



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 030**

51 Int. Cl.:  
**C07D 453/02** (2006.01)  
**A61K 31/435** (2006.01)  
**A61P 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05252102 .8**  
86 Fecha de presentación : **04.04.2005**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1700858**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.09.2006**

54 Título: **Sales de un derivado quinuclidina como antagonistas de receptores M<sub>3</sub> de muscarina.**

30 Prioridad: **08.03.2005 JP 2005-63405**  
**25.03.2005 JP 2005-88872**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.11.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.11.2008**

73 Titular/es: **Astellas Pharma Inc.**  
**3-11, Nihonbashi-Honcho 2-chome**  
**Chuo-ku, Tokyo 103-8411, JP**

72 Inventor/es: **Hayakawa, Masahiko;**  
**Samizu, Kiyohiro;**  
**Uebayashi, Hiroshi;**  
**Ikeda, Ken y**  
**Takeuchi, Makoto**

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 306 030 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

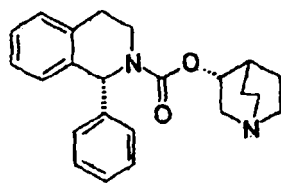
Sales de un derivado quinuclidina como antagonistas de receptores M<sub>3</sub> de muscarina.

5 **Área industrial**

La presente invención se refiere a nuevas sales de adición de ácido del (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo (citado en adelante como Compuesto A) que son útiles como fármacos, particularmente como antagonistas de receptor de muscarina M<sub>3</sub>.

10 **Técnicas antecedentes**

Se ha publicado que el Compuesto A que tiene la fórmula química dada a continuación, al presentar afinidad y selectividad para receptores de muscarina M<sub>3</sub>, es útil como antagonista de receptor M<sub>3</sub> en la profilaxis o tratamiento de diversas enfermedades mediadas por receptor M<sub>3</sub>, en particular enfermedades urológicas tales como incontinencia urinaria o polaquiuria en polaquiuria neurótica, vejiga neurogénica, enuresis nocturna, vejiga inestable, espasmo de vejiga, cistitis crónica, etc., enfermedades respiratorias, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, asma y rinitis, o enfermedades del tracto digestivo tales como síndrome de intestino irritable citado también como colitis espástica o diverticulitis (documento de Patente 1)

30 **Compuesto A**

Para la sal de adición de ácido del Compuesto A, el anterior documento de patente 1 describe solamente una sal, la sal hidrocloreto del Compuesto A en el Ejemplo 10 y no se conoce un ejemplo particular en relación con otras sales de adición de ácidos excepto la sal hidrocloreto descrita en el anterior documento de Patente 1.

[Documento de patente 1] Patente europea EP0 801 067

40 **Descripción de la invención**

El hidrocloreto del Compuesto A, la única sal de adición de ácido conocida de Compuesto A, se puede obtener como anhídrido cristalino, pero se ha encontrado que el hidrocloreto es tan higroscópico como para ser delicuescente en un entorno convencional mantenido a una humedad relativa de 70% (temperatura ambiente) y aumentar las impurezas que le acompañan en un almacenamiento a largo plazo.

Con el fin de contar con una preparación farmacéutica o ingrediente fármaco seguros, era deseable descubrir una sal del Compuesto A que fuera menos higroscópica, en particular una sal altamente estable a la humedad distinta al hidrocloreto.

Los autores de la presente invención han estudiado una serie de sales de adición de ácido del Compuesto A y han encontrado que hay sales particulares de adición de ácido del Compuesto A que son menos higroscópicas y tienen mayor estabilidad a la humedad que la sal hidrocloreto convencional. De esta forma se ha completado la presente invención. Según la invención se proporciona sal de adición de ácido del Compuesto A con un ácido seleccionado del grupo S que consiste en ácido (-)-(2S,3S)-tartárico, ácido (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartárico, ácido (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoiltartárico), (-)-L-fenilalanina, ácido bencenosulfónico, ácido ciclohexanosulfámico, ácido bromhídrico, ácido naftalen-2-sulfónico, ácido sebácico, ácido (+)-canfor-10 sulfónico, ácido p-toluensulfónico, ácido etanosulfónico, ácido metanosulfónico y fosfato de metilo.

Concretamente, la invención proporciona una sal de adición de ácido de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo, es decir Compuesto A, seleccionada entre

(-)-(2S, 3S)-tartrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo,

(+)(2S,3S)-di-O-benzoiltartrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo

## ES 2 306 030 T3

(+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoiltartrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo,

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

bencenosulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo,

ciclohexano sulfamato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)quinuclidin-3-ilo

hidrobromuro de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo

naftalen-2-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo

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

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

p-toluensulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo,

etanosulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo

metanosulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo, y

metil fosfato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo,

Entre estas sales, la preferida es (-)-(2S,3S)-tartrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto, la preferida es (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartrato; de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto la preferida es (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil)tartrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto la preferida es (-)-L-fenilalaninato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto, la preferida es bencenosulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto la preferida es ciclohexanosulfamato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto la preferida es hidrobromuro de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto la preferida es naftalen-2-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto, la preferida es sebacato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto, la preferida es (+)-canfor-10-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto, la preferida es p-toluensulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo; en otro aspecto, la preferida es etanosulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo y, en otro aspecto la preferida es metil fosfato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo.

El ácido ciclohexanosulfámico se conoce también como ácido ciclohexilsulfámico, el ácido sebácico se conoce también como ácido decanodicarboxílico, el ácido (+)canfor-10-sulfónico se llama también ácido (+)-[(1S,4R)-7,7-dimetil-2-oxibicyclo[2.2.1]heptan-1-il]metanosulfónico, y el ácido p-toluensulfónico se conoce también como ácido 4-metilbencenosulfónico.

Además, según la invención, se proporciona también una composición farmacéutica que comprende, como ingrediente activo una o más sales de adición de ácido del Compuesto A, es decir, (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-2-carboxilato de (-)(3R)-quinuclidin-3-ilo, que es un antagonista de receptor de muscarina M<sub>3</sub> particular.

En las sales de adición de ácido del Compuesto A de la invención con un ácido seleccionado del grupo S antes mencionado mejora la higroscopicidad y la estabilidad a la humedad se potencia mucho en comparación con el compuesto hidrocloreto de Compuesto A conocido. Según esto, las sales de la invención son muy útiles como fármacos o ingredientes fármaco.

En particular, como ya es sabido en general, en los fármacos higroscópicamente mejorados o sus ingredientes fármaco, los problemas en el almacenamiento a una humedad en condiciones de almacenamiento y en el control de calidad se reducen, y además los problemas de variaciones de peso del ingrediente activo en las preparaciones farmacéuticas durante la producción de preparaciones sólidas tales como tabletas o cápsulas se reducen también. Es decir, es de esperar que las sales de adición de ácido del Compuesto A de la invención muestren una vida estable en depósito y facilidad de control de calidad dado que tienen higroscopicidad mejorada, pudiéndose considerar como compuestos de fácil manejo en preparación farmacéutica y contribuir a proporcionar preparaciones farmacéuticas mucho mejores con alta calidad.

## ES 2 306 030 T3

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del hidrocloreuro de Compuesto A conocido.

- 5 La Figura 2 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 1.  
La Figura 3 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 2.  
10 La Figura 4 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 3.  
La Figura 5 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 4.  
La Figura 6 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 5.  
15 La Figura 7 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 5-1.  
La Figura 8 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 6.  
20 La Figura 9 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 7.  
La Figura 10 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 8.  
La Figura 11 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 9.  
25 La Figura 12 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 10.  
La Figura 13 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 11.  
30 La Figura 14 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 12.  
La Figura 15 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua del compuesto del Ejemplo 13.  
La Figura 16 muestra una curva isotérmica de absorción y desorción de agua en el compuesto del Ejemplo 14.  
35 La Figura 17 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 1.  
La Figura 18 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 2.  
40 La Figura 19 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 3.  
La Figura 20 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 4.  
La Figura 21 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 5.  
45 La Figura 22 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 5-1.  
La Figura 23 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 6.  
50 La Figura 24 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 7.  
La Figura 25 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 8.  
La Figura 26 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 9.  
55 La Figura 27 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 10.  
La Figura 28 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 11.  
60 La Figura 29 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 12.  
La Figura 30 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 13.  
La Figura 31 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 14.

65

**El mejor modo de llevar a cabo la invención**

Las sales de adición de ácido del Compuesto A de la invención muestran una estabilidad en un grado suficiente para su uso en preparaciones farmacéuticas o sus ingredientes fármaco, no tienen higroscopicidad que afecte al uso como fármacos o ingredientes fármaco, y es de esperar que sean químicamente estables o estables durante el almacenamiento. Por tanto, todas las sales de adición de ácido de la invención son preferidas como fármacos o ingredientes fármaco, en particular como ingredientes fármaco particularmente como ingredientes fármaco para preparaciones sólida.

*Método de producción*

Las sales de adición de ácidos del Compuesto A de la invención se puede producir siguiendo el método de producción dado a continuación.

Se añade un disolvente a una base libre del Compuesto A en una relación de 1 ml/g-100 ml/g a Compuesto A, y se añade entonces a lo anterior el ácido utilizado en la formación de la sal o una solución que contiene el ácido en el intervalo de 0,5 a 2,0 equivalentes a Compuesto A, a temperatura ambiente, Cuando existe un material insoluble, se añade el mismo disolvente o un disolvente diferente, o se calienta la mezcla para disolver el material insoluble para dar una solución, que se deja en agitación o se deja reposar a temperatura ambiente o bajo enfriamiento. Cuando queda aún un material insoluble a pesar de la adición de disolvente o calentamiento, se puede filtrar la mezcla para separarla antes de la cristalización de la sal. Así, los cristales resultantes se recogen por filtración y se lavan con un disolvente adecuado para dar la sal de adición de ácido objetivo de Compuesto A, En la operación de enfriamiento a temperatura ambiente es eficaz a veces enfriar la mezcla de forma más gradual o más rápidamente en lugar de dejarla simplemente enfriar, con el fin de obtener mejores cristales.

Entre los disolventes que pueden utilizarse en la formación de la sal antes mencionada se incluyen agua, ácido acético, acetona, anisol, 1-butanol, 2-butanol, acetato de n-butilo, éter t-butil metílico, cumeno, dimetilsulfóxido, etanol (EtOH), acetato de etilo (EtOAc) éter dietílico, formiato de etilo, ácido fórmico, heptano, acetato de isobutilo, acetato de isopropilo (1-PrOAc), acetato de metilo, 3-metil-1-butanol, metil etil cetona (2-butanona), metil isobutil cetona, 2-metil-1-propanol, pentano, 1-pentanol, 1-propenol, 2-propanol (2-PrOH), acetato de propilo, acetonitrilo, clorobenceno, cloroformo, ciclohexano, 1,2-dicloroetano, diclorometano, 1,2-dimetoxietano, DMF, DMA, 1,4-dioxano, 2-etoxietanol, etilen glicol, formamida, hexano, metanol, 2-metoxietanol, metil butil cetona, metilciclohexano, N-metilpirrolidona, nitrometano, piridina, sulfolano, THF, tetralina, tolueno, 1,1,2-tricloroetano, xileno, benceno, tetracloruro de carbono, 1,2-dicloroetano, 1,1-dicloroetano, 1,1,1-tricloroetano, éter diisopropílico, y similares.

Los cristales resultantes se pueden recrystalizar de una manera convencional como sabe cualquier experto en la técnica para dar cristales mucho más puros.

Se puede producir una base libre de Compuesto A, que es un material de partida en el método de producción antes mencionado, siguiendo el método descrito en el anterior documento de Patente 1, es decir, la Patente europea No. 0 801 067, o método correspondiente o similar, o un método de kis empleados por cualquier especialista en la técnica.

Las sales de adición de ácido de Compuesto A de la invención se pueden utilizar como ingredientes fármaco en la producción de preparaciones farmacéuticas por combinación de una o más de las sales de adición de ácido del Compuesto A de la invención con vehículos farmacéuticos convencionales o diluyentes empleados en esta área. Las preparaciones farmacéuticas se pueden producir por el método empleado habitualmente en este campo.

Las preparaciones farmacéuticas que contienen las sales de adición de ácido de Compuesto A de la invención incluyen preparaciones de administración oral tales como tabletas, píldoras, cápsulas, gránulos, polvos, líquidos y soluciones y similares; o preparaciones parenterales tales como inyecciones intra-articulares, intravenosas o intramusculares, supositorios, preparaciones líquidas percutáneas, pomadas, varitas transdérmicas, preparaciones líquidas transmucosales, varitas transmucosales, varitas, inhalaciones y similares. En particular, son ventajosas las preparaciones orales que contienen como ingrediente fármaco una sal de adición de ácido del Compuesto A, tales como tabletas, píldoras, cápsulas, gránulos y polvos, como preparaciones sólidas estables.

En las composiciones sólidas para su utilización en administración oral, se pueden mezclar uno o más de los ingredientes activos con al menos un diluyente inerte, por ejemplo, lactosa, manita, glucosa, hidroxipropilcelulosa, celulosa en cristales finos, almidón, polivinilpirrolidona, aluminato metasaliato de magnesio, y similares. Las composiciones pueden contener aditivos distintos que los diluyentes en una forma convencional, por ejemplo, lubricantes tales como estearato de magnesio, agentes disgregantes tales como glicolato de calcio fibroso, estabilizantes, o agentes solubilizantes. Las tabletas o píldoras, si se necesita, se pueden recubrir con recubrimiento de azúcar o una película de recubrimiento gástrico o entérico, tal como sacarosa, gelatina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y similares.

Las composiciones líquidas para administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, elixires, y demás, farmacéuticamente aceptables, que contienen los diluyentes convencionalmente utilizados, por ejemplo agua purificada o etanol, además de diluyentes inertes. Además de los diluyentes inertes, las composiciones pueden contener también agentes auxiliares tales como agente humectante o agente de suspensión, edulcorante, sabor, perfume o conservante.

## ES 2 306 030 T3

Las inyecciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones estériles acuosas o no-acuosas. Las soluciones y suspensiones acuosas incluyen, por ejemplo, agua destilada para inyección y solución salina fisiológica. Las soluciones y suspensiones no acuosas incluyen, por ejemplo, propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, alcoholes tales como EtOH, polisorbato 80, y similares. Una composición tal puede contener, además, un conservante, agente humectante, agente emulsionante, dispersante, estabilizante, agente solubilizante, y similares. Estos pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración, a través de un filtro impermeable a bacterias, mezclando con un bactericida, o por irradiación. Alternativamente, se pueden hacer en una composición sólida estéril, que se disuelve en agua estéril o disolvente estéril para inyectar justo antes del uso.

Dado que las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una o más de las sales de adición de ácido del Compuesto A de la invención, que son antagonistas a receptor de muscarina  $M_3$ , como el ingrediente activo, las composiciones farmacéuticas pueden utilizarse para la terapia o profilaxis de una diversidad de enfermedades a las que los receptores de muscarina  $M_3$  contribuyen o pueden emplearse en procedimientos de diagnóstico. Es decir, las composiciones farmacéuticas de la invención, son útiles específicamente como régimen en el tratamiento de, por ejemplo, urgencia urinaria, frecuencia/polaquiuria, incontinencia urinaria, enuresis nocturna o vejiga hiperrefleja causada por enfermedades urinarias, tales como vejiga hiperactiva, vejiga inestable, vejiga neurogénica, cistitis, etc.: en la terapia o profilaxis de espasmo de vejiga causado por cirugía o catéteres; en el tratamiento de enfermedades respiratorias, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, asma y rinitis, en el tratamiento de enfermedades digestivas, tales como síndrome de intestino irritable, como relajante utilizado para examen del tracto digestivo, como agente para mejorar la miopía o para promover midriasis, o como agente para tratar o prevenir la hiperhidrosis.

### Ejemplos

La invención se explicará de manera específica con los siguientes ejemplos que no han de considerarse como limitativos de ella ni restrictivos del marco de la invención.

El análisis térmico y difracción de rayos X del polvo se llevaron a cabo según los métodos siguientes.

#### (1) *Análisis térmico*

##### *Calorimetría de exploración diferencial: DSC*

Se colocó una muestra (aproximadamente 3 mg) en una cápsula de aluminio hecha a propósito. Se midió de forma continua el cambio de calor generado entre la muestra y una referencia (cápsula de aluminio vacía) y se registró bajo atmósfera de nitrógeno (50 ml/min) en el intervalo de temperaturas desde temperatura ambiente a 300°C a una velocidad de 10°C/min de temperatura programada ascendente. El aparato con los datos del proceso se hizo funcionar por el método y procedimiento indicado en cada dispositivo (Aparato: Hi-Res DSC 2910, fabricado por TA Instrument).

##### *Aparato termogravimétrico TGA*

Se colocó una muestra (aproximadamente 3 mg) en una cápsula de aluminio hecha a propósito, y se pesó la muestra de forma continua y se registró bajo atmósfera de nitrógeno (100 ml/min) en el intervalo de temperatura desde la temperatura ambiente a 300°C a una velocidad de 10°C/min de temperatura programada ascendente. El aparato, que incluía los datos del proceso se hizo funcionar según el método y procedimiento indicado en cada dispositivo (Aparato Hi-Res TGA 2950 fabricado por TA Instrument).

#### (2) *Difracción de rayos X del polvo*

Se colocó una muestra (aproximadamente 10 mg) en un soporte de muestras hecho a propósito (5 mm de ancho, 18 mm de largo, 0,2 mm de altura), y se obtuvo el modelo de difracción de rayos X y se registraron los datos según las condiciones siguientes. El aparato que incluía procesado de datos se hizo funcionar según el método y procedimiento indicado en cada dispositivo (Aparato MXP18TAHF22, hecho por MAC Science (Bruker en este caso))

##### *Condiciones*

Fuente de radiación de rayos X: Cu; longitud de onda: 1.54056 angstrom, intervalo de medida: 3,00 - 40.00°; intervalo de toma de muestras: 0,02°; velocidad de exploración: 3,00°/minuto; tensión del tubo: 40 kV; corriente del tubo: 200 mA, ranura de divergencia: 1,00°; ranura de dispersión: 1,00°; ranura receptora 0,15 mm.

Los valores obtenidos de cada espectro a veces dependen en cierto grado de la dirección de crecimiento de los cristales, tamaño de partícula, y las condiciones de medida. Estos valores no deberán, por tanto, considerarse como estrictos.

## ES 2 306 030 T3

Ejemplo 1 de referencia

*Preparación del Compuesto A en estado libre*

5 El compuesto del título se preparó siguiendo el método descrito en la Patente europea No. 0.801.067

Ejemplo 2 de referencia

10 *Preparación del hidrocloreuro del Compuesto A como compuesto de referencia*

Se preparó el compuesto del título siguiendo el método descrito en la Patente europea No. 0.801.067.

15 Ejemplo 1

*Preparación de (-)-(2S, 3S)-tartrato del Compuesto A*

20 A una solución de la base libre de Compuesto A (26,0 g) en 260 ml de EtOH se añadieron 10,8 g de ácido (-)-(2S,3S)-tartárico y se calentó la mezcla hasta disolución. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agitó la mezcla durante 20 horas. Los cristales resultantes se recogieron por filtración para obtener 30,6 g de cristales blancos. A una suspensión de 1,00 g de los cristales en 10 ml de EtOH se añadieron 0,4 ml de agua, y la mezcla se calentó para dar una solución. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agitó la mezcla durante 6 horas. Los cristales resultantes se recogieron por filtración para dar 871mg del título como cristales blancos.

25 <sup>1</sup>-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 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, s ancho), 6,25(1H, s ancho), 7,08-7,37 (9H, m)

30

Temperatura en lo alto del pico de la endoterma en la DSC: 194°C.

La Figura 17 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 1.

35

Ejemplo 2

*Preparación de (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartrato*

40 A una solución de base libre del compuesto A (180 mg) en 1,8 ml de EtOH se añadieron 180 mg de ácido (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartárico y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 12 horas. Se recogieron los cristales resultantes por filtración, se lavaron con EtOH y se secaron a presión reducida para dar 284 mg del compuesto del título como cristales blancos.

45 <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 70°C)

1,52-1,90(4H, m), 2,16(1H, s ancho), 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)

50 Temperatura del alto del pico de la endoterma en DSC: 159°C

La Figura 18 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 2.

55 Ejemplo 3

*Preparación de (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil)tartrato de Compuesto A*

60 A una solución de base libre del Compuesto A (1,00 g) en 20 ml de EtOH se añadieron 1,12 g de ácido (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil)tartárico, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 22 horas. El precipitado resultante se recogió por filtración para dar 1,60 g del compuesto del título como cristales blancos,

<sup>1</sup>H-RMN(DMSO-d<sub>6</sub>, 70°C)

65 1,53-1,88 (4H, m), 2,15 (1H, s ancho), 2,32-2,38 (6H, m), 2,76-3,16 (7H, m), 3,42 (1Hm 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, 5,2Hz), 4,88(1H, dt, J=8,8, 4,4Hz), 5,64 (2H, s), 6,23 (1H, s), 7,11-7,34 (13H, m), 7,77-7,84 (4H, m).

## ES 2 306 030 T3

La temperatura del alto del pico de la endoterma en DSC: 160°C.

La Figura 19 muestra un modelo de difracción de rayos X del compuesto del Ejemplo 3.

5

### Ejemplo 4

#### *Preparación de (-)-L-fenilalaninato del Compuesto A*

10 A una solución de base libre de Compuesto A (1,13 g) en 11,25 ml de EtOH se añadieron 515 mg de (-)-L-fenilalanina y 4,5 ml de agua, y la mezcla se calentó hasta disolución. Se agitó entonces la mezcla a temperatura ambiente durante 10 horas. Se recogieron los cristales resultantes por filtración, se lavaron con una mezcla de agua-EtOH y se secaron a presión reducida para dar 1,12 g del compuesto del título como cristales blancos.

15 <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 70,0°C)

1,20-1,36 (1H, m), 1,41-1,7(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)

20 La temperatura de lo alto del pico de la endoterma en DSC: 118°C y 235°C

La Figura 20 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 4.

### 25 Ejemplo 5

#### *Preparación de bencenosulfonato de Compuesto A (1)*

30 A una solución de base libre de Compuesto A (2,69 g) en 40 ml de EtOAc, se añadieron 1,31 g de ácido bencenosulfónico monohidratado, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. El precipitado resultante se recogió por filtración. A una suspensión del precipitado en 30 ml de 2-butanona se añadieron 0,35 ml de agua. La mezcla resultante se calentó hasta disolverse. Después de enfriar a temperatura ambiente, se agitó la mezcla durante 60 horas. Los cristales resultantes se recogieron por filtración para dar 2,49 g del compuesto del título como cristales blancos.

35

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>, 70°C)

3,66 (1H, dd, J = 13,6, 8,4 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), 7,11-7,35 (12H, m), 7,59-7,64(2H, m), 9,39 (1H, s ancho)

40

Temperatura de lo alto del pico de la endoterma en DSC: 178°C

La Figura 21 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 5.

45

### Ejemplo 5-1

#### *Preparación de bencenosulfonato del Compuesto A (2)*

50

A una solución de base libre de compuesto A (7,00 g) en 70 ml de acetona, se añadieron 3,40 g de ácido bencenosulfónico monohidratado y 70 ml de éter terc-butil metílico, y la mezcla se agitó con agitador mecánico a temperatura ambiente durante 9 horas. Se recogió el precipitado resultante por filtración para obtener 8,10 g del compuesto del título en forma de cristales blancos,

55

El espectro <sup>1</sup>H-RMN del producto era idéntico al del Ejemplo 5, pero la DSC y el modelo de difracción de rayos X del polvo sugerían que los productos del Ejemplo 5 y Ejemplo 5-1 mostraban polimorfismo cristalino.

Temperatura del alto del pico de la endoterma en DSC: 170°C.

60

La Figura 22 muestra un modelo de difracción de rayos X del compuesto en el Ejemplo 5-1.

65

## ES 2 306 030 T3

### Ejemplo 6

#### *Preparación de ciclohexanosulfamato de Compuesto A*

5 A una solución de base libre de Compuesto A (500 mg) en 5 ml de 2-PrOH se añadieron 494 mg de ácido ciclohexanosulfámico y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 13 horas. Los precipitados resultantes se recogieron por filtración para dar 550 mg del compuesto del título como cristales blancos.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>: 70°C)

10

1,00-1,35 (1 OH, m), 1,46-2,08 (14H, m), 2,23 (1H, s ancho), 2,77-3,30 (11 H, 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)

15

Temperatura de la parte alta del pico de endoterma en DSC: 127 y 170°C.

La Figura 23 muestra un modelo de difracción de rayos X de polvo del compuesto del Ejemplo 6.

### 20 Ejemplo 7

#### *Preparación de hidrobromuro de Compuesto A*

25 A una solución de base libre de Compuesto A (200 mg) en 1,0 ml de EtOH se añadieron 95 mg de ácido bromhídrico al 47%. A la mezcla de reacción, se añadieron 1,1 ml de éter diisopropílico, agitando al mismo tiempo, y la mezcla resultante se agitó a 5°C durante 18 horas. Los precipitados obtenidos se recogieron por filtración para dar 165 mg del compuesto del título en forma de cristales blancos.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>: 70°C)

30

1,65-1,98 (4H, m), 2,24(1H, s ancho), 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, 8,4Hz), 3,91 (1H, 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, s ancho)

35

Análisis elemental:

Calculado para C<sub>23</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.HBr: C, 62,31, H, 6,14, N, 6,32, Br, 18,02

Encontrado: C, 62,04, H, 6,10, N, 6,04, Br, 17,73

40

Temperatura del alto del pico de la endoterma en DSC: 199°C

La Figura 24 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 7.

45

### Ejemplo 8

#### *Preparación de naftalen-2-sulfonato del Compuesto A*

50 A una solución de base libre del Compuesto A (100 mg) en 1,0 ml de EtOH se añadieron 65 mg de ácido naftaleno-2-sulfónico hidratado y la mezcla se agitó durante 26 horas. Los cristales resultantes se recogieron por filtración para dar 79 mg del compuesto del título en forma de cristales ligeramente grises.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>: 70°C)

55

1,65-2,00 (4H, m), 2,24(1H, s ancho), 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, 8,8Hz), 3,90 (1H, dt, J=12,8, 5,6 Hz), 4,97 (1H, dt, J= 8,8, 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, 1,6Hz), 7,82 (1H, d, J=8,0Hz), 7,85-7,95 (2H, m), 8,14 (1H, s), 9,35 (1H, s ancho)

60

Temperatura del alto del pico de la endoterma en DSC: 178°C

La Figura 25 muestra un modelo de difracción de rayos X del compuesto del Ejemplo 8.

65

## ES 2 306 030 T3

### Ejemplo 9

#### *Preparación de sebacato del Compuesto A*

5 A una solución de base libre de Compuesto A (300 mg) en 1,0 ml de EtOH se añadieron 171 mg de ácido sebácico y la mezcla se agitó durante 3 horas. Los cristales resultantes se recogieron por filtración y se lavaron con etanol para dar 165 mg del compuesto del título.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>: 26,1°C)

10 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, s ancho), 6,24 (1H, s ancho), 7,12-7,26 (10 H, m).

Temperatura del alto del pico de la endoterma de la DSC: 127°C

15 La Figura 26 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 9.

### Ejemplo 10

#### *Preparación de (+)-canfor-10-sulfonato de Compuesto A*

A una solución de base libre del Compuesto A (200 mg) en 2,0 ml de acetona se añadieron 138 mg de ácido (+)-canfor-10-sulfónico y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 5 horas. Los precipitados resultantes se recogieron por filtración para dar 191 mg del compuesto del título en forma de cristales blancos.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>: 70°C)

30 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 (1H, dt, J=13,2, 5,6 Hz), 4,97 (1H, dt, J=8,8, 4,4Hz), 6,25 (1H, s), 7,11-7,35 (9H, m), 9,44 (1H, s ancho).

Temperatura del alto del pico de la endoterma en DSC: 198°C

35 La Figura 27 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 10.

### Ejemplo 11

#### *Preparación de p-toluensulfonato de Compuesto A*

A una solución de base libre de Compuesto A (200 mg) en una mezcla de 1,5 ml de acetona y 9,5 ml de éter terc-butílico se añadieron 105 mg de monohidrato de ácido p-toluensulfónico y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. Se recogió el precipitado resultante por filtración para dar 83 mg del compuesto del título como cristales blancos.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>: 26,1°C)

50 1,65-2,00 (4H, m), 2,24(1H, s ancho), 2,28 (3H, s), 2,76-2,96 (2H, m), 3,05-3,30 (5H, m), 3,44 (1H, ddd, J = 13,6, 8,0, 5,0Hz), 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, s ancho)

Temperatura del alto del pico de la endoterma de la DSC: 150°C

55 La Figura 28 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 11.

### Ejemplo 12

#### *Preparación de etanosulfonato de Compuesto A*

A una solución de base libre de Compuesto A (100 mg) en 1,0 ml de 2-butanona se añadieron 31 mg de ácido etanosulfónico y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 6,5 horas. Se recogió el precipitado resultante por filtración para dar 95 mg del compuesto del título como cristales blancos.

65 <sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>: 70°C)

## ES 2 306 030 T3

1,07 (3H, t, J=7,6 Hz), 1,62-2,10(4H, m), 2,24 (1H, s ancho), 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, m), 6,25 (1H, s), 7,10-7,35 (9H, m), 9,51 (1H, s ancho)

5 Temperatura del alto del pico de la endoterma en DSC: 233°C

La Figura 29 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 12.

10 Ejemplo 13

### *Preparación de metanosulfonato de Compuesto A*

15 A una solución de base libre de Compuesto A (200 mg) en 1,0 ml de 2-butanona se añadió una solución de 53 mg de ácido metanosulfónico en 1,0 ml de iPrOAc y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 horas. Se recogió el precipitado resultante por filtración para dar 187 mg del compuesto del título como cristales blancos.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>: 70°C)

20 1,62-2,02(4H, m), 2,24 (1H, s ancho), 2,30 (3H, s), 2,76-2,96 (2H, m), 3,00, 3,34 (5H, m), 3,4 4 (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, m), 7,08-7,36 (9H, m), 9,37 (1H, s ancho)

Temperatura del alto del pico de la endoterma en DSC: 178°C

25

La Figura 30 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 13.

Ejemplo 14

30

### *Preparación de metil fosfato de Compuesto A*

35 A una solución de base libre de Compuesto A (200 mg) en 2,0 ml de EtOAc y 0,5 ml de 2-butanona se añadieron 98 mg de fosfato de metilo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 22 horas. Se recogió el precipitado resultante por filtración para dar 124 mg del compuesto del título como cristales blancos.

<sup>1</sup>H-RMN (DMSO-d<sub>6</sub>: 70°C)

40 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)

Temperatura del alto del pico de la endoterma en DSC: 185°C

45 La Figura 31 muestra un modelo de difracción de rayos X del polvo del compuesto del Ejemplo 14.

El efecto de la sal de adición de ácido de Compuesto A de la invención se confirmó con los siguientes Ejemplos de ensayo.

50 Ejemplo de ensayo 1

### *Evaluación de la higroscopicidad*

55 Se colocó una muestra (aproximadamente 5 mg) en un soporte de cuarzo hecho a propósito, y el peso de muestra se determinó a la respectiva humedad de manera continua y se registró en las siguientes condiciones. El aparato que incluía procesado de datos se hizo funcionar siguiendo el método y procedimiento indicado en cada dispositivo. (Aparato: dispositivo de medida de la adsorción dinámica de vapor DVS Advantage, fabricado por SMS).

60 *Condiciones*

Temperatura de medida: 25°C; no se midió antes de secar; humedad al principio: 5% HR, humedad máxima: 95% de humedad relativa al final de la etapa de HR de 5%: 5% HR; patrón de equilibrio: 0,03% en peso en 5 minutos; tiempo máximo de equilibrado; 180 minutos, intervalo de toma de muestras: 20 segundos; intervalo de registro de 65 datos: 1 minuto.

## ES 2 306 030 T3

Los diagramas obtenidos en estos ensayos se muestran en la Figura 1 a Figura 14. El cambio de peso dentro del intervalo de condiciones de medida se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

5

10

15

20

25

Compuesto ensayado	Cambio de peso (%)	Compuesto ensayado	Cambio de peso (%)
Ejemplo 1	< 1	Ejemplo 8	< 4
Ejemplo 2	< 1	Ejemplo 9	< 1
Ejemplo 3	< 1	Ejemplo 10	< 2
Ejemplo 4	< 2	Ejemplo 11	< 6
Ejemplo 5	< 1	Ejemplo 12	< 5
Ejemplo 5-1	< 1	Ejemplo 13	< 25
Ejemplo 6	< 3	Ejemplo 14	< 11
Ejemplo 7	< 4	Ejemplo 2 de referencia	> 35 (delicuescente)

30 Como se muestra en la Figura 1 y en la Tabla 1, el hidrocloreto del Compuesto, que es un compuesto conocido, comenzó rápidamente a captar humedad a aproximadamente 65% de humedad relativa y la absorción de humedad se reconoció en la ganancia de peso de 15% o más a 75% o más de humedad relativa. El cambio de peso excedió el 35% dentro del intervalo de condiciones de medida, es decir, 5-95% de humedad relativa, y este cambio iba acompañado de delicuescencia. Por otra parte se confirmó, como se muestra en la Figura 2 a Figura 16 y Tabla 1, que las sales de adición de ácido del Compuesto A de la invención tenían higroscopicidad mejorada en comparación con el hidrocloreto del Compuesto A conocido y tenían propiedades mucho mejores como fármacos o ingredientes de fármacos.

35

Ejemplo 2 de ensayo

40 *Evaluación de estabilidad (I)*

Se pesó una muestra (aproximadamente 0,5 mg) en un vial de vidrio y se aplicó a un ensayo de degradación forzada en las siguientes condiciones de almacenamiento.

45

Condición 1: 120°C-cerrado herméticamente - 24 horas

Condición 2: 25°C - humedad relativa 93% - abierto - 5 días

50

Condición 3 - 25°C - irradiado con NUV (rayos ultravioletas cercanos)- cerrado herméticamente - 5 días

55 Se disolvió una muestra, después del almacenamiento, en 1 ml de MeOH y se utilizó en una solución de muestra. La solución de muestra se diluyó 100 veces con MeOH y se utilizó como solución patrón. Las impurezas contenidas en la solución de muestra se analizaron cuantitativamente utilizando la solución patrón. En esta determinación, el aparato que incluía procesado de datos se hizo trabajar según el método y procedimiento indicado en cada dispositivo. (Aparato: LC-MSD serie 1100, fabricado por Agilent).

60

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 2.

65

## ES 2 306 030 T3

TABLA 2

	Impurezas antes del almacenamiento	Cambio de la cantidad de impurezas antes del almacenamiento (%)			
		Condición 1	Condición 2	Condición 3	
5					
10	Ejemplo 1	1,5	0,2	-0,1	-0,3
	Ejemplo 2	0,0	0,2	0,1	0,0
	Ejemplo 3	0,0	2,3	0,1	0,0
15	Ejemplo 4	1,9	50,8	0,3	-0,3
	Ejemplo 5	1,6	0,3	0,1	-0,1
	Ejemplo 5-1	1,8	-0,1	0,0	0,2
20	Ejemplo 6	1,4	8,1	0,0	0,1
	Ejemplo 7	0,5	-0,2	0,2	0,3
25	Ejemplo 8	2,0	1,3	0,2	2,6
	Ejemplo 9	3,7	-0,3	0,2	-0,8
	Ejemplo 10	0,9	0,0	0,0	0,0
30	Ejemplo 11	0,5	-0,1	0,1	0,0
	Ejemplo 12	1,4	-0,2	-0,1	-0,1
35	Ejemplo 2 de referencia	0,1	0,2	3,8	2,0

Ejemplo 3 de ensayo

*Evaluación de la estabilidad (2)*

Se pesó una muestra (aproximadamente 5 mg) en un matraz de medida de vidrio de 10 ml y se aplicó a un ensayo de tensión en las condiciones de almacenamiento.

Condición 1: 5°C - protegido de la luz - cerrado herméticamente

Condición 2: 40°C- humedad relativa 75% - abierto

Condición 3: 60° C- protegido de la luz - herméticamente cerrado

Condición 4: 80°C - protegido de la luz - cerrado herméticamente

Condición 5: 25°C - D65 (1000 lux) - herméticamente cerrado

Estabilidad química. Después del almacenamiento. Se colocó MeOH en el matraz de medida que contenía la muestra hasta el nivel de la línea marcada, y la solución resultante se utilizó como solución de muestra. La solución de muestra se diluyó 100 veces con MeOH para preparar una solución patrón, que se utilizó en la determinación de las impurezas contenidas en la solución de muestra. La detección de las impurezas se llevó a cabo por UV a 210 nm. El aparato que incluía procesado de datos se hizo funcionar según el método y procedimiento indicado en cada dispositivo (Aparato: LC-MSD serie 1100, fabricado por Agilent).

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3

Condición de ensayo	Plazo	Impurezas (%)	
		Ejemplo 1	Ejemplo 2 de referencia
Condición 1	2 semanas	0,00	0,25
	1 mes	0,00	0,21
	2 meses	0,00	0,18
Condición 2	2 semanas	0,00	8,72
	1 mes	0,00	8,19
	2 meses	0,00	9,20
Condición 3	2 semanas	0,00	0,34
	1 mes	0,00	0,22
	2 meses	0,00	0,24
Condición 4	2 meses	0,00	0,43
	1 mes	0,00	0,39
	2 meses	0,00	0,47
Condición 5	2 semanas	0,00	1,73
	1 mes	0,00	2,38
	2 meses	0,00	3,68

Como se muestra en la Tabla 2 y en la Tabla 3, se ha encontrado que las impurezas se incrementan durante el almacenamiento en el hidrocloreto del Compuesto A que era un compuesto conocido. En particular, queda claro que el hidrocloreto del Compuesto A no es tan estable frente a la humedad (Condición 2 en el Ejemplo de ensayo 2 y Condición 2 en el Ejemplo de ensayo 3) y a la luz (Condición 3 en el Ejemplo de ensayo 2 y Condición 5 en el Ejemplo de ensayo 3). Por otra parte, como se muestra en la Tabla 2 y Tabla 3, se confirmó que las sales de adición de ácido de la invención no mostraban apenas incremento de impurezas, indicando con ello que eran química y físicamente muy estables en comparación con el hidrocloreto del Compuesto A conocido y que tienen mucho mejores propiedades que los fármacos o ingrediente de fármaco. Se relacionó la razón del incremento de impurezas reconocido en los compuestos del Ejemplo 4 y Ejemplo 6 con los puntos de fusión algo bajos de estos compuestos, que fundían en la Condición 1 del Ejemplo de ensayo 2 (ensayo de estabilidad al calor) o la condición mantenida estaba cerca del punto de fusión.

#### Ejemplo de ensayo 4

##### *Afinidad funcional estimada para receptores de muscarina M<sub>3</sub> en vejigas*

Según un método como el descrito por Ikeda y col. (2002, Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, vol. 366, p.97-103), se determinaron las estimaciones de afinidad funcional del compuesto de ensayo para receptores muscarínicos M<sub>3</sub> utilizando cambios en Ca<sup>2+</sup> intracelular. A continuación se escribe el método de manera abreviada.

Se aislaron células de músculo liso de vejigas de cobayas cuya epidermis había sido eliminada, se cargaron con tinte fluorescente sensible al calcio Fura2 y se suspendieron en solución tampón de Hanks libre de rojo fenol suplementada con HEPES 20 mM (pH 7,4) y albúmina de suero bovino al 0,1%. Se agitó continuamente una parte alícuota de suspensión celular (490 µl), se mantuvo a 28°C y se hizo el seguimiento para un relación de fluorescencia (500 nm) a excitación de 340 nm a la de excitación de 380 nm. A cada parte alícuota, se añadieron en serie 5 µl de soluciones de compuesto de ensayo y carbacol a intervalos de 2 minutos, y el incremento del pico en la relación por encima del nivel justo antes de la estimulación se utilizó en análisis de datos. La concentración requerida para estimulación del 50% o inhibición del 50%, es decir EC<sub>50</sub> o IC<sub>50</sub> se obtuvo por obtención de un diagrama de curva sigmoideal, se convirtieron entonces los valores IC<sub>50</sub> del compuesto de ensayo en valores Ki basados en el valor EC<sub>50</sub> de carbacol utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff.

## ES 2 306 030 T3

La Tabla 4 muestra los resultados.

TABLA 4

Compuesto ensayado	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	Ki (nM)
Ejemplo 1	2,4 ± 0,75	0,68 ± 0,21
Ejemplo 2	3,2 ± 0,97	0,82 ± 0,16
Ejemplo 3	3,8 ± 1,2	0,69 ± 0,19
Ejemplo 4	2,5 ± 0,044	0,66 ± 0,046
Ejemplo 5	1,8 ± 0,79	0,47 ± 0,12
Ejemplo 6	4,3 ± 1,2	0,84 ± 0,10
Ejemplo 7	1,8 ± 0,49	0,66 ± 0,28
Ejemplo 8	2,3 ± 0,87	0,55 ± 0,12
Ejemplo 9	2,2 ± 0,33	0,56 ± 0,48
Ejemplo 10	2,6 ± 0,42	0,65 ± 0,12
Ejemplo 11	2,2 ± 0,87	0,52 ± 0,13
Ejemplo 12	1,9 ± 0,30	0,54 ± 0,055

Como se ha mostrado antes, las sales de adición de ácido del Compuesto A de la presente invención han demostrado tener afinidad para receptores de muscarina M<sub>3</sub> suficiente para su utilización en medicina.

Ejemplo de ensayo 5

*Efectos inhibidores sobre contracción de vejiga evocada por carbacol en ratones anestesiados*

A continuación se describe el método para determinación de efectos inhibidores de los compuestos de ensayo sobre la contracción de vejiga.

Se anestesiaron ratones hembra de 30 a 35 g de peso con una dosis sub-letal (75 mg/kg, i.v.) de pentobarbital sodio y se colocaron en posición supina en una almohadilla caliente para mantener la temperatura del cuerpo. Se encanuló un catéter de polietileno (PE 10) a la vejiga a través de la uretra y se aseguró por sutura con cordón en la abertura externa de la uretra. Se insertó otro catéter en la vena femoral para inyecciones de soluciones de fármaco en un volumen de 3 ml. El catéter de la vejiga se conectó a un transductor de presión a través de una válvula de llave de tres pasos. Se vació la vejiga por drenado de la orina a través del catéter y después se distendió con aproximadamente 100 µl de solución salina fisiológica, y se midió la presión intravesical.

Después de la estabilización de la presión intravesical, se administró el agonista muscarínico carbacol (10 µg/kg) repetidamente con intervalos de 15 minutos o más. Por este medio, las contracciones de la vejiga tenían lugar de manera reproducible a lo largo de 2 horas sin deterioro de condiciones físicas. Después de obtener tres respuestas al carbacol, a la inyección del compuesto de ensayo siguió la administración de carbacol 10 minutos más tarde y este procedimiento se repitió con dosis crecientes del compuesto de ensayo. Se obtuvo, en cuatro o cinco ratones por compuesto de ensayo, el porcentaje de inhibición de media de respuestas de fármaco anteriores y se estimó la dosis de compuesto de ensayo requerida para 50% de inhibición (ID<sub>50</sub>) por análisis de regresión lineal. Los ratones que mostraban constricción rítmica de vejiga no se utilizaron para el análisis de datos.

Se obtuvieron los siguientes valores de ID<sub>50</sub>: 0,079 mg/kg para el Ejemplo 1, 0,090 mg/kg para el Ejemplo 4, 0,059 mg/kg para el Ejemplo 5, 0,050 mg/kg para el Ejemplo 7, y 0,057 mg/kg para el Ejemplo 8.

El resultado sugiere claramente que las sales de adición de ácido del Compuesto A de la presente invención tienen efectos inhibidores sobre la contracción de la vejiga inducidos por el agonista muscarínico carbacol.

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sal de adición de ácido según la reivindicación 1, donde la sal es (1R)-1-(fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo con un ácido seleccionado del grupo S consistente en
- ácido (-)-(2S,3S)-tartárico,
- ácido (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartárico,
- 10 ácido (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil) tartárico, (-)-L-fenilalanina, ácido bencenosulfónico, ácido ciclohexano-sulfámico, ácido bromhídrico, ácido naftalen-2-sulfónico, ácido sebácico, ácido (+)canfor-10-sulfónico, ácido p-to-luensulfónico, ácido etanosulfónico, ácido metanosulfónico y fosfato de metilo.
- 15 2. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es (-)-(2S,3S)-tartrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
3. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es (+)-(2S,3S)-di-O-benzoiltartrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
- 20 4. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es (+)-(2S,3S)-di-O-(4-metilbenzoil)tartrato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
- 25 5. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es (-)-L-fenilalaninato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
6. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es bencenosulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
- 30 7. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es ciclohexanosulfamato de (1R)-1-(fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
8. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es hidrobromuro de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
- 35 9. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es naftalen-2-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
- 40 10. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es sebacato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
11. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es (+)-canfor-10-sulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
- 45 12. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es p-toluensulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
13. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es etanosulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
- 50 14. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es (+)-metanosulfonato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
- 55 15. La sal de adición de ácido según la reivindicación 1 donde la sal es metil.fosfato de (1R)-1-fenil-1,2,3,4-tetrahydroquinolina-2-carboxilato de (-)-(3R)-quinuclidin-3-ilo.
16. Una composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos mencionados en la reivindicación 1 como ingrediente activo.
- 60
- 65

Figura 1

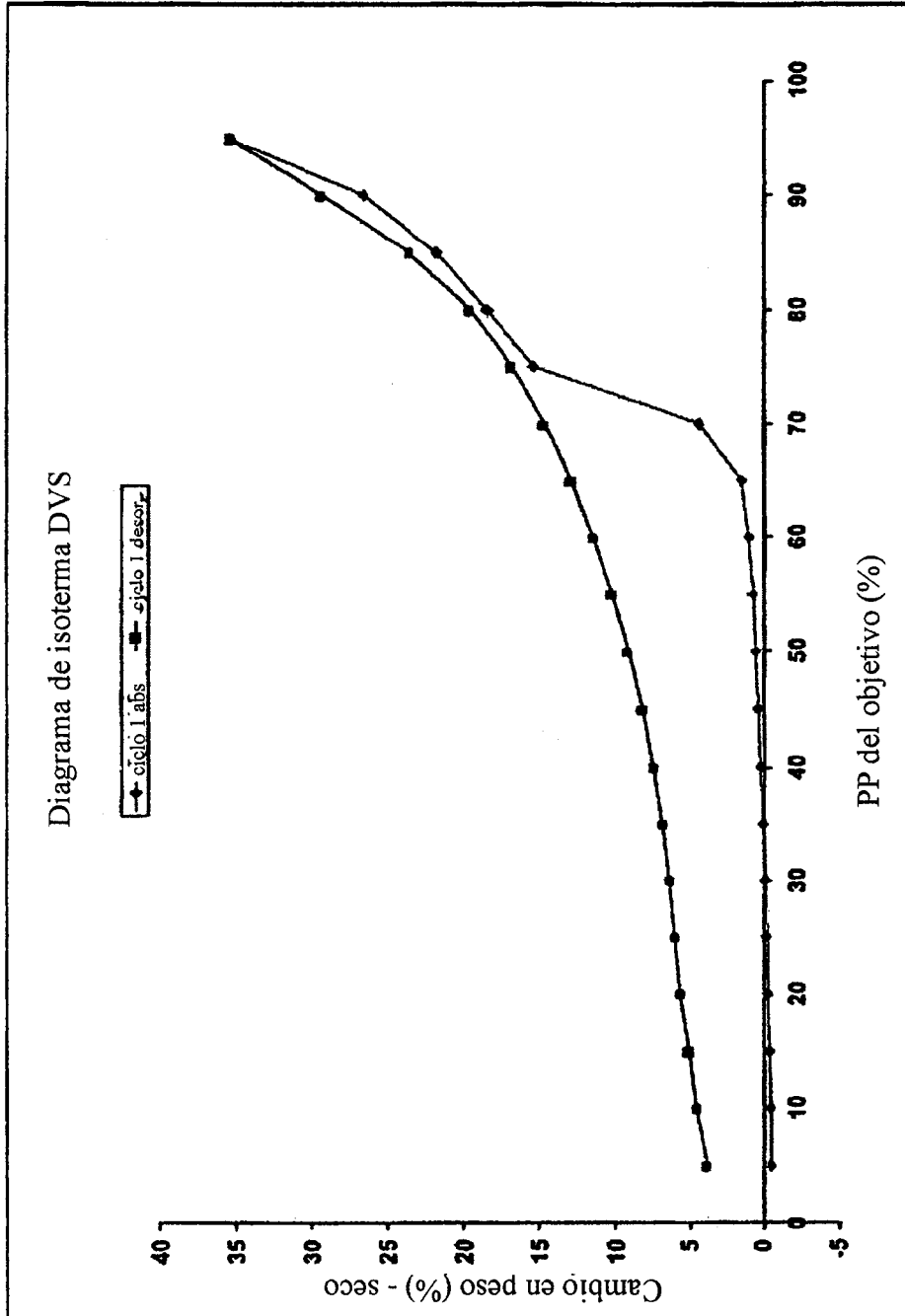


Figura 2

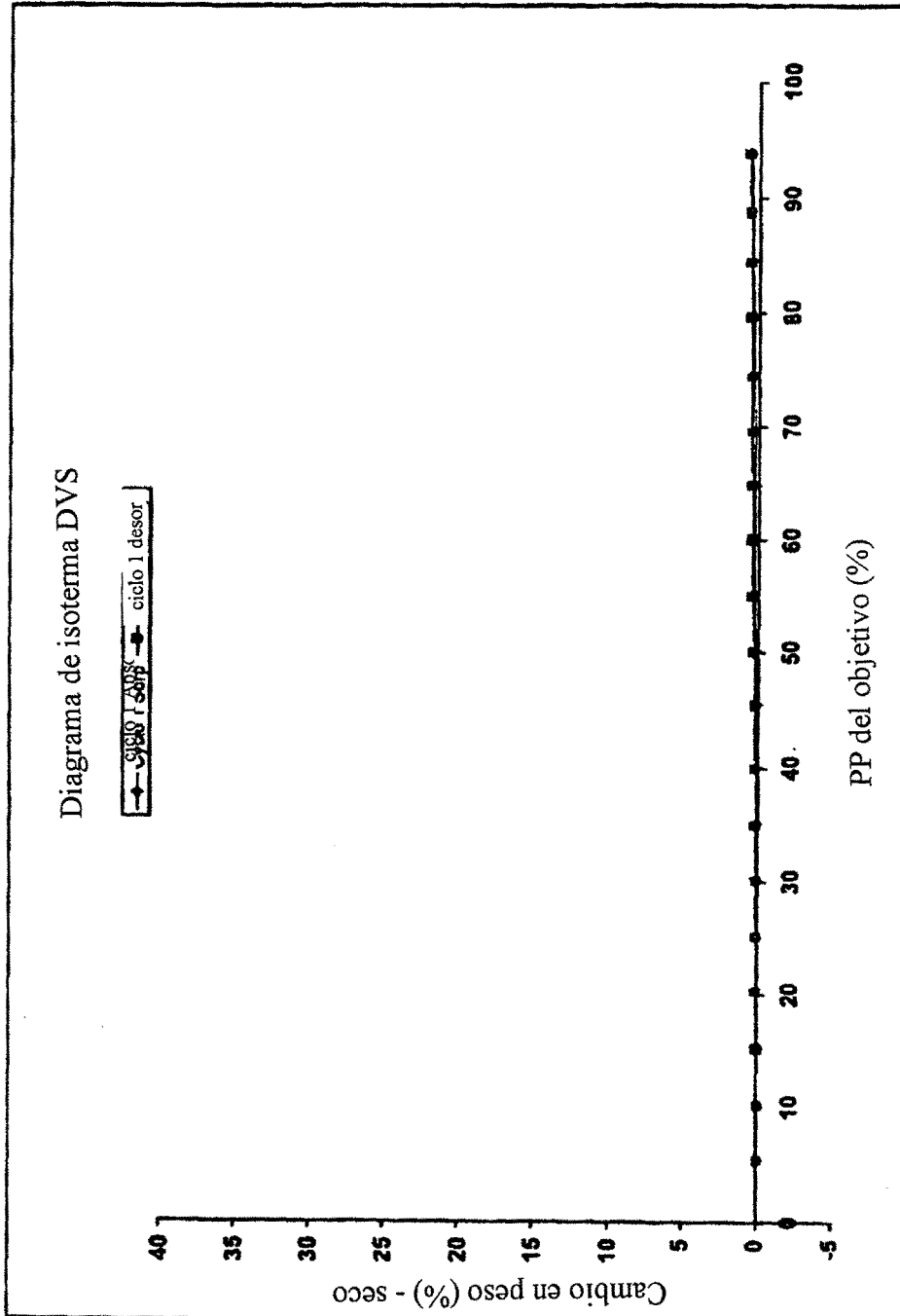


Figura 3

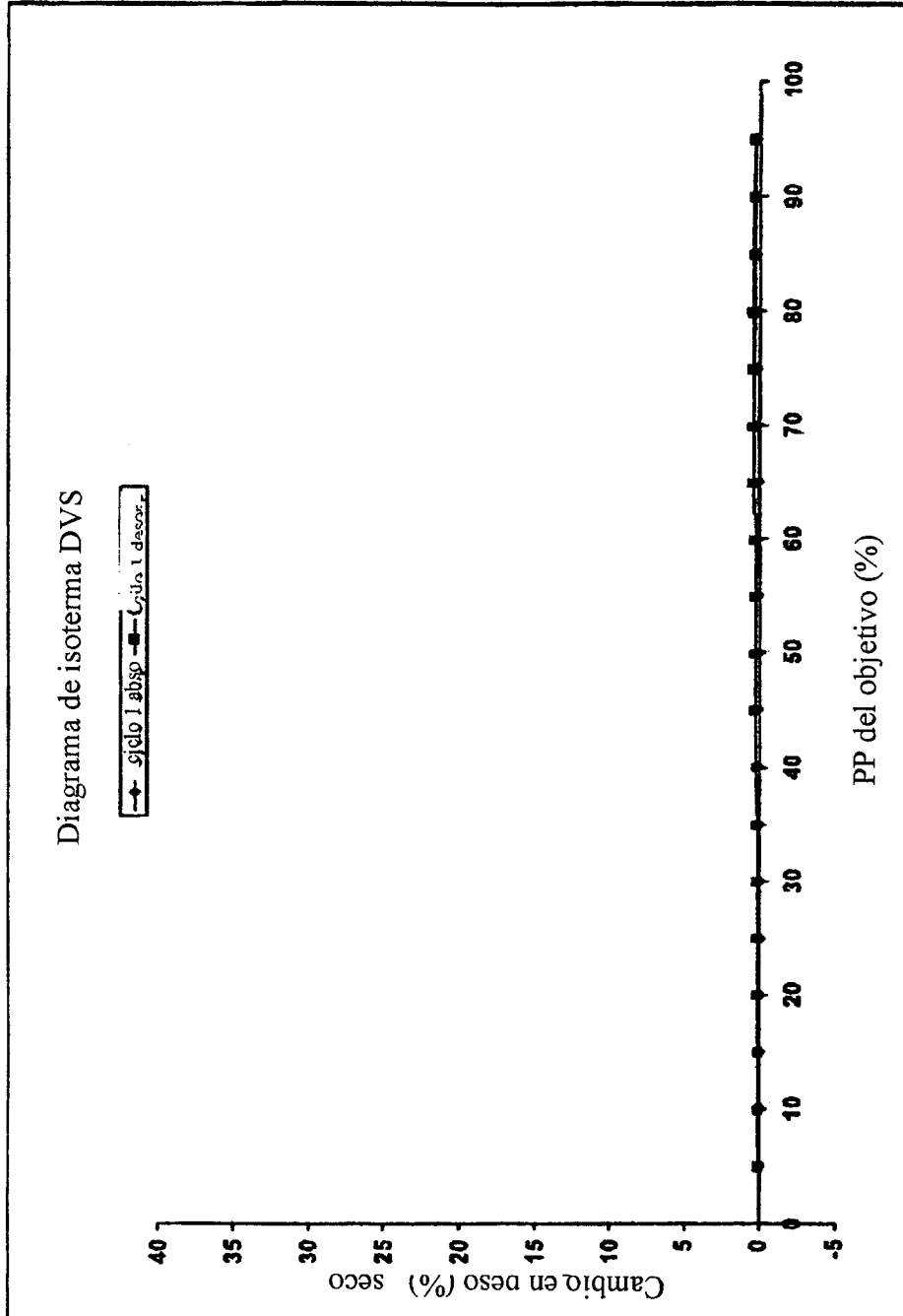


Figura 4

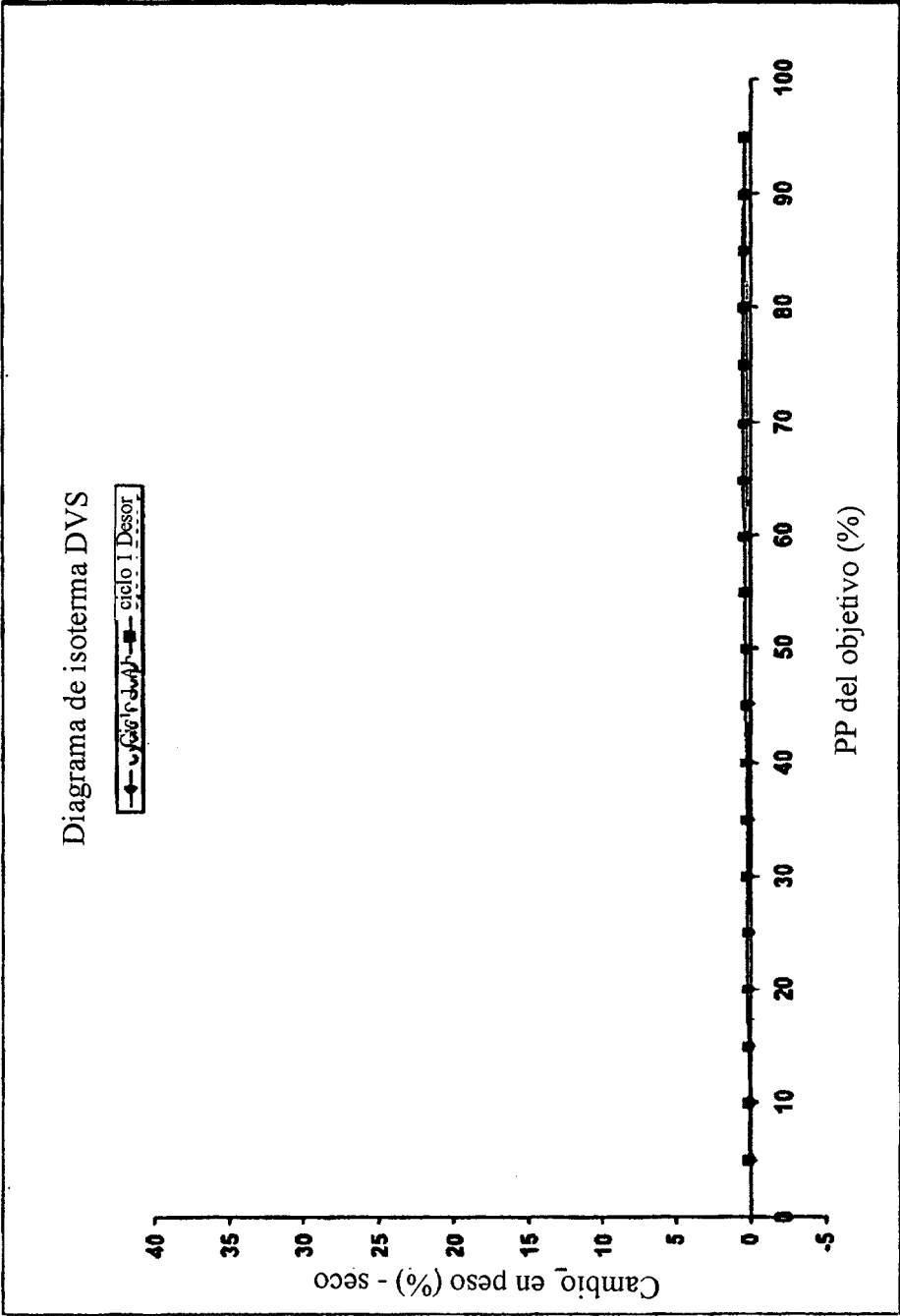


Figura 5

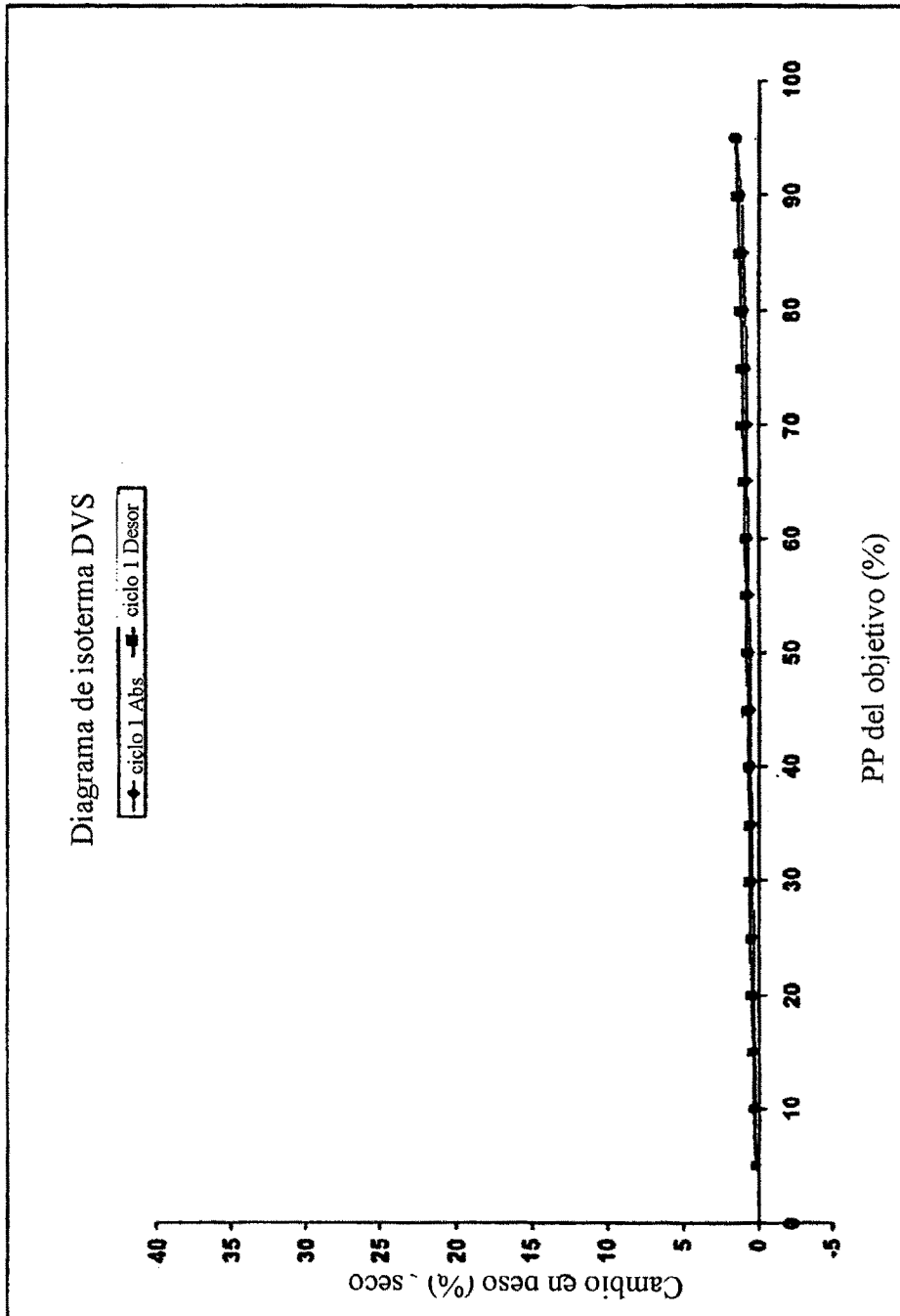


Figura 6

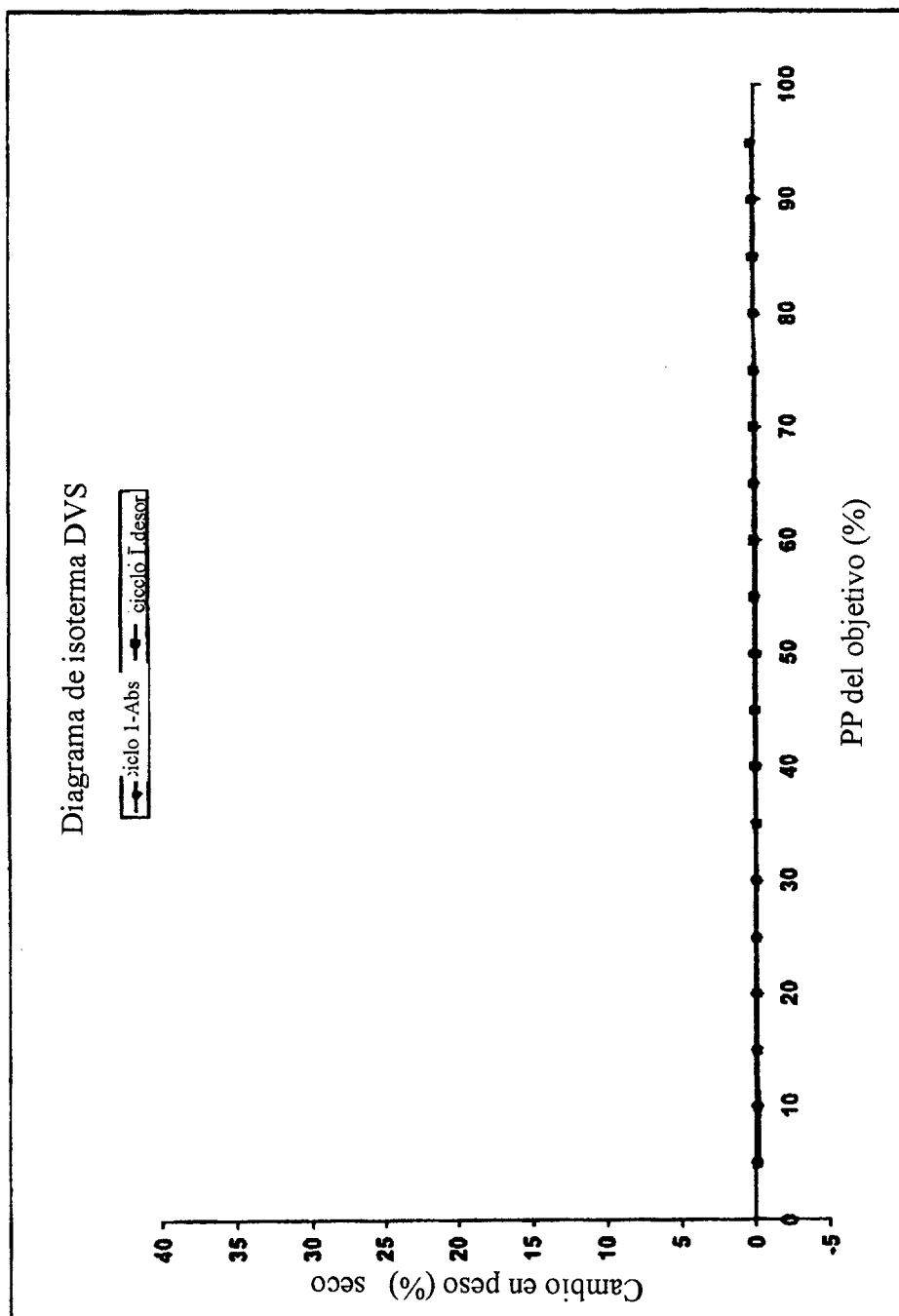


Figura 7

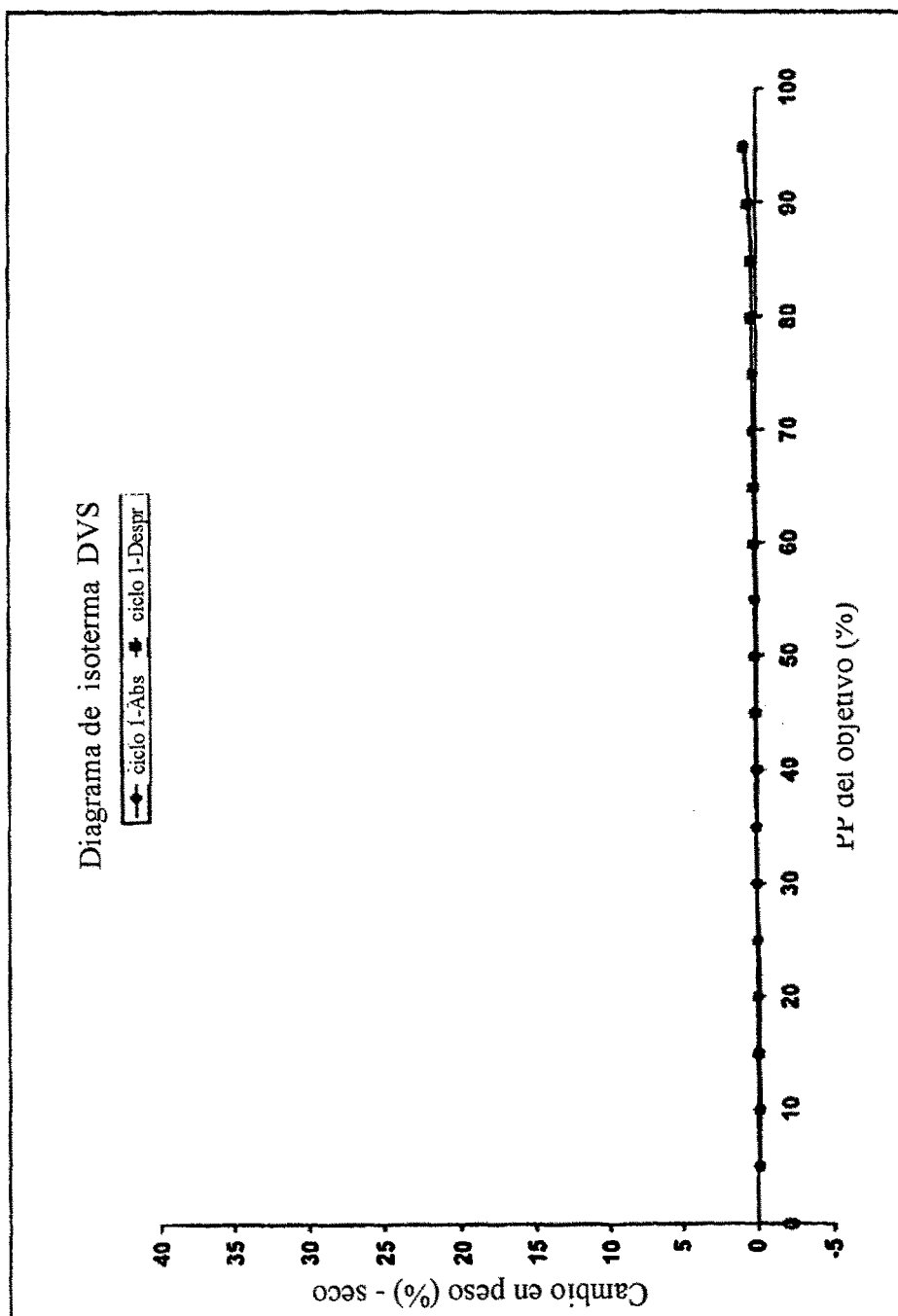


Figura 8

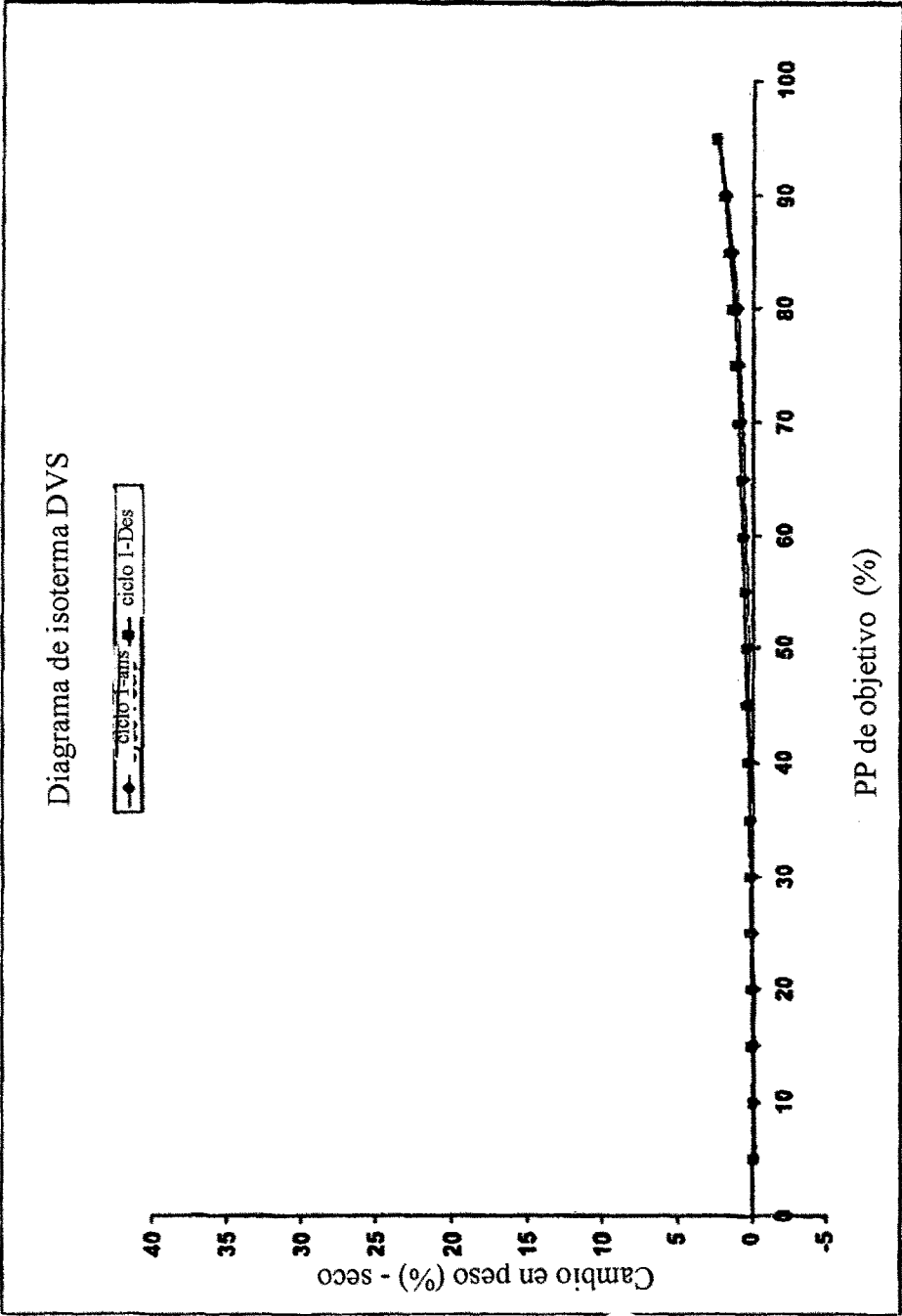


Figura 9

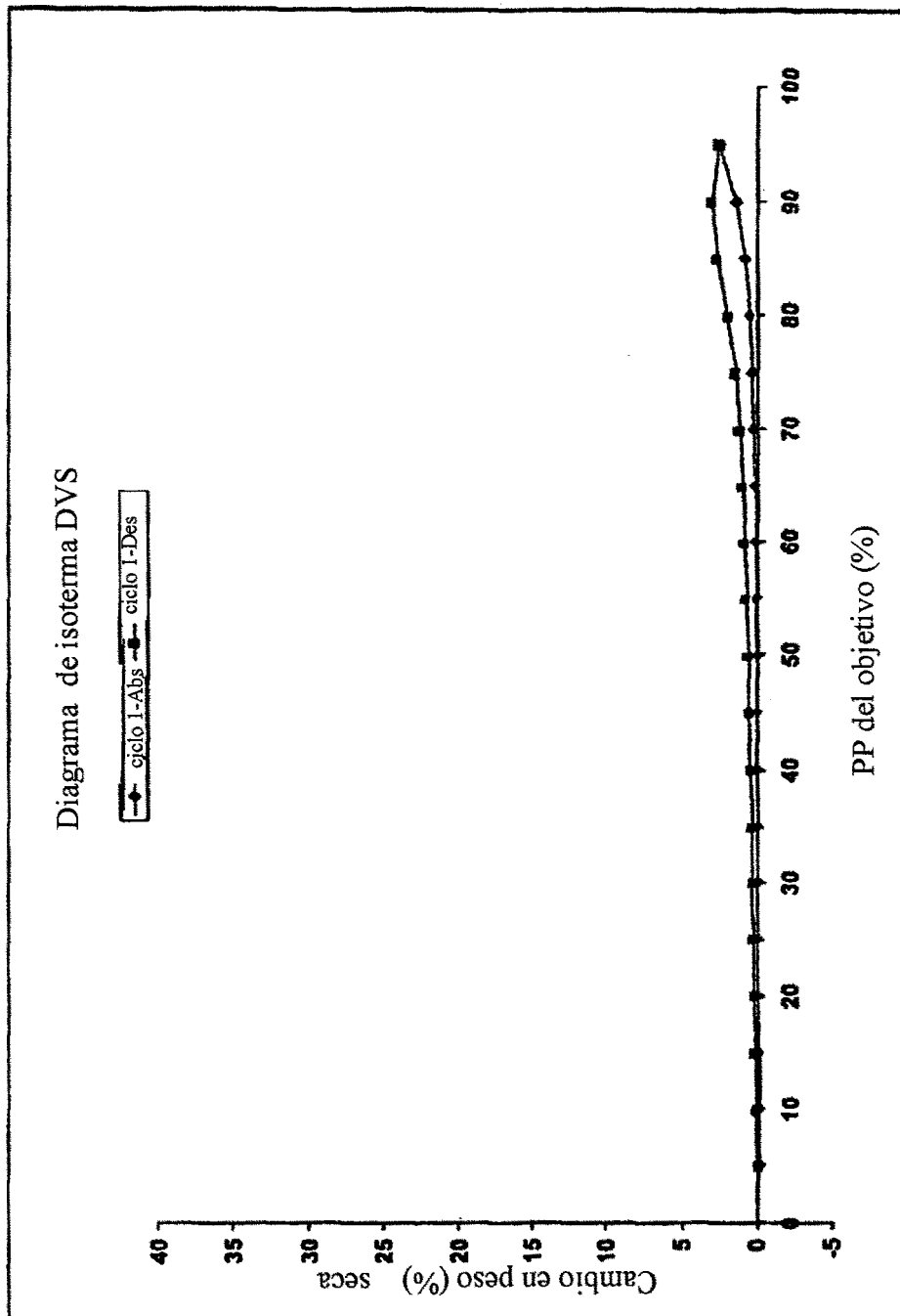


Figura 10

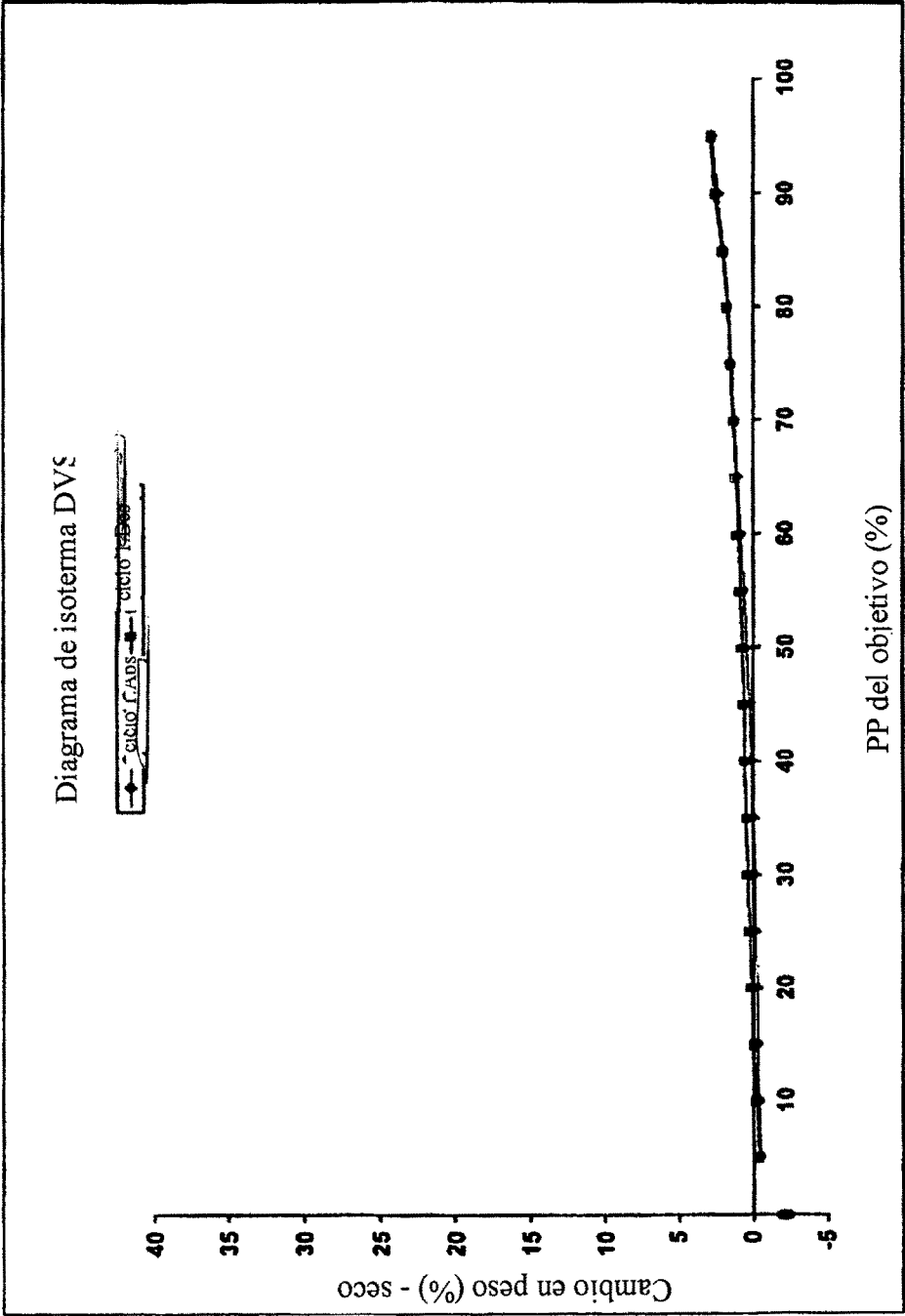


Figura 11

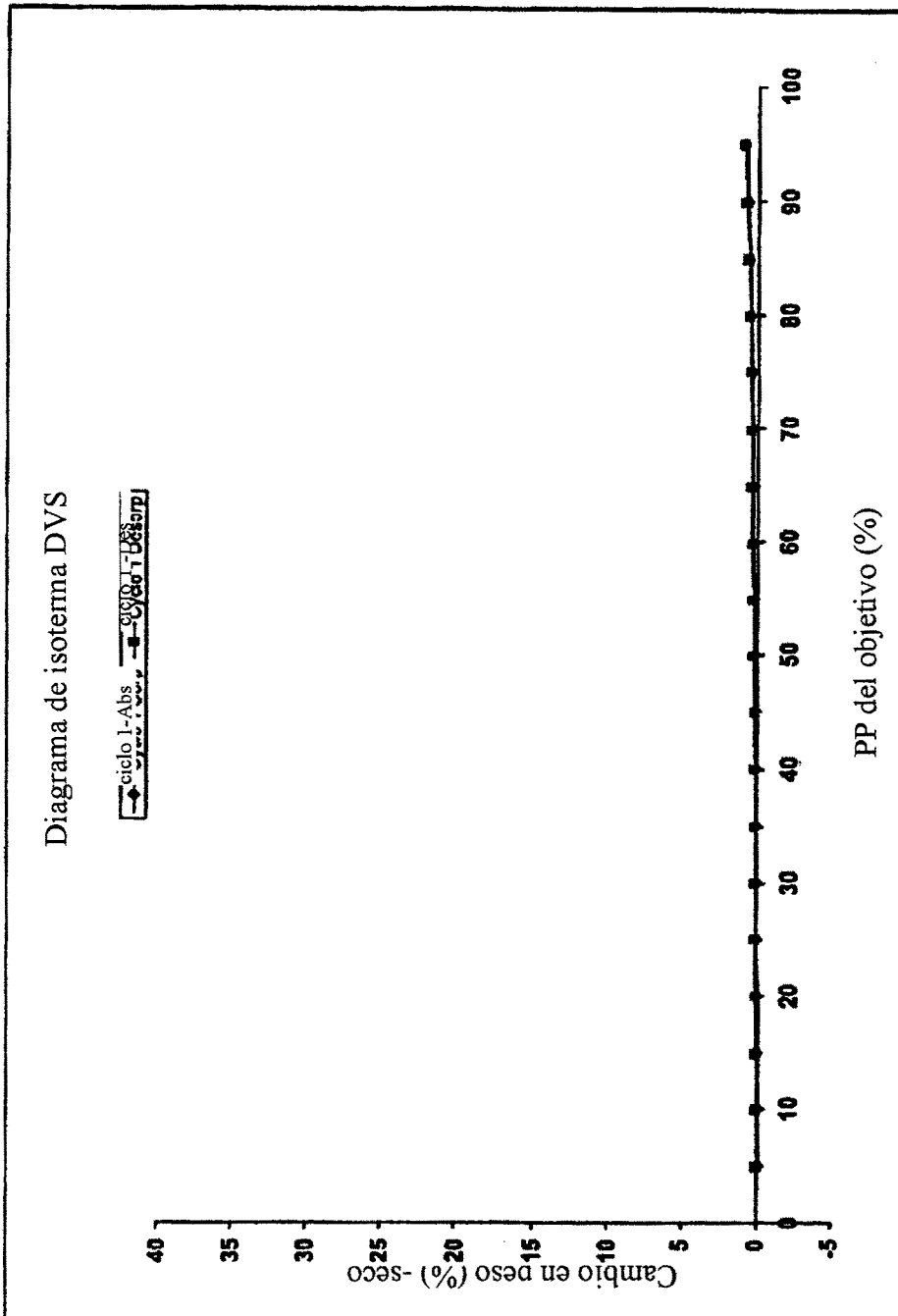


Figura 12

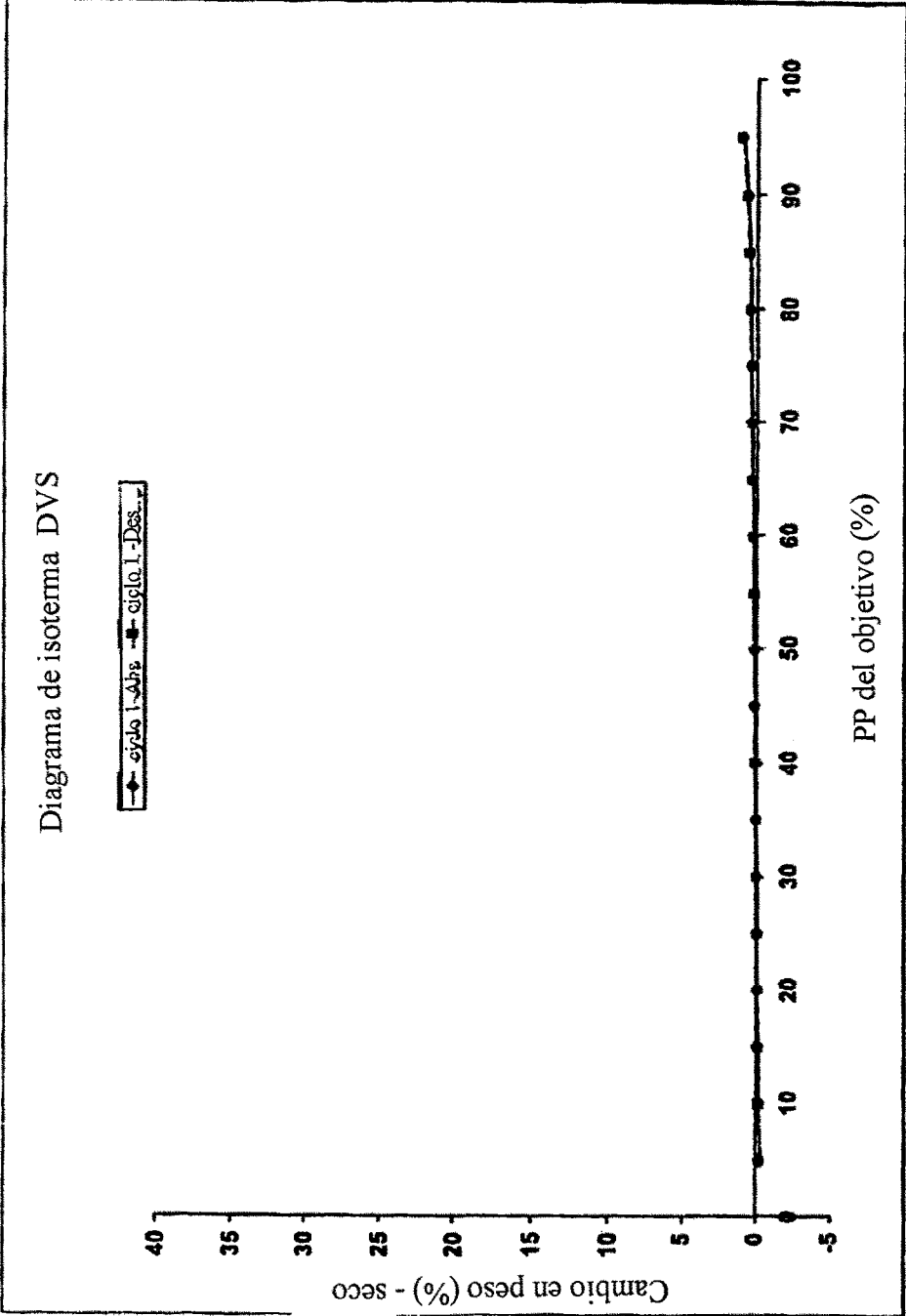


Figura 13

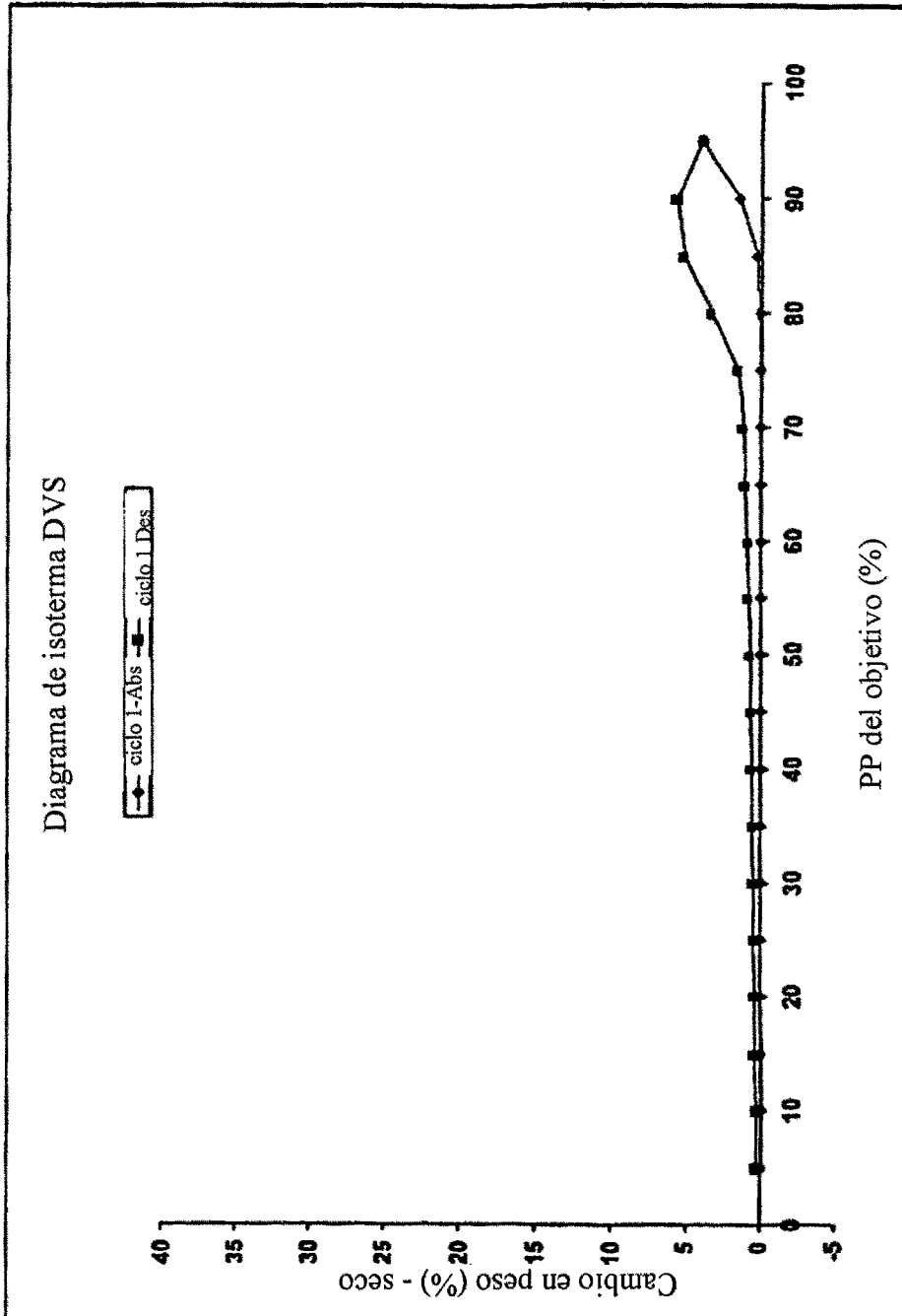


Figura 14

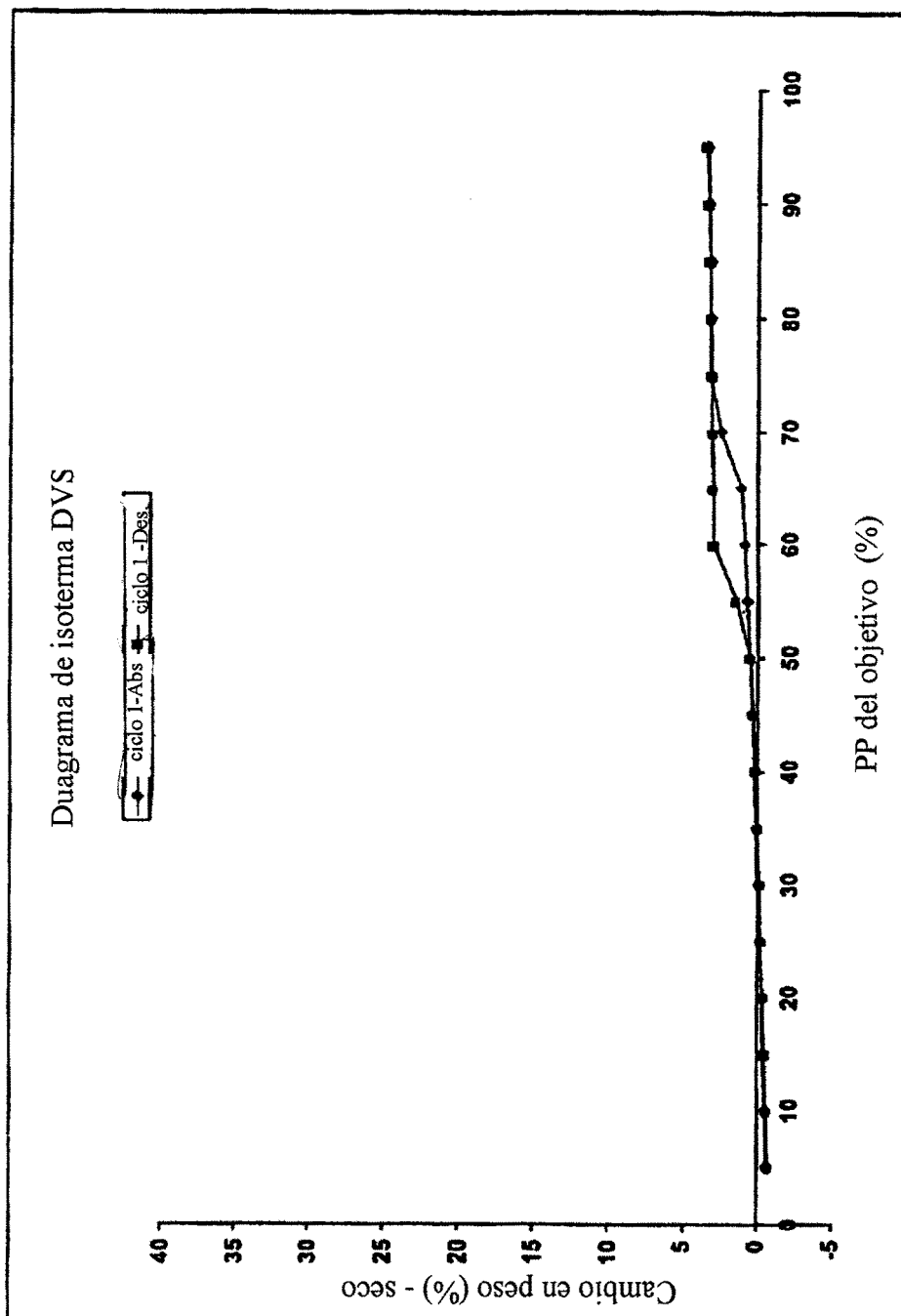


Figura 15

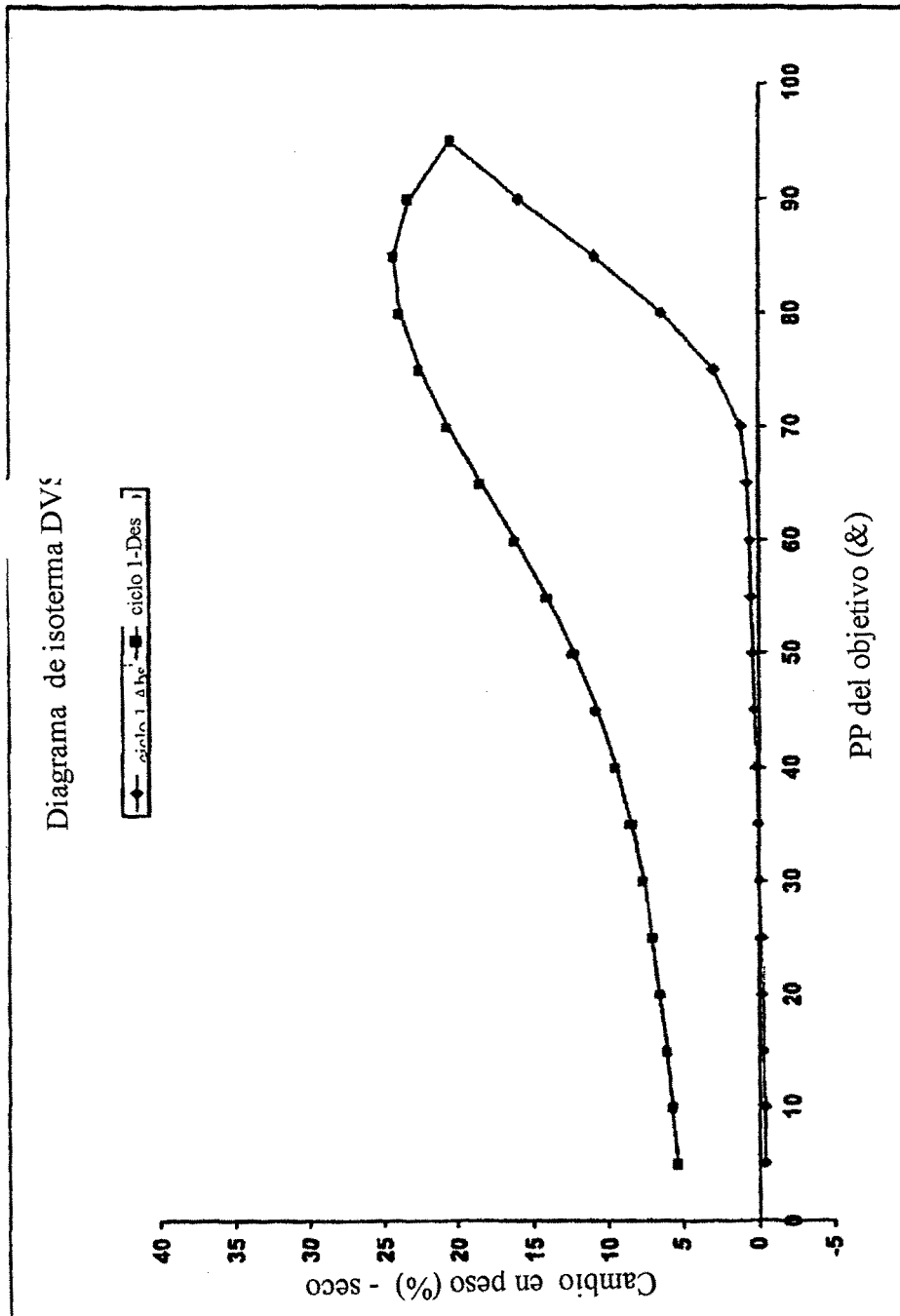


Figura 16

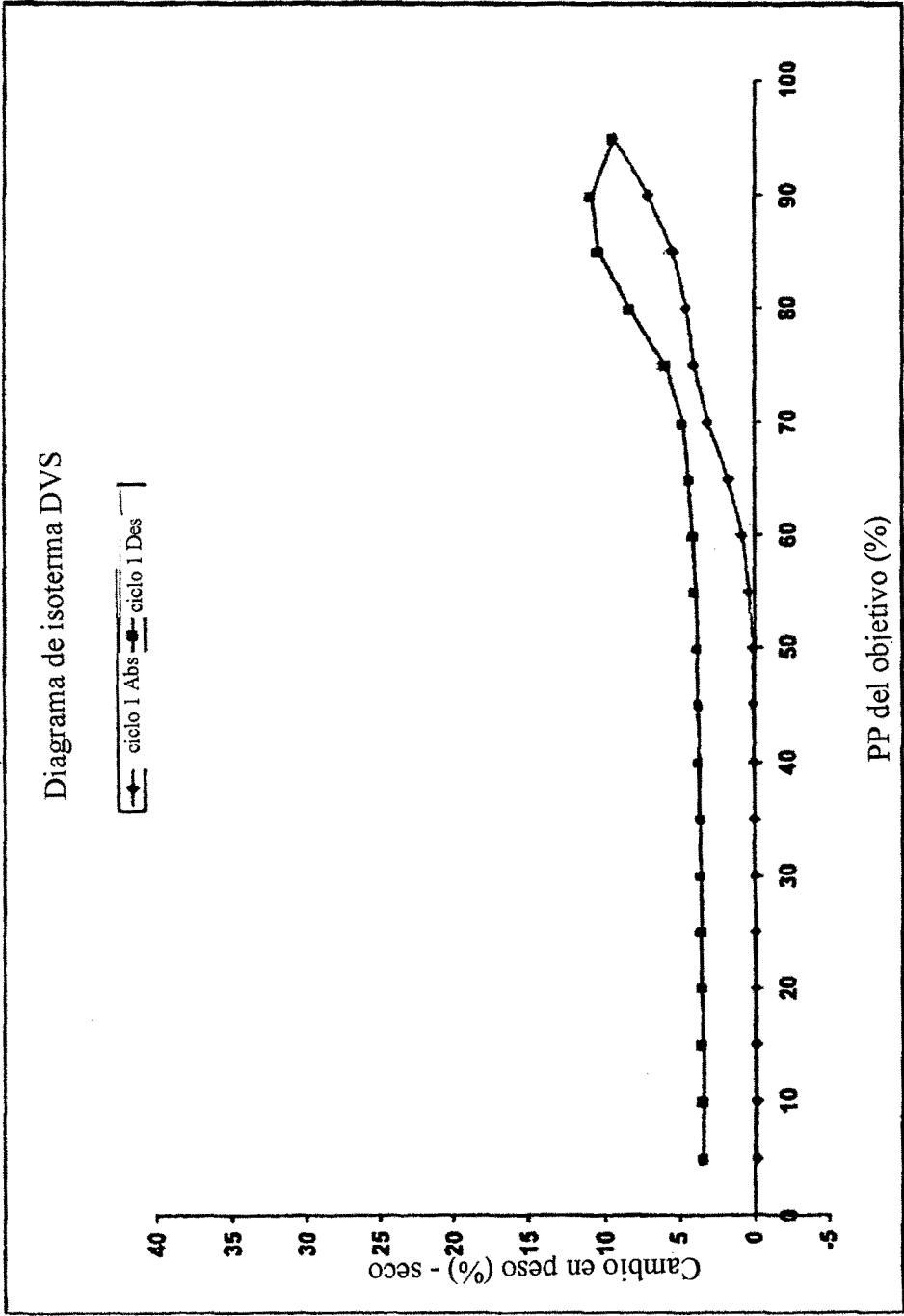
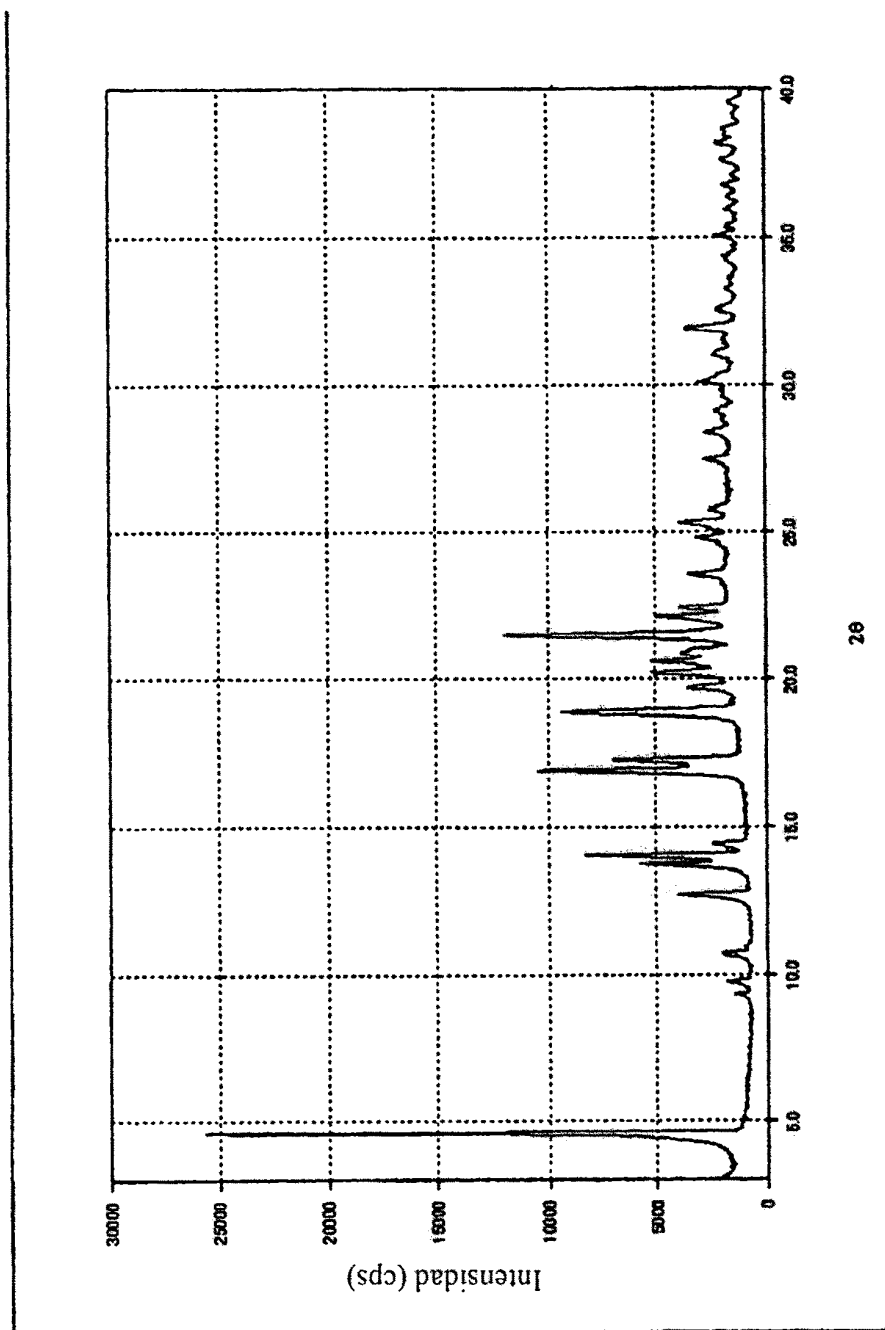


Figura 17



26

Figura 18

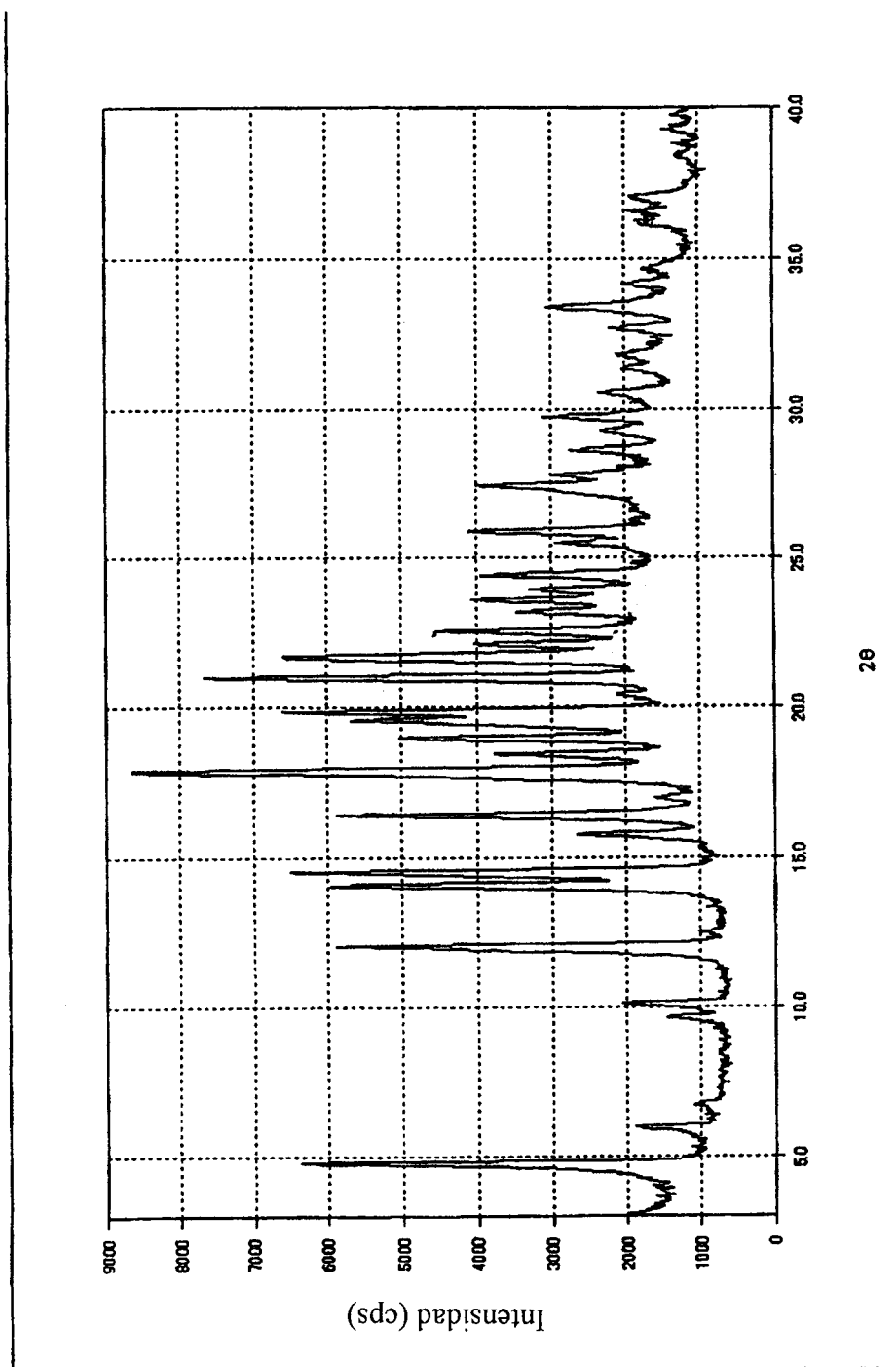


Figura 19

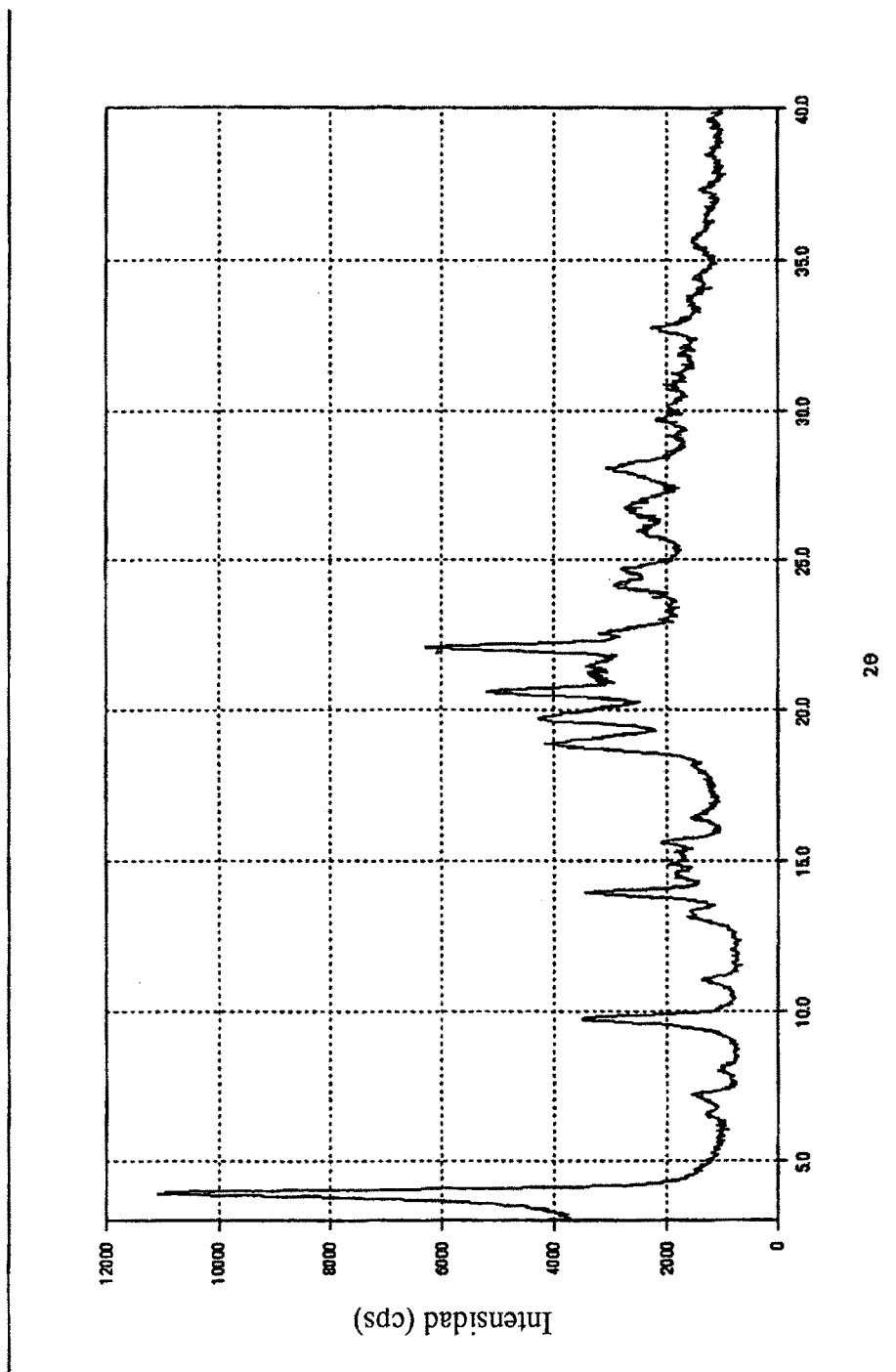


Figura 20

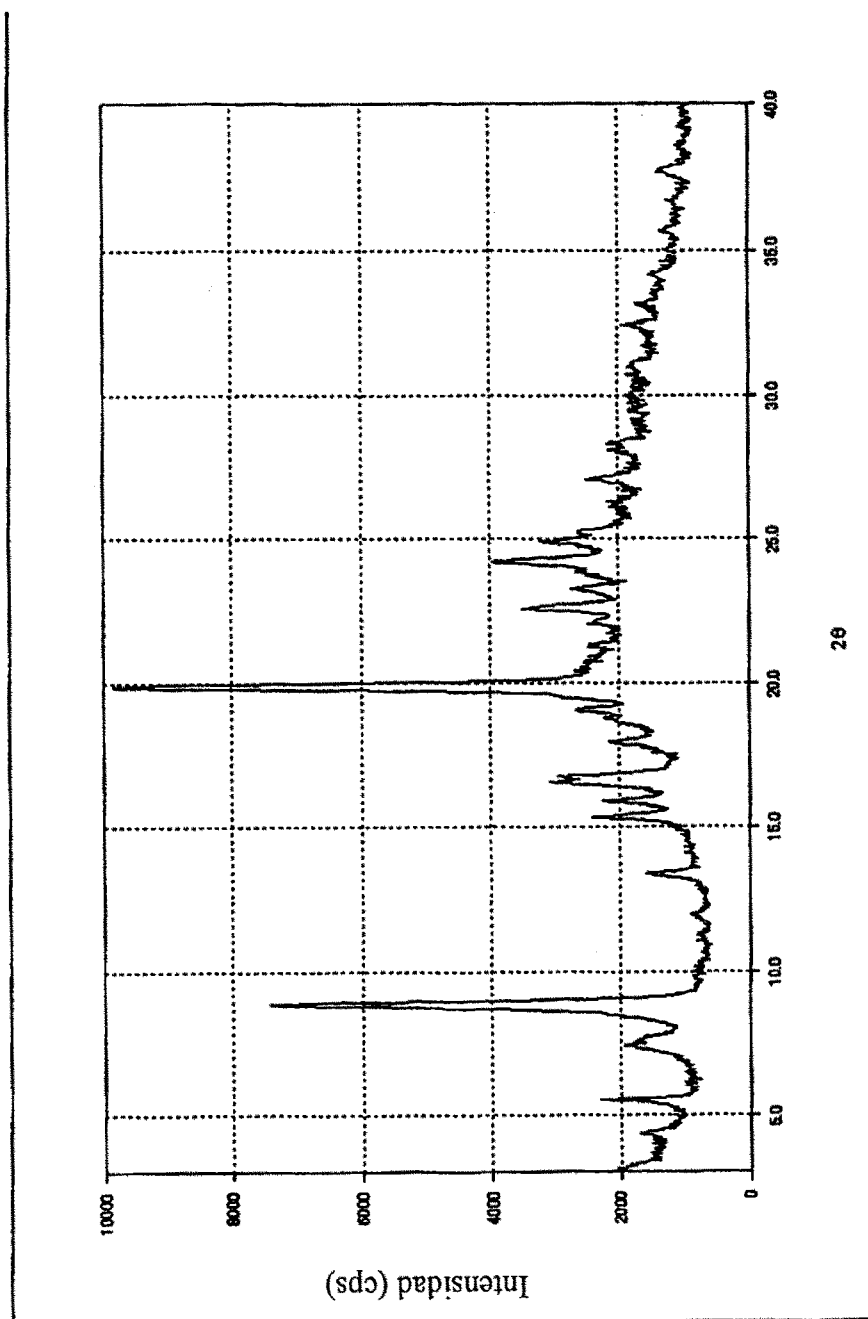


Figura 21

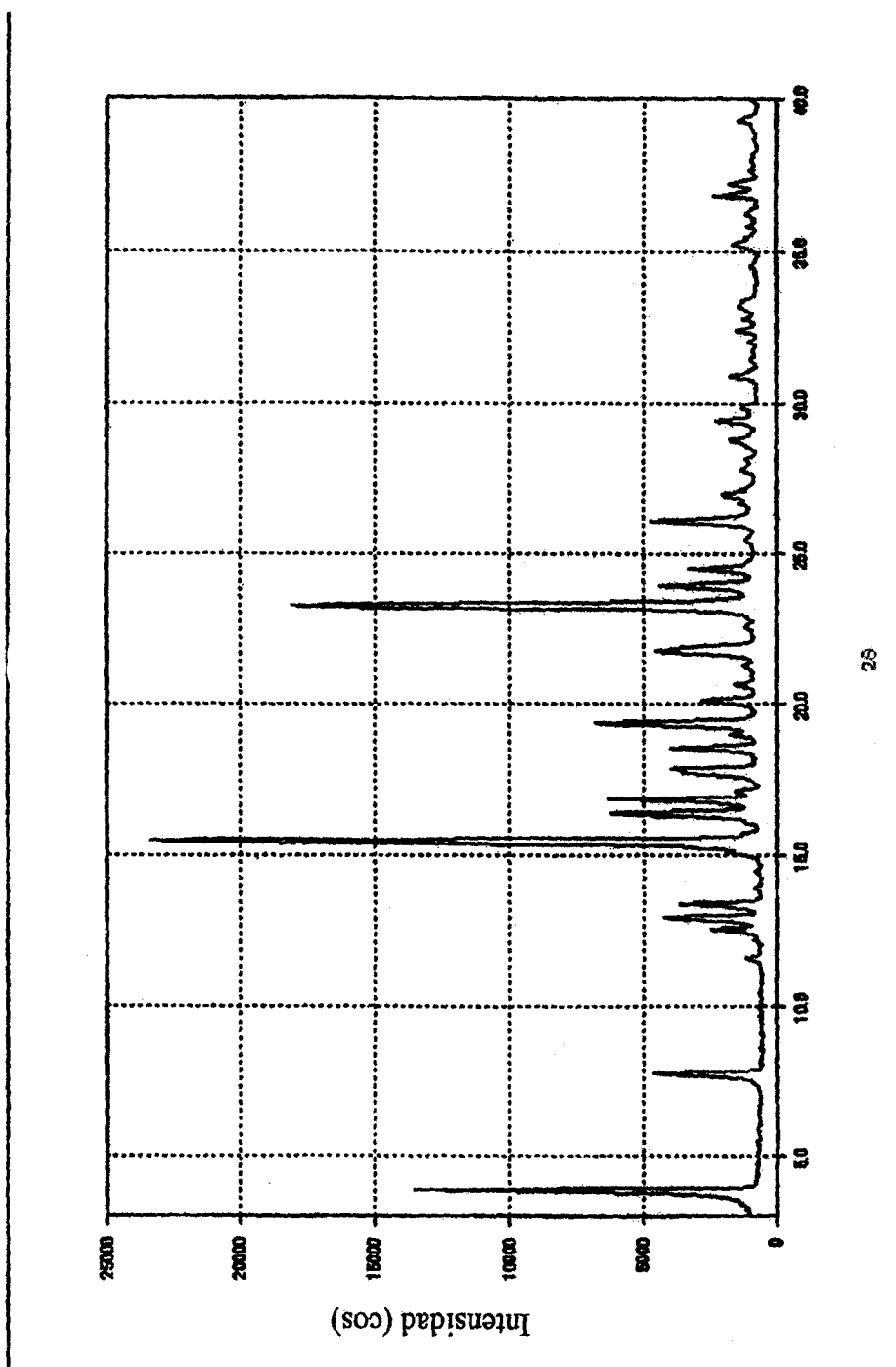


Figura 22

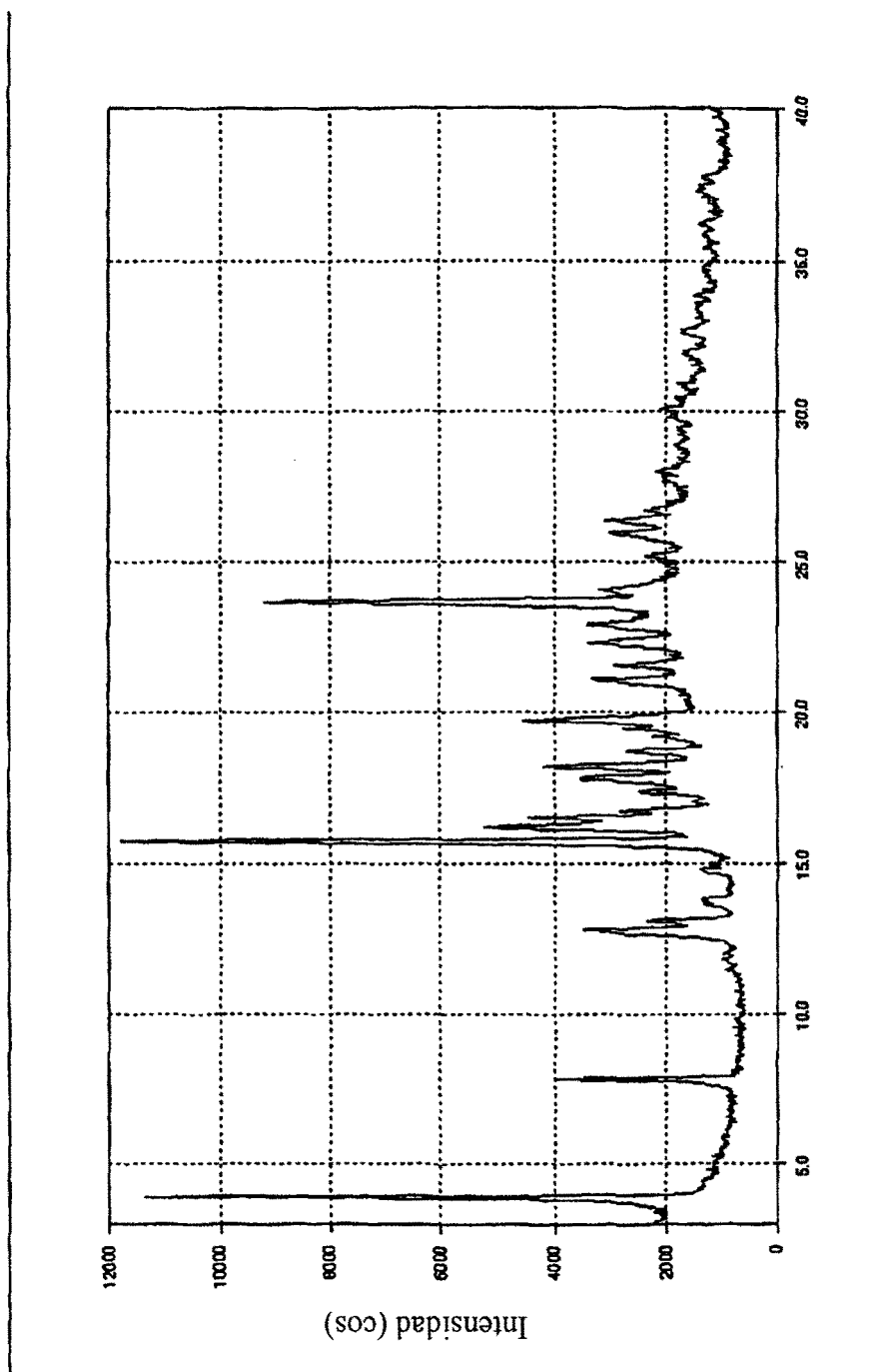


Figura 23

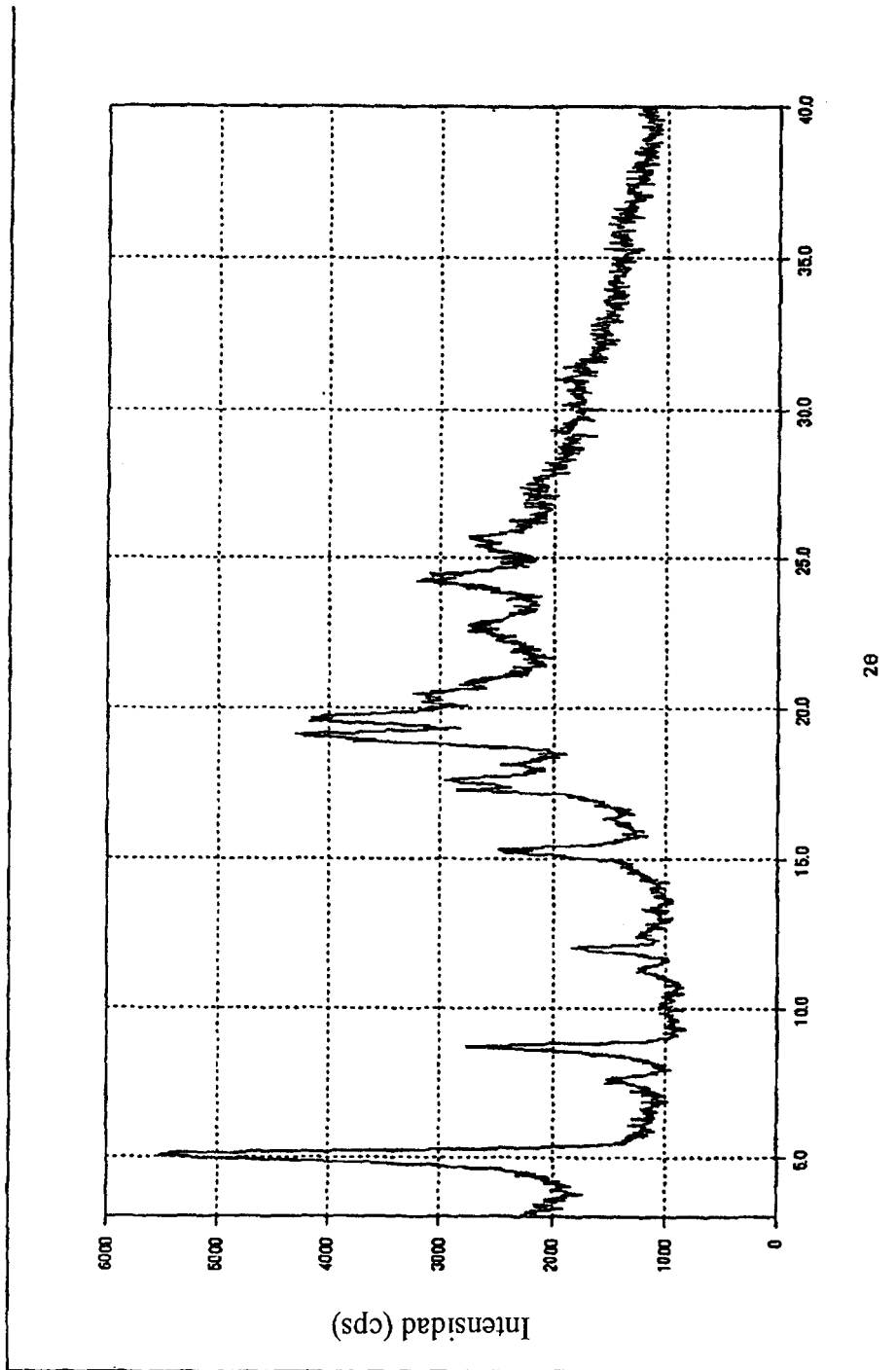


Figura 24

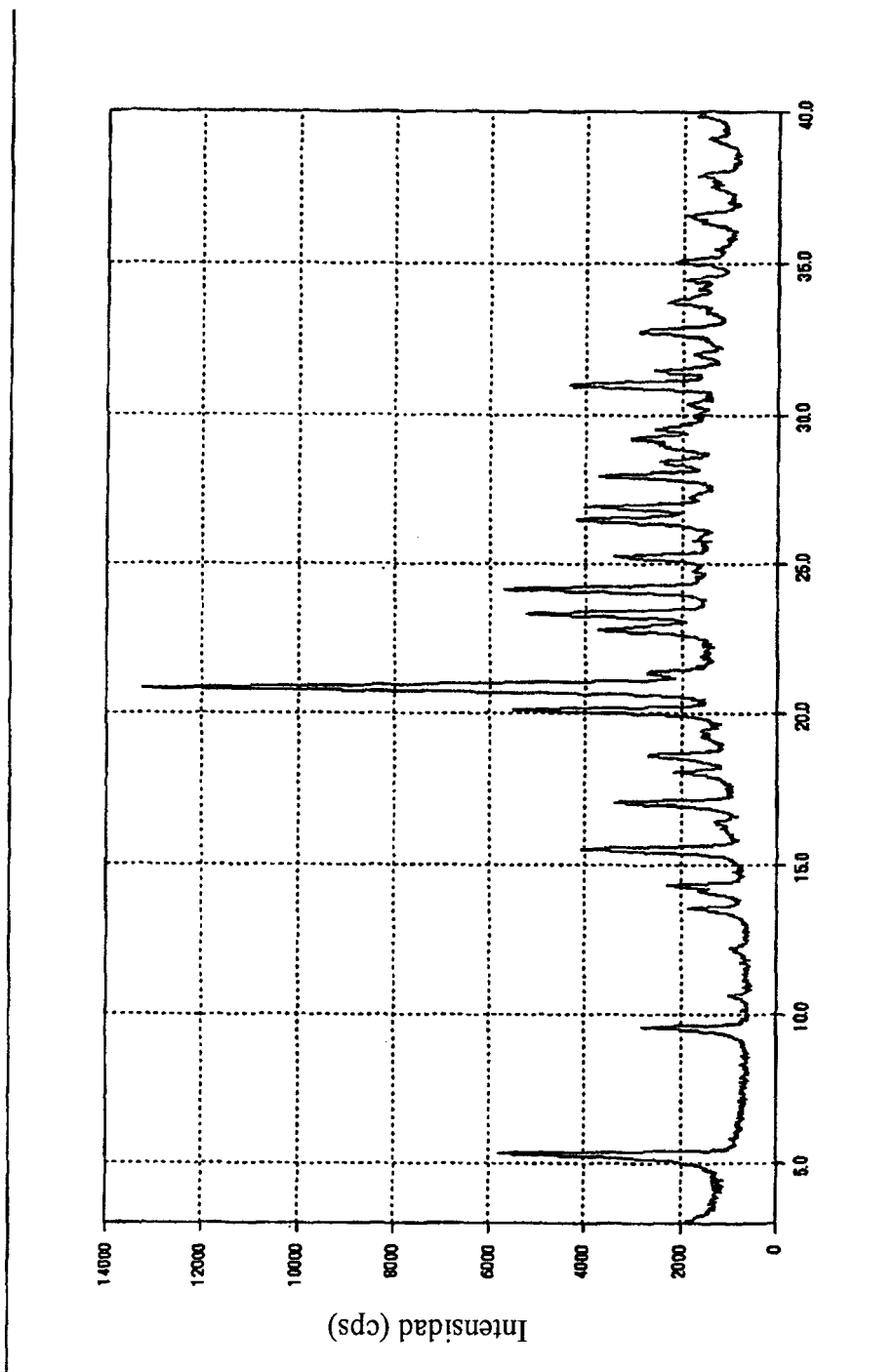


Figura 25

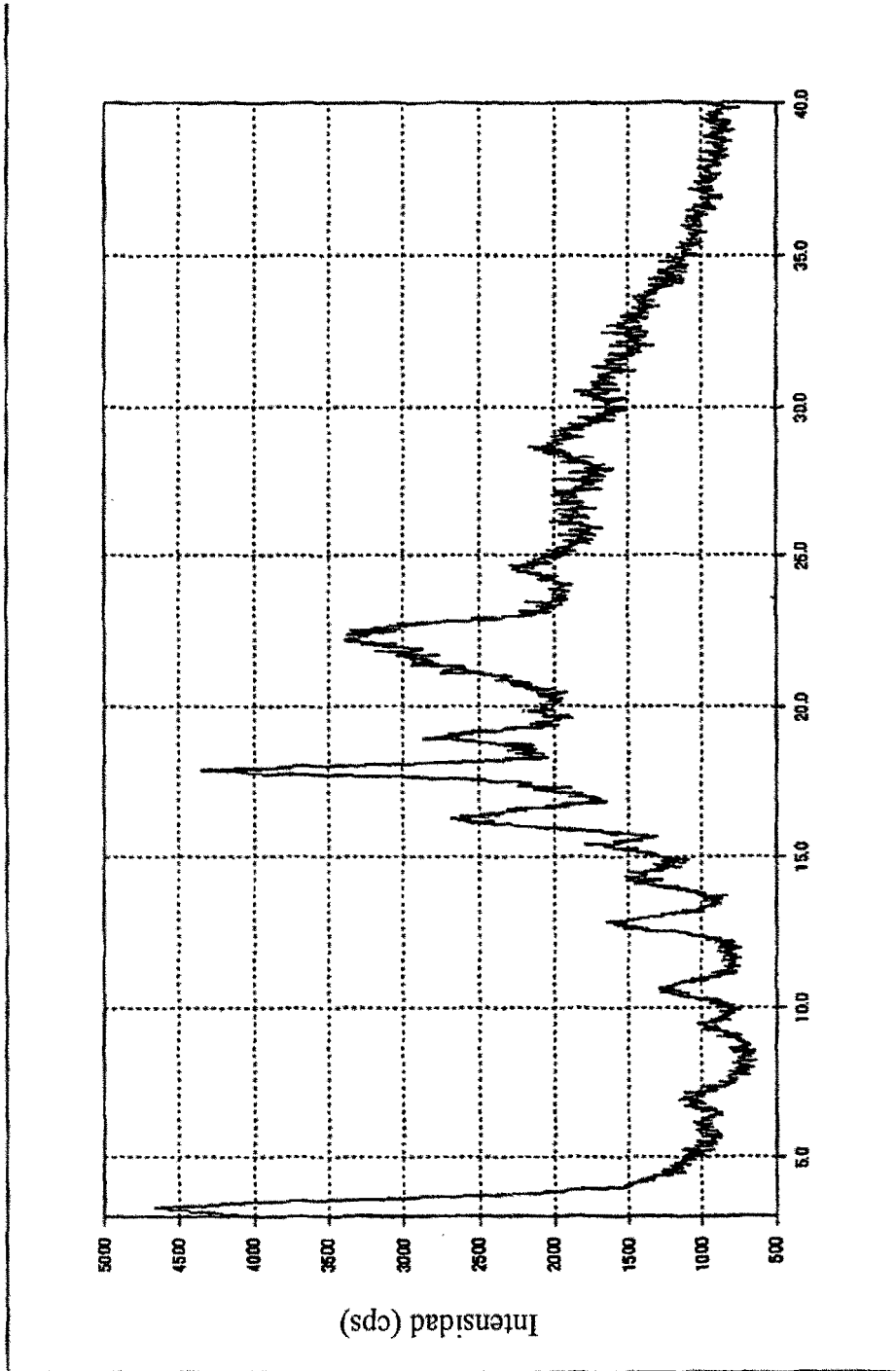


Figura 26

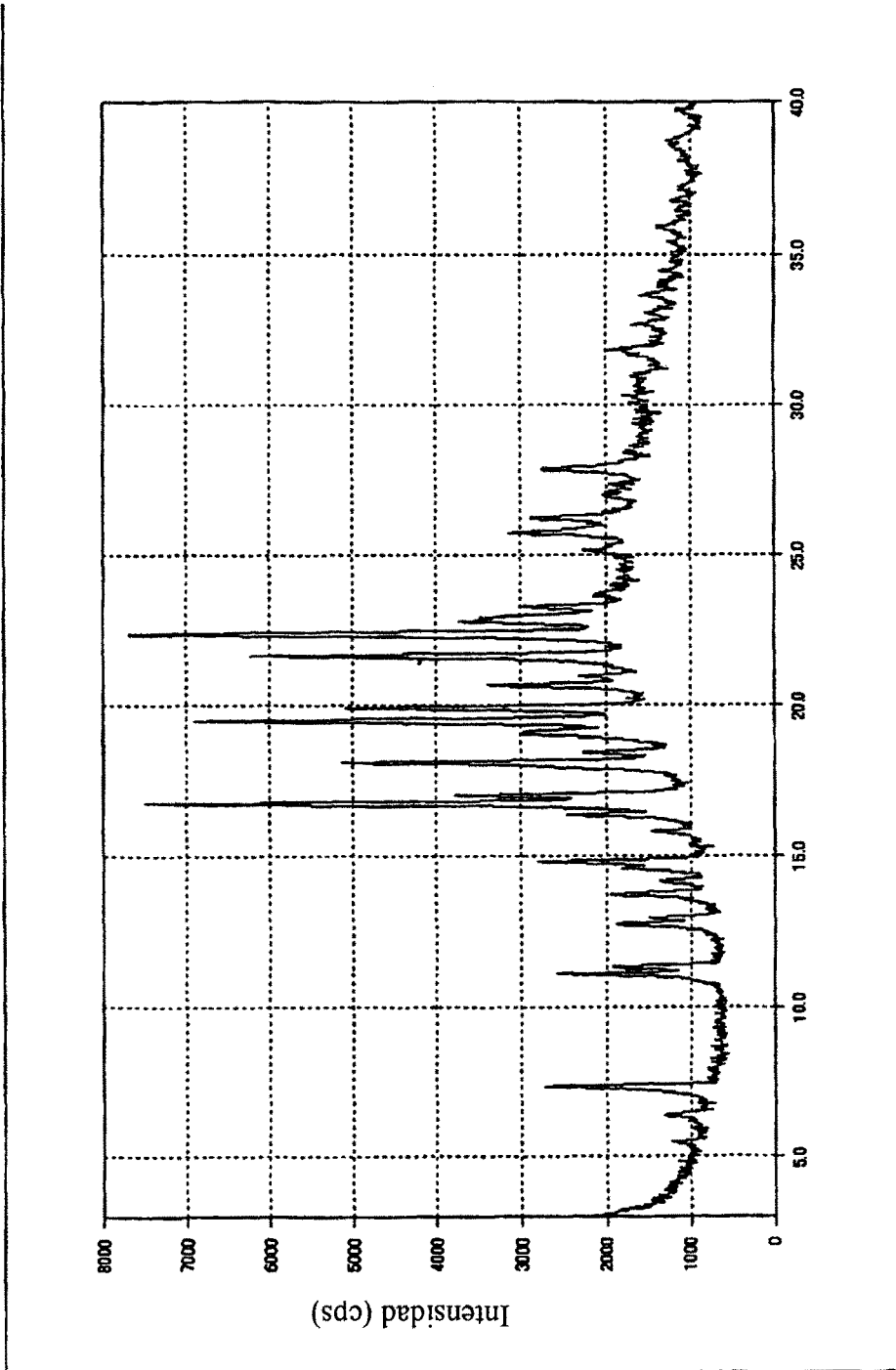


Figura 27

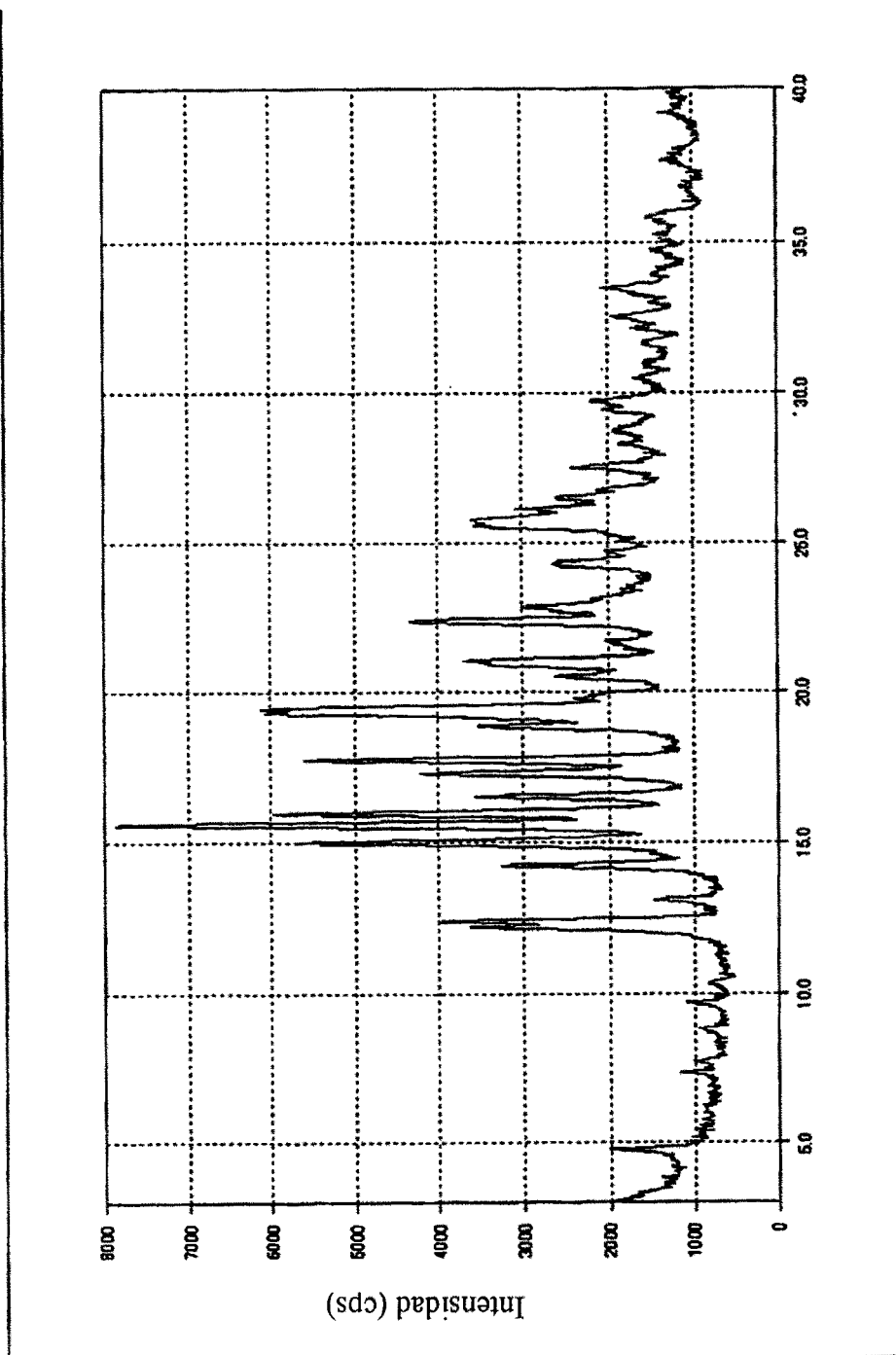


Figura 28

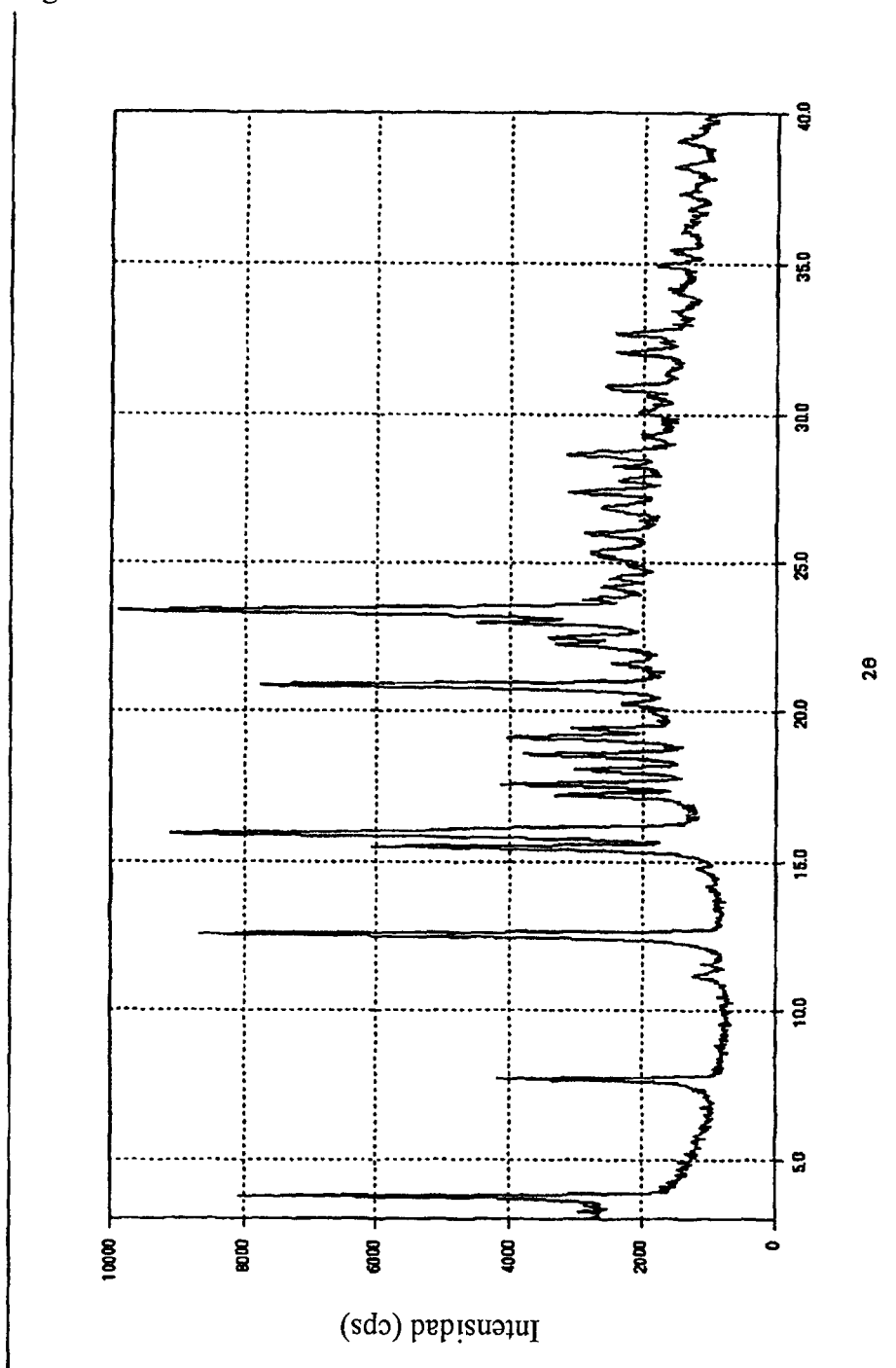


Figura 29

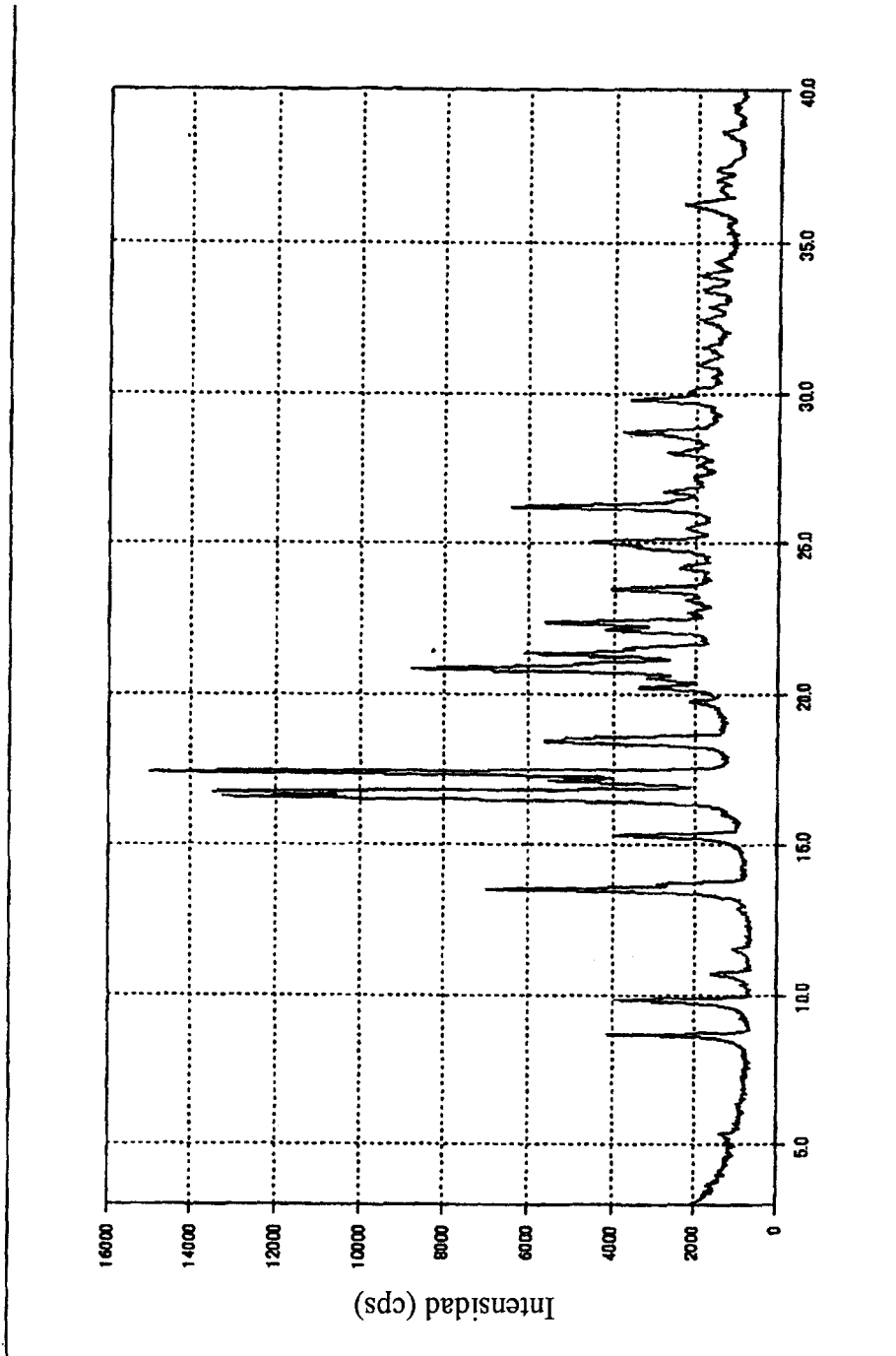


Figura 30

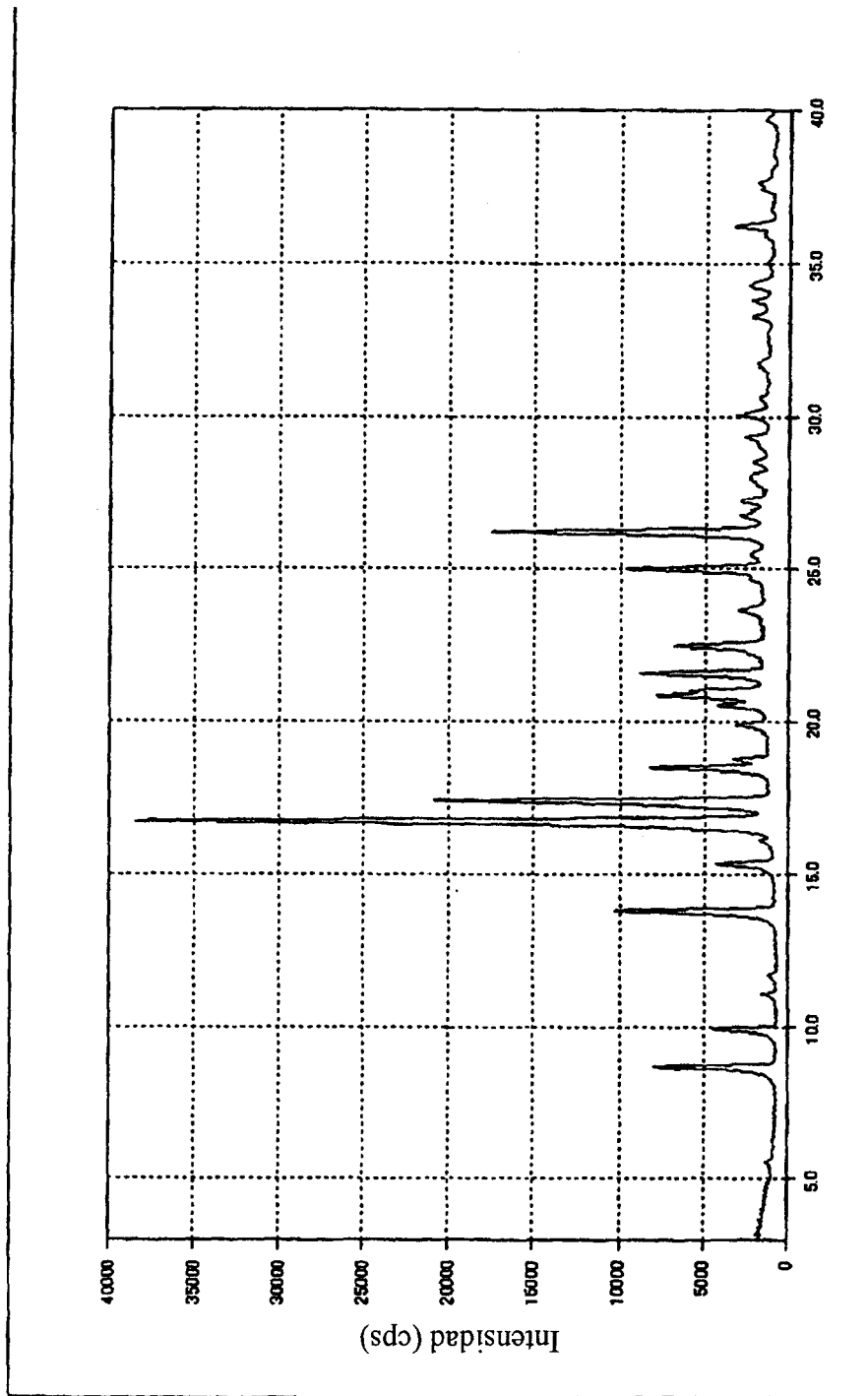


Figura 31

