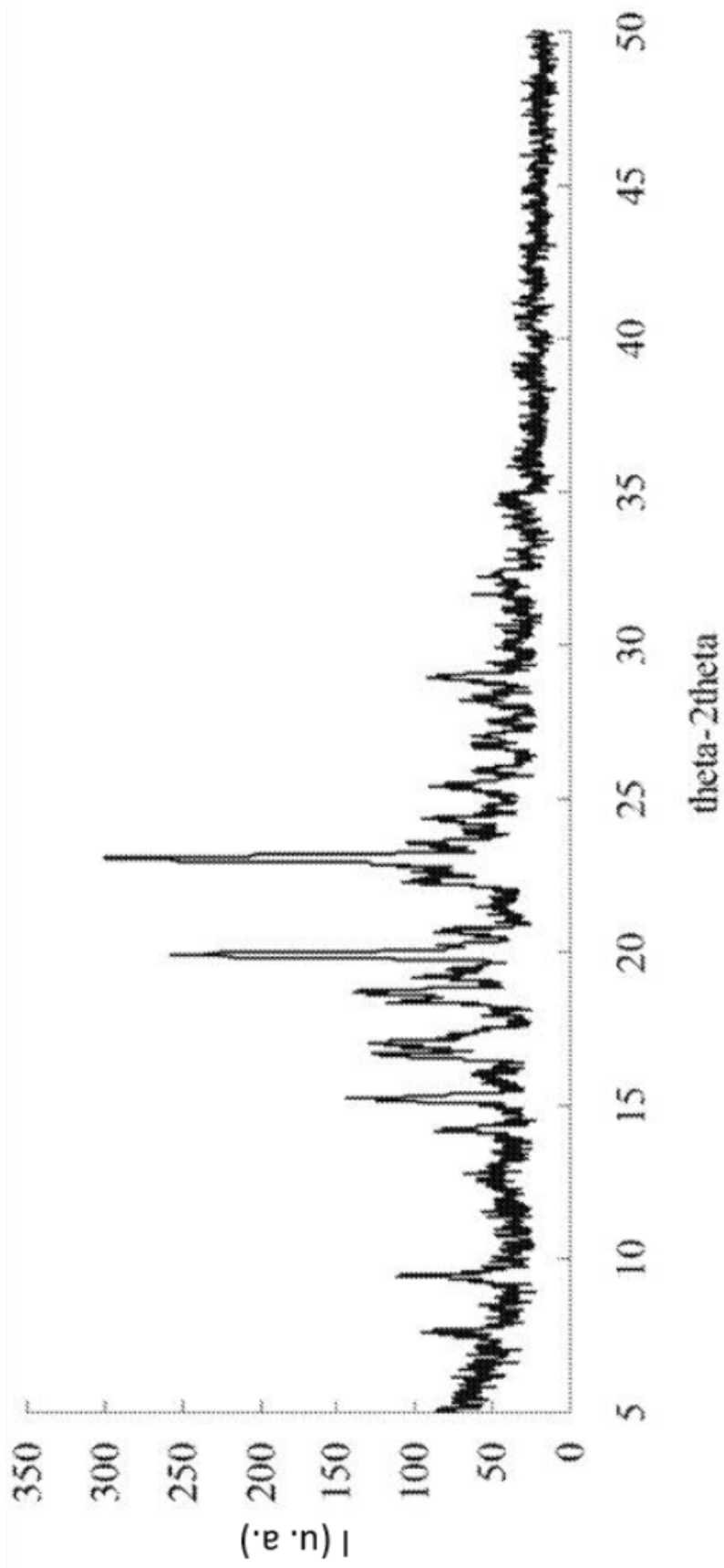


Figura 6

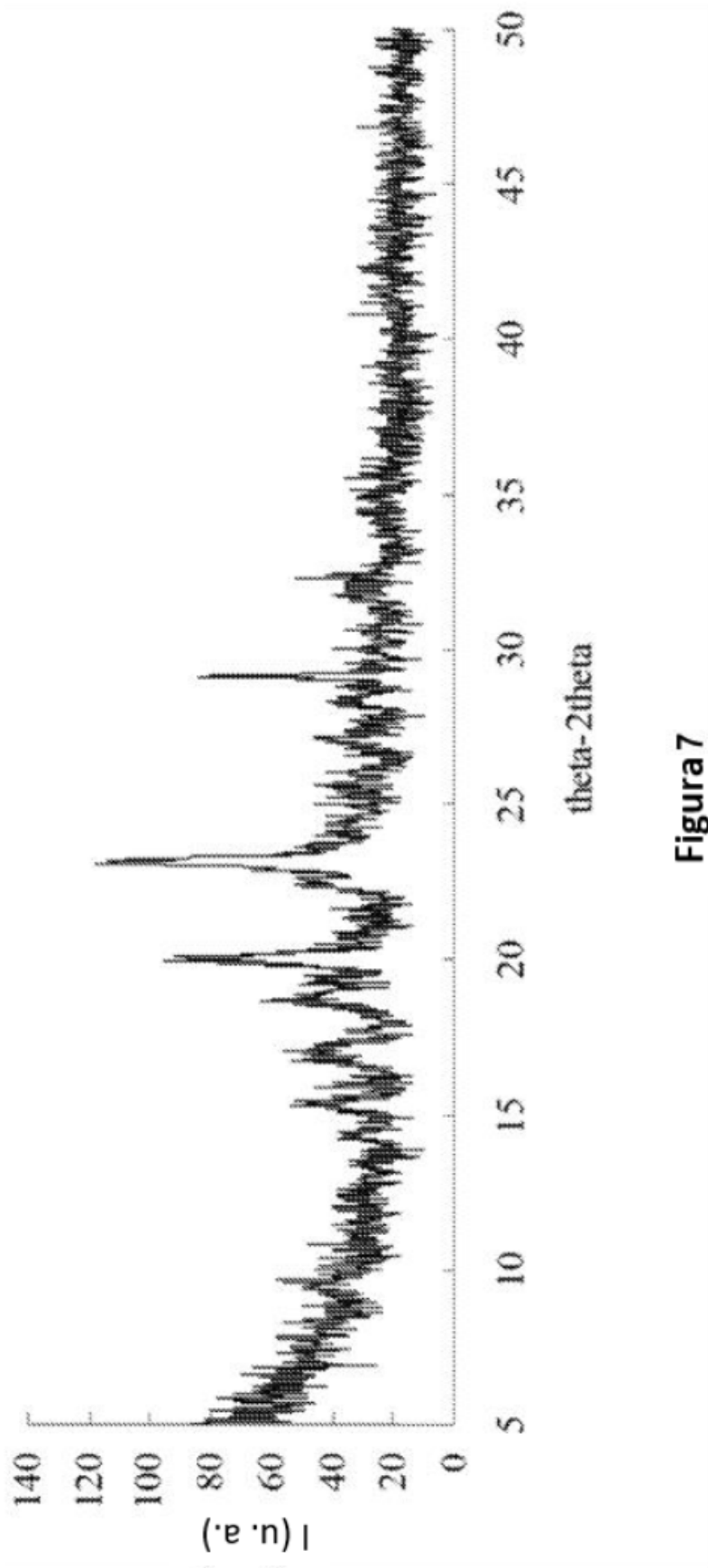


Figura 7

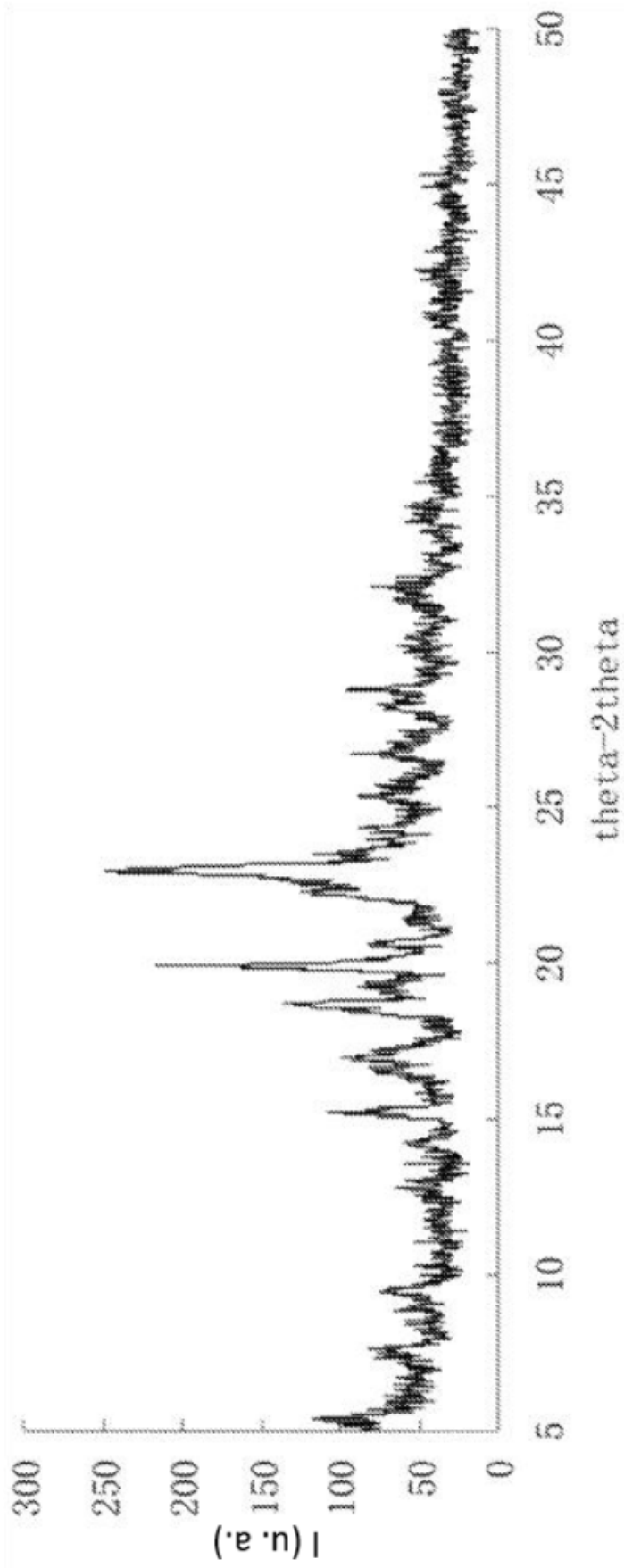


Figura 8

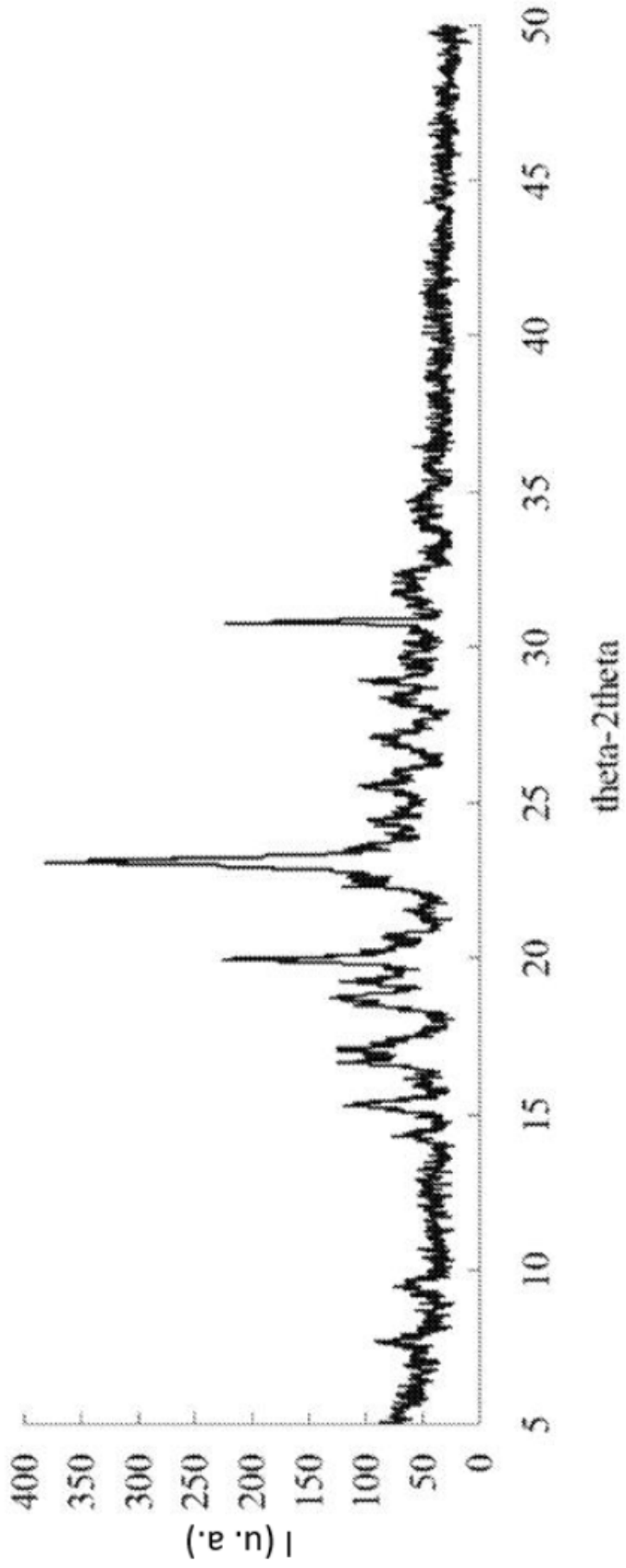


Figura 9

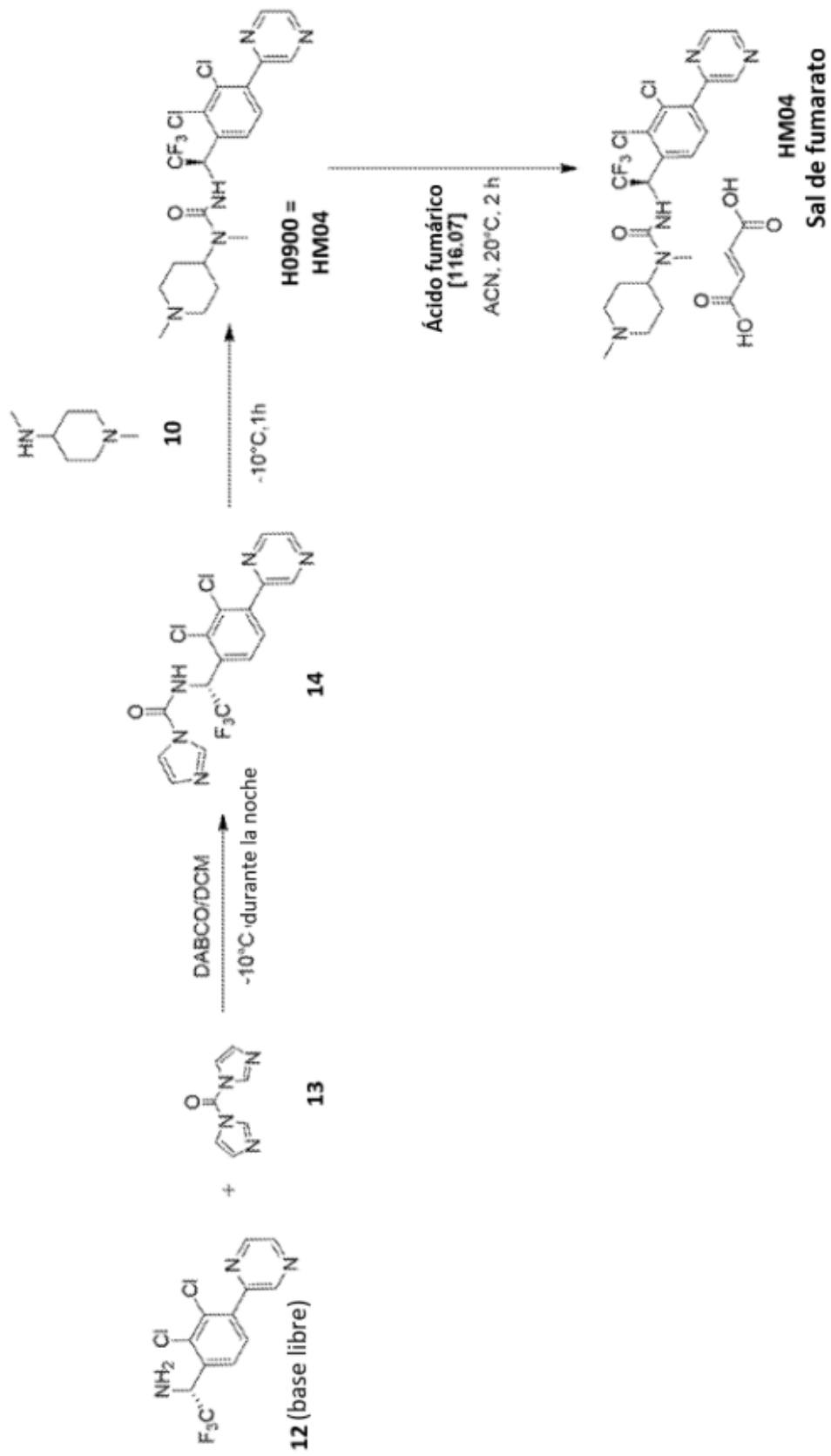


Figura 10

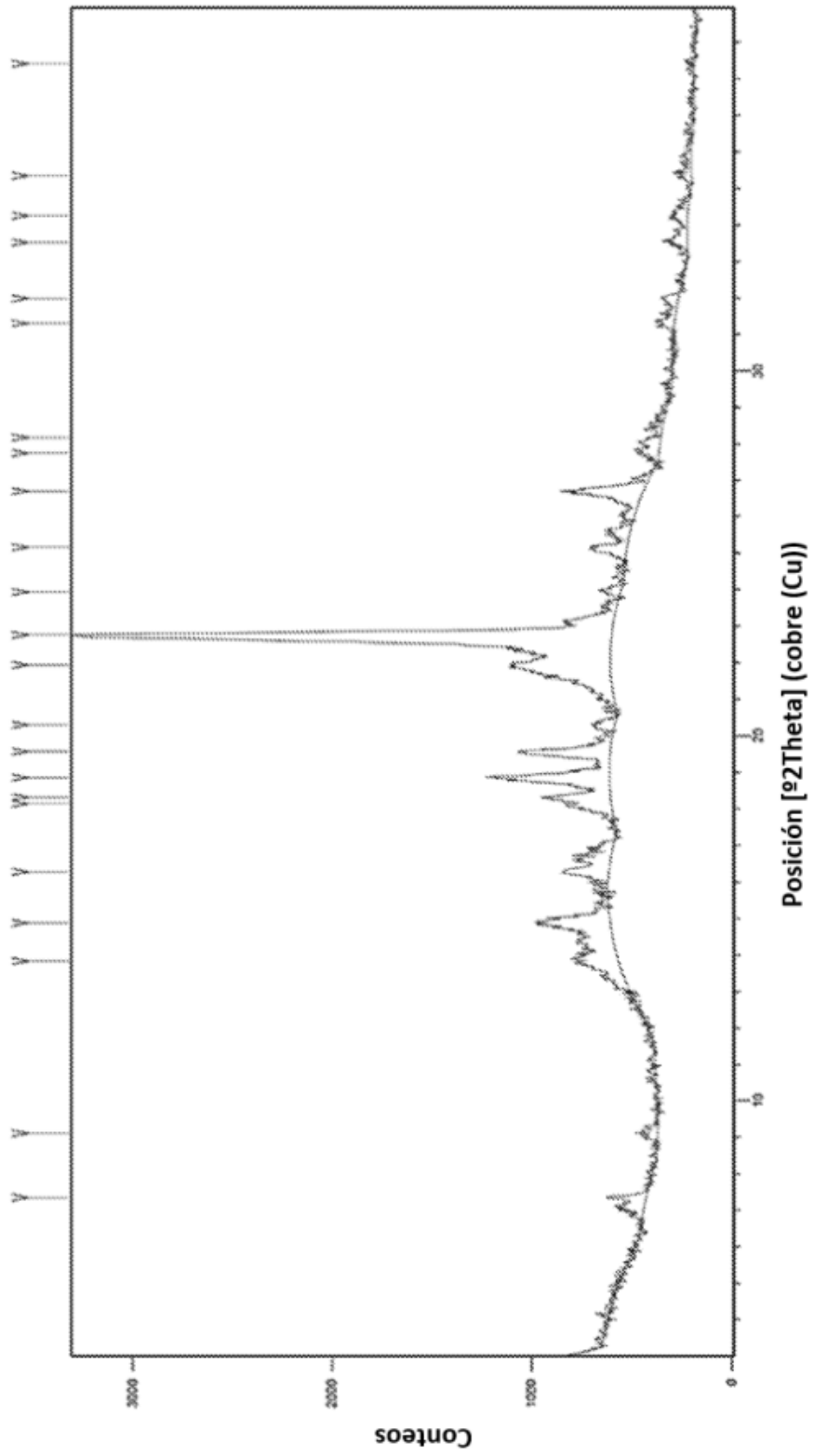
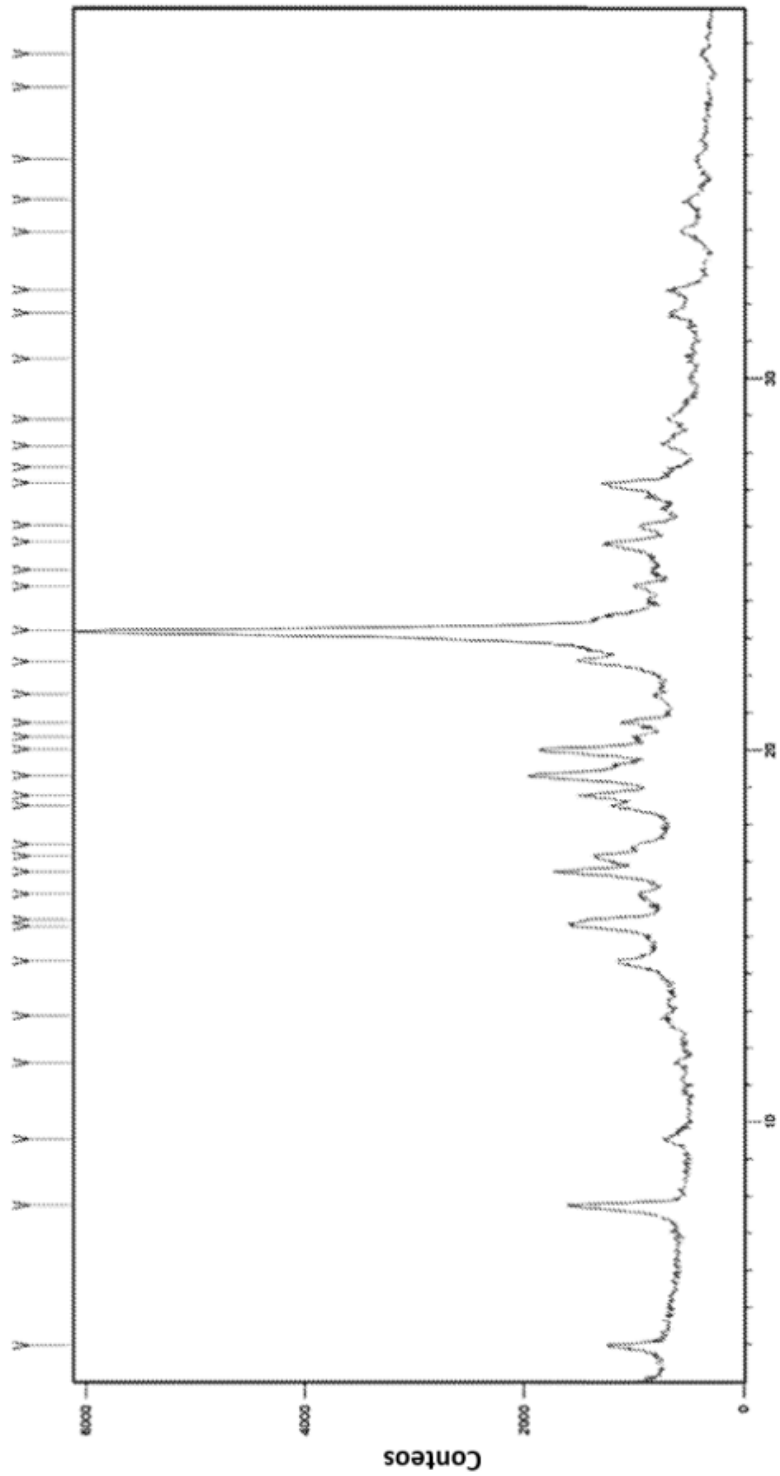
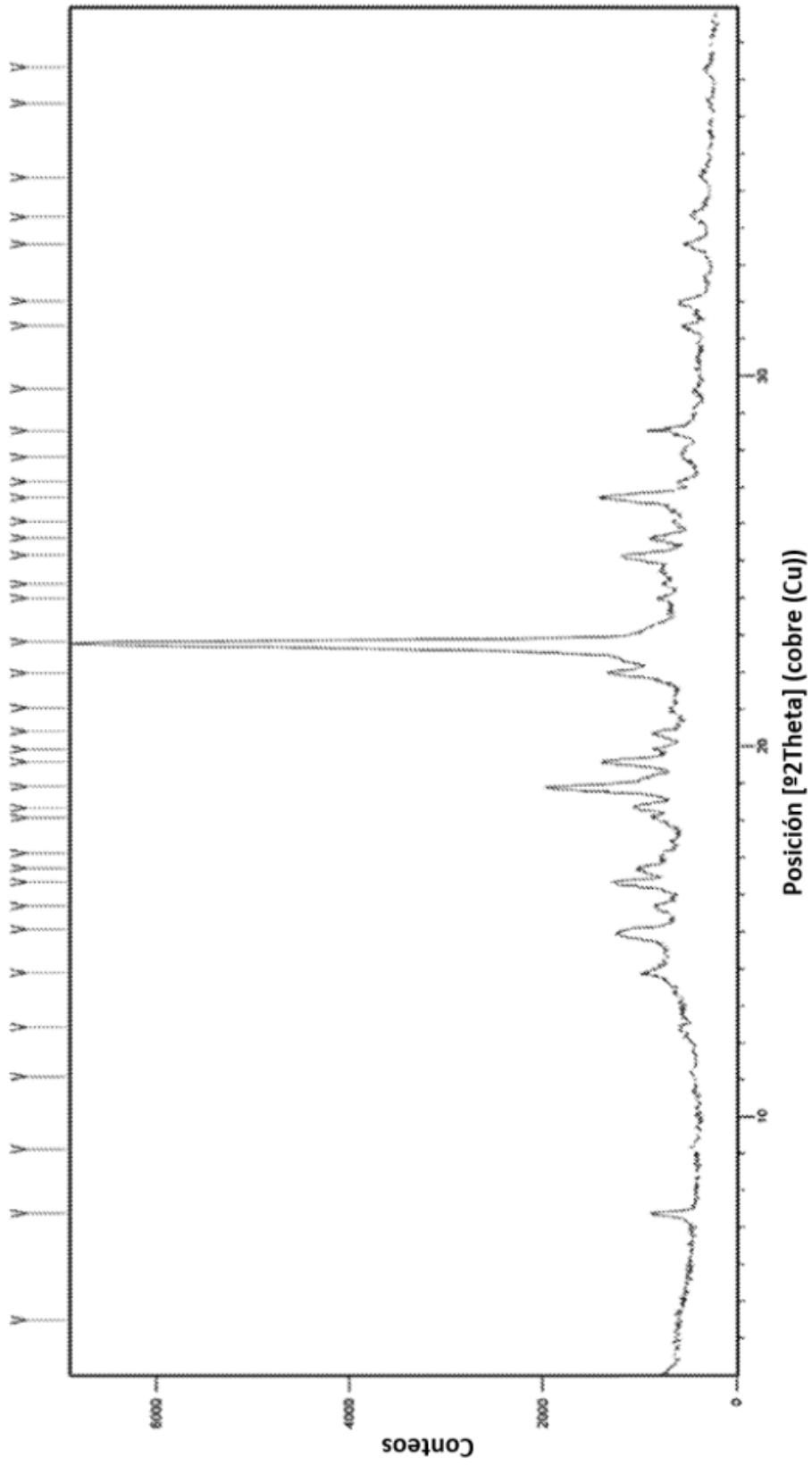


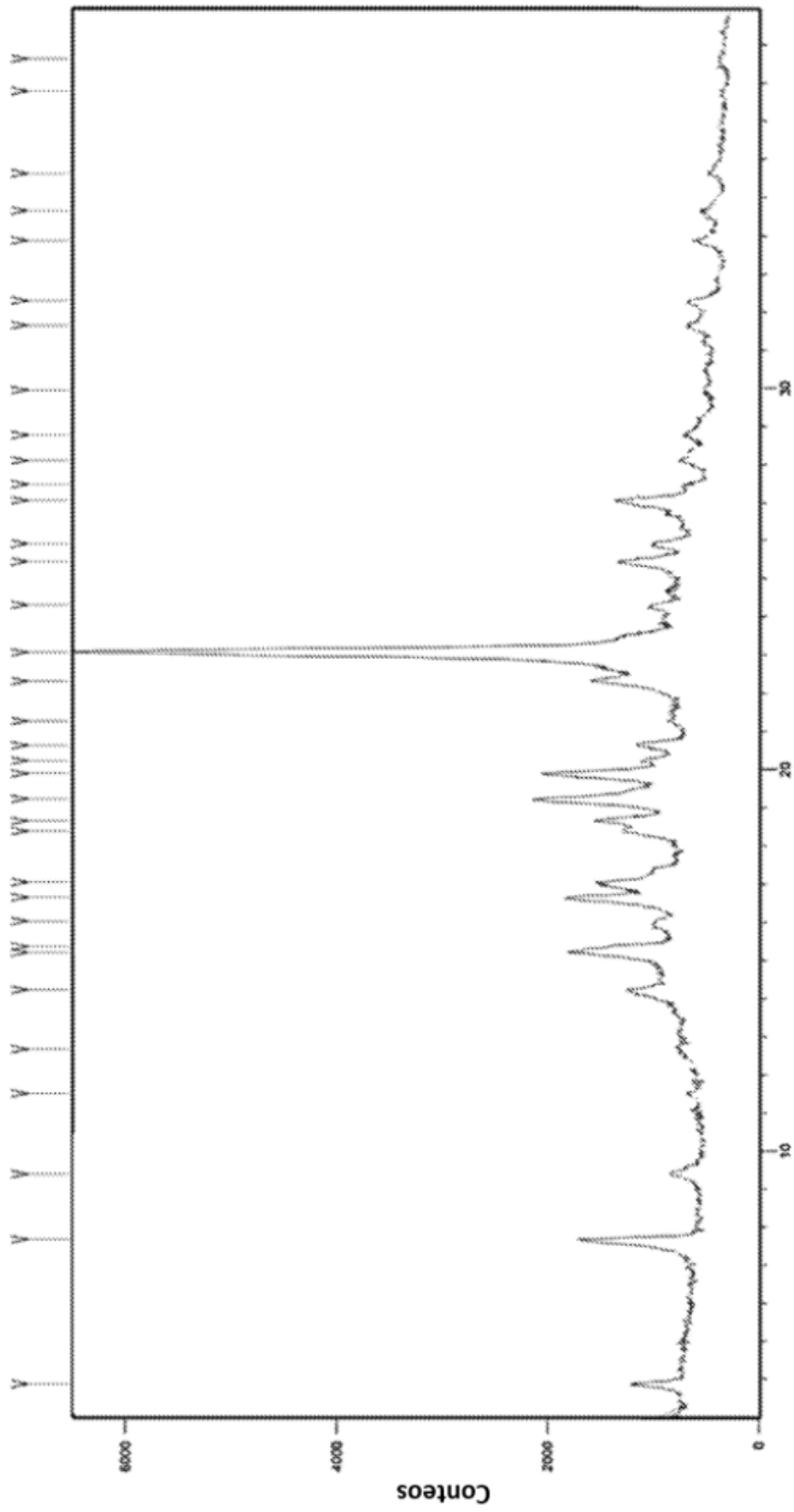
Figura 11



**Figura 12**

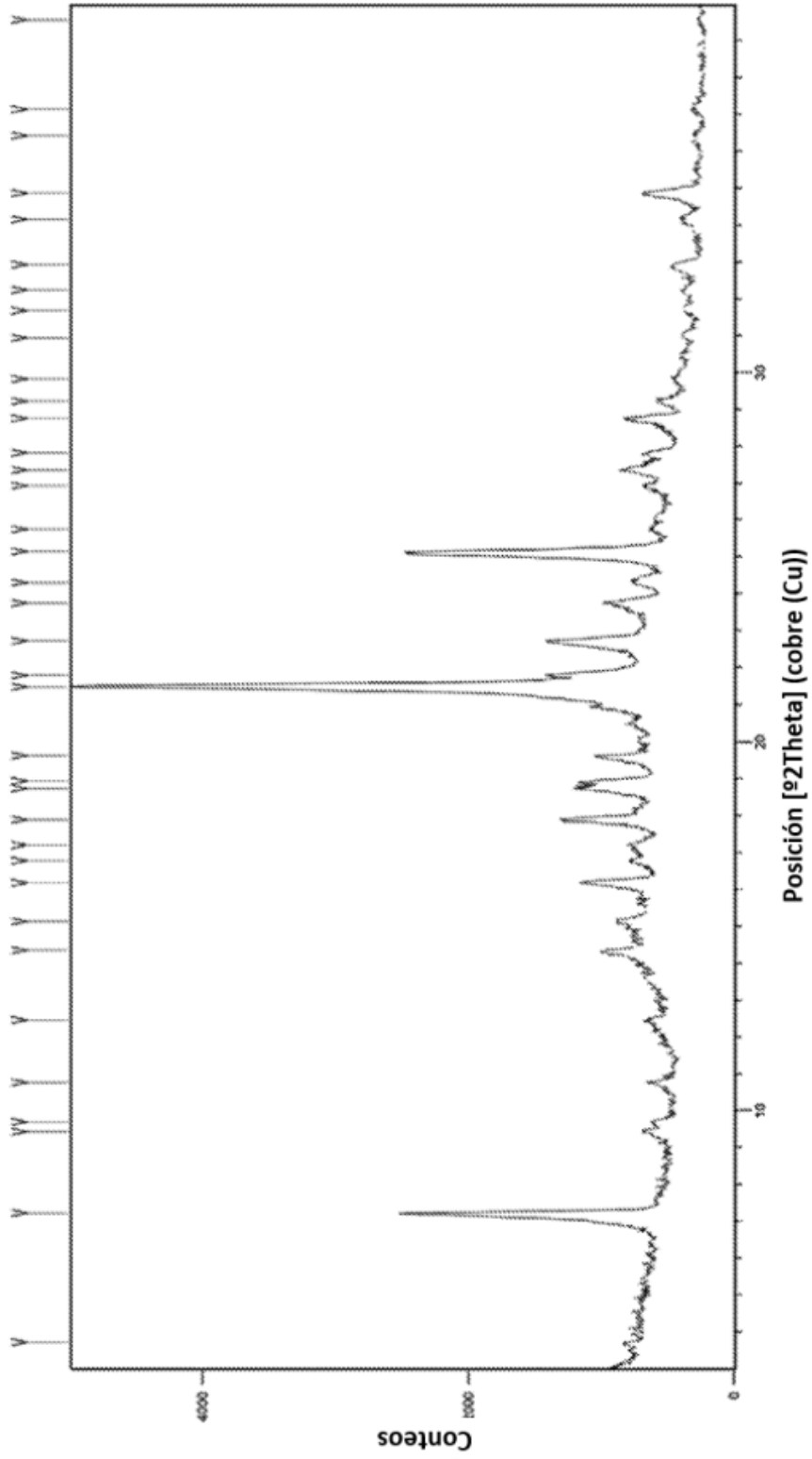


**Figura 13**



Posición [°2Theta] (cobre (Cu))

**Figura 14**



**Figura 15**

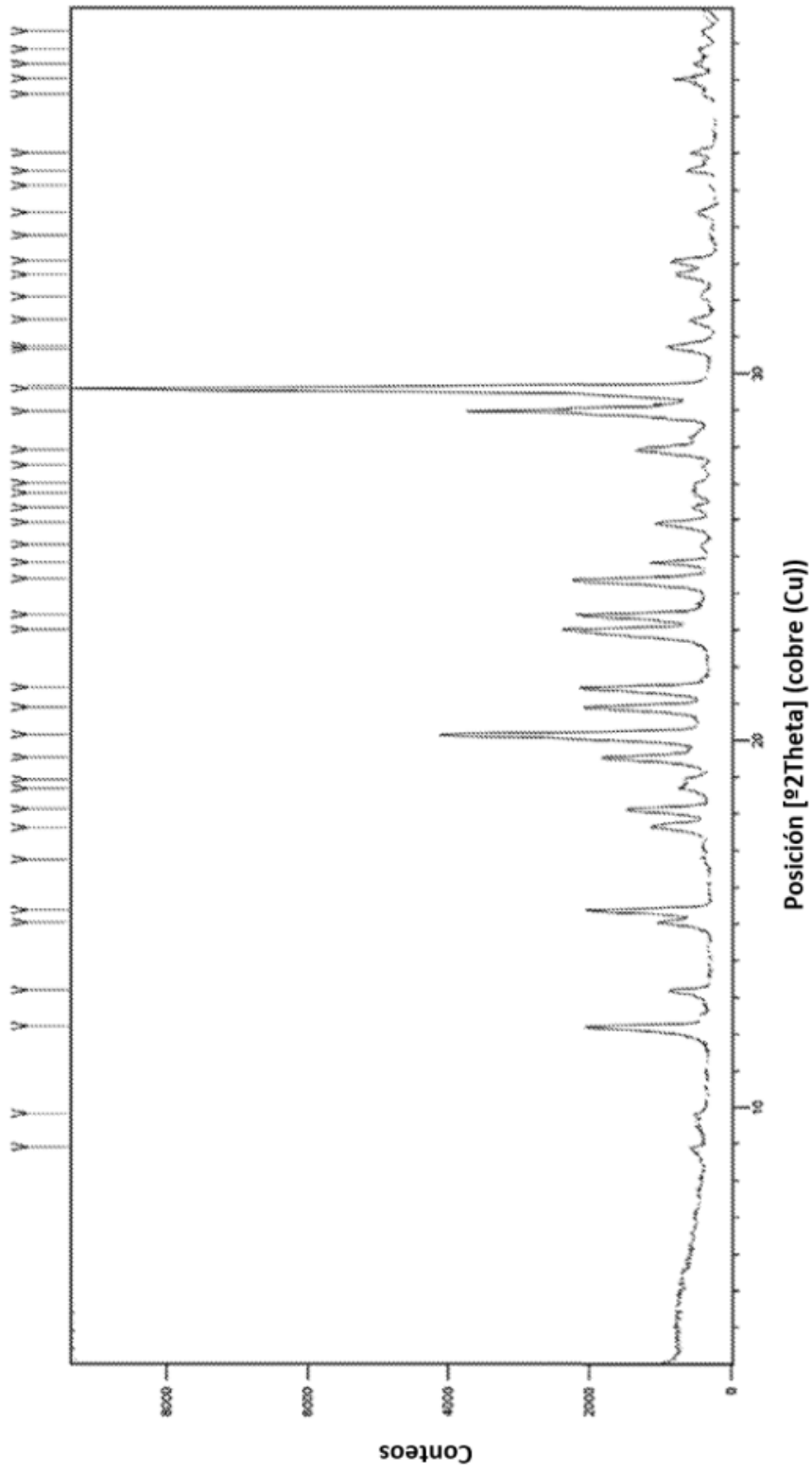


Figura 16

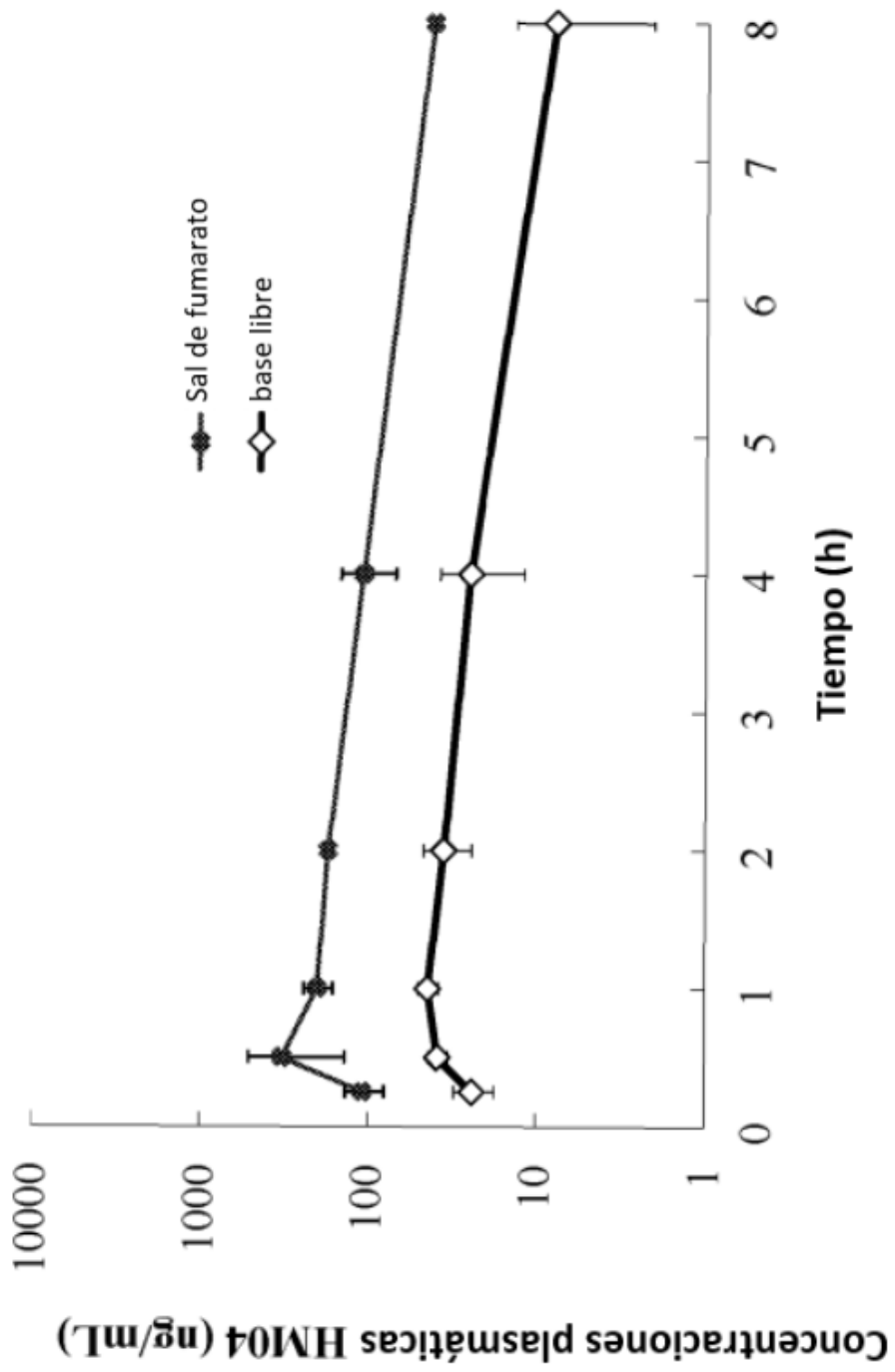


Figura 17

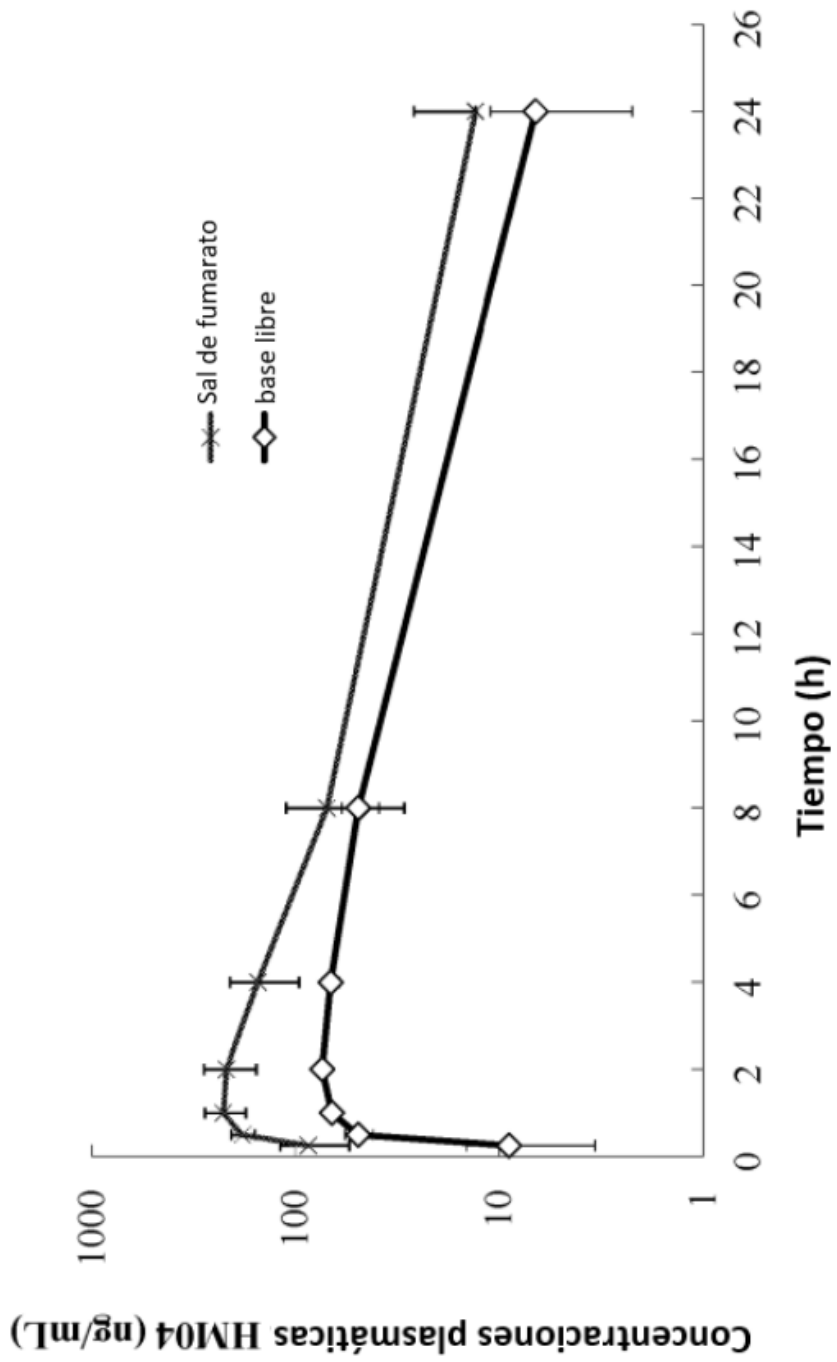


Figura 18

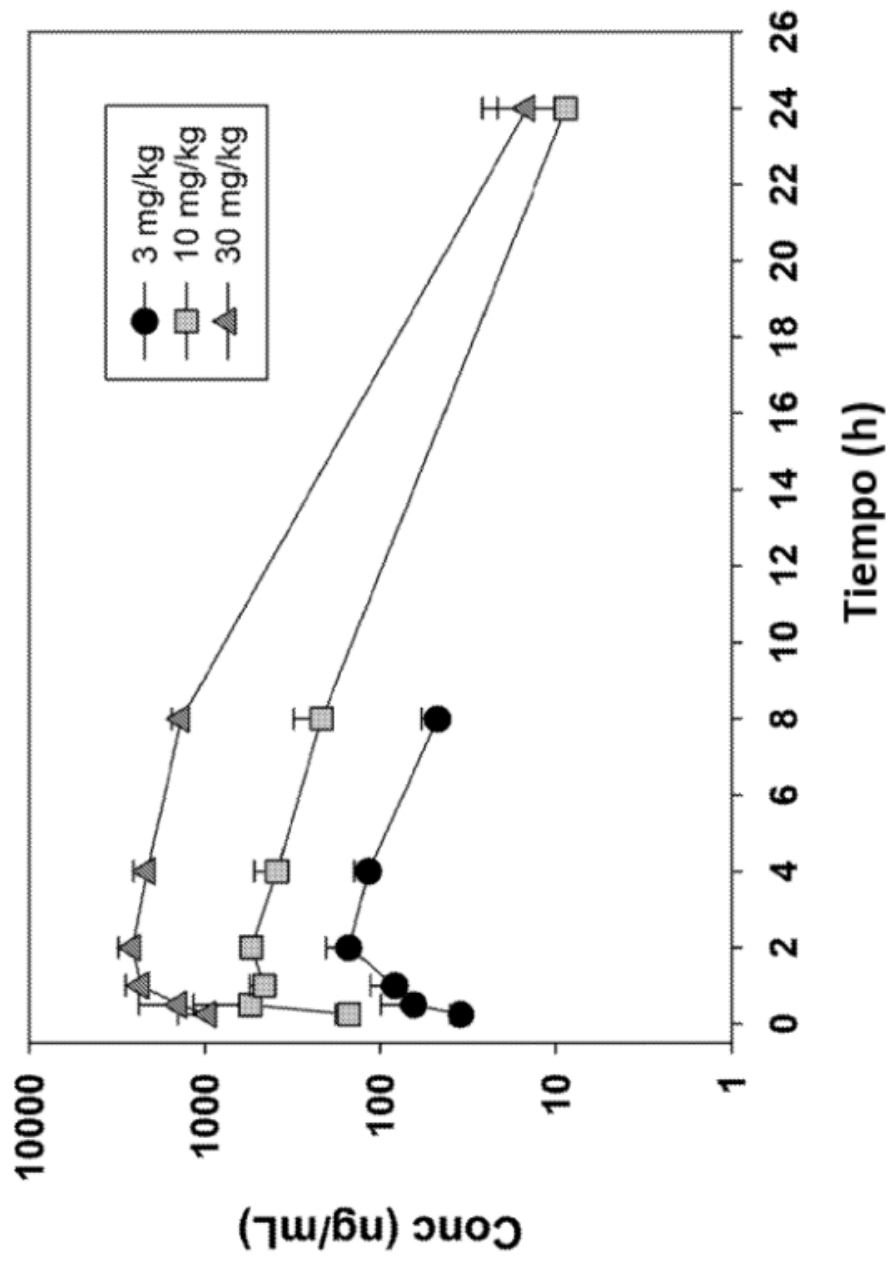


Figura 19

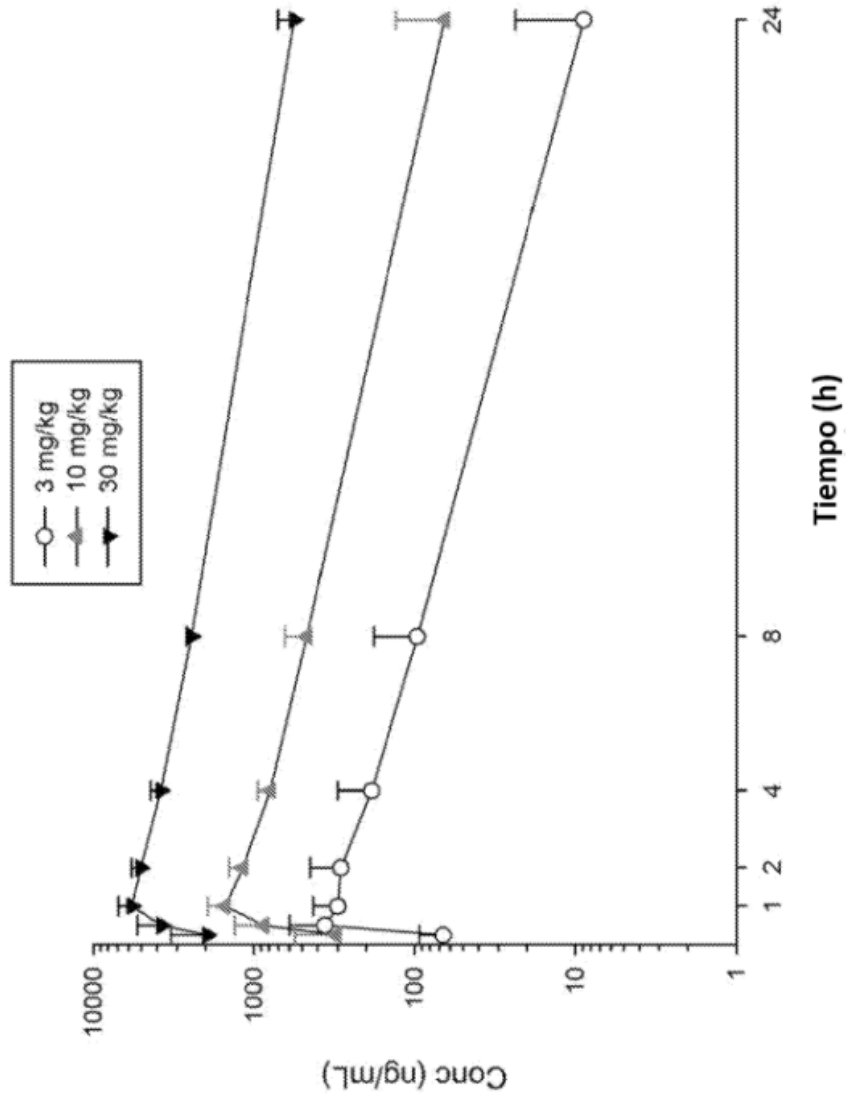


Figura 20

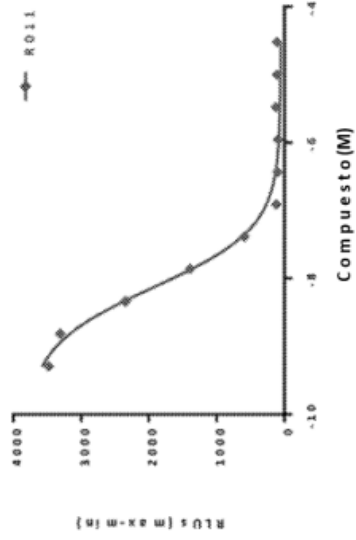


Figura 21B

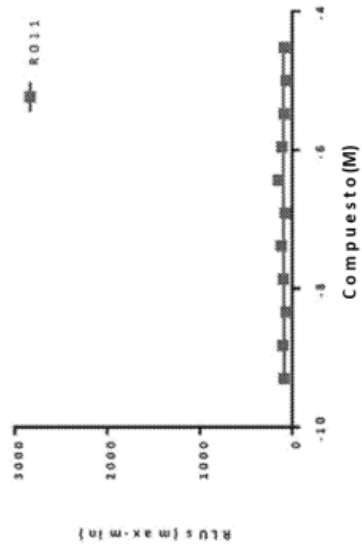


Figura 21D

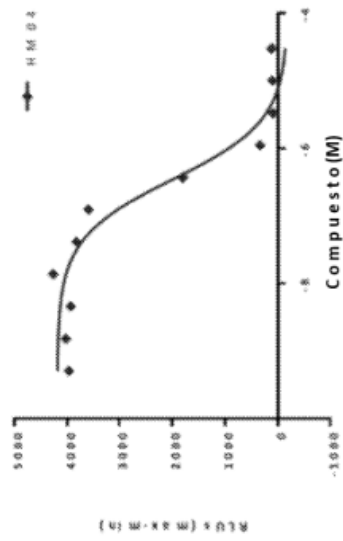


Figura 21A

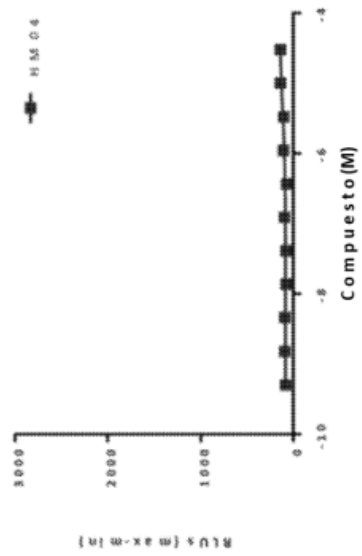


Figura 21C

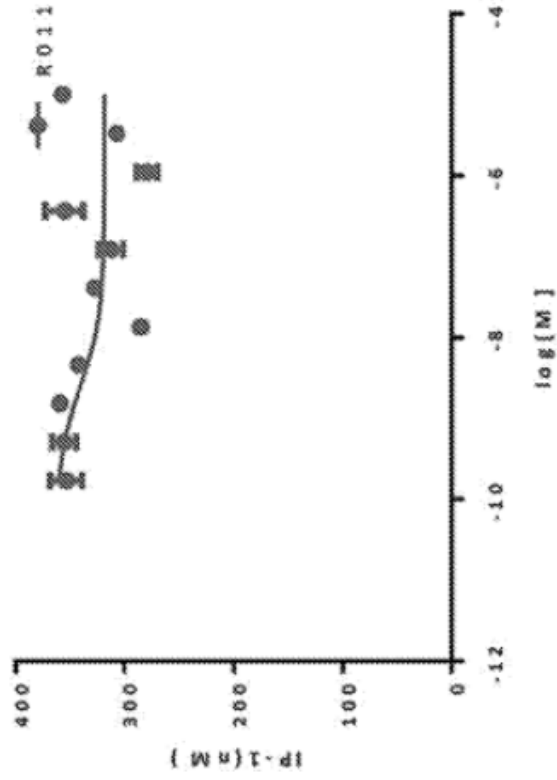


Figura 21F

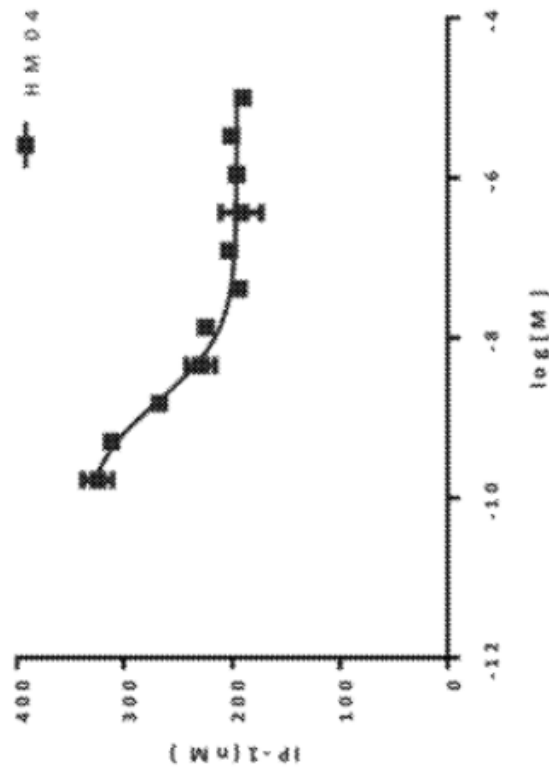


Figura 21E

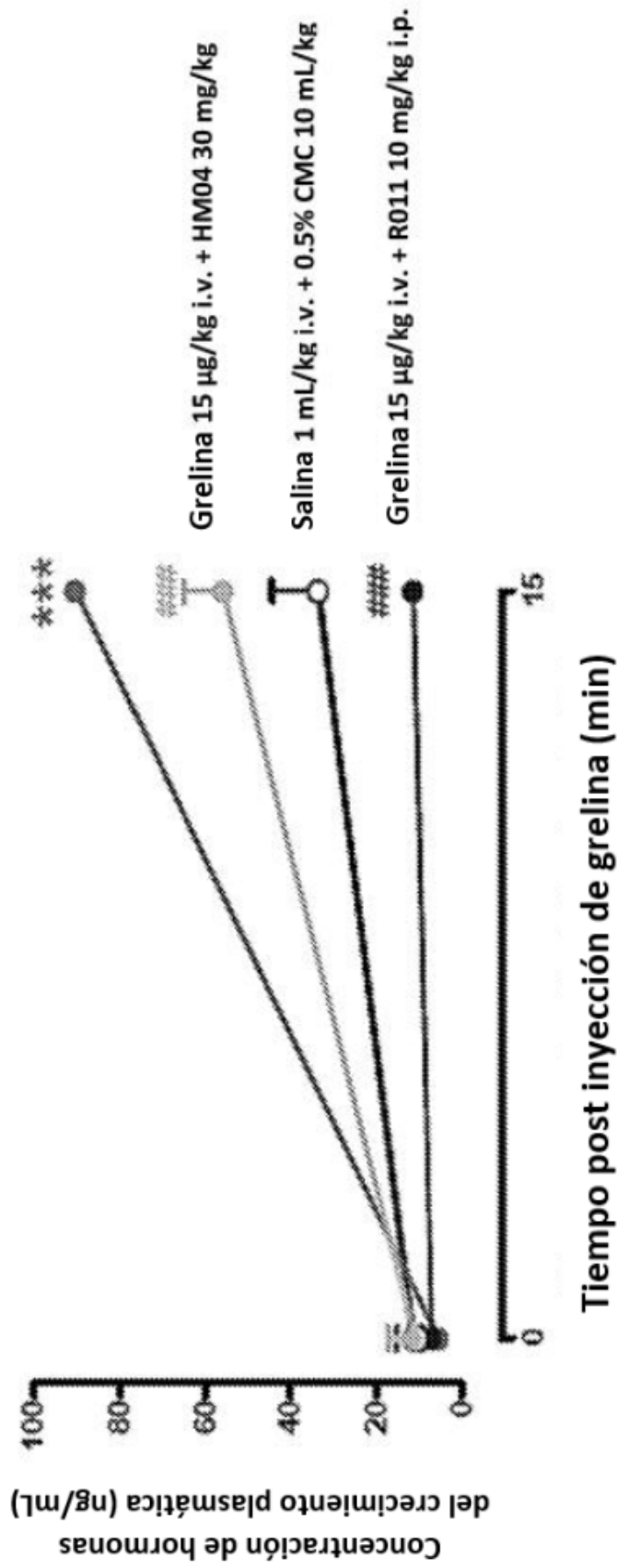


Figura 22

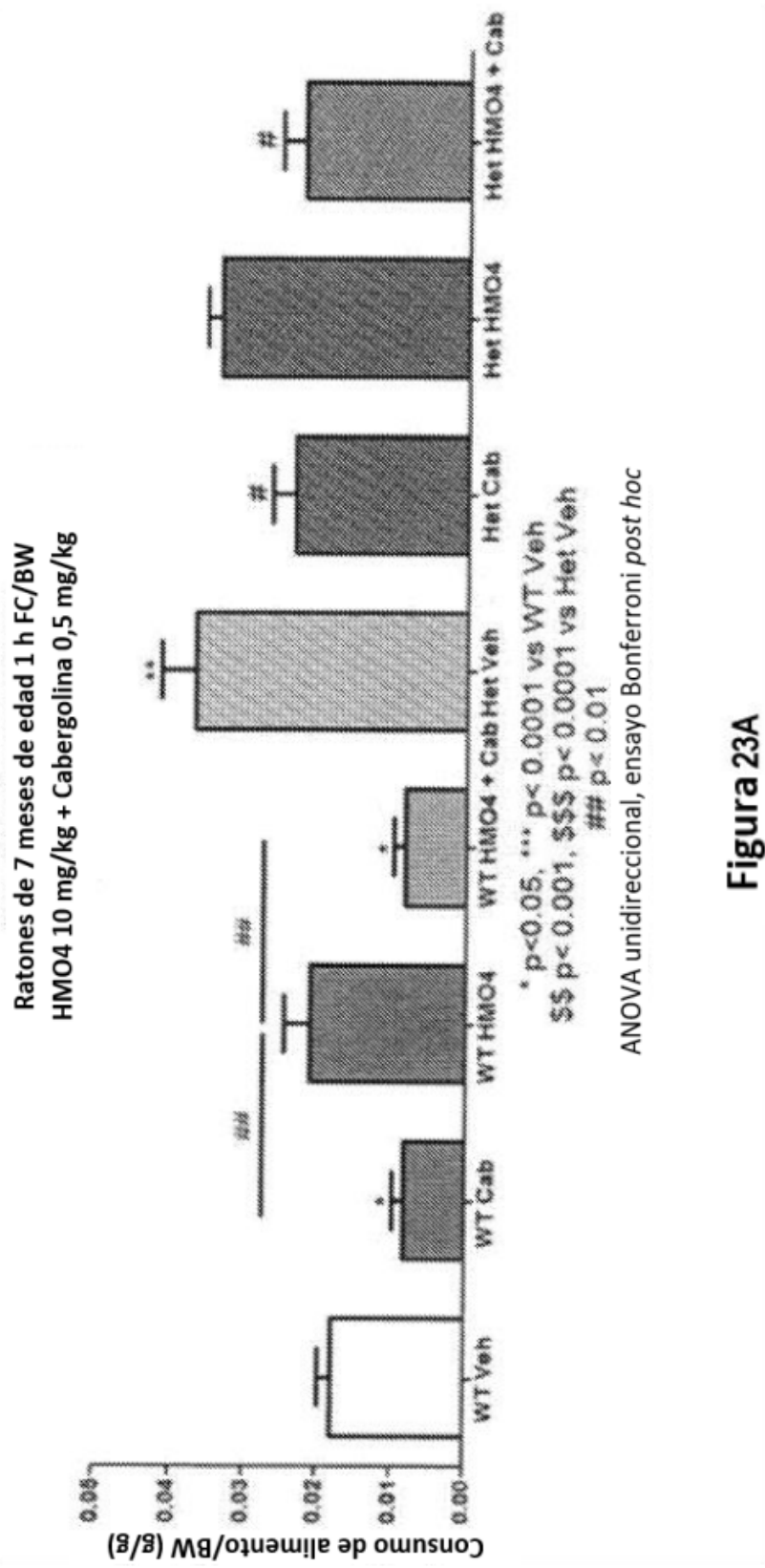


Figura 23A

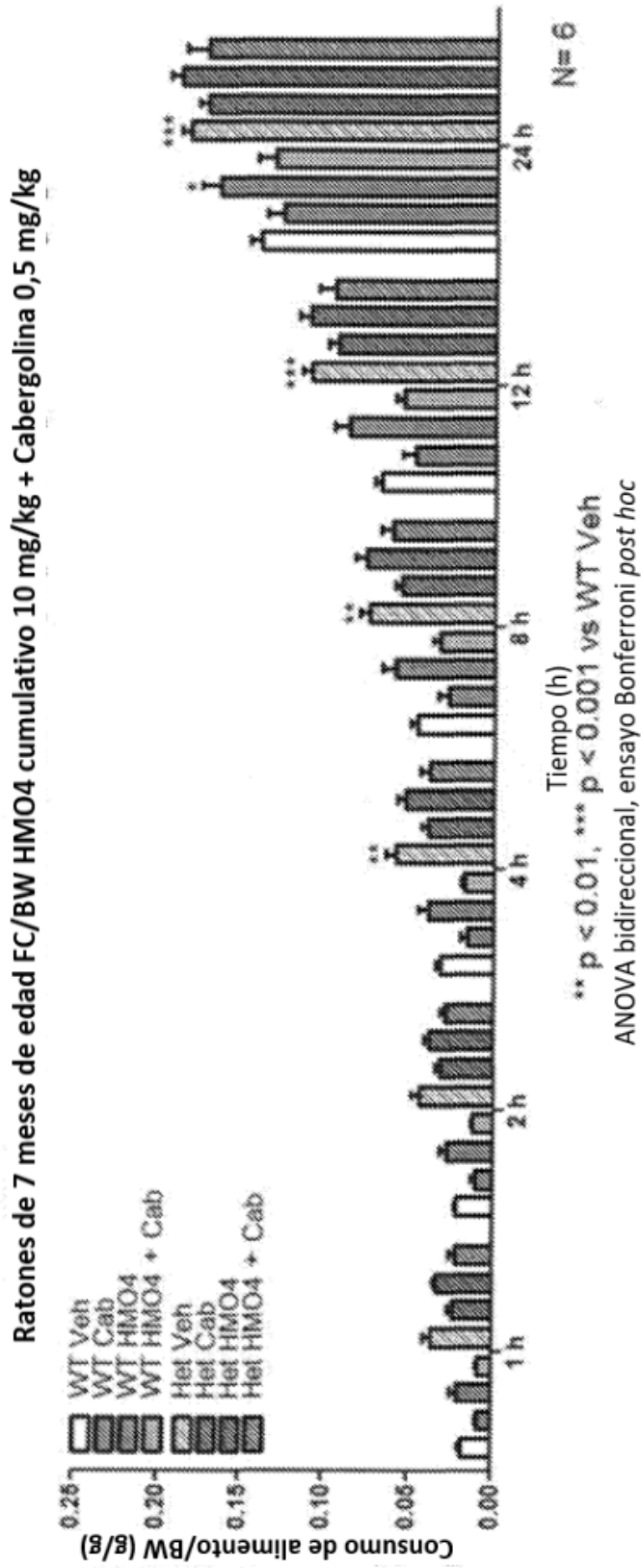


Figura 23B

### FC/BW HMO4 cumulativo

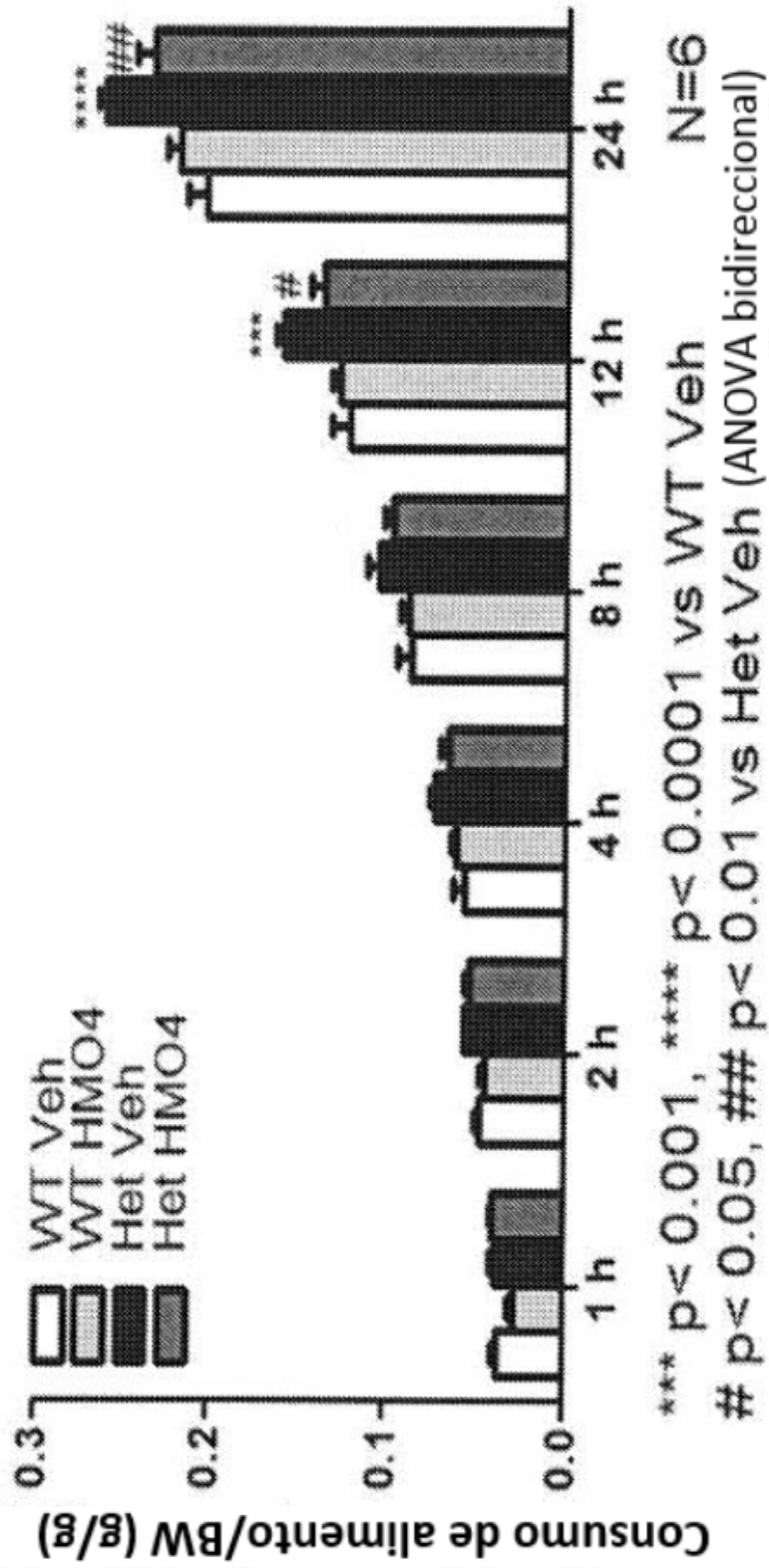


Figura 24

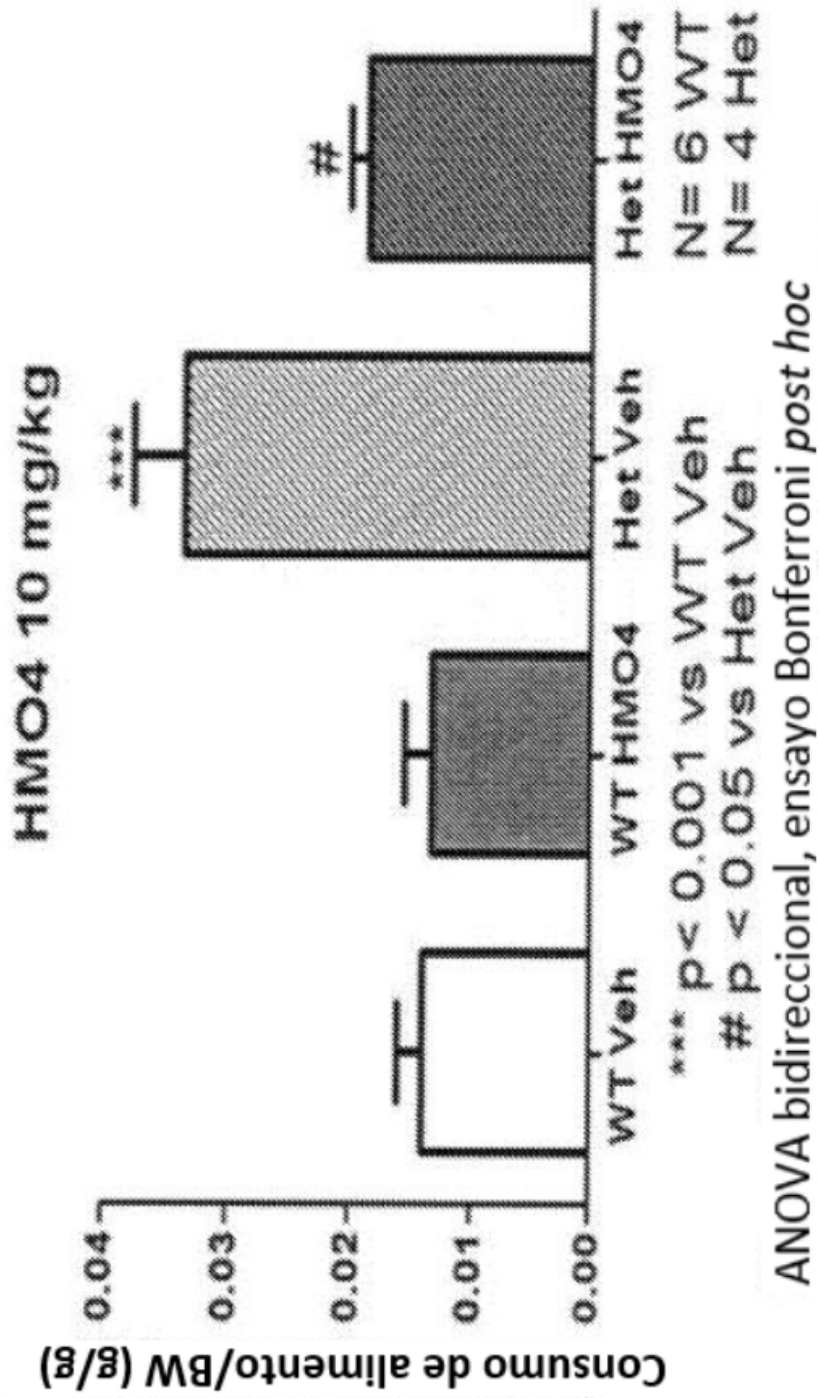
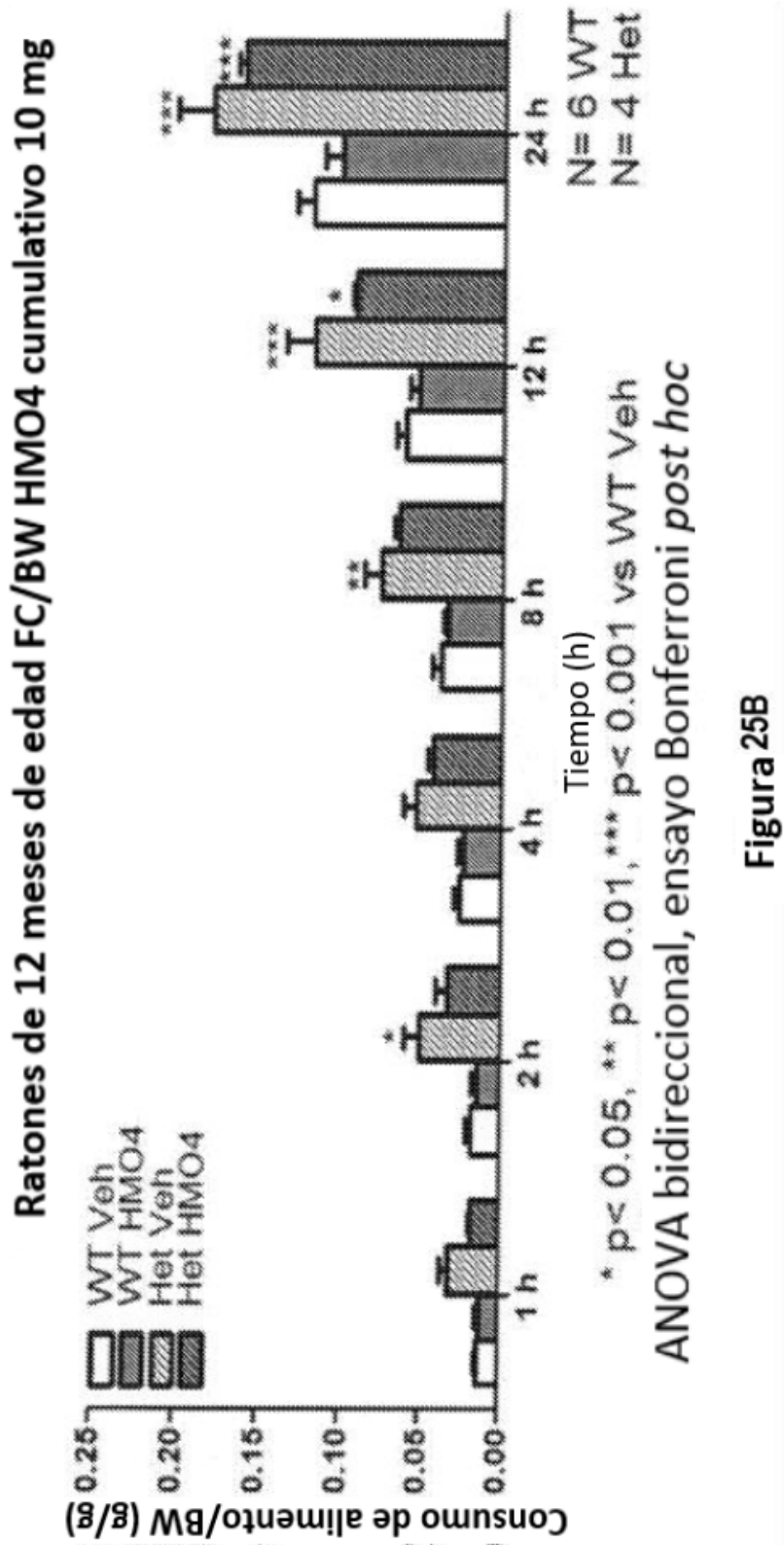


Figura 25A



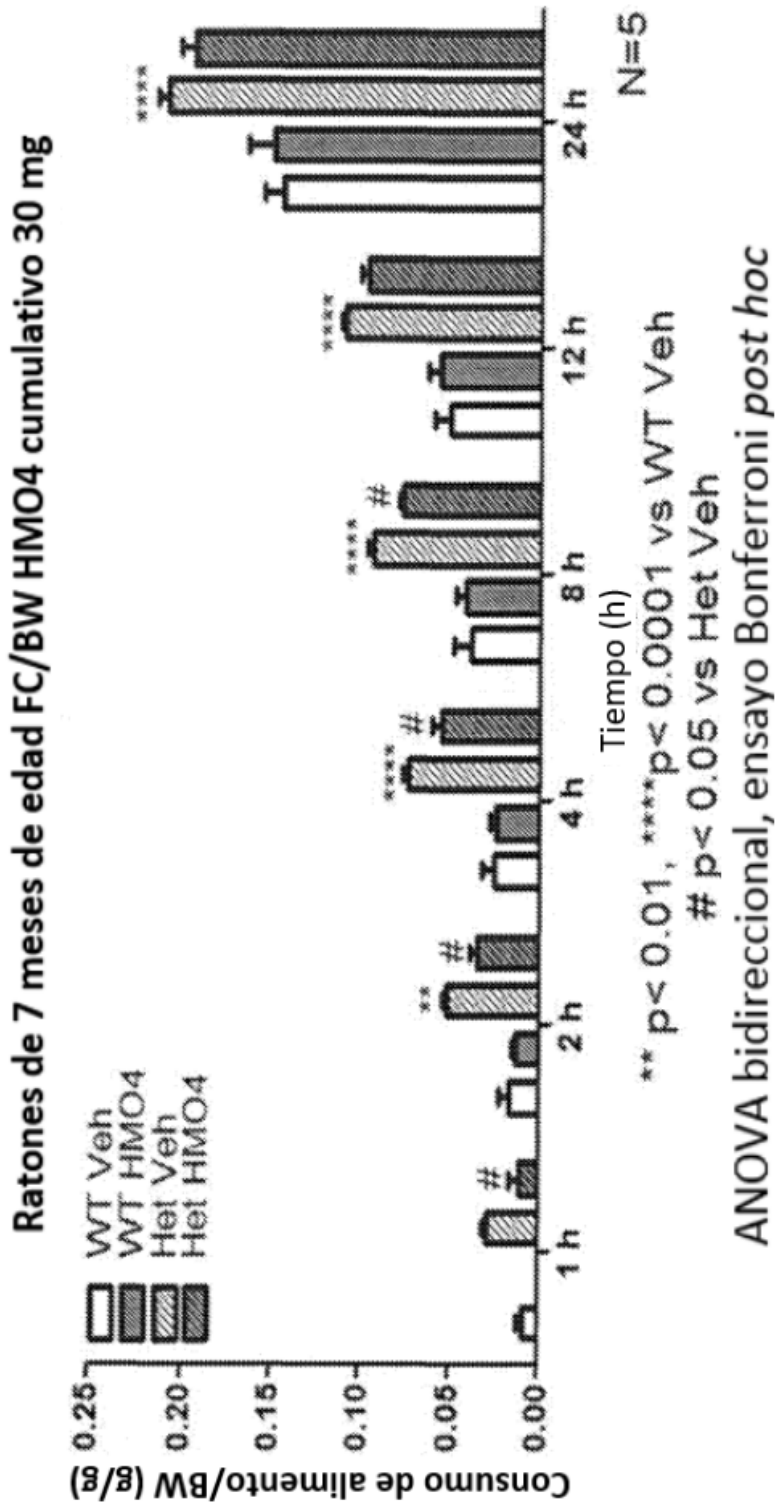
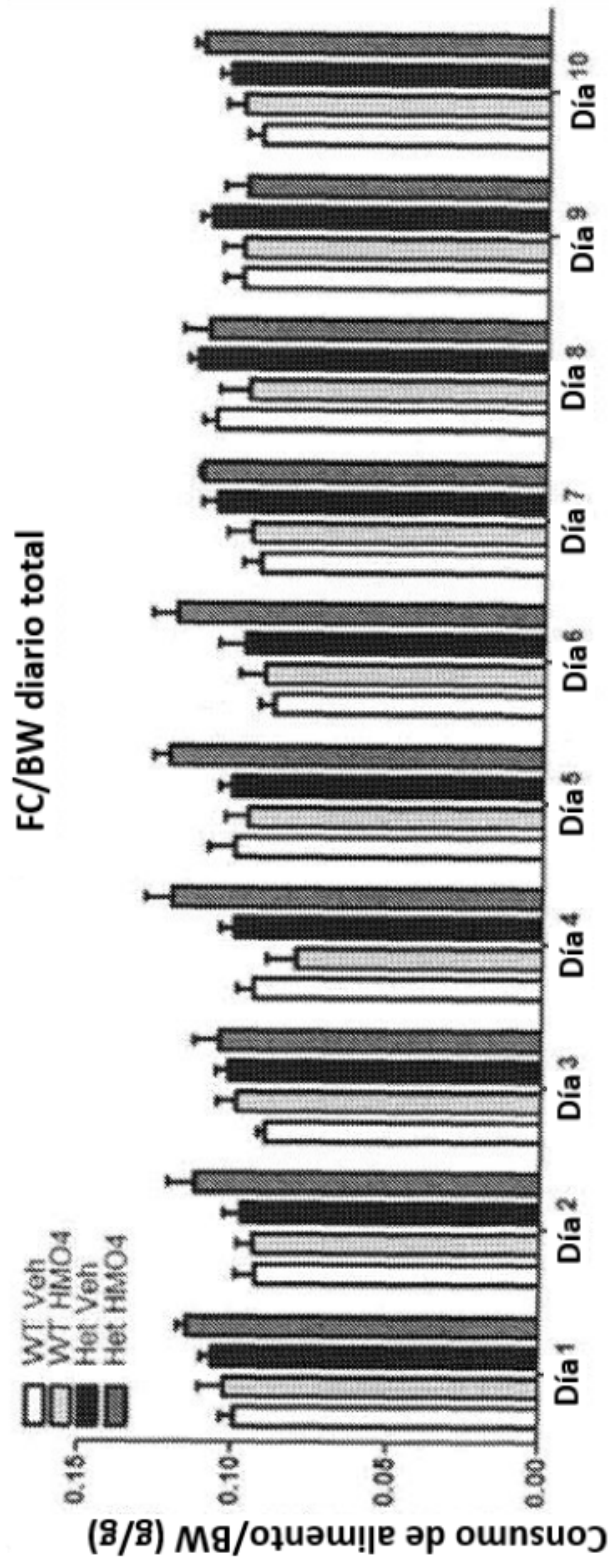


Figura 26



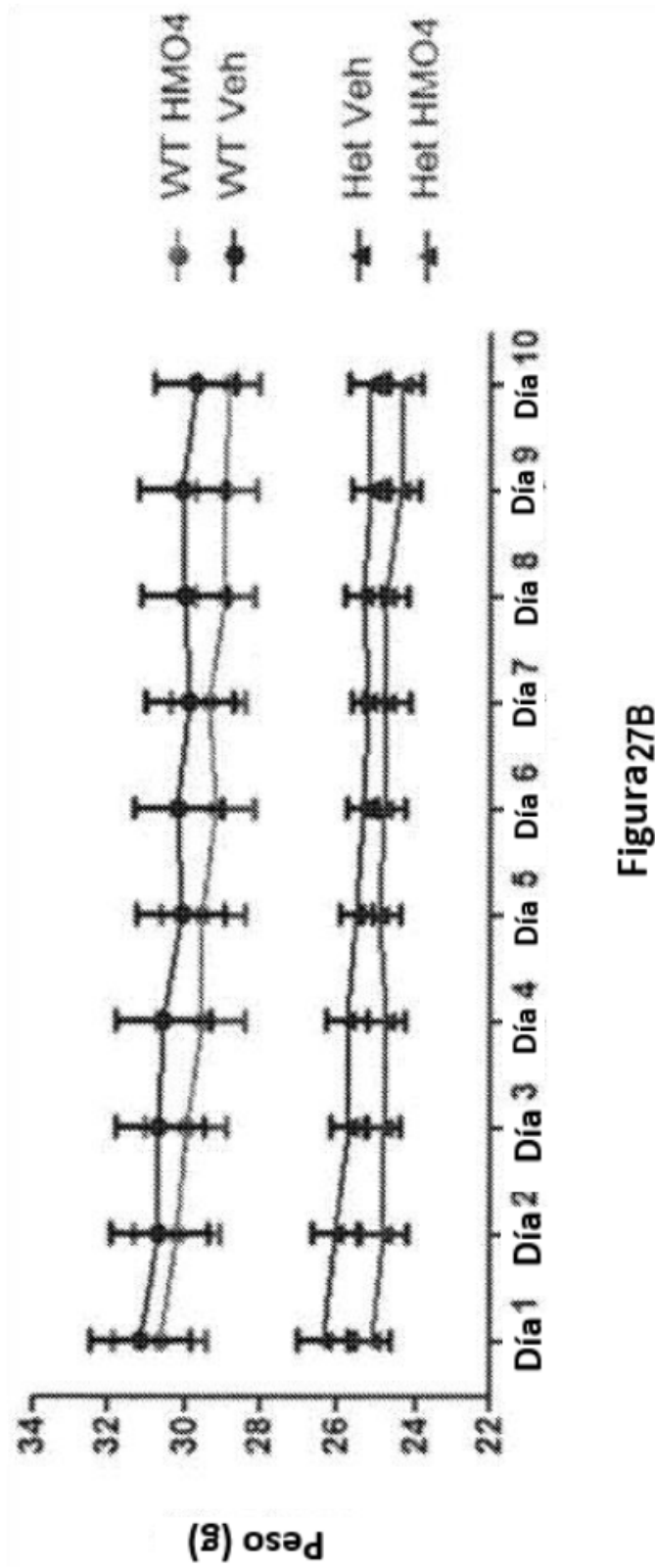
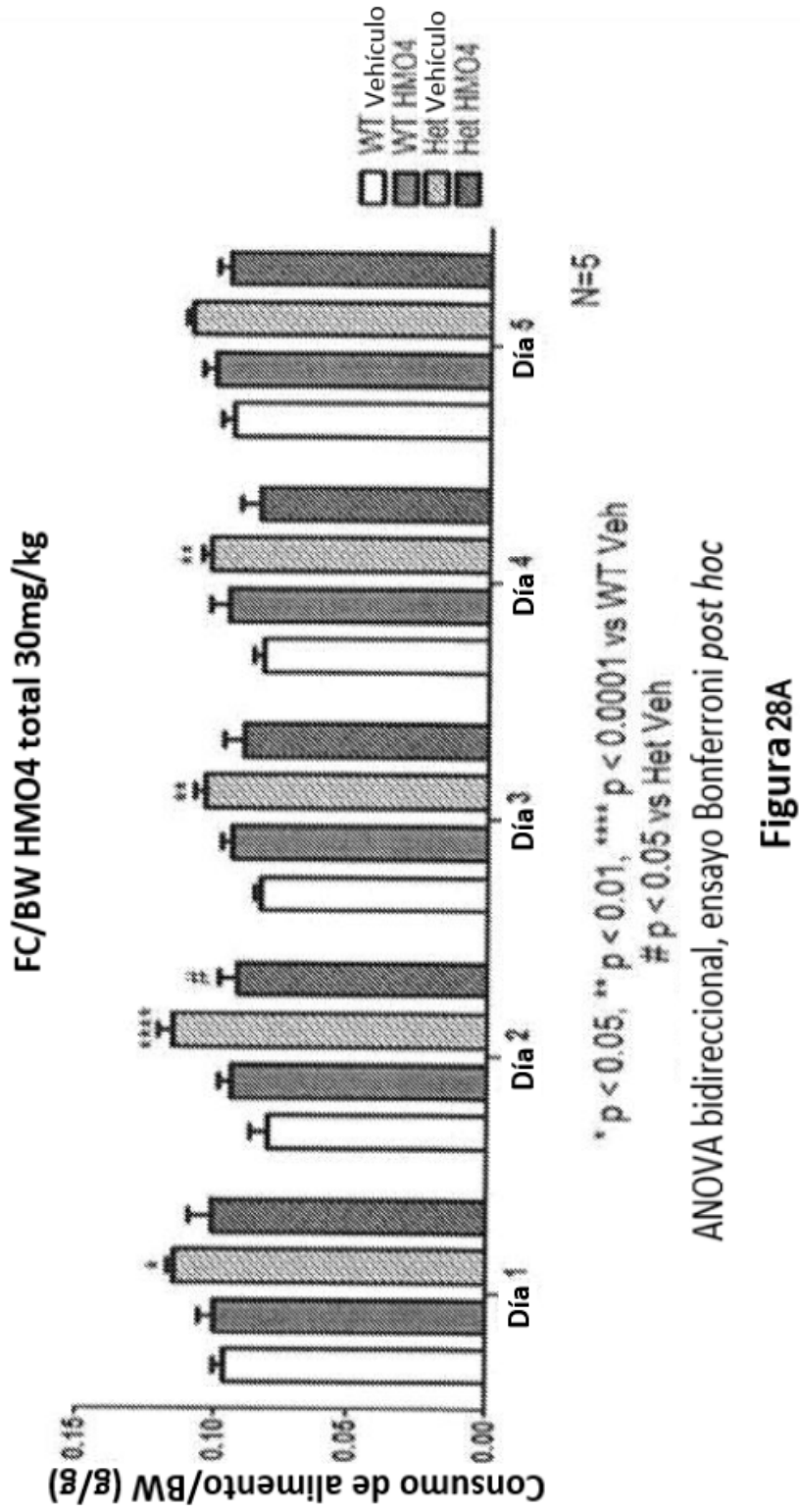


Figura 27B



ANOVA bidireccional, ensayo Bonferroni post hoc

**Figura 28A**

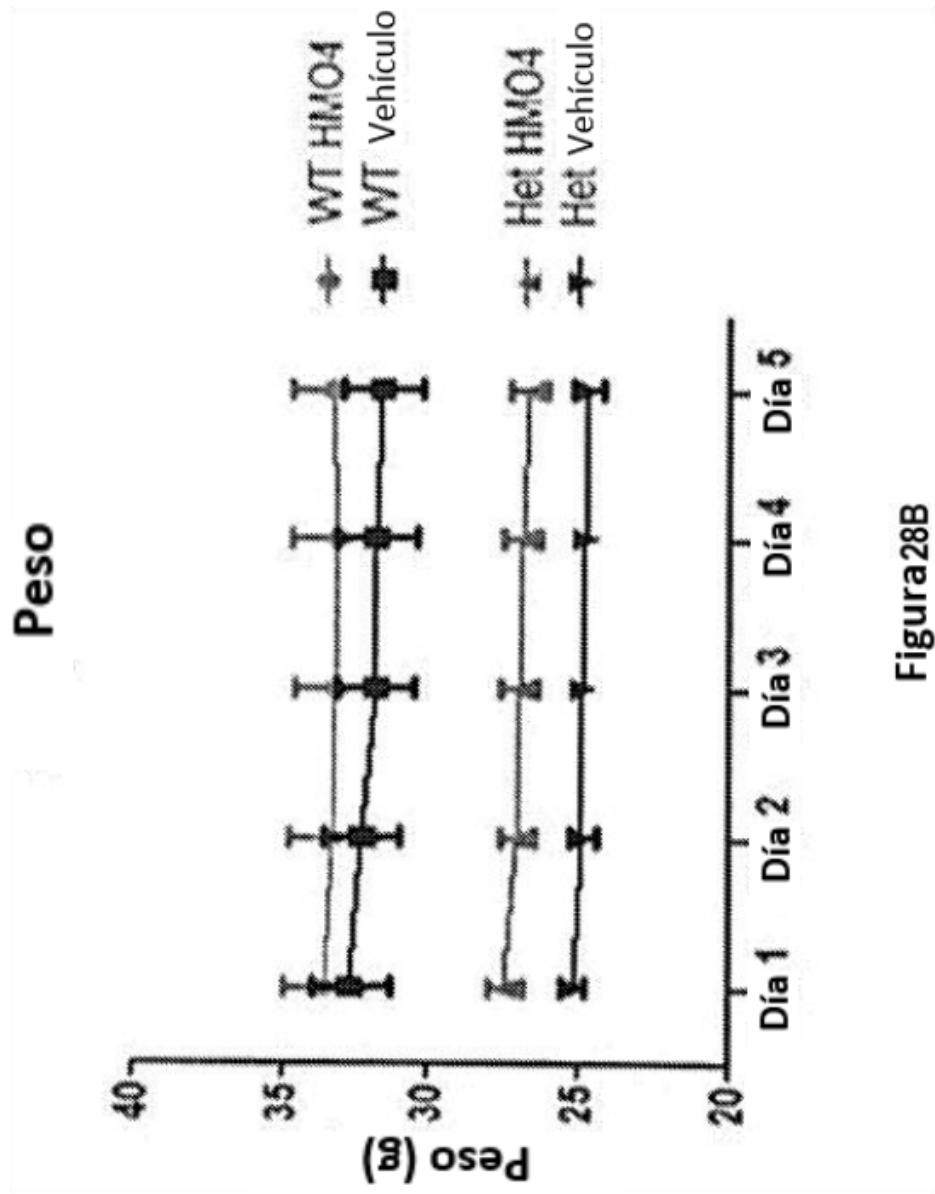
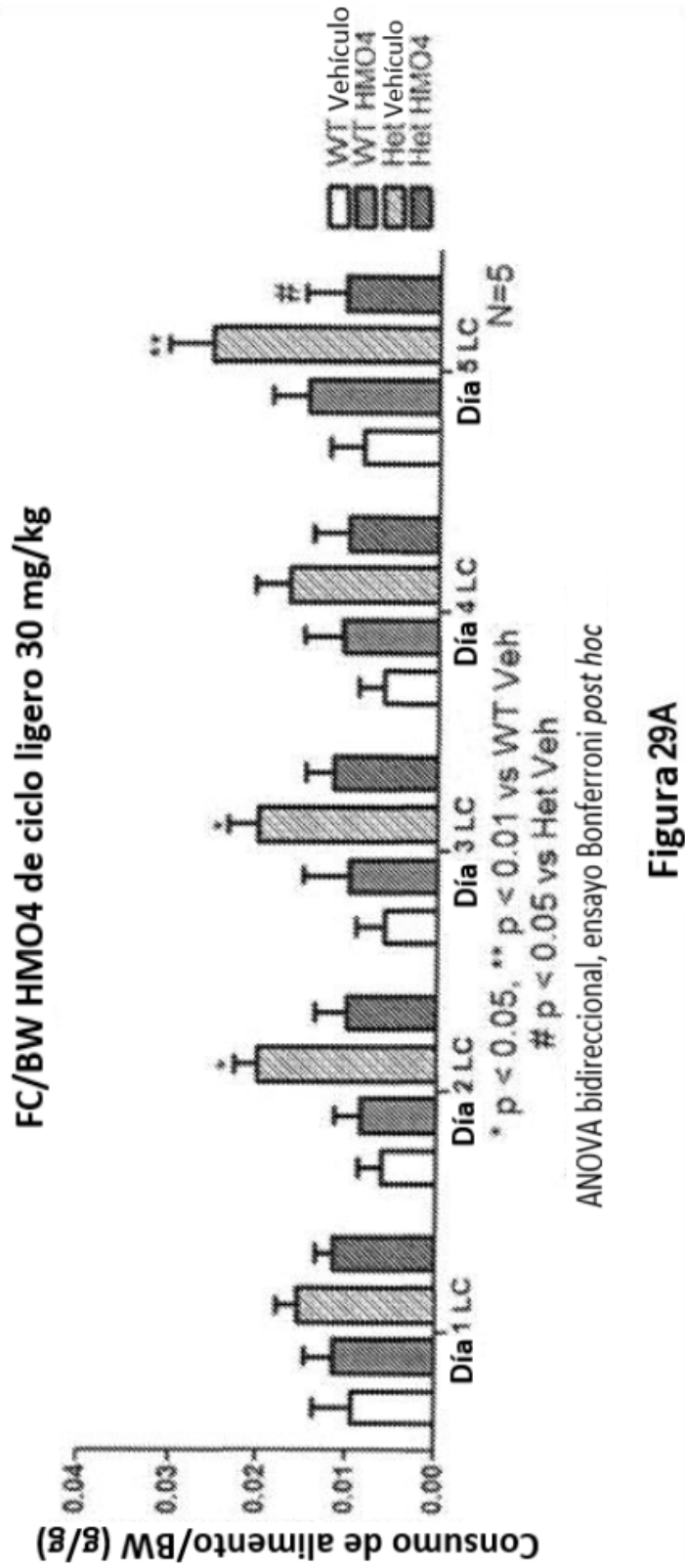
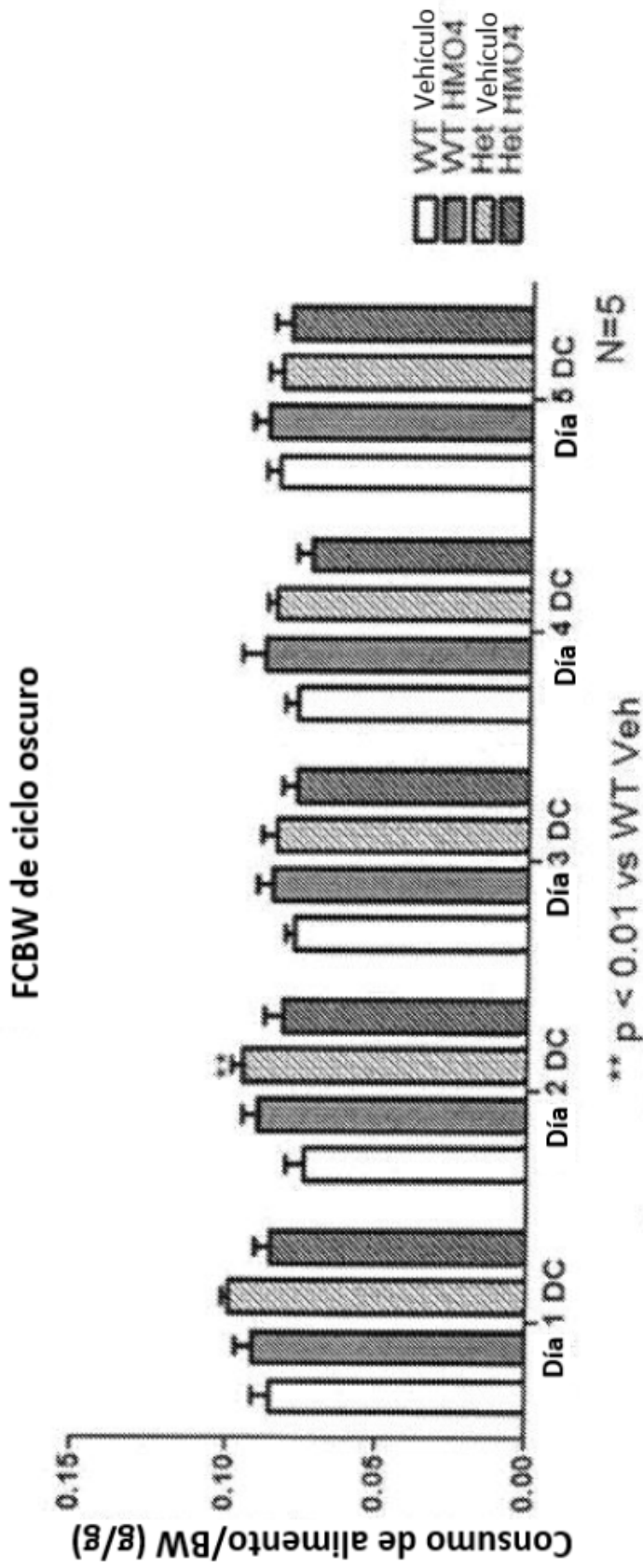


Figura28B





**Figura 29B**