

(11) Número de Publicação: **PT 1700858 E**

(51) Classificação Internacional:
C07D 453/02 (2007.10) **A61K 31/435** (2007.10)
A61P 13/00 (2007.10)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: **2005.04.04**

(30) Prioridade(s): **2005.03.08 JP 2005063405**
2005.03.25 JP 2005088872

(43) Data de publicação do pedido: **2006.09.13**

(45) Data e BPI da concessão: **2008.05.28**
139/2008

(73) Titular(es):

ASTELLAS PHARMA INC.
3-11, NIHONBASHI-HONCHO 2-CHOME, CHUO-
KU TOKYO 103-8411 JP

(72) Inventor(es):

MASAHIKO HAYAKAWA JP
KIYOHIRO SAMIZU JP
HIROSHI UEBAYASHI JP
KEN IKEDA JP
MAKOTO TAKEUCHI JP

(74) Mandatário:

PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **SAIS DE UM DERIVADO DE QUINUCLIDINA COMO ANTAGONISTAS DO RECEPTOR M3 MUSCARÍNICO**

(57) Resumo:

RESUMO

"SAIS DE UM DERIVADO DE QUINUCLIDINA COMO ANTAGONISTAS DO RECEPTOR M₃ MUSCARÍNICO"

É proporcionado um sal de adição de ácido de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo com um ácido selecionado do grupo consistindo de ácido (-)-(2S,3S)-tartárico, ácido (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartárico, ácido (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil) tartárico, (-)-L-fenilalanina, ácido benzenossulfônico, ácido ciclohexanossulfâmico, ácido bromídrico, ácido naftaleno-2-sulfônico, ácido sebácico, ácido (+)-canfor-10-sulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido metanossulfônico e metilfosfato, que apresenta pouca higroscopicidade que afete a utilização como um fármaco ou sua substância fármaco e é muito útil como um fármaco ou sua substância fármaco.

DESCRIÇÃO

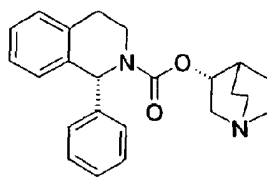
"SAIS DE UM DERIVADO DE QUINUCLIDINA COMO ANTAGONISTAS DO RECEPTOR M₃ MUSCARÍNICO"

Campo Técnico

A presente invenção refere-se a novos sais de adição de ácidos de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo (daqui em diante referido como Composto A) que são úteis como fármacos, particularmente, como antagonistas do receptor M₃ muscarínico.

Técnica Anterior

Foi divulgado que o Composto A, com a fórmula química apresentada abaixo, uma vez que apresenta uma afinidade e selectividade para receptores M₃ muscarínicos, é útil como um antagonista do receptor M₃ na profilaxia ou tratamento de várias doenças mediadas pelo receptor M₃, particularmente, doenças urológicas, tais como incontinência urinária ou polaquiúria em polaquiúria neurótica, bexiga neurogénica, enurese nocturna, bexiga instável, espasmos da bexiga, cistite crónica, etc., doenças respiratórias, tais como doença pulmonar obstrutiva crónica, bronquite crónica, asma e rinite, ou doenças do tracto digestivo, tais como síndrome do intestino irritável, também referido como colite espástica ou diverticulite (documento de Patente 1).



Composto A

Para o sal de adição de ácido do Composto A, o documento de patente 1 acima revela apenas um sal, o sal de cloridrato do Composto A no Exemplo 10 e não é conhecido nenhum exemplo particular, no que se refere a outros sais de adição de ácido, excepto o sal de cloridrato descrito no documento da patente 1 acima.

[Documento da patente 1] EP 0801067

Descrição da Invenção

O cloridrato do Composto A, o único sal de adição de ácido conhecido do Composto A, pode ser obtido como um anidrido cristalino, mas verificou-se que o cloridrato é muito higroscópico pelo que deliquesce num ambiente convencional mantido a uma humidade relativa de 70% (temperatura ambiente) e acompanhado pelo aumento de impurezas durante o armazenamento a longo termo.

Consequentemente, de modo a fornecer uma preparação farmacêutica segura ou sua substância fármaco, é desejado que possa ser descoberto um sal do Composto A menos higroscópico, particularmente o sal altamente estável à humidade que não o cloridrato.

O presente requerente investigou vários sais de adição de ácido do Composto A e verificou que sais de adição de ácido do Composto A particulares, são menos higroscópicos e apresentam estabilidade superior à humidade que o sal de cloridrato convencional. Assim, a invenção estava completa. De acordo com a invenção, é proporcionado um sal de adição de ácido do Composto A com um ácido seleccionado do grupo S, consistindo de

ácido (-)-(2S,3S)-tartárico,

ácido (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartárico,

ácido (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil) tartárico,
(-)-L-fenilalanina,

ácido benzenossulfónico, ácido ciclo-hexanossulfâmico, ácido bromídrico,

ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido sebácico, ácido (+)-canfor-10-sulfónico, ácido p-toluenossulfónico, ácido etanossulfónico, ácido metanossulfónico e metilfosfato.

Concretamente, a invenção proporciona um sal de adição de ácido de

(1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo, *i. e.*, Composto A, seleccionado de (-)-(2S,3S)-tartarato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

(+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartarato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

(+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil)tartarato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

(-)-L-fenilalaninato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

benzenossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

ciclo-hexanossulfamato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

bromidrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

naftaleno-2-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

sebacato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

(+)-canfor-10-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

p-toluenossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

etanossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

metanossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinoli-

na-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

e metilfosfato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

Entre estes sais, o preferido é (-)-(2S,3S)-tartarato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartarato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil)tartarato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é (-)-L-fenilalaninato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é benzenossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é ciclo-hexanossulfamato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é bromidrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é naftaleno-2-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é sebacato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é (+)-canfor-10-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é p-toluenossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é etanossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

noutro aspecto, o preferido é metanossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo;

e noutro aspecto, o preferido é metilfosfato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

Na realidade, o ácido ciclo-hexanossulfâmico é também denominado ácido ciclo-hexilsulfâmico, o ácido sebácico é também denominado ácido decandicarboxílico, o ácido (+)-canfor-10-sulfônico é também denominado ácido (+)-[(1S,4R)-7,7-dimetil-2-

-oxobicyclo[2.2.1]heptan-1-il]metanossulfónico e o ácido p-toluenossulfónico é também denominado ácido 4-metilbenzenossulfónico.

Além disso, de acordo com a invenção, é proporcionado uma composição farmacêutica compreendendo, como um ingrediente activo, um ou mais sais de adição de ácido do Composto A, *i. e.*, (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo, sendo particularmente um antagonista do receptor M₃ muscarínico.

Nos sais de adição de ácido da invenção do Composto A, com um ácido seleccionado do grupo S acima mencionado, a higroscopicidade é melhorada e a estabilidade à humidade é muito aumentada em comparação com o cloridrato do Composto A conhecido. Assim, os sais da invenção são muito úteis como fármacos ou suas substâncias fármaco.

Em particular, como normalmente conhecido, é conhecido que em fármacos higroscopicamente melhorados ou suas substâncias fármaco, os problemas durante o armazenamento a uma humidade em condições de armazenamento e no controlo de qualidade são reduzidas e, adicionalmente, o problema de variações de peso do ingrediente activo nas preparações farmacêuticas durante a produção de preparações sólidas, tais como comprimidos ou cápsulas, são também reduzidas. Isto é, espera-se que os sais de adição de ácido do Composto A da invenção apresentem uma estabilidade em armazenamento estável e facilidade de controlo de qualidade uma vez que apresentam higroscopicidade melhorada; assim, os sais podem ser considerados como sendo compostos de fácil manuseamento em preparação farmacêutica e contribuem para proporcionar preparações farmacêuticas muito melhores com

elevada qualidade.

Breve Descrição das Figuras

A Fig. 1 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no cloridrato do Composto A conhecido.

A Fig. 2 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 1.

A Fig. 3 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 2.

A Fig. 4 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 3.

A Fig. 5 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 4.

A Fig. 6 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 5.

A Fig. 7 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 5-1.

A Fig. 8 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 6.

A Fig. 9 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 7.

A Fig. 10 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 8.

A Fig. 11 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 9.

A Fig. 12 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 10.

A Fig. 13 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 11.

A Fig. 14 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 12.

A Fig. 15 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 13.

A Fig. 16 mostra um curva isotérmica de absorção e desabsorção de água no composto do Exemplo 14.

A Fig. 17 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 1.

A Fig. 18 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 2.

A Fig. 19 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 3.

A Fig. 20 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 4.

A Fig. 21 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 5.

A Fig. 22 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 5-1.

A Fig. 23 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 6.

A Fig. 24 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 7.

A Fig. 25 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 8.

A Fig. 26 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 9.

A Fig. 27 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 10.

A Fig. 28 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 11.

A Fig. 29 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 12.

A Fig. 30 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 13.

A Fig. 31 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 14.

Melhor Modo de Executar a Invenção

Os sais de adição de ácido do Composto A da invenção apresentam uma estabilidade a um nível suficiente para utilização em preparações farmacêuticas ou suas substâncias fármaco, não apresentam higroscopicidade que afecte a utilização como fármacos ou suas substâncias fármaco e espera-se que sejam quimicamente estáveis ou estáveis durante armazenamento. Deste modo, todos os sais de adição de ácido da invenção são preferidos como fármacos ou suas substâncias fármaco, particularmente como substâncias fármaco para preparações sólidas.

(Método de Preparação)

Os sais de adição de ácido do Composto A da invenção podem ser produzidos de acordo com o seguinte método de preparação.

Isto é, é adicionado um solvente a uma base livre do Composto A numa proporção de 1 mL/g - 100 mL/g para Composto A e, depois, a este é adicionado um ácido utilizando um ácido na formação do sal ou uma solução contendo o ácido, na gama de 0,5 a 2,0 equivalentes ao Composto A à temperatura ambiente. Quando existe um material insolúvel, é adicionado o mesmo solvente ou um solvente diferente, ou a mistura é aquecida para dissolver o material insolúvel para proporcionar uma solução, que é deixada com agitação ou permanece à temperatura ambiente ou sob arrefecimento. Quando ainda permanece um material insolúvel, mesmo com a adição do solvente ou aquecimento, a mistura pode ser filtrada para o remover antes da cristalização do sal. Assim, os cristais resultantes são recolhidos por

filtração e lavados com um solvente adequado para proporcionar o sal de adição de ácido do Composto A do objectivo. Nesta operação para arrefecimento até à temperatura ambiente é, algumas vezes, eficaz arrefecer a mistura mais gradualmente ou rapidamente em vez de meramente deixá-la a arrefecer, de modo a obter melhores cristais.

O solvente/solventes que pode(m) ser utilizado(s) na formação de sal acima mencionada, inclui(em), água, ácido acético, acetona, anisole, 1-butanol, 2-butanol, acetato de n-butilo, éter t-butilmetílico, cumeno, dimetilsulfóxido, etanol (EtOH), acetato de etilo (EtOAc), éter dietílico, formato de etilo, ácido fórmico, heptano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo (iPrOAc), acetato de metilo, 3-metil-1-butanol, metiletilcetona (2-butanona), 2-metil-1-propanol, pentano, 1-pentanol, 1-propanol, 2-propanol (2-PrOH), acetato de propilo, acetonitrilo, clorobenzeno, clorofórmio, ciclo-hexano, 1,2-dicloroetano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, DMF, DMA, 1,4-dioxano, 2-etoxietanol, etilenoglicol, formamida, hexano, metanol, 2-metoxietanol, metilbutilcetona, metilciclo-hexano, N-metilpirrolidona, nitrometano, piridina, sulfolano, THF, tetralina, tolueno, 1,1,2-tricloroetano, xileno, benzeno, tetracloroeto de carbono, 1,2-dicloroetano, 1,1-dicloroetano, 1,1,1-tricloroetano, éter diisopropílico e semelhantes.

Assim, os cristais resultantes podem ser recristalizados de um modo convencional, como empregue por um especialista na técnica, para proporcionar cristais muito mais puros.

Uma base livre de Composto A, que é um material de partida no método de preparação acima mencionado, pode ser produzida de acordo com o método descrito no documento 1 da Patente anterior,

i. e., Patente Europeia N° 0801067 ou sua correspondente ou método semelhante, ou um método obviamente empregue por um especialista na técnica.

Os sais de adição de ácido do Composto A da invenção podem ser utilizados como substância fármaco na produção de preparações farmacêuticas, ao combinar um ou mais dos sais de adição de ácido do Composto A da invenção com veículos ou diluentes farmacêuticos convencionais empregues nesta área. As preparações farmacêuticas podem ser produzida através de um método normalmente empregues nesta área.

As preparações farmacêuticas contendo os sais de adição de ácido do Composto A da invenção incluem preparações passíveis de administração oral, tais como comprimidos, pílulas, cápsulas, grânulos, pós, líquidos e soluções e semelhantes; ou preparações parentéricas, tais como injeções intra-articulares, intravenosas ou intramusculares, supositórios, preparações líquidas percutâneas, unguentos, emplastros transdérmicos, preparações líquidas transmucosais, emplastros transmucosais, inalações e semelhantes. De um modo particular, as preparações orais contendo, como uma substância fármaco, um sal de adição de ácido do Composto A, tais como comprimidos, pílulas, cápsulas, grânulos e pós, são vantajosas como preparações sólidas estáveis.

Nas composições sólidas para utilização em administração oral, podem ser misturados um ou mais ingredientes activos com, pelo menos, um diluente inerte, por exemplo, lactose, manitol, glucose, hidroxipropilcelulose, celulose cristalina fina, amido, polivinilpirrolidona, aluminato metassilicato de magnésio e semelhantes. As composições podem conter aditivos que não

diluentes num modo convencional, por exemplo, lubrificantes, tais como estearato de magnésio, agentes desintegrantes, tais como glicolato de cálcio fibroso, estabilizadores ou agentes de solubilização. Se necessário, os comprimidos ou pílulas podem ser revestidos com açúcar ou uma película de revestimento gástrica ou entérica, tal como sacarose, gelatina, hidroxipropilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose e semelhantes.

As composições líquidas para administração oral incluem emulsões, soluções, suspensões, xaropes, elixires farmacologicamente aceitáveis e semelhantes, que contêm diluentes utilizados convencionalmente, por exemplo, água purificada ou etanol. Para além de diluentes inertes, as composições podem também conter agentes auxiliares, tais como agentes humidificantes ou agentes de suspensão, adoçante, aroma, perfume ou conservante.

As injeções para administração parentérica incluem soluções, suspensões e emulsões estéreis, aquosas e não aquosas. As soluções e suspensões aquosas incluem, por exemplo, água destilada para injeção e solução salina fisiológica. As soluções e suspensões não aquosas incluem, por exemplo, propilenoglicol, polietilenoglicol, óleos vegetais, tais como azeite, álcoois, tais como EtOH, polissorbato 80 e semelhantes. Tal composição pode também conter um conservante, agente humidificante, agente emulsionante, dispersante, estabilizador e agente de solubilização. Estes podem ser esterilizados, por exemplo, por filtração através de um filtro impermeável a bactérias, mistura com um bactericida ou irradiação. Alternativamente, estes podem ser preparados numa composição sólida estéril, que é dissolvida em água estéril ou solvente estéril para injeção, imediatamente antes da utilização.

Uma vez que as composições farmacêuticas da presente invenção compreendem um ou mais dos sais de adição de ácido do Composto A da invenção, que são antagonistas do receptor M₃ muscarínico, como o ingrediente activo, as composições farmacêuticas podem ser utilizadas para a terapia ou profilaxia de várias doenças nas quais os receptores M₃ muscarínicos contribuem ou podem ser empregues em processos de diagnóstico. Isto é, as composições farmacêuticas da invenção são especificamente úteis como regime no tratamento de, por exemplo, urgência urinária, frequência/polaquiúria, incontinência urinária, enurese nocturna ou bexiga hiperreflexica provocada por doenças urinárias, tais como bexiga hiper-reactiva, bexiga instável, bexiga neurogénica, cistite, etc; na terapia ou profilaxia de espasmo da bexiga provocado por cirurgia ou cateteres; no tratamento de doenças respiratórias, tais como doença pulmonar obstrutiva crónica, bronquite crónica, asma e rinite; no tratamento de doenças digestivas, tais como síndrome do intestino irritável; como o relaxante utilizado para exame do tacto digestivo; como um agente para melhorar miopia ou para promover midríase; ou como um agente para tratar ou prevenir hiperidrose.

Exemplos

A invenção será explicada especificamente através dos seguintes exemplos, que não pretendem ser considerados como uma sua limitação e não pretendem limitar o âmbito da invenção.

A análise térmica e a difractometria de raio X de pó foram efectuadas de acordo com os seguintes métodos.

(1) Análise térmica

(Calorimetria Diferencial de Varrimento: DSC)

Uma amostra (cerca de 3 mg) foi colocada num recipiente de alumínio preparado para esse objectivo. A alteração do calor produzido entre a amostra e uma referência (recipiente de alumínio vazio) foi continuamente determinada e registada sob uma atmosfera de azoto (50 mL/min) na gama de temperatura ambiente a 300 °C a uma velocidade de 10 °C/min de temperatura ascendente programada. O aparelho incluindo o processamento dos dados foi utilizado de acordo com o método e processo indicado em cada aparelho. (Aparelho: Hi-Res DSC 2910, produzido por TA Instrument).

(Aparelho de termogravimetria: TGA)

Uma amostra (cerca de 3 mg) foi colocada num recipiente de platina preparado para esse objectivo e o peso da amostra foi continuamente determinado e registado sob uma atmosfera de azoto (100 mL/min) numa gama de temperatura entre a temperatura ambiente e 300 °C a uma velocidade de 10 °C/min de temperatura ascendente programada. O aparelho incluindo o processamento dos dados foi utilizado de acordo com o método e processo indicado em cada aparelho. (Aparelho: Hi-Res TGA 2950, produzido por TA Instrument).

(2) Difractometria de Raios X em Pó

Uma amostra (cerca de 10 mg) foi colocada num recipiente de

amostra preparado para esse objectivo (5 mm de largura, 18 mm de comprimento, 0,2 mm de altura) e foi efectuado o padrão de difracção de raios X e os dados registados de acordo com a seguinte condição. O aparelho incluindo o processamento dos dados foi utilizado de acordo com o método e processo indicado em cada aparelho. (Aparelho: MXP18TAHF22, produzido por (actualmente, Bruker)).

(Condição)

Fonte de radiação de raio X: Cu; comprimento de onda: 1,54056 angstrom; gama de determinação: 3,00 - 40,00°; intervalo de recolha de amostra: 0,02°; velocidade de varrimento: 3,00°/min; voltagem no tubo: 40 kV; corrente no tubo: 200 mA; fenda de divergência: 1,00°; fenda de dispersão: 1,00°; fenda de recepção: 0,15 mm.

Algumas vezes, os valores obtidos de cada espectro dependem, em algum nível, da direcção do crescimento do cristal, tamanho de partícula e a condição de determinação. Consequentemente, estes valores não devem ser rigidamente avaliados.

Exemplo de Referência 1: Preparação de Composto A num estado livre

O composto do título foi preparado de acordo com o método descrito na Patente Europeia N° 0801067.

Exemplo de Referência 2: Preparação do cloridrato do Composto A como um composto de referência

O composto do título foi preparado de acordo com o método descrito na Patente Europeia N° 0801067.

Exemplo 1

Preparação do Composto A (-)-(2S,3S)-tartarato

A uma solução da base livre do Composto A (26,0 g) em 260 mL de EtOH, foram adicionadas 10,8 g de ácido (-)-(2S,3S)-tartárico e a mistura foi aquecida até ficar dissolvida. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura foi agitada durante 20 horas. Os cristais resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 30,6 g de cristais brancos. A uma suspensão de 1,00 g dos cristais em 10 mL de EtOH, foram adicionados 0,4 mL de água e a mistura foi aquecida para proporcionar uma solução. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura foi agitada durante 6 horas. Os cristais resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 871 mg do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 , 25,9 °C):

1,40-1,98 (4H, m), 2,00-2,25 (1H, m), 2,70-3,20 (7H, m),
3,33-3,53 (2H, m), 3,83-3,94 (1H, m), 3,99 (2H, s), 4,85
(1H, brs), 6,25 (1H, brs), 7,08-7,37 (9H, m).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 194 °C

A Fig. 17 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 1.

Exemplo 2

Preparação do Composto A (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartarato

A uma solução da base livre do Composto A (180 mg) em 1,8 mL de EtOH, foram adicionadas 180 mg de ácido (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartárico e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 12 horas. Os cristais resultantes foram recolhidos por filtração, lavados com EtOH e secos sob pressão reduzida para proporcionar 284 mg de cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70 °C):

1,52-1,90 (4H, m), 2,16 (1H, brs), 2,76-3,16 (7H, m), 3,37-3,56 (2H, m), 3,89 (1H, dt, J=13,2, 5,4 Hz), 4,85-4,92 (1H, m), 5,68 (2H, s), 6,23 (1H, s), 7,11-7,33 (9H, m), 7,43-7,55 (4H, m), 7,57-7,63 (2H, m), 7,90-7,96 (4H, m).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 159 °C

A Fig. 18 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 2.

Exemplo 3

Preparação do Composto A (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil)tartarato

A uma solução da base livre do Composto A (1,00 g) em 20 mL de EtOH, foram adicionadas 1,12 g de ácido (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil)tartárico e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 22 horas. Os precipitados resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 1,60 g do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70 °C):

1,53-1,88 (4H, m), 2,15 (1H, brs), 2,32-2,38 (6H, m), 2,76-3,16 (7H, m), 3,42 (1H, ddd, J =13,6, 8,8, 5,2 Hz), 3,50 (1H, dd, J=14,4, 8,8 Hz), 3,90 (1H, dt, J=13,2, 5,2 Hz), 4,88 (1H, dt, J=8,8, 4,4 Hz), 5,64 (2H, s), 6,23(1H, s), 7,11-7,34 (13H, m), 7,77-7,84 (4H, m).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 160 °C

A Fig. 19 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 3.

Exemplo 4

Preparação do Composto A (-)-L-fenilalaninato

A uma solução da base livre do Composto A (1,13 g) em 11,25 mL de EtOH, foram adicionadas 515 mg de (-)-L-fenilalanina

e 4,5 mL de água e a mistura foi aquecida até ficar dissolvida. A mistura foi, depois, agitada à temperatura ambiente durante 10 horas. Os cristais resultantes foram recolhidos por filtração, lavados com uma mistura de água-EtOH e secos sob pressão reduzida, para proporcionar 1,12 g do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70,0 °C):

1,20-1,36 (1H, m), 1,41-1,70 (3H, m), 1,86-1,95 (1H, m),
2,50-2,95 (8H, m), 3,03-3,17 (2H, m), 3,33-3,47 (2H, m),
3,84-3,95 (1H, m), 4,60-4,71 (1H, m), 6,23 (1H, s), 7,11-7,33
(14H, m).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 118 °C e 235 °C

A Fig. 20 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 4.

Exemplo 5

Preparação do benzenossulfonato do Composto A (1)

A uma solução da base livre do Composto A (2,69 g) em 40 mL de EtOAc, foram adicionadas 1,31 g de mono-hidrato de ácido benzenossulfónico e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 1 hora. Os precipitados resultantes foram recolhidos por filtração. A uma suspensão dos filtrados em 30 mL de 2-butanona, foram adicionados 0,35 mL de água. A mistura resultante foi aquecida até ficar dissolvida. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura foi agitada durante 60 horas. Os

cristais resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 2,49 g do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70 °C):

1,65-1,99 (4H, m), 2,23 (1H, brs), 2,77-2,96 (2H, m), 3,06-3,32 (5H, m), 3,44 (1H, ddd, J=13,6, 8,4, 5,2 Hz), 3,66 (1H, dd, J=13,6, 8,4 Hz), 3,91 (1 H, dt, J=12,8, 5,6 Hz), 4,97 (1H, dt, J=8,4, 4,4 Hz), 6,25 (1H,s), 7,11-7,35 (12H, m), 7,59-7,64 (2H, m), 9,39 (1H, brs).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 178 °C

A Fig. 21 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 5.

Exemplo 5-1

Preparação do benzenossulfonato do Composto A (2)

A uma solução da base livre do Composto A (7,00 g) em 70 mL de acetona, foram adicionadas 3,40 g de mono-hidrato de ácido benzenossulfónico e 70 mL de éter terc-butilmetílico e a mistura foi agitada utilizando um agitador mecânico à temperatura ambiente durante 9 horas. Os precipitados resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 8,10 g do composto do título como cristais brancos.

O espectro de RMN de ^1H do produto foi idêntico ao do Exemplo 5, mas a DSC e o padrão de difracção de raios X sugeriram que os produtos do Exemplo 5 e Exemplo 5-1

apresentavam polimorfismo cristalino.

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 170 °C

A Fig. 22 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 5-1.

Exemplo 6

Preparação do ciclo-hexanossulfamato do Composto A

A uma solução da base livre do Composto A (500 mg) em 5 mL de 2-PrOH, foram adicionadas 494 mg de ácido ciclo-hexanossulfâmico e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 13 horas. Os precipitados resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 550 mg do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70 °C):

1,00-1,35 (10H, m), 1,46-2,08 (14H, m), 2,23 (1H, brs), 2,77-3,30 (11H, m), 3,44 (1H, d dd, J=13,6, 8,8, 5,2 Hz), 3,64 (1H, dd, J=13,8, 8,8 Hz), 3,91 (1H, dt, J=12,8, 5,6 Hz), 4,96 (1H, dt, J=8,4, 4,4 Hz), 6,25 (1H, s), 7,10-7,36 (9H, m).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 127 °C e 170 °C

A Fig. 23 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 6.

Exemplo 7

Preparação do bromidrato do Composto A

A uma solução da base livre do Composto A (200 mg) em 1,0 mL de EtOH, foram adicionadas 95 mg de ácido bromídrico a 47%. À mistura reaccional, foram adicionados 1,1 mL de éter diisopropílico com agitação e a mistura resultante foi agitada a 5 °C durante 18 horas. Os precipitados obtidos foram recolhidos por filtração para proporcionar 165 mg do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70 °C):

1,65-1,98 (4H, m), 2,24 (1H, brs), 2,77-2,97 (2H, m), 3,05-3,35 (5H, m), 3,45 (1H, ddd, J =13,6, 8,8, 5,2 Hz), 3,65 (1H, dd, J=13,2, 8,4 Hz), 3,91 (1 H, dt, J=12,8, 5,6 Hz), 4,97 (1H, dt, J=8,8, 4,4 Hz), 6,26 (1H, s), 7,11-7,35 (9H, m), 9,68 (1H, brs).

Análise Elementar: (calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2\cdot\text{HBr}$) C, 62,31, H, 6,14, N, 6,32, Br, 18,02. (verificado) C, 62,04, H, 6,10, N, 6,09, Br, 17,73.

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 199 °C

A Fig. 24 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 7.

Exemplo 8

Preparação do naftaleno-2-sulfonato do Composto A

A uma solução da base livre do Composto A (100 mg) em 1,0 mL de EtOH, foram adicionadas 65 mg de hidrato do ácido naftaleno-2-sulfônico e a mistura foi agitada durante 26 horas. Os cristais resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 79 mg do composto do título como cristais ligeiramente cinzentos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70 °C):

1,65-2,00 (4H, m), 2,24 (1H, brs), 2,77-2,97 (2H, m), 3,05-3,32 (5H, m), 3,45 (1H, ddd, $J=14,0, 9,2, 5,2$ Hz), 3,65 (1H, dd, $J=14,0, 8,8$ Hz), 3,90 (1 H, dt, $J=12,8, 5,6$ Hz), 4,97 (1H, dt, $J=8,0, 4,4$ Hz), 6,25 (1H, s), 7,12-7,34 (9H, m), 7,49 (2H, dt, $J=10,4, 4,0$ Hz), 7,74 (1H, dd, $J=8,4, 1,6$ Hz), 7,82 (1H, d, $J=8,0$ Hz), 7,85-7,95 (2H, m), 8,14 (1H, s), 9,35 (1H, brs).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 178 °C

A Fig. 25 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 8.

Exemplo 9

Preparação do sebacato do Composto A

A uma solução da base livre do Composto A (300 mg) em 1,0 mL de EtOH, foram adicionadas 171 mg de ácido sebácico e a

mistura foi agitada durante 3 horas. Os cristais resultantes foram recolhidos por filtração e lavados com etanol para proporcionar 165 mg do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 26,1 °C):

1,16-2,00 (17H, m), 2,17 (4H, t, $J=7,2$), 2,50-2,97 (7H, m), 3,02-3,08 (1H, m), 3,28-3,50 (1H, m), 3,78-3,98 (1H, m), 4,65 (1H, brs), 6,24 (1H, brs), 7,12-7,26 (10H, m).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 127 °C

A Fig. 26 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 9.

Exemplo 10

Preparação do (+)-canfor-10-sulfonato do Composto A

A uma solução da base livre do Composto A (200 mg) em 2 mL de acetona, foram adicionadas 138 mg de ácido (+)-canfor-10-sulfónico e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 5 horas. Os precipitados resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 191 mg do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70 °C):

0,76 (3H, s), 1,08 (3H, s), 1,20-1,33 (2H, m), 1,65-1,98 (7H, m), 2,18-2,28 (2H, m), 2,37-2,42 (1H, m), 2,65-2,97 (4H, m), 3,05-3,31 (5H, m), 3,44 (1H, ddd, $J=13,6, 8,8, 4,8$ Hz),

3,65 (1H, dd, J=13,6, 8,4 Hz), 3,91 (1 H, dt, J=13,2, 5,6 Hz), 4,97 (1H, dt, J=8,8, 4,4 Hz), 6,25(1H, s), 7,11-7,35 (9H, m), 9,44 (1H, brs).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 198 °C

A Fig. 27 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 10.

Exemplo 11

Preparação do p-toluenossulfonato do Composto A

A uma solução da base livre do Composto A (200 mg) numa mistura de 1,5 mL de acetona e 0,5 mL de éster terc-butilmetílico, foram adicionadas 105 mg de mono-hidrato de ácido p-toluenossulfónico e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 17 horas. Os precipitados resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 83 mg do composto do título como cristais brancos.

RMN de ¹H (DMSO-d₆: 70 °C):

1,65-2,00 (4H, m), 2,24 (1H, brs), 2,28 (3H, s), 2,76-2,96 (2H, m), 3,05-3,30 (5H, m), 3,44 (1 H, ddd, J=13,6, 8,0, 5,0 Hz), 3,65 (1H, dd, J=13,6, 8,0 Hz), 3,91 (1H, dt, J=12,8, 5,6 Hz), 4,97 (1H, dt, J=8,4, 4,4 Hz), 6,25 (1H, s), 7,09 (2H, d, J=7,6 Hz), 7,11-7,35 (9H, m), 7,47-7,52 (2H, m), 9,38 (1H, brs).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 150 °C

A Fig. 28 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 11.

Exemplo 12

Preparação do etanossulfonato do Composto A

A uma solução da base livre do Composto A (100 mg) em 1,0 mL de 2-butanona, foram adicionadas 31 mg de ácido etanossulfónico e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 6,5 horas. Os precipitados resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 95 mg do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70 °C):

1,07 (3H, t, $J=7,6$ Hz), 1,62-2,10 (4H, m), 2,24 (1H, brs), 2,39 (2H, q, $J=7,6$ Hz), 2,76-2,96 (2H, m), 3,08-3,32 (5H, m), 3,44 (1H, ddd, $J=13,6, 8,8, 4,8$ Hz), 3,65 (1H, dd, $J=13,6, 8,8$ Hz), 3,91 (1H, dt, $J=12,4, 5,2$ Hz), 4,92-5,02 (1H, m), 6,25 (1H, s), 7,10-7,35 (9H, m), 9,51 (1H, brs).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 233 °C

A Fig. 29 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 12.

Exemplo 13

Preparação do metanossulfonato do Composto A

A uma solução da base livre do Composto A (200 mg) em 1,0 mL de 2-butanona, foi adicionada uma solução de 53 mg de ácido metanossulfónico em 1,0 mL de iPrOAc e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 0,5 horas. Os precipitados resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 187 mg do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70 °C):

1,62-2,02 (4H, m), 2,24 (1H, brs), 2,30 (3H, s), 2,76-2,96 (2H, m), 3,00-3,34 (5H, m), 3,44 (1H, ddd, $J=13,6, 8,8, 4,8$ Hz), 3,65 (1H, dd, $J=13,6, 8,6$ Hz), 3,91 (1H, dt, $J=13,2, 5,2$ Hz), 4,90-5,40 (1H, m), 6,25 (1H, s), 7,08-7,36 (9H, m), 9,37 (1H, brs).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 178 °C

A Fig. 30 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 13.

Exemplo 14

Preparação do fosfato de metilo do Composto A

A uma solução da base livre do Composto A (200 mg) em 2,0 mL de EtOAc e 0,5 mL de 2-butanona, foram adicionadas 98 mg de fosfato de metilo e a mistura foi agitada à temperatura

ambiente durante 22 horas. Os precipitados resultantes foram recolhidos por filtração para proporcionar 124 mg do composto do título como cristais brancos.

RMN de ^1H (DMSO- d_6 : 70 °C):

1,43-1,54 (1H, m), 1,57-1,81 (3H, m), 2,01-2,10 (1H, m), 2,77-2,99 (7H, m), 3,29-3,46 (2H, m), 3,42 (3H, d, $J=10,8$ Hz), 3,90 (1H, dt, $J=13,2, 5,6$ Hz), 4,76-4,84 (1H, m), 6,24 (1H, s), 7,12-7,33 (9H, m).

Pico da temperatura máxima de endotermia em DSC: 195 °C

A Fig. 31 mostra um padrão de difracção de raio X de pó do composto do Exemplo 14.

O efeito do sal de adição de ácido do Composto A da invenção foi confirmado pelos seguintes Exemplos de Teste.

Exemplo de Teste 1: Avaliação de higroscopicidade

Uma amostra (cerca de 5 mg) foi colocada num recipiente de quartzo, feito para esse objectivo, e o peso da amostra à humidade respectiva foi continuamente determinada e registada nas seguintes condições. O aparelho incluindo o processamento dos dados foi utilizado de acordo com o método e processo indicado em cada aparelho. (Aparelho: aparelho para medição da absorção dinâmica de vapor DVS Advantage, produzido por SMS)

(Condição)

Temperatura de determinação: 25 °C; secagem antes da determinação: não efectuada; humidade no início: 5% de HR; humidade máxima: 95% de HR; humidade no fim: 5% de HR; passo: 5% de HR; padrão de equilíbrio: 0,03% em peso em 5 min; tempo em equilíbrio máximo: 180 min; intervalo entre recolha de amostra: 20 s; intervalo entre registo de dados: 1 min

Os gráficos obtidos nestes testes são apresentados na Fig. 1 até à Fig. 14. A alteração no peso dentro da gama da condição de determinação é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1

Composto testado	Alteração no Peso (%)	Composto testado	Alteração no Peso (%)
Exemplo 1	<1	Exemplo 8	<4
Exemplo 2	<1	Exemplo 9	<1
Exemplo 3	<1	Exemplo 10	<2
Exemplo 4	<2	Exemplo 11	<6
Exemplo 5	<1	Exemplo 12	<5
Exemplo 5-1	<1	Exemplo 13	<25
Exemplo 6	<3	Exemplo 14	<11
Exemplo 7	<4	Exemplo de Referência 2	>35 (deliquescente)

Como apresentado na Fig. 1 e Tabela 1, o cloridrato do Composto A, que é um composto conhecido, começa, rapidamente, a absorver humidade a cerca de 65% de humidade relativa e a

absorção de humidade foi reconhecida como um ganho de peso de 15% ou mais a 75% ou mais de humidade relativa. A alteração de peso excedeu 35% dentro da gama da condição de determinação, *i. e.*, 5-95% de humidade relativa e esta alteração foi acompanhada por deliquescência. Por outro lado, como apresentado na Fig. 2 à Fig. 16 e Tabela 1, foi confirmado que os sais de adição de ácido do Composto A da invenção apresentam higroscopicidade em comparação com o cloridrato conhecido do Composto A e apresentam propriedades muito superiores como fármacos e suas substâncias de fármaco.

Exemplo de Teste 2: Avaliação da Estabilidade (1)

Uma amostra (cerca de 0,5 mg) foi pesada num recipiente de vidro e aplicada num teste de degradação forçada nas seguintes condições de armazenamento.

Condição 1: 120 °C - bem fechado - 24 horas

Condição 2: 25 °C - 93% de humidade relativa - aberto - 5 dias

Condição 3: 25 °C - irradiado NUV (raio perto do ultravioleta) - bem fechado - 5 dias

Uma amostra após armazenamento foi dissolvida em 1 mL de MeOH e utilizada como uma solução de amostra. A solução de amostra foi diluída 100 vezes com MeOH e utilizada como uma solução padrão. As impurezas contidas na solução de amostra foram analisadas quantitativamente utilizando a solução padrão. Nesta determinação, o aparelho incluindo o processamento dos dados foi utilizado de acordo com o método e processo indicado

em cada aparelho. (Aparelho: série LC-MSD 1100, produzido por Agilent).

Os resultados do teste são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2

	Impurezas antes do Armazenamento (%)	Alteração na Qt. de Impurezas antes de Armazenamento (%)		
		Condição 1	Condição 2	Condição 3
Exemplo 1	1,5	0,2	-0,1	-0,3
Exemplo 2	0,0	0,2	0,1	0,0
Exemplo 3	0,0	2,3	0,1	0,0
Exemplo 4	1,9	50,8	-0,3	-0,3
Exemplo 5	1,6	0,3	0,1	-0,1
Exemplo 5-1	1,8	-0,1	0,0	-0,2
Exemplo 6	1,4	8,1	0,0	0,1
Exemplo 7	0,5	-0,2	0,2	0,3
Exemplo 8	2,0	1,3	0,2	2,6
Exemplo 9	3,7	-0,3	0,2	-0,8
Exemplo 10	0,9	0,0	0,0	0,0
Exemplo 11	0,5	-0,1	0,1	0,0
Exemplo 12	1,4	-0,2	-0,1	-0,1
Exemplo de Referência 2	0,1	0,2	3,8	2,0

Exemplo de Teste 3: Avaliação da Estabilidade (2)

Uma amostra (cerca de 0,5 mg) foi pesada num recipiente de vidro de 10 mL e aplicada num teste de stresse nas seguintes condições de armazenamento.

Condição 1: 5 °C - protegido da luz - bem fechado

Condição 2: 40 °C - 75% de humidade relativa - aberto

Condição 3: 60 °C - protegido da luz - bem fechado

Condição 4: 80 °C - protegido da luz - bem fechado

Condição 5: 25 °C - D65 (1000 lux) - bem fechado

Estabilidade química: Após armazenamento, foi colocado MeOH no recipiente contendo a amostra até ao nível da linha marcada e a solução resultante foi utilizada como uma solução padrão. A solução de amostra foi diluída 100 vezes com MeOH para preparar um solução padrão, que foi utilizada na determinação de impurezas contidas na solução de amostra. A detecção das impurezas foi efectuada através de UV a 210 nm. O aparelho incluindo o processamento dos dados foi utilizado de acordo com o método e processo indicado em cada aparelho. (Aparelho: série LC-MSD 1100, produzido por Agilent).

Os resultados do teste são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3

Condição do Teste	Duração	Impurezas (%)	
		Exemplo 1	Exemplo de Referência 2
Condição 1	2 semanas	0,00	0,25
	1 mês	0,00	0,21
	2 meses	0,00	0,18
Condição 2	2 semanas	0,00	8,72
	1 mês	0,00	8,19
	2 meses	0,00	9,20
Condição 3	2 semanas	0,00	0,34
	1 mês	0,00	0,22
	2 meses	0,00	0,24
Condição 4	2 semanas	0,00	0,43
	1 mês	0,00	0,39
	2 meses	0,00	0,47
Condição 5	2 semanas	0,00	1,73
	1 mês	0,00	2,38
	2 meses	0,00	3,68

Como apresentado na Tabela 2 e Tabela 3, verificou-se que as impurezas aumentaram durante o armazenamento no cloridrato do Composto A, que era um composto conhecido. Em particular, torna-se evidente que o cloridrato do Composto A não é assim tão estável à humidade (Condição 2 no Exemplo de Teste 2 e Condição 2 do Exemplo de Teste 3) e luz (Condição 3 no Exemplo de Teste 2 e Condição 5 do Exemplo de Teste 3). Por outro lado, como apresentado na Tabela 2 e Tabela 3, foi confirmado que os sais de adição de ácido da invenção não apresentaram quase nenhum

aumento de impurezas, indicando ser quimicamente e fisicamente altamente estável em comparação com o cloridrato do Composto A conhecido e apresentaram propriedades muito superiores como fármacos ou suas substâncias de fármaco. Com respeito a isto, a razão do aumento de impurezas, conhecida nos compostos do Exemplo 4 e Exemplo 6, foi considerada que estes apresentam pontos de fusão um pouco baixos, que se fundem sob a Condição 1 do Exemplos de Teste 2 (teste de estabilidade ao calor) ou a condição conservada foi próxima do ponto de fusão.

Exemplo de Teste 4: Estimativa da afinidade funcional para receptores M₃ muscarínicos nas bexigas

De acordo com um método descrito por Ikeda *et al.*, (2002, *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Vol, 366, p. 97-103), foi determinada a estimativa da afinidade funcional do composto de teste para os receptores M₃ muscarínicos, utilizando alterações no Ca²⁺ intracelular. O método é abaixo descrito, de um modo resumido.

Foram isoladas células de músculo liso de bexigas de cobaias, das quais foi removida a epiderme, carregadas com um corante fluorescente sensível ao cálcio, Fura2, e suspensas em solução tampão de Hank sem vermelho de fenol suplementada com HEPES 20 mM (pH 7,4) e albumina de soro bovino a 0,1%. Um alíquota de suspensão celular (490 µL) foi continuamente agitada, mantida a 28 °C e monitorizada para a proporção de fluorescência (500 nm) com excitação a 340 nm e com excitação a 380 nm. A cada alíquota, foram adicionados, em série, 5 µL de composto de teste e soluções de carbacol com um intervalo de 2 minutos e o aumento máximo na proporção superior ao nível

imediatamente antes da estimulação foi utilizado na análise dos dados. A concentração necessária para 50% de estimulação ou 50% de inibição, isto é, EC₅₀ ou IC₅₀, foi obtida por ajuste de curva sigmóide, depois, os valores de IC₅₀ do composto de teste foram convertidos nos valores Ki, com base no valor de EC₅₀ do carbacol, utilizando a equação de Cheng-Prusoff.

A Tabela 4 mostra os resultados.

Tabela 4

Composto Testado	IC ₅₀ (ng/mL)	Ki (nM)
Exemplo 1	2,4 ± 0,75	0,68 ± 0,21
Exemplo 2	3,2 ± 0,97	0,62 ± 0,16
Exemplo 3	3,8 ± 1,2	0,69 ± 0,19
Exemplo 4	2,5 ± 0,044	0,66 ± 0,046
Exemplo 5	1,8 ± 0,79	0,47 ± 0,12
Exemplo 6	4,3 ± 1,2	0,84 ± 0,10
Exemplo 7	1,8 ± 0,49	0,66 ± 0,28
Exemplo 8	2,3 ± 0,87	0,55 ± 0,12
Exemplo 9	2,2 ± 0,33	0,56 ± 0,048
Exemplo 10	2,6 ± 0,42	0,65 ± 0,12
Exemplo 11	2,2 ± 0,87	0,52 ± 0,13
Exemplo 12	1,9 ± 0,30	0,54 ± 0,055

Como apresentado acima, os sais de adição de ácido do Composto A da presente invenção mostraram apresentar a afinidade para receptores M₃ muscarínicos que é suficiente para a sua utilização como um medicamento.

Exemplo de Teste 5: Efeitos inibitórios na contracção de bexiga induzida por carbacol em murganhos anestesiados

O método para determinação dos efeitos inibitórios dos compostos de teste na contracção da bexiga é descrito de seguida.

Murganhos fêmea, pesando 30 a 35 g, foram anestesiados com uma dose sub-letal (75 mg/kg, i.v.) de pentobarbital de sódio e colocadas em supino numa placa de aquecimento para manter a temperatura corporal. Foi canulado um cateter de polietileno (PE10) na bexiga via a uretra e mantido por sutura em bolsa na abertura uretral externa. Foi inserido outro cateter na veia femoral para injeções de soluções de fármaco num volume de 3 mL. O cateter da bexiga foi ligado a um transdutor de pressão através de uma válvula de torneira de três vias. A bexiga foi esvaziada por drenagem da urina através do cateter e, depois, distendida com cerca de 100 µL de solução salina fisiológica e foi determinada a pressão intravesicular.

Após a estabilização da pressão intravesicular, foi administrado, repetidamente, o agonista muscarínico carbacol (10 µg/kg) com um intervalo de 15 minutos ou mais. Através disto, as contracções da bexiga ocorreu de um modo reprodutível ao longo de 2 horas sem deterioração das condições físicas. Após terem sido obtidas três respostas ao carbacol, uma injeção de composto de teste foi seguida por administração de carbacol 10 minutos depois e este processo foi repetido com doses crescentes do composto de teste. Em quatro ou cinco murganhos por composto de teste, foi obtida a inibição percentual de meios de respostas anteriores ao fármaco e foi estimada a dose de composto de teste necessária para 50% de inibição (ID₅₀) através

de análise de regressão linear. Os murganhos que apresentaram constrição rítmica de bexiga não foram utilizados para a análise de dados.

Foram obtidos os seguintes valores de ID₅₀: 0,079 mg/kg para o Exemplo 1, 0,090 mg/kg para o Exemplo 4, 0,059 mg/kg para o Exemplo 5, 0,050 mg/kg para o Exemplo 7 e 0,057 mg/kg para o Exemplo 8.

O resultado sugere claramente que os sais de adição de ácido do Composto A da presente invenção apresentam efeitos inibitórios na contracção da bexiga induzida pelo agonista muscarínico carbacol.

Lisboa, 4 de Julho de 2008

REIVINDICAÇÕES

1. Sal de adição de ácido de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo com um ácido selecionado do grupo S consistindo em

ácido (-)-(2S,3S)-tartárico,

ácido (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartárico,

ácido (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoyl) tartárico,
(-)-L-fenilalanina, ácido benzenossulfônico, ácido ciclo-hexanossulfâmico, ácido bromídrico, ácido naftaleno-2-sulfônico, ácido sebácico, ácido (+)-canfor-10-sulfônico, ácido p-toluenossulfônico, ácido etanossulfônico, ácido metanossulfônico e metilfosfato.
2. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

(-)-(2S,3S)-tartarato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo
3. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

(+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartarato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

4. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

(+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil)tartarato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

5. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

(-)-L-fenilalaninato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

6. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

benzenossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

7. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

ciclo-hexanossulfamato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

8. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

bromidrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-

-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

9. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

naftaleno-2-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

10. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

sebacato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

11. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

(+)-canfor-10-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

12. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

p-toluenossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

13. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em que o sal é

etanossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-
-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-
-ilo.

14. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em
que o sal é

metanossulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-
-hidroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-
-ilo.

15. Sal de adição de ácido, de acordo com a Reivindicação 1, em
que o sal é

metilfosfato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetra-hidroisoquinoli-
na-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.

16. Composição farmacêutica compreendendo um ou mais compostos,
mencionados na Reivindicação 1 como um ingrediente activo.

Lisboa, 4 de Julho de 2008

Figura 1

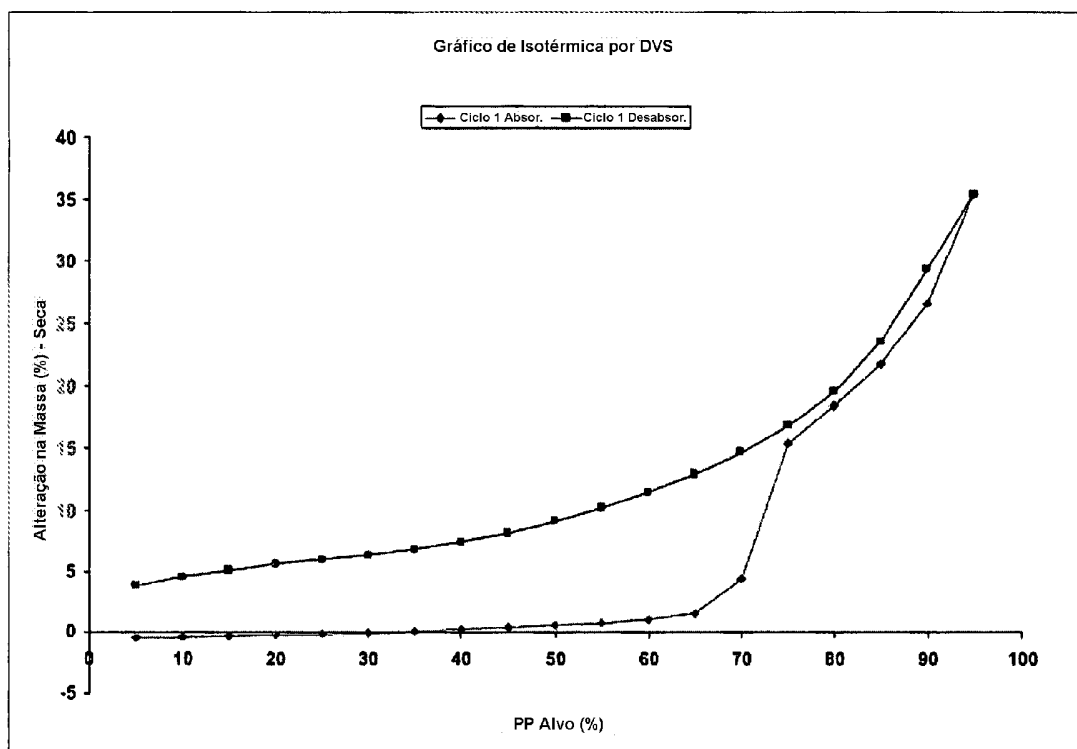


Figura 2

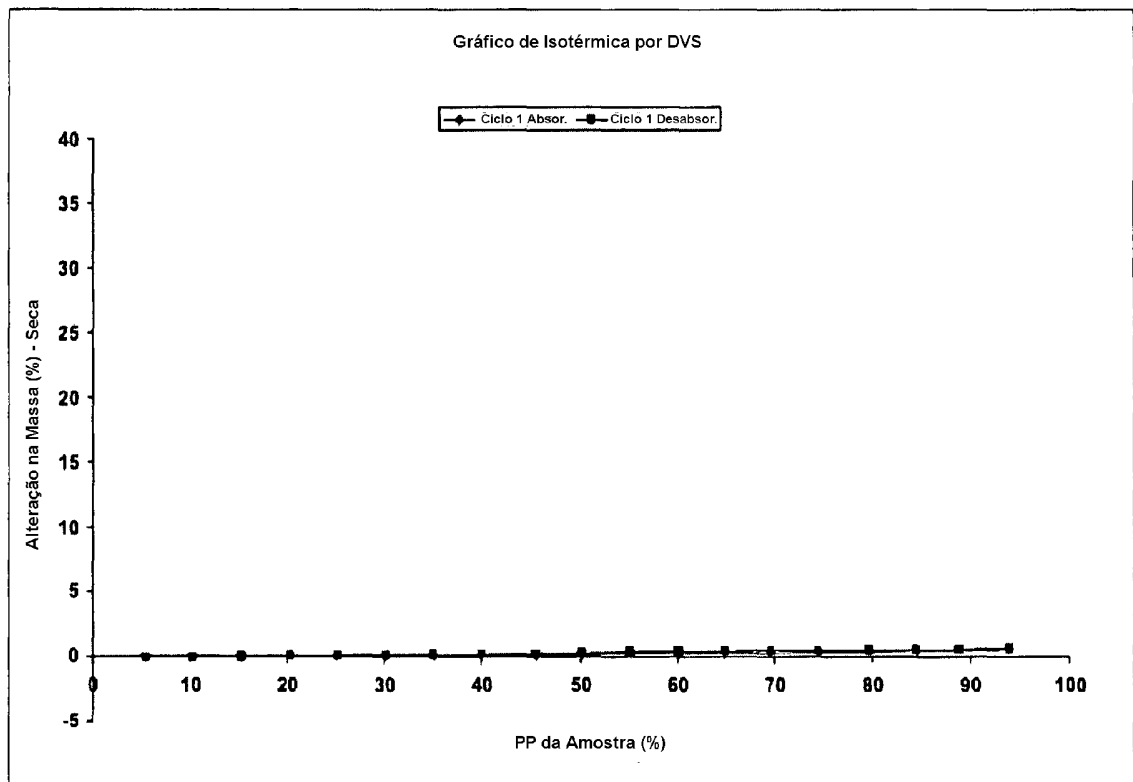


Figura 3

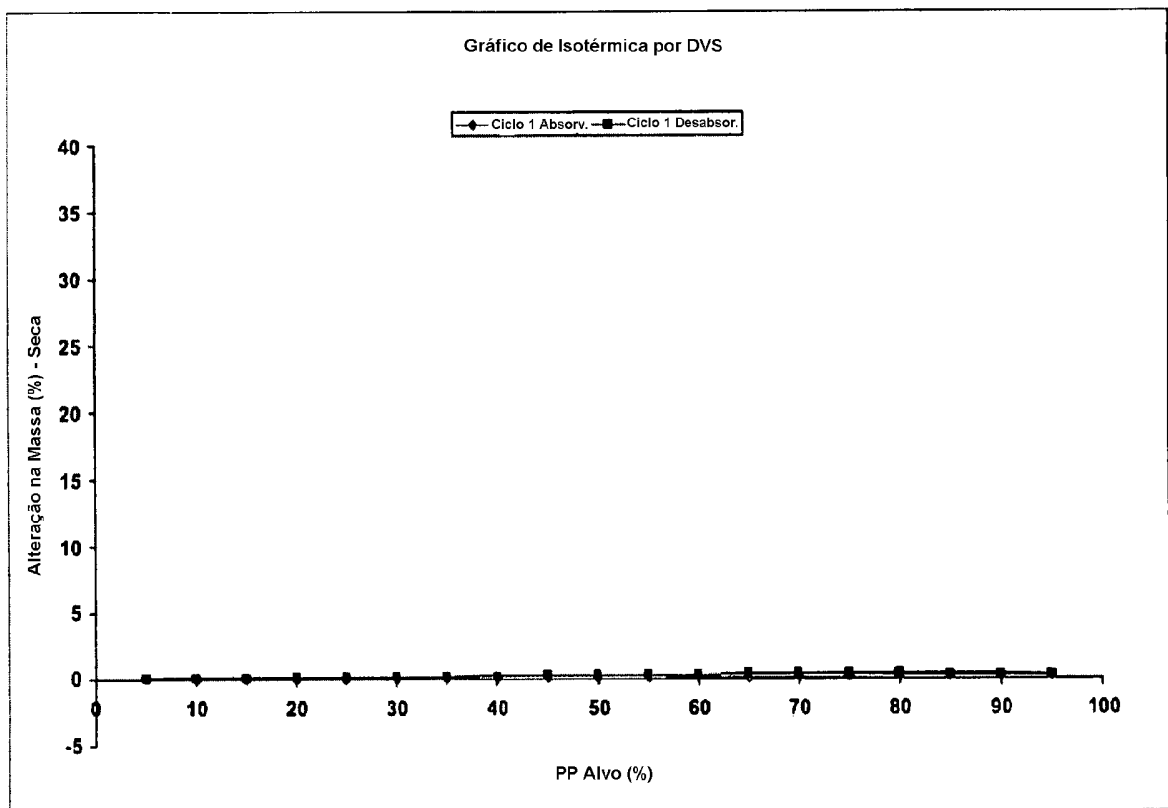


Figura 4

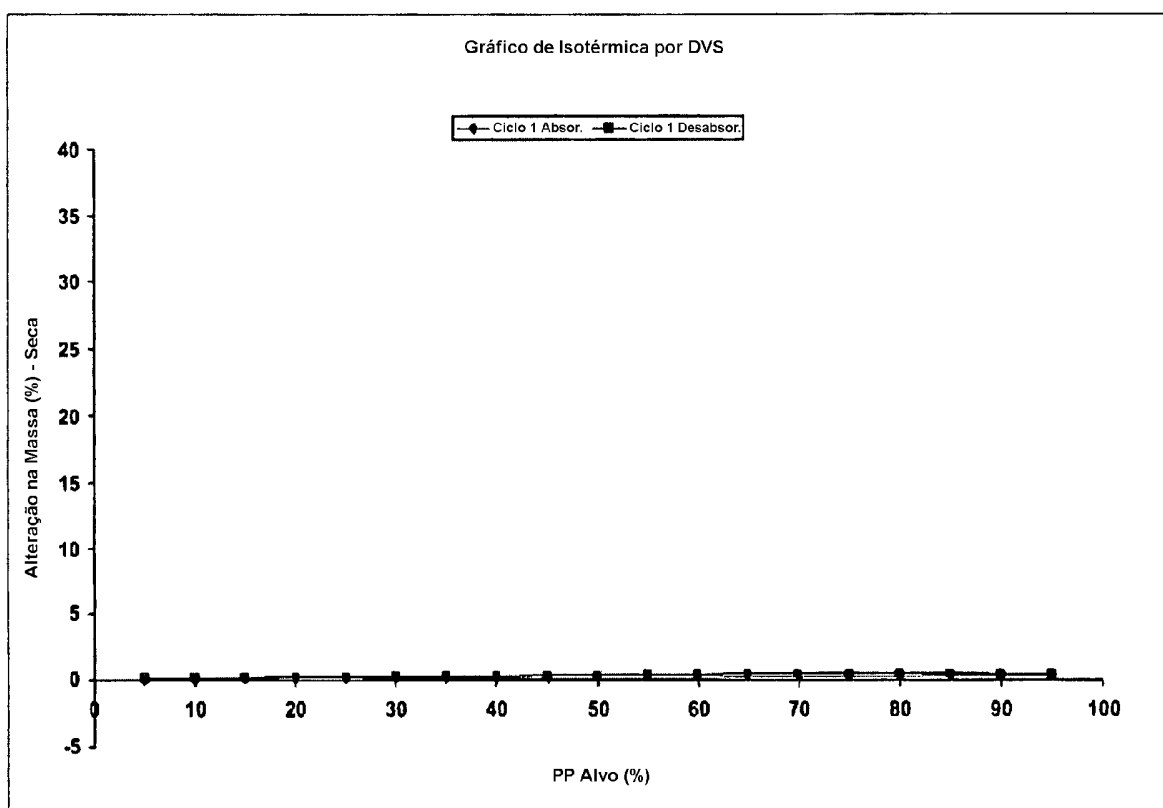


Figura 5

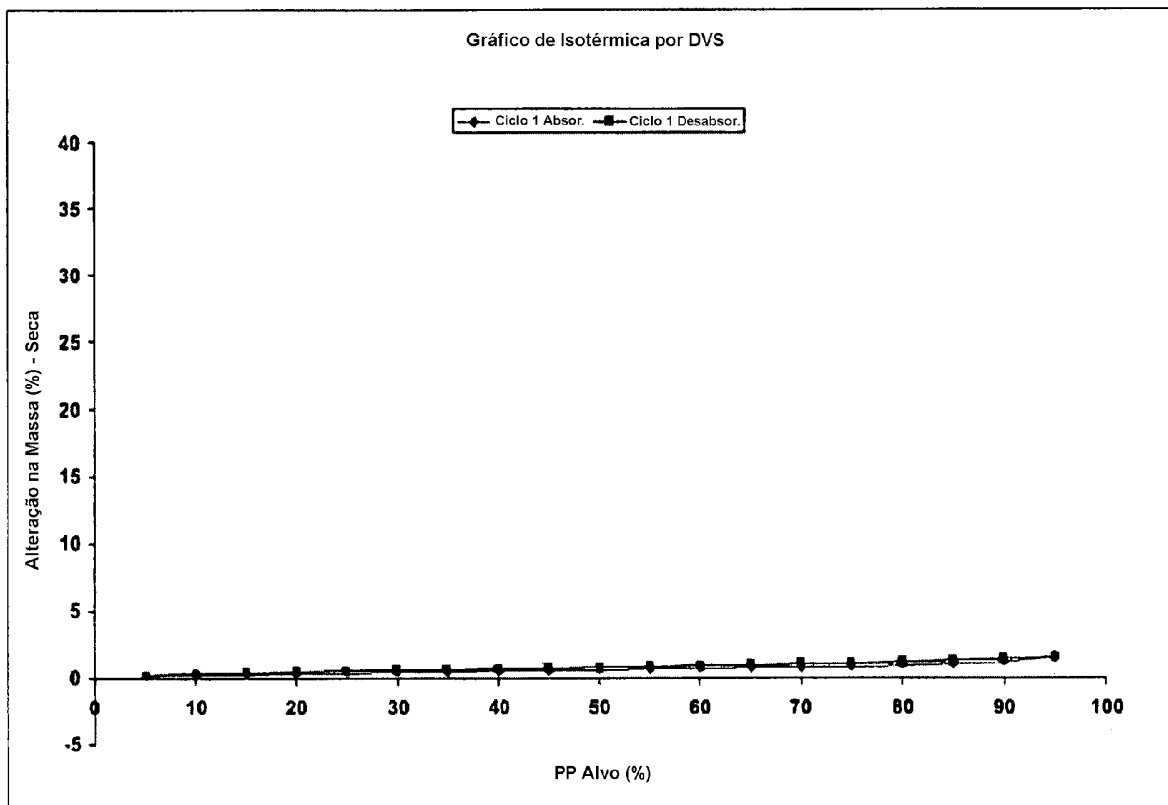


Figura 6

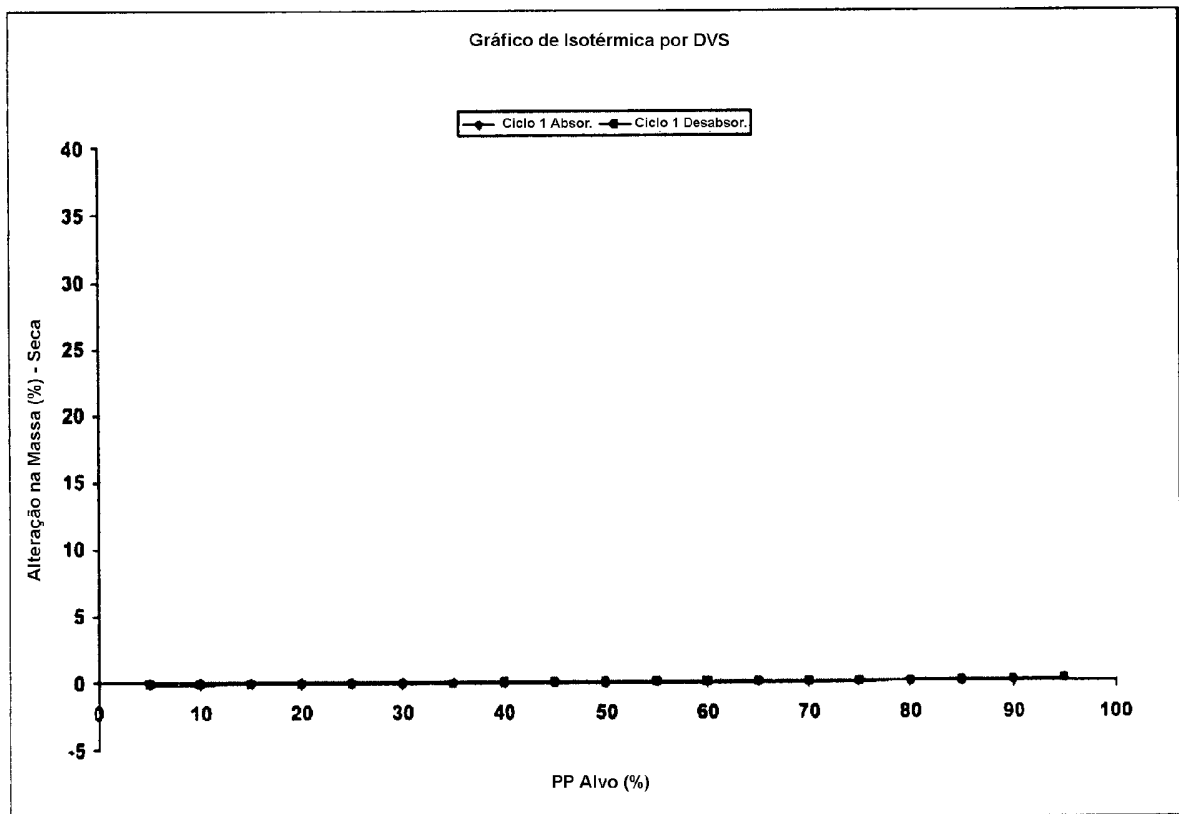


Figura 7

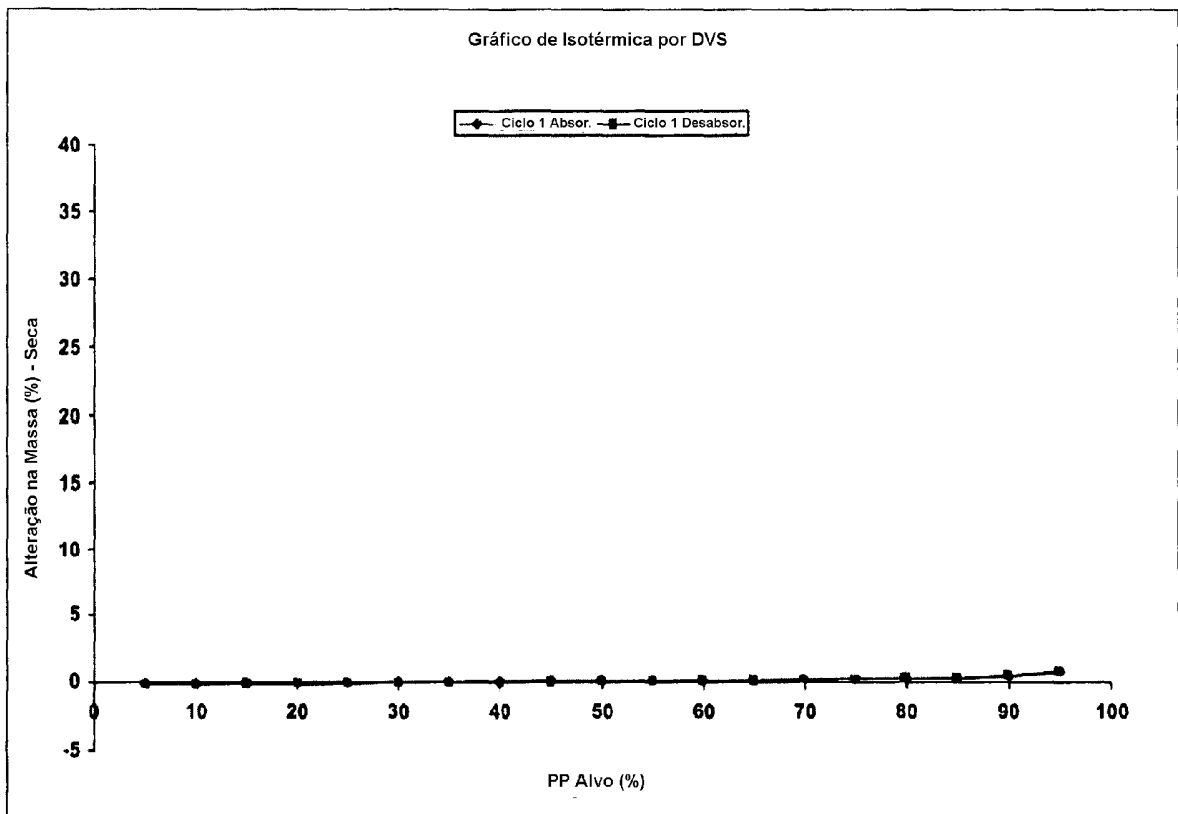


Figura 8

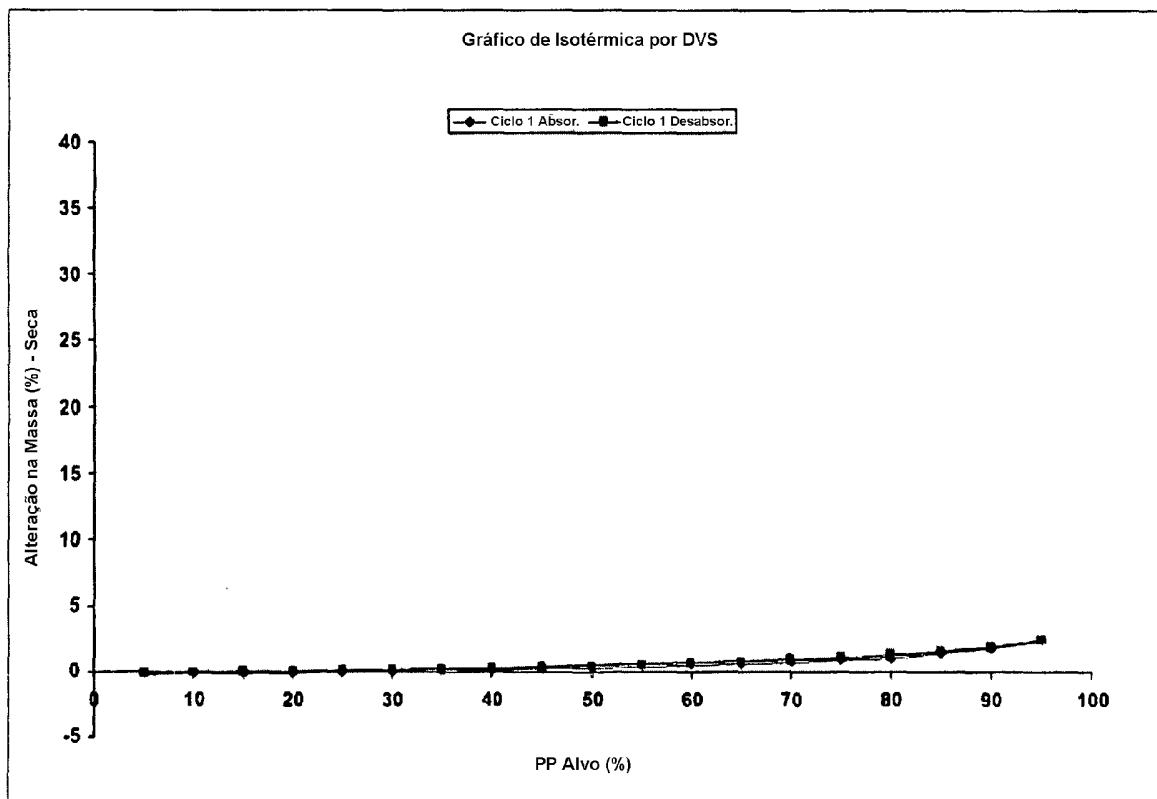


Figura 9

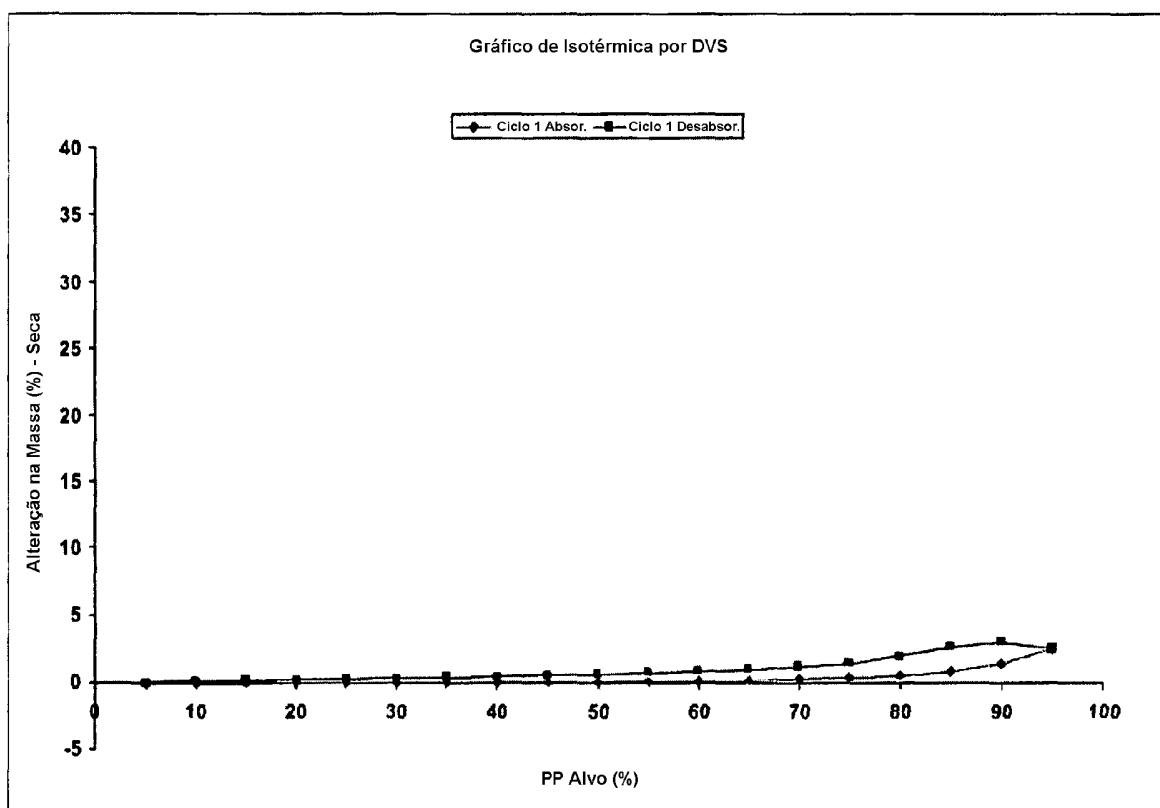


Figura 10

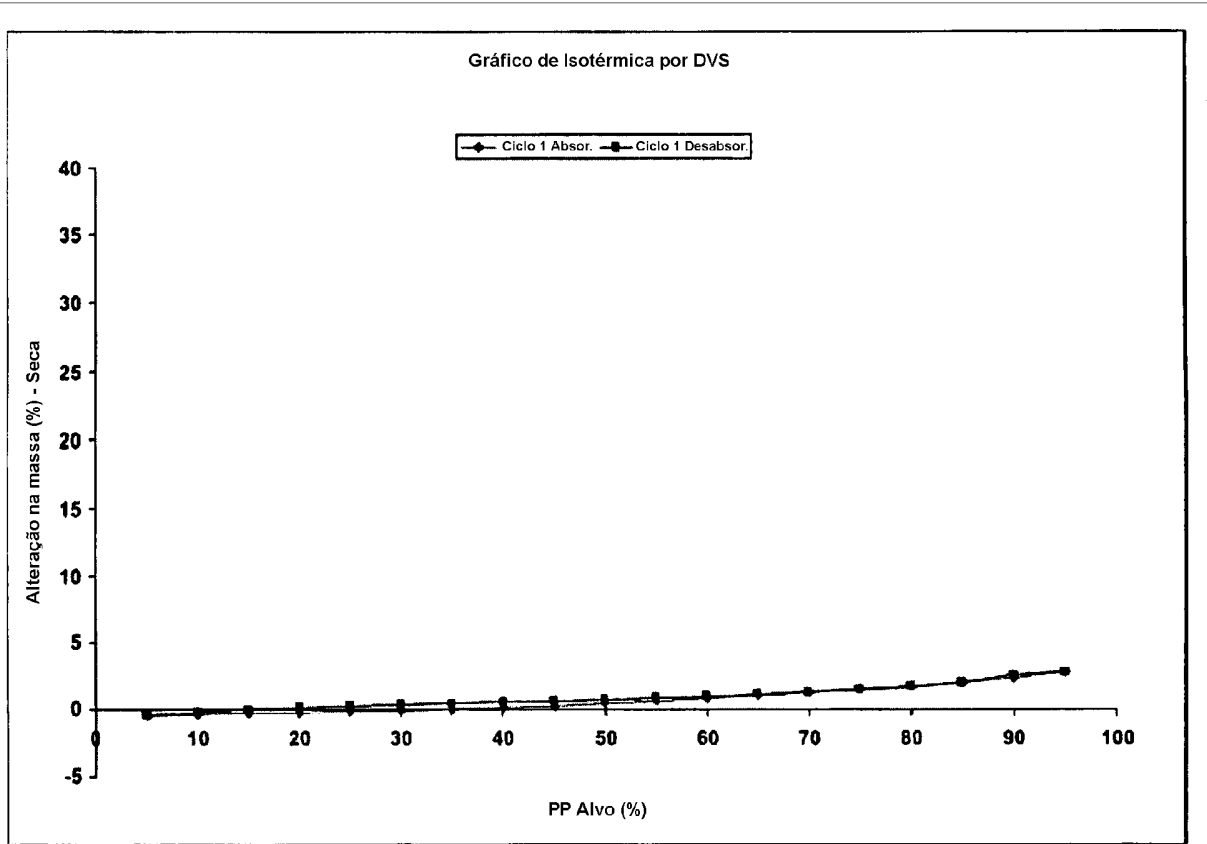


Figura 11

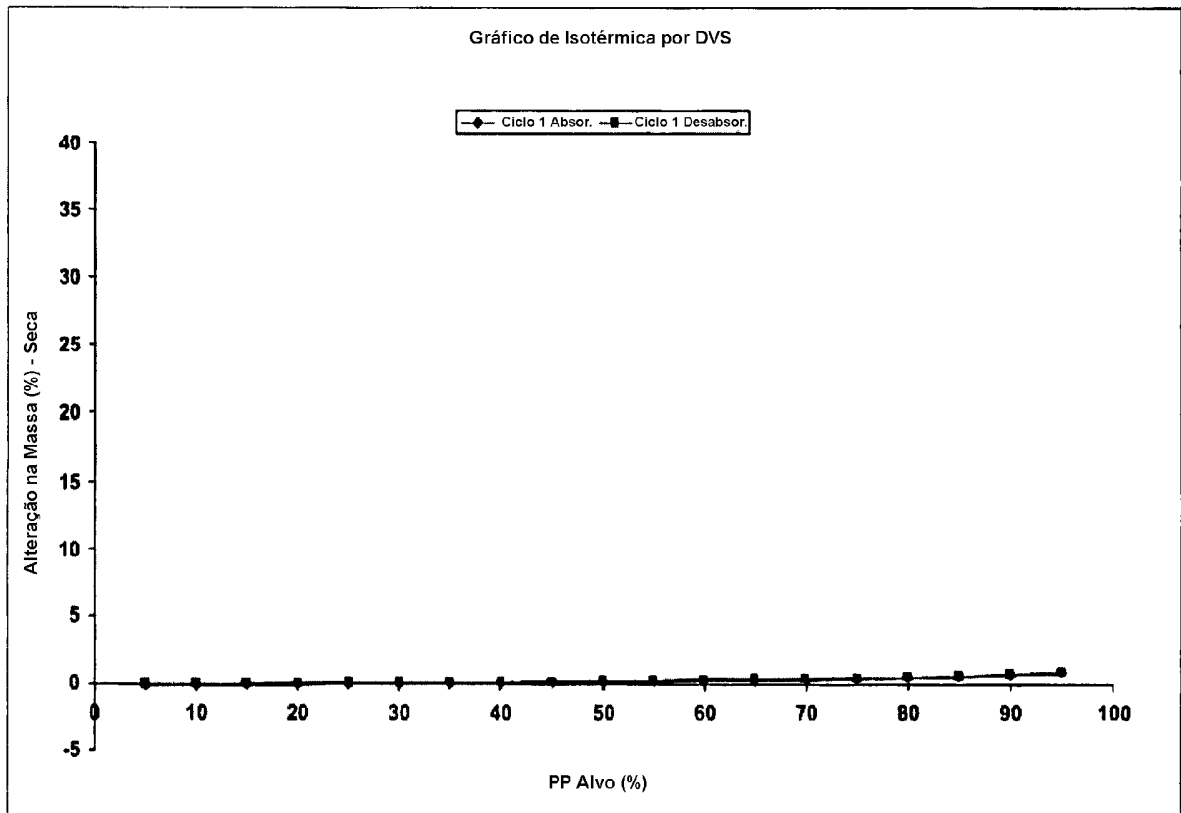


Figura 12

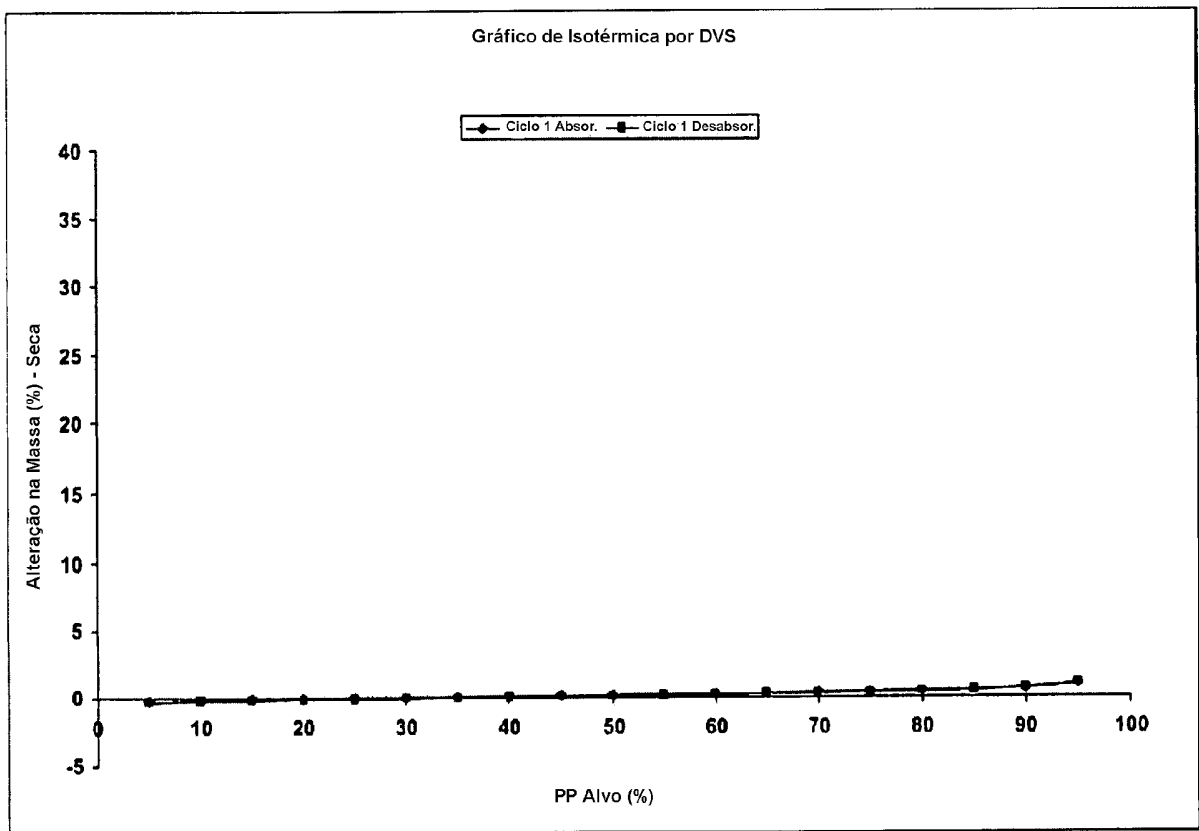


Figura 13

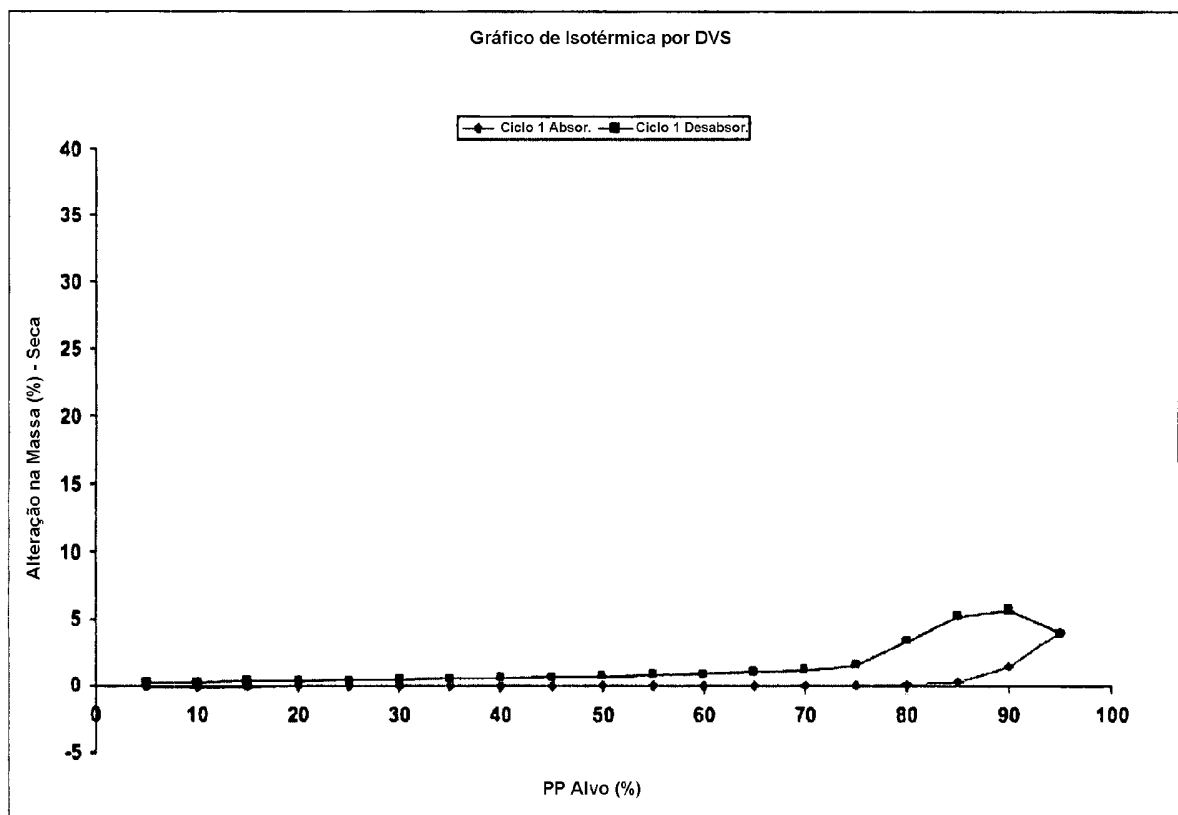


Figura 14

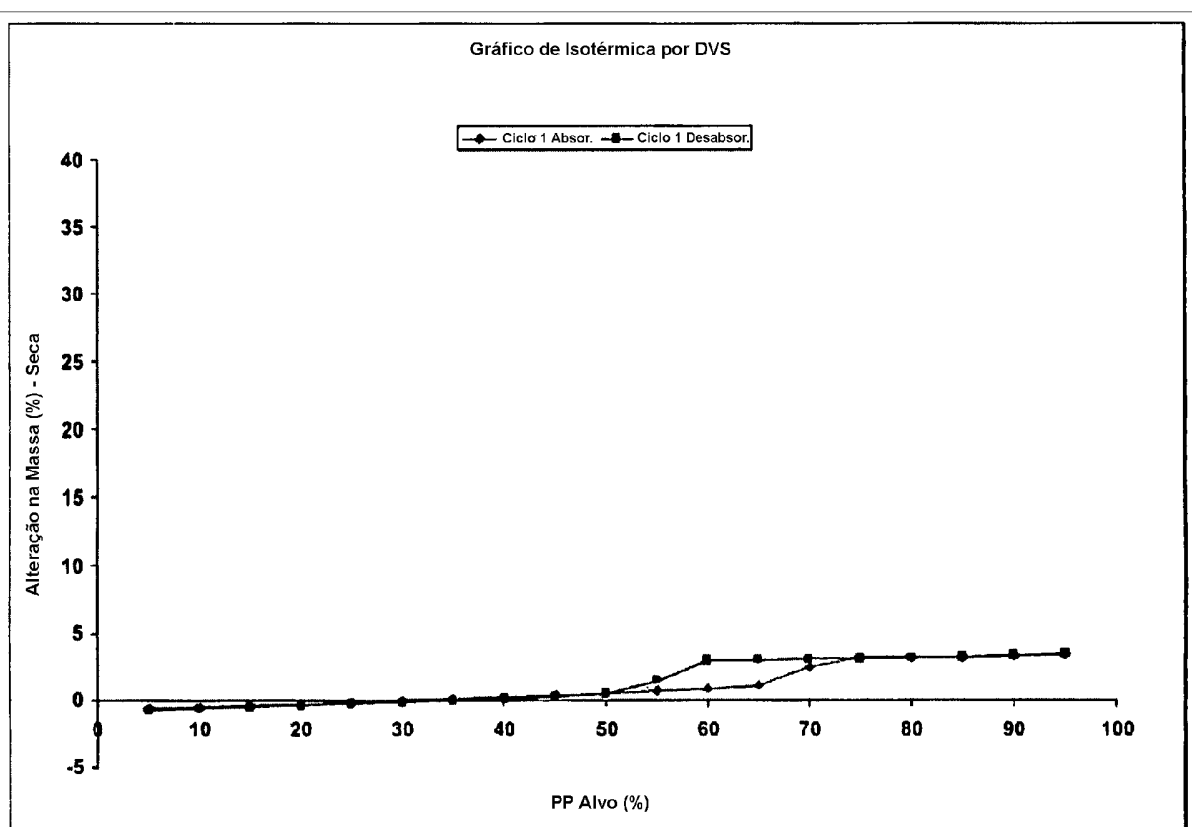


Figura 15

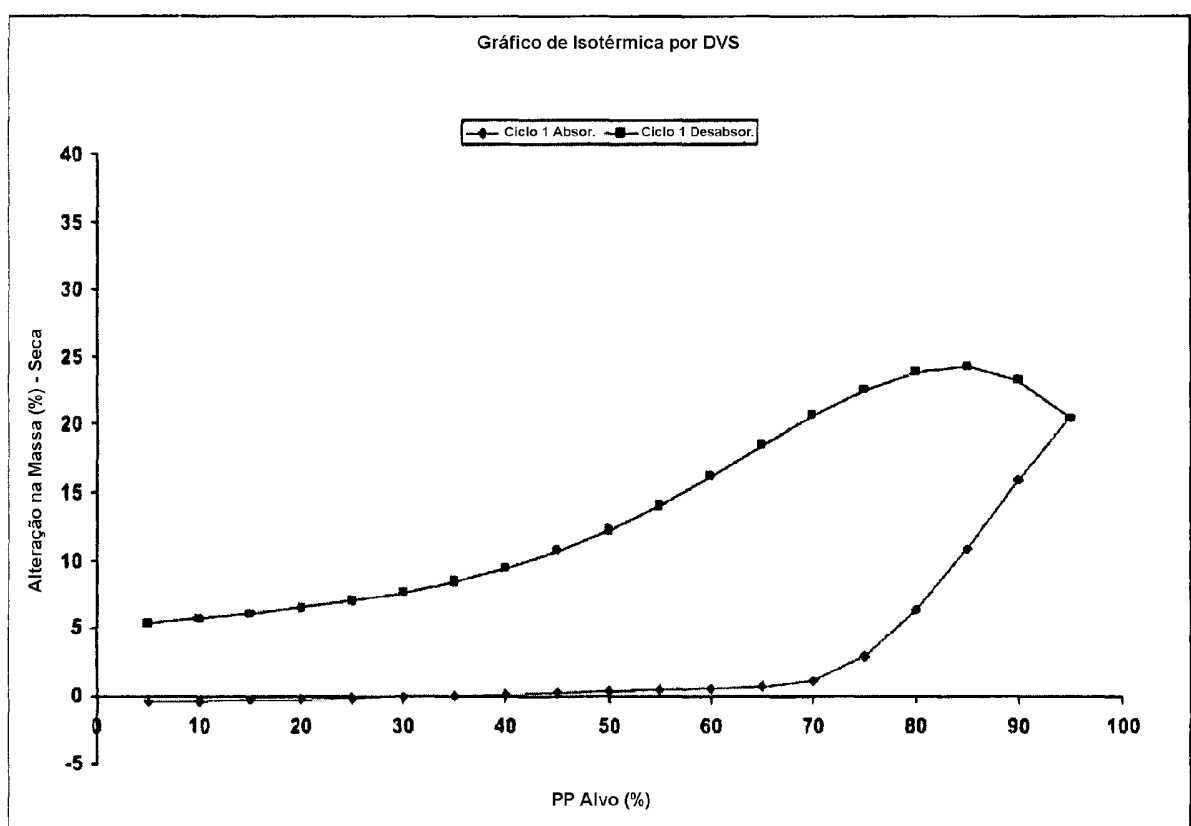


Figura 16

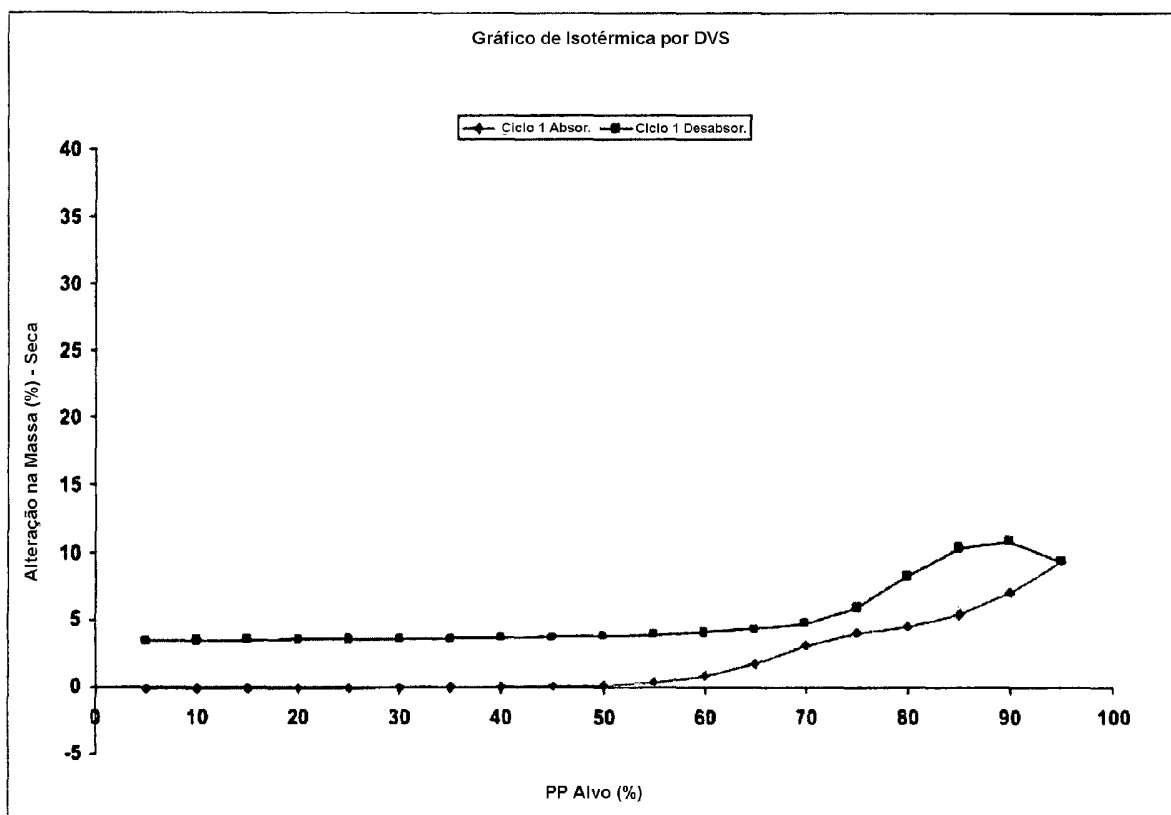


Figura 17

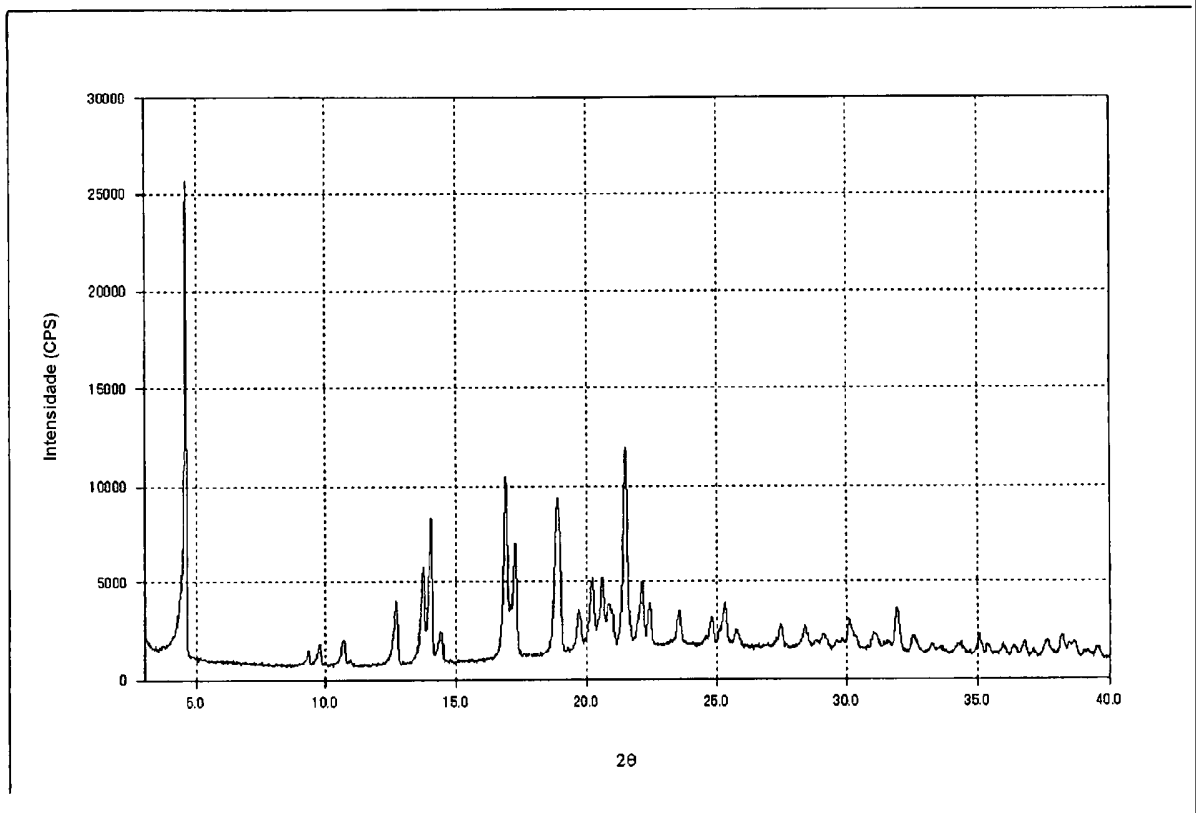


Figura 18

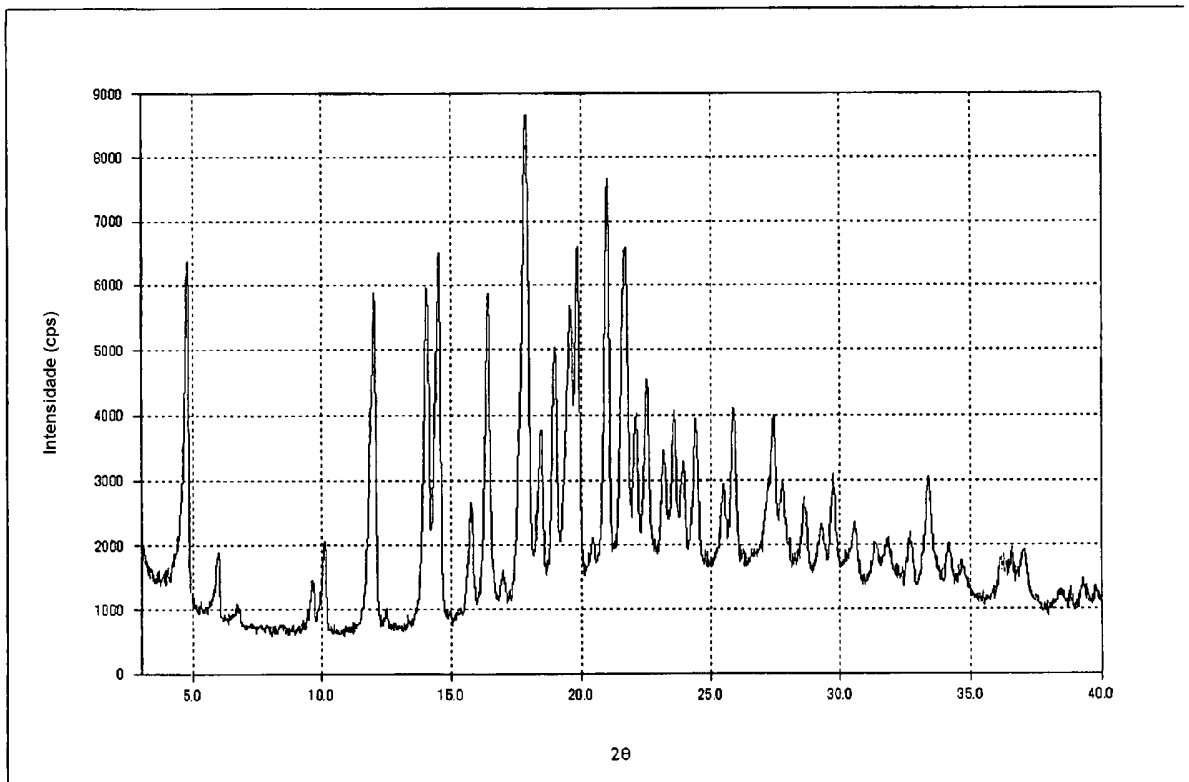


Figura 19

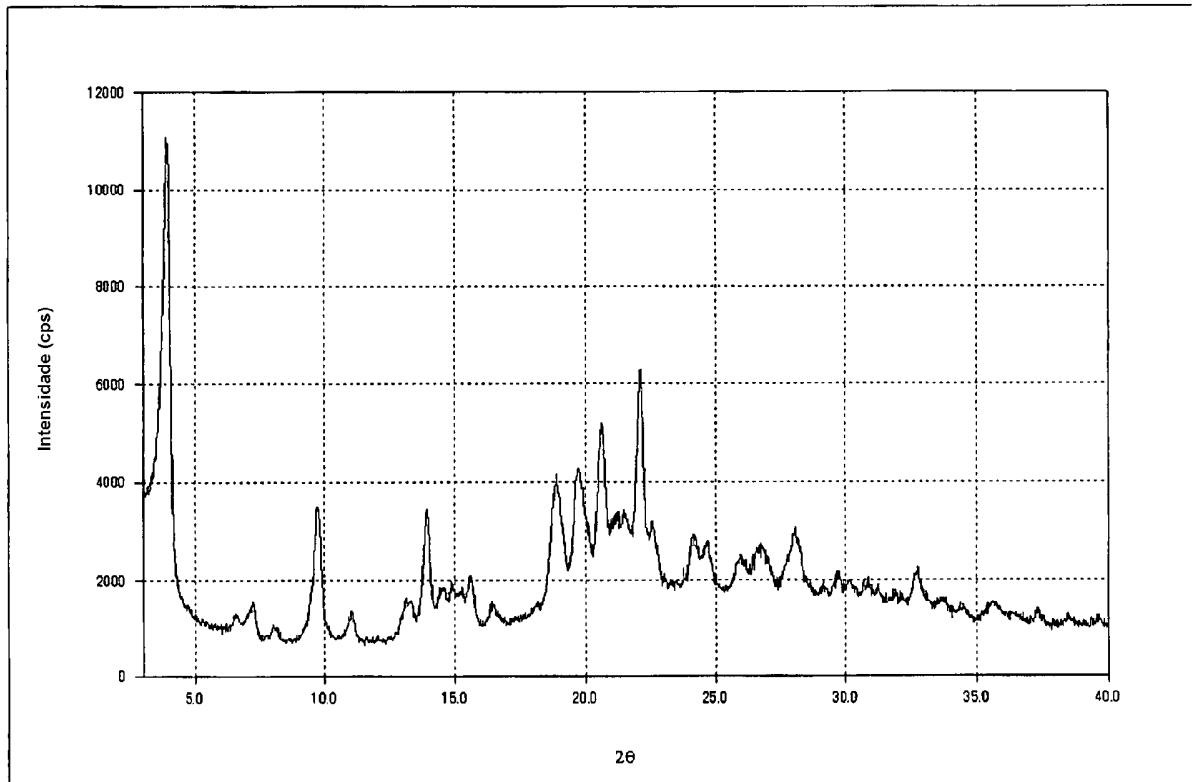


Figura 20

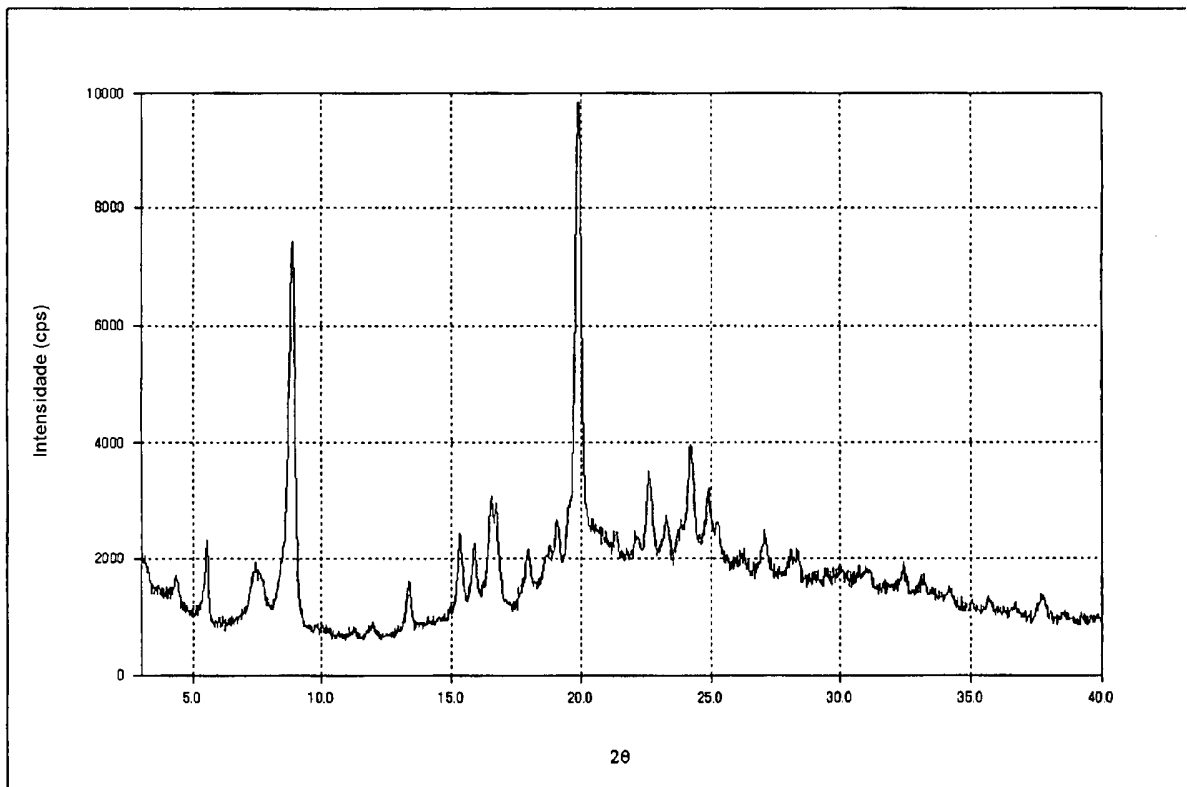


Figura 21

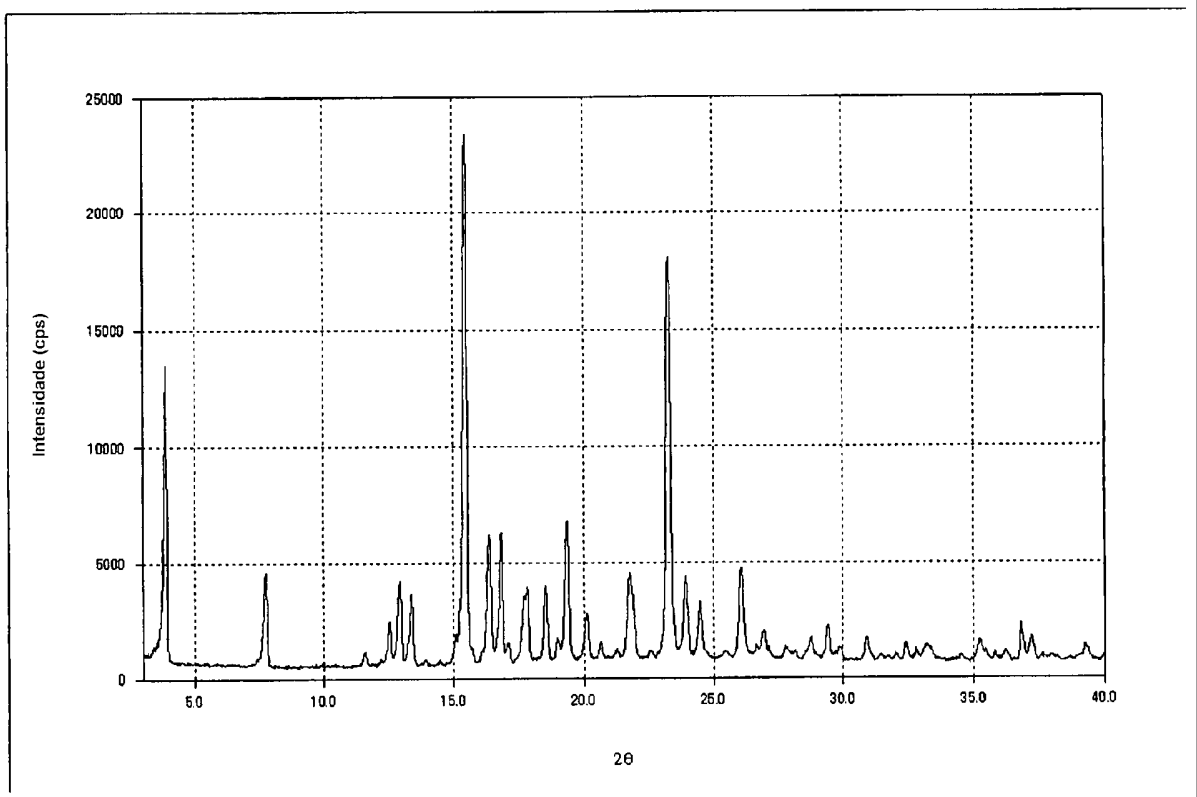


Figura 22

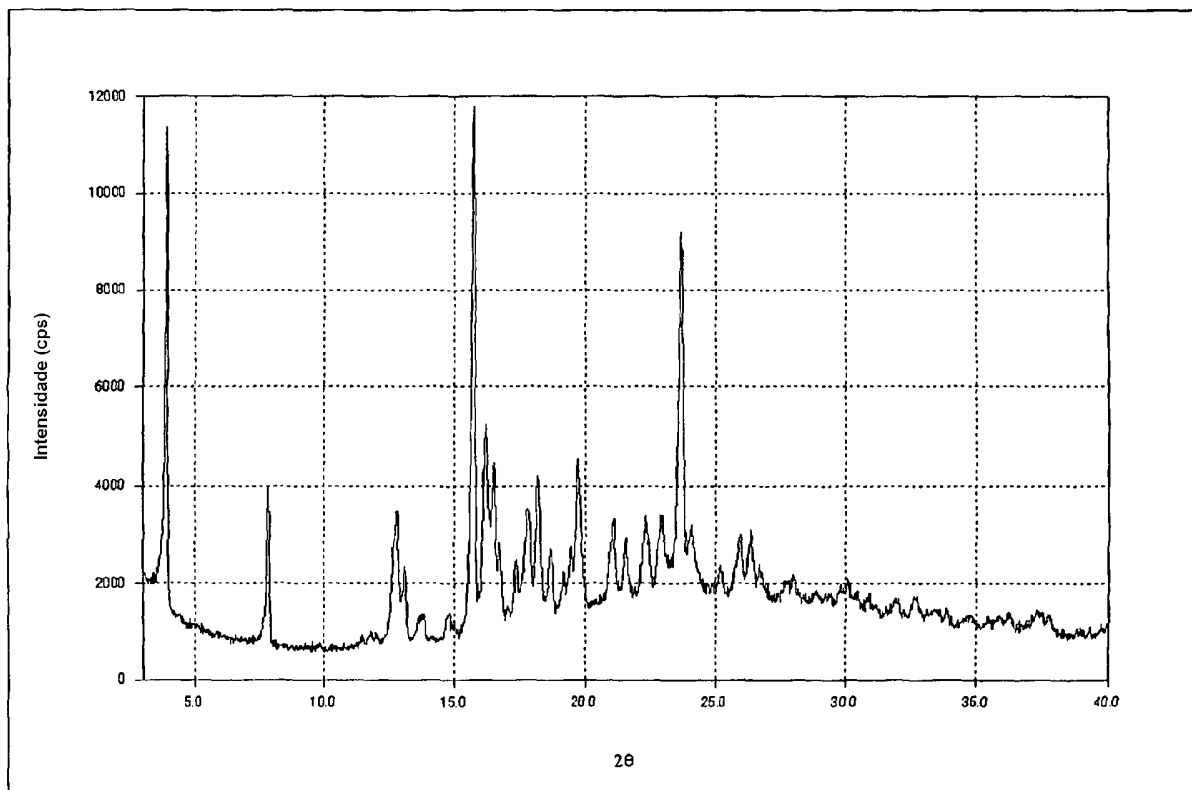


Figura 23

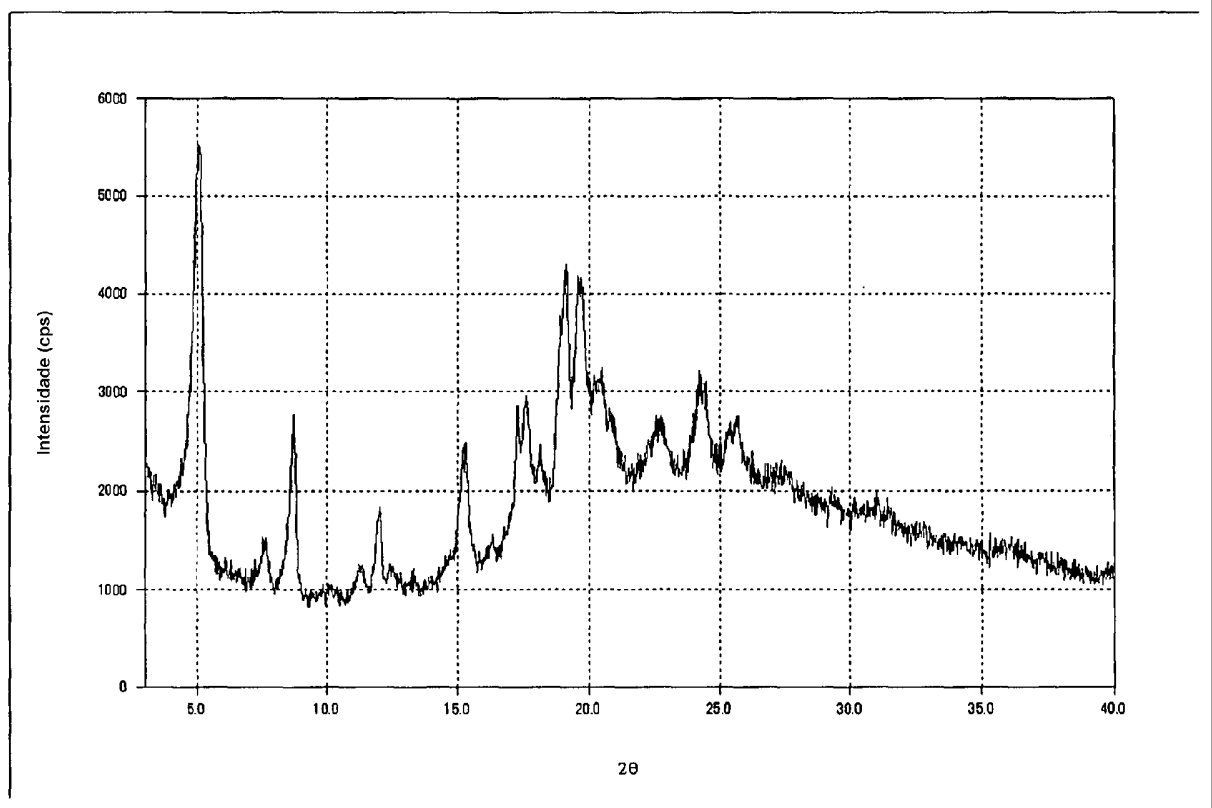


Figura 24

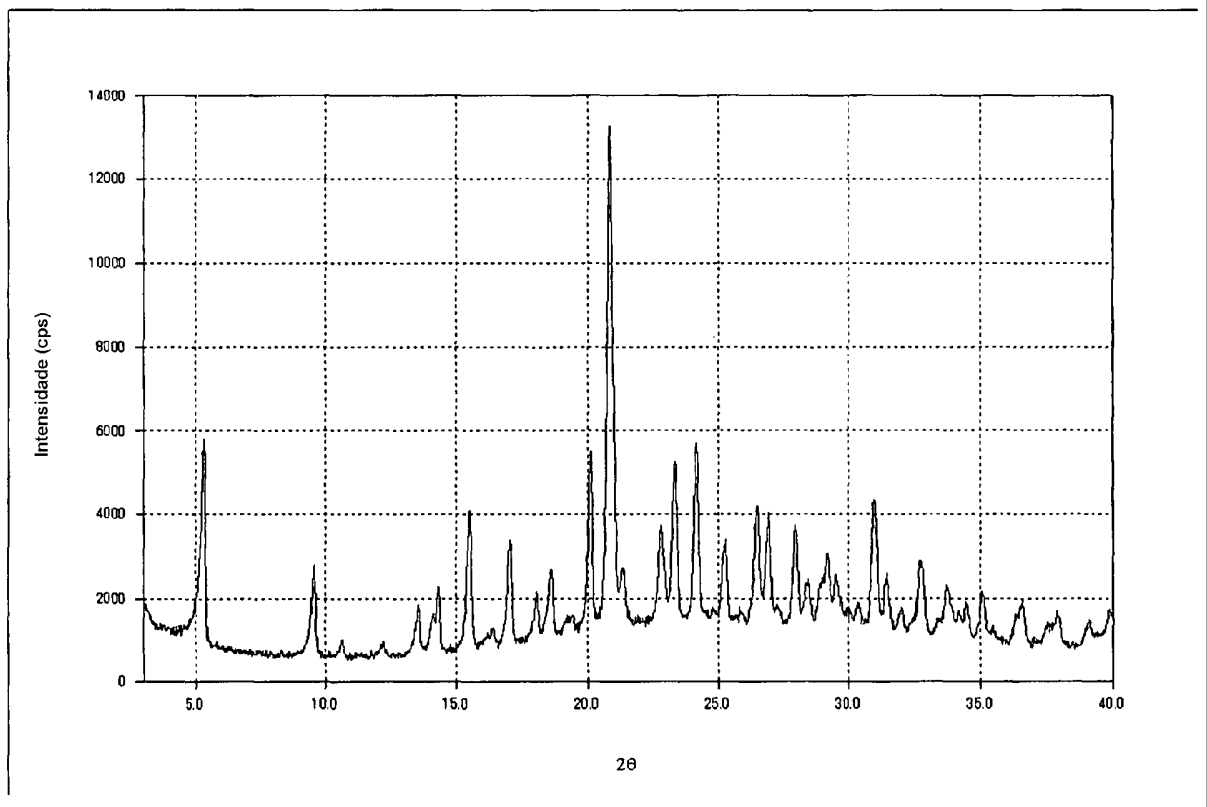


Figura 25

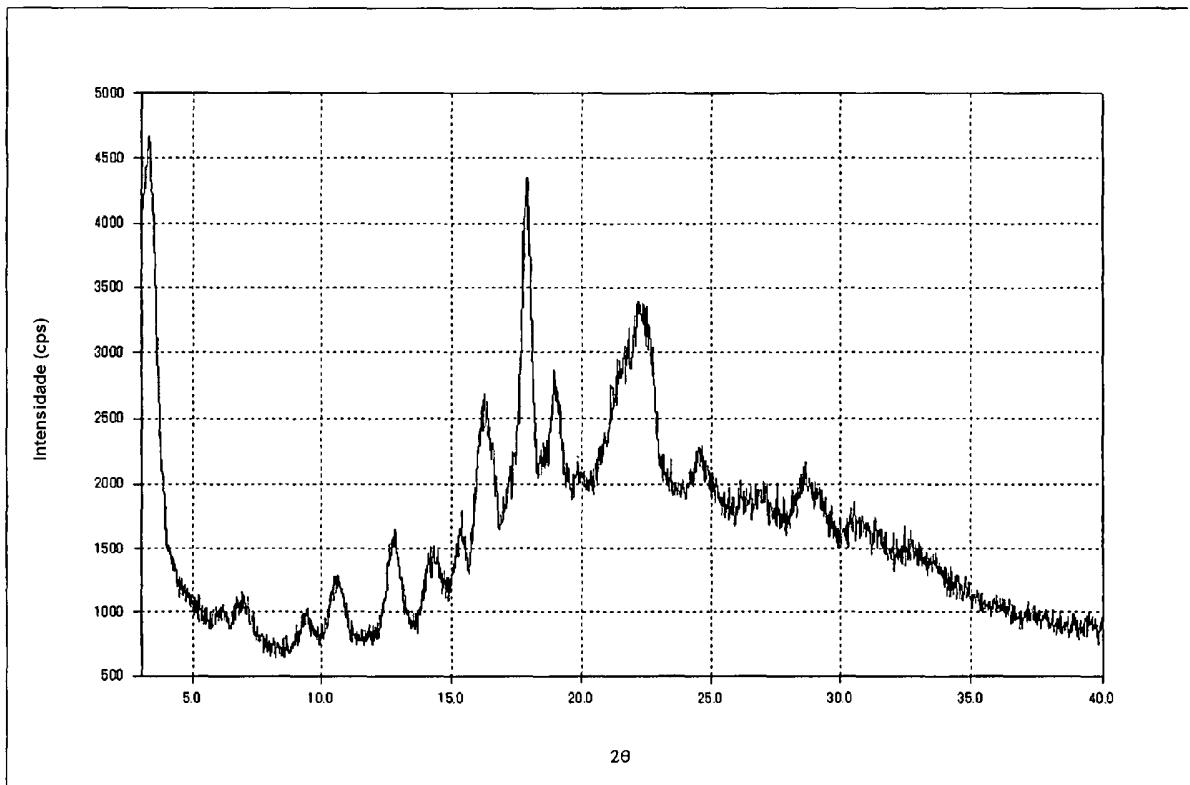


Figura 26

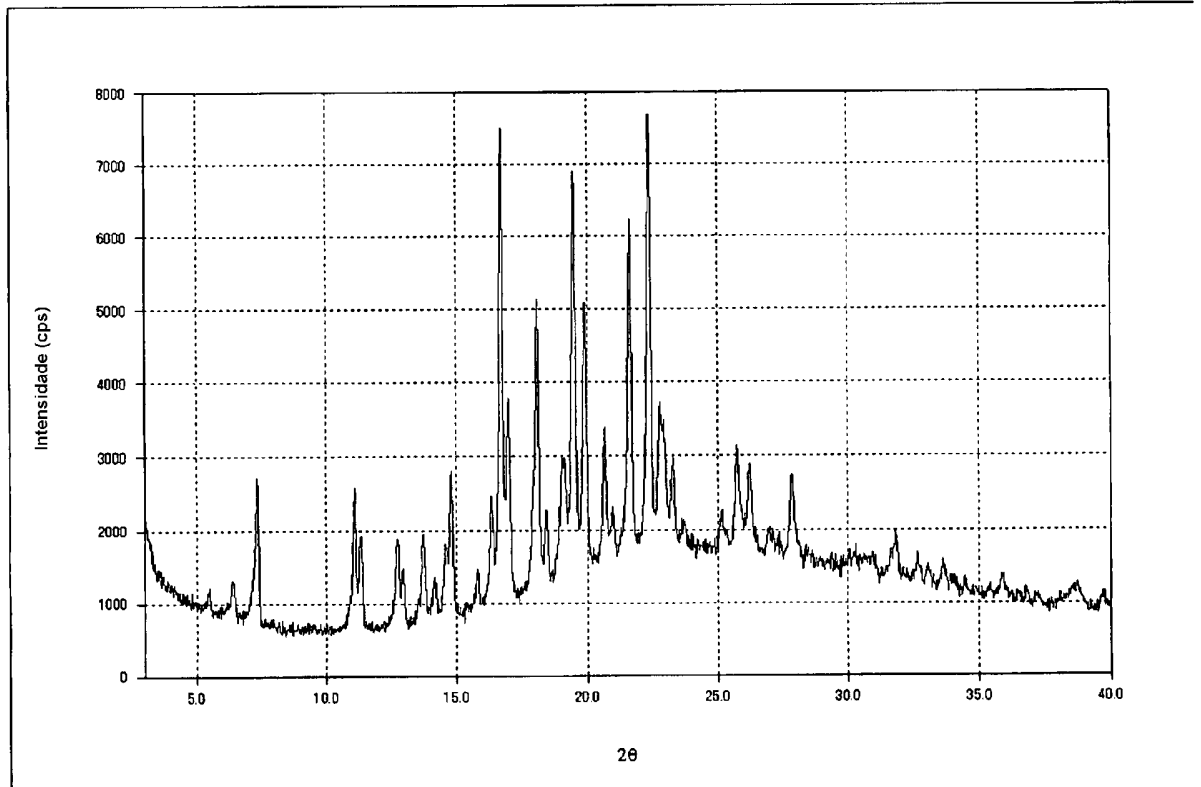


Figura 27

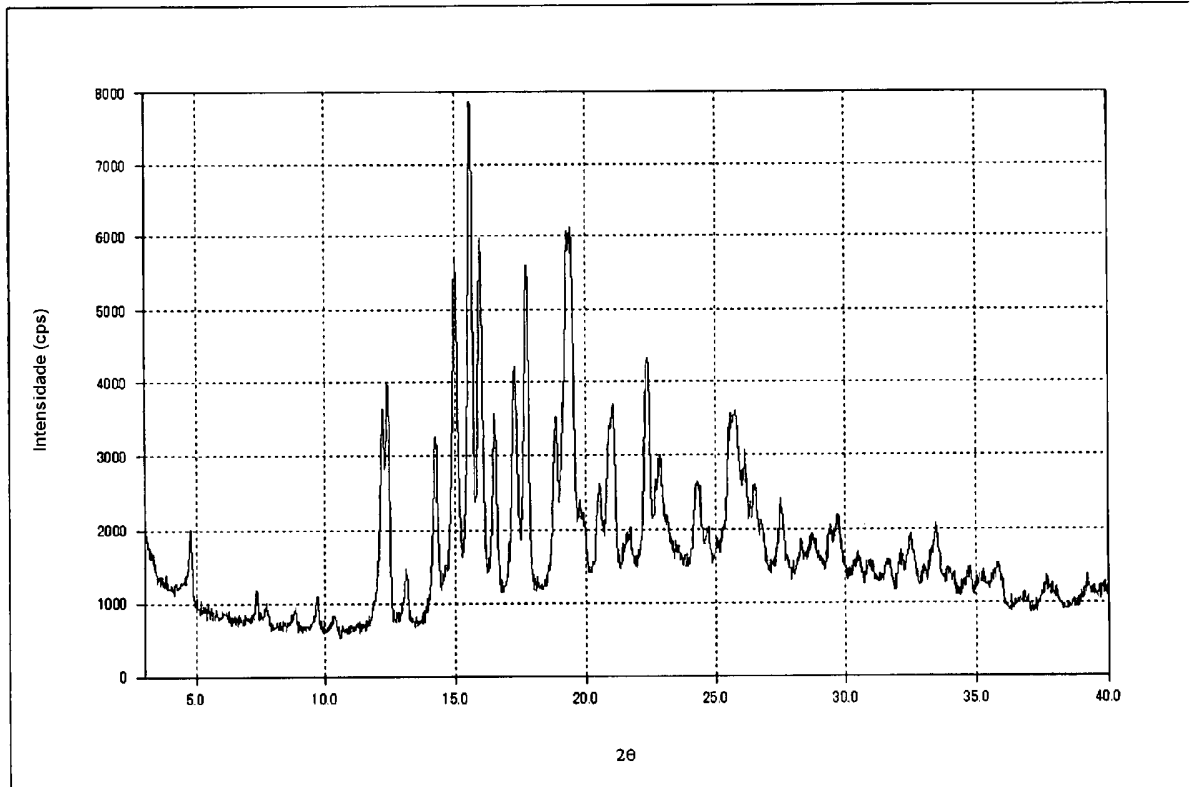


Figura 28

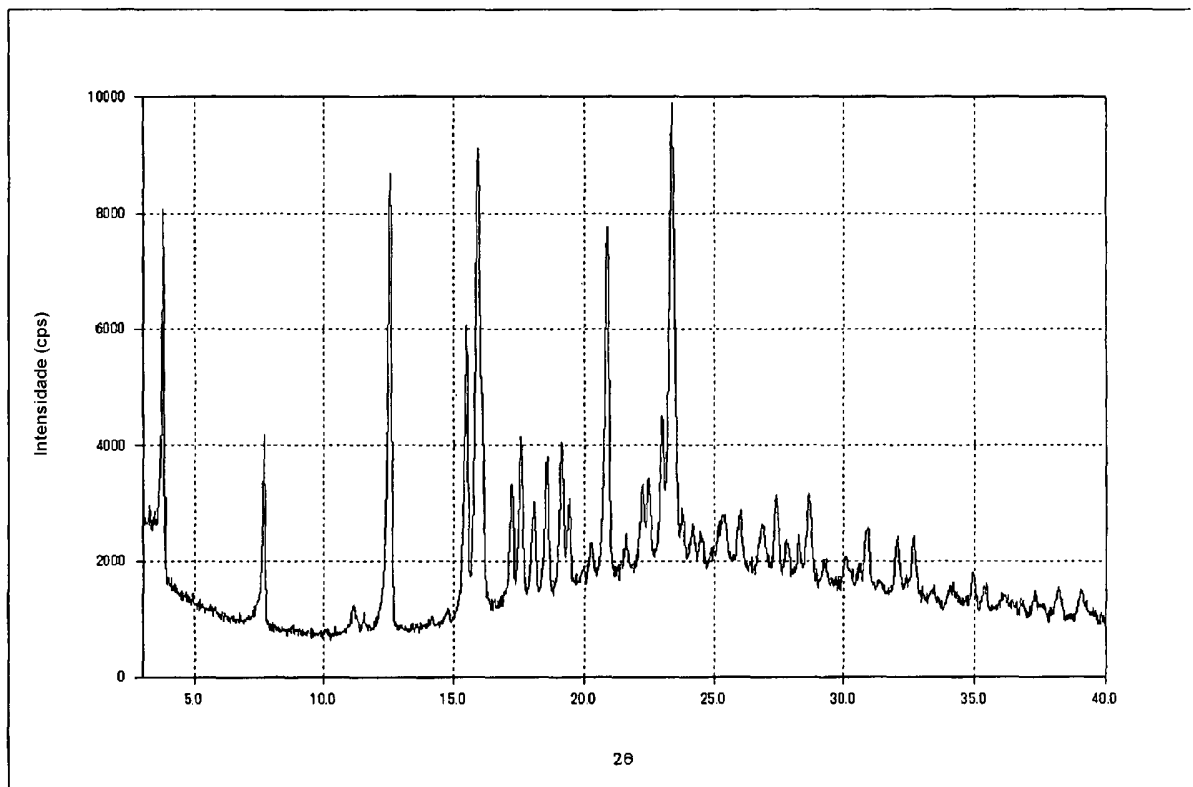


Figura 29

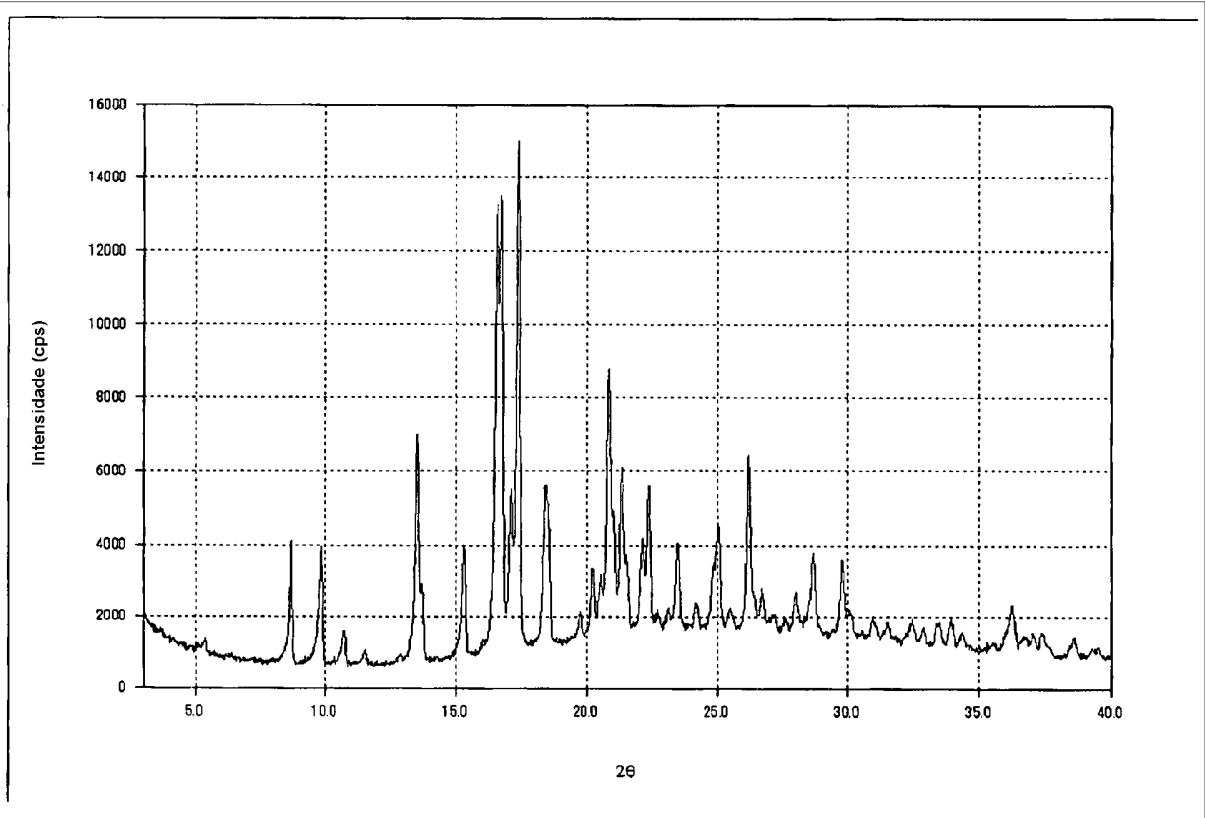


Figura 30

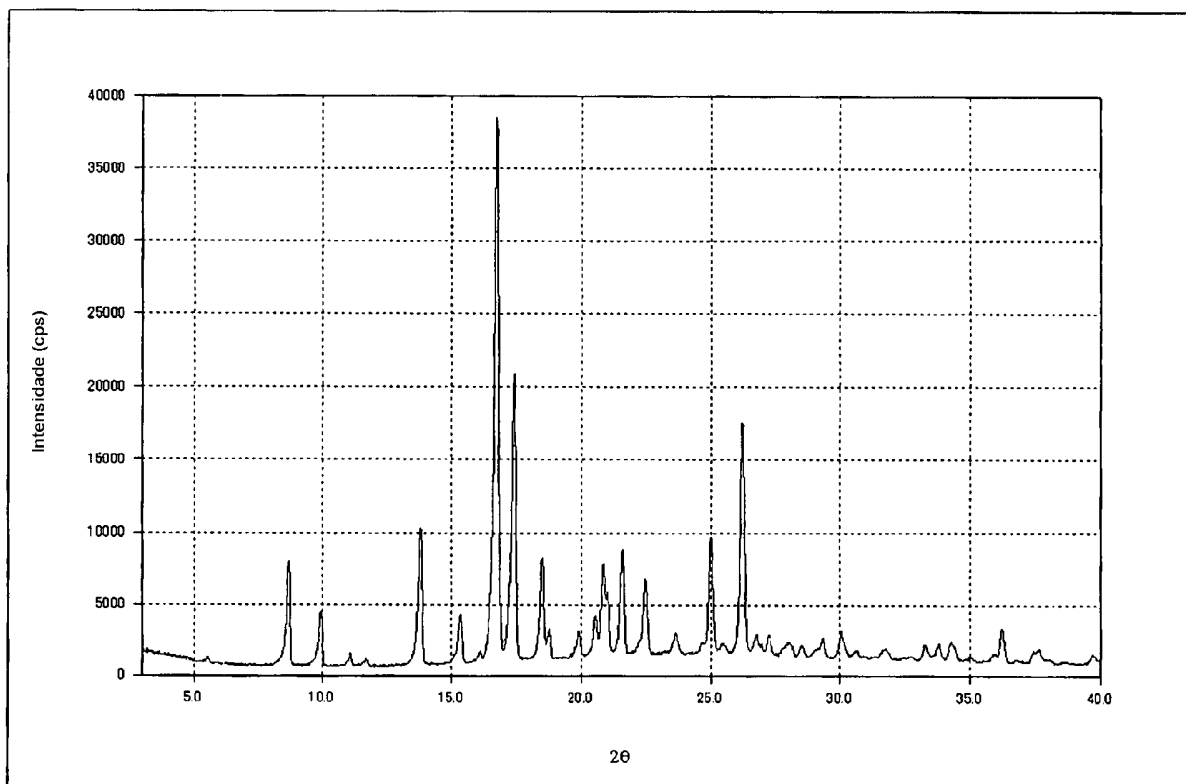


Figura 31

