



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 319**

51 Int. Cl.:
G01N 23/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01955745 .3**

96 Fecha de presentación : **13.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1309851**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.05.2003**

54 Título: **Screening de las condiciones de cristalización de polimorfos.**

30 Prioridad: **13.07.2000 EP 00202500**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.09.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.09.2010

73 Titular/es: **Universiteit Leiden
Rapenburg 70
2300 RA Leiden, NL
Avantium International B.V.**

72 Inventor/es: **Kuil, Maxim, Emile;
Hoedemaeker, Philippus, Jacobus;
Abrahams, Jan, Pieter;
Maxwell, Ian, Ernest y
Plaisier, Jasper, Rikkert**

74 Agente: **Manresa Val, Manuel**

ES 2 345 319 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

Screening de las condiciones de cristalización de polimorfos.

5 La presente invención se refiere a unos procedimientos para formas cristalinas (polimorfos) de análitos que utilizan, por ejemplo, un procedimiento y un aparato para screening del comportamiento de fase, más particularmente el comportamiento de la cristalización en fase líquida, de gel o sólida de dichos análitos, tales como moléculas orgánicas, por ejemplo compuestos de interés farmacéutico y complejos, oligómeros, sales, ésteres y solvatos de los mismos, moléculas organometálicas tales como catalizadores para catálisis homogéneas, etc. La presente invención se refiere
10 asimismo a la detección en paralelo de transiciones de fase, más específicamente la cristalización, de dichos análitos.

La presente invención proporciona asimismo unos procedimientos para producir cristales de análitos a cualquier escala pretendida utilizando las condiciones identificadas según la presente invención. Se proporciona, además, la utilización de los cristales y las composiciones que comprenden dichos cristales. Se pueden utilizar asimismo los cristales
15 de análitos según la presente invención para recoger información sobre la estructura de análitos, más particularmente con respecto a la existencia de polimorfismo cristalino. La presente invención proporciona un procedimiento para la determinación rápida de polimorfismo cristalino.

En general se considera la cristalización como la separación o precipitación fuera de un medio líquido. El planteamiento básico de la cristalización es habitualmente muy sencillo. La molécula a cristalizar se disuelve o suspende y a continuación se somete a unas condiciones que afectan a la solubilidad de la molécula de la disolución. Ello se puede realizar mediante la eliminación del disolvente o mediante la adición de otros compuestos que reducen la solubilidad, opcionalmente en combinación con la variación de otros factores tales como la temperatura, la presión o la fuerza de la gravedad. Cuando las condiciones son las correctas, se formarán unos núcleos pequeños a partir de los que crecerán los
20 cristales. Sin embargo, generalmente no se comprende bien la relación entre las condiciones y la cristalización. La optimización de las condiciones de cristalización se basa en gran medida en procedimientos empíricos. La determinación de las condiciones de cristalización óptimas para ello puede resultar un proceso laborioso y lento.

Muchas moléculas pueden cristalizar en distintas formas cristalinas, un fenómeno conocido como polimorfismo. El aspecto de dichas distintas formas cristalinas depende en gran medida del medio físico y químico en el que el cristal forma un núcleo, crece o se expone tras el crecimiento. Las distintas formas cristalinas proceden de las diferentes condiciones en las que se realiza la cristalización. Sin embargo, no existe un marco teórico significativo que permita predecir de un modo fiable si existen o se pueden esperar unas formas polimórficas específicas de una molécula y, en caso afirmativo, cuántas se pueden producir de las mismas. La identificación del comportamiento polimórfico de las
25 moléculas y la determinación de las condiciones en las que se pueden obtener las distintas formas polimórficas de las mismas se ha de realizar experimentalmente, un proceso lento y laborioso.

Una vez que el material se encuentra en forma cristalina, se puede obtener una información valiosa con respecto a la estructura tridimensional de la molécula. Además, se puede obtener información valiosa a partir de distintas formas cristalinas de las moléculas. Por ejemplo, distintas formas polimórficas pueden expresar distintos comportamientos de disolución o incluso expresar distintas propiedades por lo que se refiere a su actividad biológica.
40

Muchas moléculas farmacéutica y/o industrialmente importantes tales como fármacos o catalizadores para catálisis homogéneas son sólidos una temperatura ambiente. Con frecuencia dichas moléculas cristalizan en distintas formas estructurales, presentando de este modo un comportamiento polimórfico. Por lo tanto, resulta interesante obtener información del comportamiento de cristalización de dichos compuestos.
45

El comportamiento de cristalización de un compuesto viene determinado principalmente por su estereoquímica. Esta comprende obviamente su pauta de enlaces covalentes así como su estructura iónica tal como se determina mediante la presencia de contraiones disponibles en la red cristalina. Aparte de su constitución cristalina, otros parámetros externos afectan asimismo a la cristalización de compuestos orgánicos tales como la concentración del compuesto en la disolución madre, la hidrofobia/polaridad de los disolventes, la temperatura, la velocidad de formación de los cristales (nucleación), la presión y muchos otros.
50

Debido a este gran número de parámetros que afectan a la cristalización, la determinación de la combinación óptima de parámetros tiene como resultado una gran cantidad de combinaciones posibles. La optimización lineal convencional (analizar una condición tras otra) basada en procedimientos empíricos es, por lo tanto un procedimiento largo y engorroso, si es que resulta factible. Constituye por lo tanto un objetivo de la presente invención proporcionar unos procedimientos en los que el análisis de las diversas combinaciones resulte posible y se pueda realizar eficiente y rápidamente, y preferentemente en paralelo, es decir analizando diversas combinaciones de parámetros al mismo tiempo.
55

La optimización lineal convencional tal como se ha descrito anteriormente constituye una práctica habitual en la búsqueda de polimorfos de compuestos orgánicos pequeños. Al realizar el screening en serie de distintas condiciones por separado y analizar los resultados, puede obtenerse la información pretendida en cada uno de los artículos estándar de cristal para laboratorios, aunque se trata de un proceso lento. La recogida del material cristalino (por ejemplo en forma de polvo) antes de la caracterización se realiza habitualmente a mano, de uno en uno.
60

ES 2 345 319 T3

La presente invención pretende proporcionar mejoras en la determinación de las condiciones de cristalización en general y particularmente la determinación del comportamiento polimórfico. La presente invención pretende además superar las desventajas mencionadas anteriormente haciendo referencia a las técnicas convencionales.

5 Los presentes inventores han descubierto un procedimiento para el screening de un gran número de condiciones de cristalización. Además, han diseñado un modo de screening de un gran número de condiciones de cristalización en paralelo y de identificación de polimorfos cristalinos.

Se dan a conocer un procedimiento y un aparato para generar y analizar, preferentemente en paralelo, una pluralidad de formas cristalinas (polimorfos) de sustancias químicas o de mezclas de sustancias (el análito) de las que se conoce preferentemente por lo menos forma cristalina. Con este objetivo se prepara un conjunto de disoluciones o, por lo menos, una disolución, por ejemplo en una serie de disolventes o mezclas de disolventes, o por lo menos un disolvente. Se puede proporcionar el análito en un sustrato diseñado especialmente, pero puede resultar suficiente un sustrato convencional tal como una placa de microvaloraciones siempre que se satisfagan algunas condiciones que se mencionan a título de ejemplo en diversas formas de realización. Se cambian las condiciones en las que se mantienen los análisis en el sustrato, por ejemplo, alterando o modificando condiciones físicas o químicas tales como mediante una disminución de la temperatura o permitiendo que se evapore un disolvente. Se puede provocar la cristalización de los análisis cambiando dichas condiciones físicas o químicas. Se analiza el material insoluble, mediante técnicas de difracción por rayos X en geometría de transmisión. El análisis del material insoluble se realiza *en situ* sobre el sustrato. Los espectros de difracción por rayos X se corrigen y comparan, preferentemente automáticamente. Se comparan los espectros de distintos análisis, permitiendo de desde modo la identificación de distintos polimorfos y las condiciones en las que se forman dichos polimorfos o se convierten a partir de una forma polimórfica en otra.

La presente invención se refiere, en un aspecto, a un procedimiento según la reivindicación 1.

Un análisis, en el contexto de la presente invención, es un compuesto del que se ha de determinar el comportamiento de cristalización. Un análisis, en el contexto de la presente invención, es una sustancia química o una mezcla de distintas sustancias de las que se conoce por lo menos una forma cristalina o de las que se espera que exista por lo menos una forma cristalina. Un análisis, en el contexto de la presente invención, es preferentemente una molécula o compuesto orgánico u organometálico, tal como una molécula farmacéuticamente activa o un complejo catalizador - ligando o un dímero, sal, éster o solvato de la misma. En otro aspecto, un análisis, en el contexto de la presente invención, puede ser asimismo una biomolécula, es decir, ácidos nucleicos, ADN, ARN APN, polipéptidos, péptidos, glucoproteínas y otras sustancias proteicas, complejos lipoproteína - ácido nucleico peptídico, hidratos de carbono, sustancias biomiméticas, etc.

Un modo preferido de realizar el procedimiento de la presente invención comprende proporcionar un sustrato que comprende un conjunto de recipientes que opcionalmente se pueden precintar, presentando dichos recipientes opcionalmente unos medios para provocar la cristalización, tales como sustancias que alteren o influyan en el comportamiento de la cristalización tales agentes de nucleación, depositando unos volúmenes separados de análisis en forma de sólidos, suspensiones, emulsiones o disoluciones y en los que la composición de cada recipiente difiere en por lo menos un aspecto de la composición de por lo menos otro recipiente, precintando opcionalmente los recipientes con respecto a la atmósfera, proporcionando opcionalmente a los recipientes una atmósfera que influyan en comportamiento de cristalización, permitiendo que se forme el material cristalino, manipulando la difracción del material cristalino obtenido, por ejemplo retirando los disolventes o proporcionando el material cristalino en un material transportador para permitir el análisis de la estructura cristalina, preferentemente mediante técnicas de difracción por rayos X, preferentemente determinando automáticamente los espectros de difracción por rayos X de análisis o composiciones opcionalmente seleccionados, comparando opcionalmente los espectros de difracción de los análisis o composiciones, corrigiendo opcionalmente los espectros de difracción con respecto a las fluctuaciones de fondo, identificando opcionalmente polimorfos del análisis y relacionando opcionalmente la presencia y la forma cristalina de los polimorfos con la composición y las condiciones a las que se ha sometido el análisis.

El sustrato es preferentemente químicamente inerte ante las sustancias y los disolventes utilizados y es preferentemente transparente a la técnica de detección utilizada, es decir es transparente a los rayos X con la técnica de difracción por rayos. El sustrato es asimismo preferentemente transparente al espectro de luz visible (aproximadamente entre 200 nm y 1000 nm) para permitir una inspección visual u óptica. El sustrato puede asimismo preferentemente transmitir calor, permitiendo de este modo variaciones de temperatura. Los ejemplos de conjuntos de elementos son de 8 por 12 hasta 32 por 48, con una distancia ortogonal entre centros que varía entre 2 y 10 mm entre los recipientes o pocillos del sustrato.

Se realiza la determinación de las formas polimórficas del análisis mediante la tecnología de difracción por rayos X. Los distintos polimorfos de un análisis producen distintos espectros de difracción. Al determinar los espectros de difracción en geometría de transmisión a partir de los análisis cristalizados y comparar dichos espectros de difracción, se obtiene información sobre las distintas condiciones de cristalización para las distintas formas cristalinas del análisis.

La determinación de las características de difracción por rayos X de los análisis cristalizados se puede realizar ventajosamente en el conjunto de recipientes proporcionado en el que se ha realizado el procedimiento de cristalización (*in situ*). En geometría de difracción de la transmisión, el modo de realización preferido, se necesita que el propio conjunto de recipientes sea transparente a la difracción por rayos X o que se determine el espectro de difracción de

fondo del conjunto de recipientes se corrijan los datos obtenidos mediante la difracción por rayos X del cristal del conjunto de recipientes con respecto a dicho espectro de fondo. La ventaja de utilizar la geometría de transmisión con respecto a métodos más convencionales de geometría de reflexión para los experimentos de difracción, es que se obtiene sustancialmente más señal por unidad de masa del análito. Por lo tanto, resulta posible de este modo utilizar unas cantidades en miligramos, preferentemente nanogramos o picogramos del material y conseguir todavía un rendimiento mejorado.

La determinación de la existencia de distintos polimorfos de un análito se puede utilizar para determinar y/o optimizar las condiciones de conversión de una forma cristalina del análito en otra forma del análito. Un aspecto ventajoso de la presente invención se refiere a un procedimiento para optimizar las condiciones de transformación de una forma polimórfica de un análito en otra forma polimórfica sometiendo una forma polimórfica del análito al procedimiento de detección del polimorfismo de la presente invención.

Según la presente invención, se proporciona preferentemente una pluralidad de condiciones distintas, difiriendo cada una de las mismas en por lo menos un parámetro que influye en el comportamiento de cristalización del análito a cristalizar. En una forma de realización de la presente invención, las distintas condiciones pueden ser químicas o físicas. Una condición química comprende en general distintos tipos (concentraciones de) disolventes, amortiguadores del pH, precipitantes, sales, etc. Una condición física se considera desde el punto de vista de la temperatura, la presión, etc.

Aunque en la técnica se describe generalmente que se requieren grandes de material para una cristalización satisfactoria, los presentes inventores han demostrado que se pueden utilizar cantidades inferiores al microgramo para moléculas pequeñas (peso molecular aproximadamente inferior a 500 gramos por mol) y incluso inferiores a 1 nanogramo en el caso de las proteínas (peso molecular aproximadamente superior a 5000 gramos por mol). Gracias a los pequeños volúmenes que se pueden utilizar en los procedimientos según la presente invención, la disponibilidad de los análisis resulta menos problemática y se realizan fácilmente análisis de numerosas condiciones y se ajustan fácilmente las condiciones apropiadas. El procedimiento resulta, por lo tanto, ventajoso cuando únicamente se encuentran disponibles unas cantidades muy reducidas del análito, por ejemplo en las primeras etapas de la investigación.

Las principales ventajas del procedimiento según la presente invención son que, generalmente, la preparación automática de los experimentos es más rápida en el caso de volúmenes pequeños, la detección automática de cristales en un conjunto de condiciones es más rápida al poder analizar simultáneamente más muestras, se requiere menos material, reduciendo de este modo pérdidas, se pueden realizar más pruebas considerando la cantidad de material disponible, las posibilidades de que las condiciones en las que se alcanza la cristalización aumentan significativamente y las probabilidades de identificar distintas formas polimórficas aumentan del mismo modo.

Un modo preferido de proporcionar un conjunto de composiciones para determinar las condiciones de cristalización de análisis consiste en un procedimiento en el que dicho conjunto de composiciones se proporciona en un medio de soporte sólido que comprende una pluralidad de celdas independientes, comprendiendo cada una de las mismas una composición. De este modo, se proporciona un formato de análisis del tipo conjunto permitiendo una fácil automatización en la dispensación de composiciones y/o en el cambio de las condiciones por composición y de detección del comportamiento del cambio de fase (habitualmente cristalización del análito). En cualquier formato, la cristalización se puede alcanzar mejor mediante un cambio adicional de las condiciones permitiendo cambios en cualquiera de los parámetros mediante la difusión, evaporación, cambios de temperatura u otras técnicas o procesos y combinaciones de los mismos. Dichos cambios adicionales de las condiciones físicas o químicas se pueden aplicar en la presente invención y muy ventajosamente en el formato del conjunto de recipientes. Se pueden realizar asimismo cambios adicionales para ajustar las condiciones de cristalización. Las celdas del soporte sólido están preferentemente equipadas con unos medios para controlar la atmósfera de, o justo encima de, las celdas. Con este objetivo el medio de soporte se equipa, por ejemplo, con unos dispositivos de cierre hermético o unas sustancias de cierre hermético que sellan el soporte entero o precintando las celdas individuales o los grupos de células. Con este objetivo se pueden disponer bolas, placas, tapas, líquidos inertes tales como el aceite de parafina, el aceite de silicona, etc.

Se dispone el análito en las celdas del soporte sólido mediante técnicas que permitan la distribución precisa y controlada de unas cantidades muy reducidas de materia. Las técnicas apropiadas son aquellas que permiten la distribución precisa y controlada de cantidades de líquidos o sólidos del orden de microlitros o microgramos, preferentemente nanolitros o nanogramos, más preferentemente picolitros o picogramos. Cuando el análito se proporciona en cualquier forma líquida, se pueden utilizar preferentemente técnicas de dispensación tales como técnicas de dispensación piezoeléctrica, técnicas de dispensación en chorro, técnicas de dispensación de electropulverización, así como otras técnicas de microdispensación y submicrodispensación, se utilizan preferentemente técnicas de nanodispensación. Al utilizar dichas técnicas de dispensación resulta posible disponer en cada celda una cantidad determinada de análito. De este modo, resulta igualmente posible disponer en cada celda una cantidad distinta de análito.

Se puede utilizar asimismo ventajosamente la dispensación no direccional de un fluido sobre el sustrato, por ejemplo cubriendo el sustrato al sumergirlo en un fluido, vertiendo el fluido sobre el sustrato, u otras técnicas de sumersión.

Cuando se proporciona el análito con algún transportador, por ejemplo en forma de disolución o emulsión, la opción preferida es retirar por lo menos parcialmente los disolventes y/o los otros fluidos transportadores permitiendo

o provocando un cierto grado de evaporación, secado, drenaje, liofilización u otra técnica de eliminación de fluidos de las celdas.

5 A menudo se pretende poder influir en la velocidad y la duración de los procesos de cristalización, así como en el tamaño y la distribución de tamaños y homogeneidad y/o pureza de los cristales resultantes. La presente invención es particularmente apta para este propósito. Si se pretende de este modo, se puede diseñar una formación rápida de los núcleos, seguido por una cristalización lenta en dichos núcleos. Se pueden determinar las condiciones sobre cómo influir en la velocidad y el crecimiento y cómo finalizar la cristalización. A continuación, una escala de producción de cristales, por ejemplo para uso farmacéutico (en preparaciones farmacéuticas) se puede basar en las condiciones identificadas según la presente invención. Durante el crecimiento de los cristales, la convección provocada por la gravedad que se origina por los gradientes de concentración local que se producen como resultado de la acreción de moléculas en el cristal en crecimiento, pueden afectar negativamente al orden cristalino de dicho cristal. En volúmenes pequeños, dicha convección provocada por la gravedad es menos importante, ya que junto con la velocidad de difusión y la velocidad de crecimiento de los cristales, dicha convección aumenta el tamaño físico del recipiente en el que tiene lugar la cristalización. Por lo tanto, el presente procedimiento en general tendrá como resultado unos cristales que están mejor ordenados que los cristales que han crecido en volúmenes superiores, que se encuentran sometidos a la gravedad.

20 Debido a que el procedimiento reduce la convección provocada por la gravedad durante el crecimiento de los cristales, el orden cristalino de los cristales producido con el procedimiento se aproximará al de los cristales de alta calidad que hayan crecido en el espacio, es decir, en unas condiciones de microgravedad.

25 La presente invención proporciona la determinación de las condiciones de cristalización que permiten el crecimiento de distintas formas cristalinas del análogo, permitiendo de este modo la identificación de formas polimórficas del análogo. Ésta es una información valiosa, por ejemplo en el caso de un producto farmacéutico en el que cada uno de los polimorfos del compuesto farmacéutico de interés pueden presentar propiedades distintas en lo que se refiere a su actividad biológica. La autorización oficial de un fármaco específico y bien definido por parte de la Dirección General de Fármacos y Alimentos de los Estados Unidos no se puede trasladar a otro polimorfo del mismo fármaco, aunque la naturaleza química de las moléculas constituyentes sea idéntica. Resulta, por lo tanto, muy importante descubrir e identificar los diversos polimorfos de un fármaco a fin de comprender sus propiedades biológicas. Además, el descubrimiento temprano de dichos polimorfos de un fármaco resulta asimismo farmacéuticamente interesante ya que los distintos polimorfos pueden presentar una actividad biológica distinta, por ejemplo diferencias de solubilidad.

35 Una utilización preferida de los cristales producidos según la presente invención es la determinación de las estructuras de los análisis. De este modo, la presente invención proporciona además un procedimiento para determinar la estructura de un análisis que comprende someter los cristales de dicha composición según la presente invención a técnicas de resonancia magnética nuclear (NMR) en estado sólido, difracción de neutrones, difracción de electrones y/o difracción por rayos X y determinar su estructura cristalina.

40 Preferentemente, el procedimiento se realiza en un conjunto de celdas independientes, en el que cada celda contiene una composición distinta. Cuando se produce un cambio en el comportamiento de fase, éste se detecta y se puede correlacionar con la composición específica y las condiciones en las que se está realizando el screening. Para aumentar la fiabilidad del procedimiento, se puede proporcionar cada combinación por duplicado o triplicado en el mismo medio de soporte sólido.

45 Se conoce que cualquier cristal que no presente una simetría cúbica cambia la polarización de la luz polarizada linealmente, en función de su orientación con respecto a la dirección de polarización de la luz de transiluminación. Dicha propiedad de los cristales y del biomaterial cristalino particularmente, se utiliza en la actualidad para determinar e inspeccionar la calidad de los cristales individuales. Sin embargo, se puede utilizar asimismo dicha propiedad para determinar la presencia o ausencia de un cristal de un análisis que no sea cúbico. Cuando se analiza el cambio en la polarización de la luz de transiluminación, al cambiar la dirección de polarización, se puede determinar la presencia de material cristalino no cúbico. Preferentemente, el cambio en comportamiento de fase del análisis está provocado por la formación del material cristalino. Ello permite la incorporación de una etapa independiente en el procedimiento de detección del comportamiento polimórfico. Al determinar en primer lugar la presencia de material cristalino, disminuye el número de espectros de difracción por rayos X que se han de grabar. Ello permite aumentar adicionalmente la eficiencia del procedimiento según la presente invención.

60 Los cambios en el comportamiento de fase se pueden determinar de diversos modos, pero para el screening rápido de una pluralidad de muestras en unas condiciones reproducibles las técnicas preferidas se basan en la detección o determinación de, continuamente o intermitentemente, de las características ópticas y/o de difracción de las celdas individuales.

La determinación de las características ópticas y/o de difracción de las celdas individuales se puede realizar con un sistema que comprende:

- 65
- una fuente lumínica cuya dirección de polarización se puede variar
 - un soporte para

ES 2 345 319 T3

- un sustrato que comprende una pluralidad de celdas
- un sistema para detectar un cambio en la polarización de la luz que procede de una fuente de luz polarizable.
- 5 - un detector sensible a la posición.

Un cambio en la polarización de la luz corresponde generalmente a un cambio en el comportamiento de fase. Se prefiere que el cambio en comportamiento de fase se deba principalmente a un cambio de fase del análito. Un cambio en el comportamiento de fase que no está provocado por un cambio de fase del análito puede proporcionar adicionalmente una información útil y valiosa con respecto al comportamiento de fase del propio análito. Por ejemplo, si cristaliza una sal cualquiera, mientras la sustancia de interés continúa siendo soluble, la sustancia de interés no se puede precipitar a su concentración actual con dicha sal.

15 La detección de los cambios de fase se puede realizar asimismo mediante identificación visual, por ejemplo utilizando técnicas de microscopía. A continuación se puede determinar la existencia de polimorfos mediante la técnica descrita anteriormente.

20 La presente invención proporciona además como forma de realización específica un procedimiento para identificar el comportamiento de cristalización de por lo menos un análito que comprende las etapas de:

- proporcionar un medio de soporte sólido que comprenda una pluralidad de celdas independientes,
- 25 - combinar el análito en cada celda independiente con uno o más componentes distintos, preferentemente de tal modo que la composición total de una celda individual difiera en por lo menos un aspecto de la composición de por lo menos otra celda, realizándose la mezcla de los componentes y los análisis simultáneamente o en secuencia, en cualquier orden;
- modificar opcionalmente las condiciones que provocan cambios en el comportamiento de fase en las composiciones individuales;
- 30 - detectar los cambios en el comportamiento de fase, más particularmente en la cristalización, de las composiciones de las celdas independientes.

35 Además de acelerar la identificación de las condiciones ideales, las distintas celdas se pueden comparar (automáticamente) entre sí.

40 Naturalmente, el cambio en el comportamiento de fase de la composición está preferentemente provocado principalmente por un cambio de fase, más particularmente por la cristalización, del análito.

Para aumentar cristalización del análito, se puede proporcionar un núcleo inerte o núcleos inertes para la cristalización. En una forma de realización, la presente invención proporciona, por lo tanto, un procedimiento en el que la superficie del medio de soporte comprende por lo menos un núcleo cristalización que comprende un cristal inerte, preferentemente en los que los centros de nucleación se encuentran en forma de cristalitos pequeños, preferentemente de sales o complejos del análito. En otra forma de realización la propia naturaleza (cristalina) del sustrato puede influir en la cristalización del análito.

50 La iniciación de la cristalización se puede ver afectada además por una etapa en la que la nucleación se provoque por agitación, vibraciones, tratamiento con microondas, tratamientos (ultra)sónicos o una combinación de los mismos.

Descripción de las figuras

- Figura 1: Esquema global de la microplaca de sustrato con 96 recipientes.
- 55 - Figura 2: Soporte del filtro.
- Figura 3: Tabla de traslación X - Y en el difractómetro.
- 60 - Figura 4: Espectros de difracción por rayos X de distintos polimorfos grabados en el conjunto de microrrecipientes.
- Figura 5: Espectros de difracción de polvo por rayos X de los polimorfos A, B y C de $F_5O_3NC_{18}H_2$.
- 65 - Figura 6: Vía utilizada para producir los polimorfos B y C en masa a partir del polimorfo A de $F_5O_3NC_{18}H_2$.
- Figura 7: Micropocillo que contiene un polimorfo de $F_5O_3NC_{18}H_2$.

Ejemplos

Se utilizó un conjunto de microgrupos diseñado para procesar líquidos orgánicos e inorgánicos a una temperatura y presión elevadas. Se seleccionaron los materiales para que fueran tan químicamente inertes como resultara posible, para permitir una transferencia térmica rápida hacia y desde los compartimientos de los líquidos. Se preparó con latón una disposición en microplaca con unas dimensiones exteriores de 127,7 mm por 85,5 mm, que contenía 96 pocillos, y a continuación se revistió de oro. El volumen de los micropocillos era aproximadamente de 50 μl y se precintaron los pocillos individuales con una junta tórica realizada de un polímero flexible sintético. Para ello se utilizaron juntas de Viton[®], pero pueden resultar preferibles anillos químicamente más inertes de Kalrez[®] o Teflon[®]. Los pocillos se cerraron cubriendo las juntas tóricas con una placa de cristal de 4 mm de espesor (longitud 117 mm, anchura 75 mm). Para inmovilizar la placa de cristal en la microplaca, se dispone una abrazadera de latón con 16 tornillos pequeños. El formato de la disposición en microplaca se basa en un tamaño estándar de placa de microvaloración con 96 pocillos. La microplaca de latón se atornilla a un soporte adaptador de acero inoxidable que se aprieta suavemente con el elemento calefactor de un alternador térmico de 96 pocillos comercialmente disponible. (Viton y Kalrez son marcas registradas de DuPont Dow Elastomers, Teflon es una marca registrada de DuPont Company).

Los pocillos o recipientes del sustrato se llenan con cualquier dispositivo de dispensación manual, semiautomático o automático. Se introduce el análisis en disolución, con lo que se puede evaporar el disolvente. Puede ser importante filtrar completamente la disolución de dicho análisis antes de introducirla en dichos recipientes. Posteriormente, se pueden introducir otros componentes o disolventes mediante pipeteo. Si alguno o todos los análisis presentes en un recipiente no se disuelve en su medio líquido, se puede elevar la temperatura, opcionalmente una vez que se ha precintado dicho recipiente, hasta una temperatura suficientemente elevada para alcanzar la disolución total.

Se pueden proporcionar opcionalmente unos medios para cambiar las condiciones del conjunto de recipientes, lo que tiene como resultado la cristalización del análisis. Al cambiar la temperatura, permitiendo que se evapore el disolvente, o mediante una combinación de dichos dos procesos, se provoca la cristalización en paralelo en uno o más de los recipientes de dicho sustrato. Se proporcionan unos medios de análisis de la cristalinidad y de identificación de polimorfos en cada una de las fracciones sólidas del conjunto de recipientes.

Opcionalmente, los materiales sólidos de cada uno de los recipientes individuales se pueden transferir simultáneamente a una membrana fina transportadora utilizando uno de diversos modos. Por ejemplo, Whatman Polyftronics ha desarrollado un sistema para recoger en un filtro simple productos químicos precipitados procedentes de una placa con 96 pocillos por filtración, utilizando un sistema especial de aspiración. Se proporcionan unos medios de análisis automático y de identificación de las propiedades físicas de los polimorfos del conjunto de recipientes.

El filtro opcional se monta en un sistema de traslación X - Z, tal como el fabricado por Altechna Co. Ltd., (Vilnius, Letonia) que se dispone en un difractor de rayos X, tal como un generador FRG-391 de Nonius (Delft, Países Bajos). Los espectros de difracción por rayos X (polvo de transmisión) se pueden registrar en un detector de áreas, tal como el detector de imágenes en placas de MAR-345 de MAR Research GmbH (Hamburgo, Alemania). Se registran los espectros de difracción por rayos X de cada uno de los concentrados que permanecen en el filtro. Una vez que ha finalizado la exposición de un concentrado, la tabla de traslación X-Z desplaza el siguiente concentrado hasta la posición de exposición. Se analizan y se comparan las imágenes de la difracción por rayos X. Las fluctuaciones de fondo, debidas a, por ejemplo, irregularidades del filtro, se pueden eliminar de las imágenes de la difracción antes de comparar entre sí los espectros observados.

A continuación se proporciona un ejemplo de aplicación de la técnica descrita:

Resultados del $F_5O_3NC_{18}H_2$ en un conjunto de microrrecipientes

Un compuesto químico simple ($F_5O_3NC_{18}H_2$, peso molecular: 393,36) se analizó con respecto a sus condiciones de cristalización y su polimorfismo, utilizando un ciclo simple de calentamiento y enfriamiento en una muestra que consistía en 16 composiciones de distintos disolventes. Los espectros de difracción de los distintos polimorfos se identificaron automáticamente utilizando un procedimiento de correlación cruzada. La muestra completa comprendía 6 subconjuntos idénticos. Los polimorfos identificados se indican en la tabla I.

En algunos de los recipientes no se pudo identificar polimorfo alguno. Ello se puede deber a la ausencia de cristalinidad y/o la cantidad muy reducida de material cristalino presente. De los 73 compuestos clasificados, según su difracción por rayos X, únicamente dos pocillos contenían material que *no* era polimorfo del material original (polimorfo A). Los espectros de difracción por rayos X de los tres polimorfos se proporcionan en la figura 4. En resumen, resulta posible producir y detectar polimorfos en volúmenes pequeños. Es posible relacionar las condiciones del proceso con la formación del polimorfo pretendido. Se obtuvo información adicional a partir de screening adicionales explorando el diagrama de fases con un mayor detalle para encontrar unas condiciones de proceso optimizadas.

Resultados del $F_5O_3NC_{18}H_2$ en masa

Se obtuvieron dos polimorfos B y C a partir del material original, el polimorfo A, utilizando distintas vías. La formación del polimorfo B se realizó tras disolver el polimorfo A en agua a una temperatura de 120°C y una presión elevada. Ésta parece ser una estructura intermedia y se pueden utilizar diversas vías para obtener el polimorfo C en

ES 2 345 319 T3

masa. Los espectros de difracción por rayos X de los tres polimorfos se proporcionan en la figura 5. En resumen, tanto B como C se pueden producir en masa utilizando distintas vías tal como se representa en la figura 6. La masa de los polimorfos A y C se determinó mediante espectrometría de masas ESI y ambas masas resultaron coherentes con la composición química tal como se encuentra documentada. Se puede descartar que el polimorfo B o C sean productos de degradación, ya que C se puede producir a partir de A puro pasando por el intermedio B.

TABLA I

Identificación de polimorfos en el conjunto de microrrecipientes

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I	C	B	B	C	-	B	B	B	A	B	C	C
II	-	C	C	-	B	-	C	C	B	C	C	C
III	B	C	C	C	-	C	C	C	B	C	C	C
IV	B	-	C	C	-	C	-	C	B	-	C	C
V	C	B	-	C	C	A	B	B	B	C	C	B
VI	B	-	C	-	B	-	-	-	B	C	C	-
VII	-	C	-	B	C	C	C	C	C	C	C	C
VIII	B	C	C	-	B	-	C	C	B	-	-	-

Nota: en las tablas los símbolos numéricos en ***cursiva*** se utilizan para indicar la posición en la placa. En la presente tabla, los símbolos en letra no cursiva A, B y C indican la identificación del polimorfo

TABLA II

Composición del disolvente de cada micropocillo

Se disolvió un gramo de $F_5O_3NC_{18}H_2$ en 4,5 gramos de acetato de etilo p. a. y se añadieron 20 μ l en dos partes de 10 μ l en cada uno de los 96 pocillos de la placa de microgrupos. Se dejó evaporar el disolvente calentando hasta 40 °C en un dispositivo convencional de PCR con una tapa abierta durante una hora. Se realizó el screening siguiente de los 96 pocillos con 4 disolventes: agua (H_2O), metanol (MeOH), 1-butanol (BuOH) y 2-propanol (i-PrOH).

Índice	1	2	3	4
A	15 μ l H_2O	5 μ l MeOH 10 μ l H_2O	10 μ l H_2O 5 μ l BuOH	10 μ l H_2O 5 μ l i-PrOH.
B	5 μ l H_2O 10 μ l MeOH	15 μ l MeOH	10 μ l MeOH 5 μ l BuOH	10 μ l MeOH 5 μ l i-PrOH.
C	5 μ l H_2O 10 μ l BuOH	5 μ l MeOH 10 μ l BuOH	15 μ l BuOH	10 μ l BuOH 5 μ l i-PrOH.
D	5 μ l H_2O 10 μ l i-PrOH.	5 μ l MeOH 10 μ l i-PrOH.	5 μ l BuOH 10 μ l i-PrOH.	15 μ l i-PrOH.

ES 2 345 319 T3

TABLA III

Índice	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
I					A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
II					B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4
III					C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4
IV					D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4
V	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4	A1	A2	A3	A4
VI	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4	B1	B2	B3	B4
VII	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4	C1	C2	C3	C4
VIII	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4	D1	D2	D3	D4

La composición del screening con los 16 disolventes se repitió seis veces en cada conjunto de 96 pocillos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento para detectar el polimorfismo de por lo menos un análito, que comprende proporcionar un conjunto de composiciones en un medio de soporte sólido, comprendiendo el medio de soporte sólido una pluralidad de celdas independientes, comprendiendo cada una de dichas composiciones por lo menos un análito, y provocando o permitiendo cada composición adoptar por lo menos una primera condición que posiblemente influya en la cristalización de las composiciones que se encuentran en las celdas con el medio de soporte sólido, y detectando cualquier cristalización en por lo menos una composición, determinando los espectros de difracción por rayos X en geometría de difracción de la transmisión en las celdas en las que se ha realizado la cristalización, comparando los espectros de difracción por rayos X e identificando de este modo cualquier polimorfo del análito.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el conjunto proporcionado de composiciones contiene por lo menos un análito en una forma polimórfica y en el que, mediante la comparación de los espectros de difracción por rayos X y la identificación de cualquier otro polimorfo del análito, se determinan y/u optimizan las condiciones de la transformación de una forma polimórfica de un análito en otra forma polimórfica.
- 15 3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que cada elemento de dicho conjunto de composiciones difiere en por lo menos una condición de cualquier otra composición de dicho conjunto.
- 20 4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicha por lo menos una condición comprende una condición física.
- 25 5. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que dicha por lo menos una condición comprende una condición química.
6. Procedimiento según la reivindicación 3, que comprende además cambiar por lo menos una condición adicional tras exponer la composición a dicha primera condición.
- 30 7. Procedimiento según la reivindicación 3, que comprende además identificar las condiciones en las que se obtienen el tamaño y la homogeneidad pretendidos de los análisis.
- 35 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho análito es una molécula orgánica pequeña, un compuesto organometálico, un catalizador, una sal de una molécula orgánica o un compuesto farmacéuticamente activo o una biomolécula.
9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición presenta un volumen inferior a 1000, preferentemente inferior a 100, más preferentemente inferior a 10 microlitros.
- 40 10. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la composición total de una celda individual difiere en por lo menos un aspecto de la composición de por lo menos otra celda y en el que se detectan los cambios en comportamiento polimórfico de las composiciones en las celdas independientes determinando la forma cristalina del análito.
- 45 11. Procedimiento según la reivindicación 10, que comprende además una etapa en la que la composición de la celda se modifica adicionalmente.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el análito se proporciona en forma de un estado cristalino o agregado, disolución, emulsión o suspensión.
- 50 13. Procedimiento según la reivindicación 10 a 12, en el que la superficie del medio de soporte comprende por lo menos un núcleo cristalización que comprende un cristal inerte.
- 55 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que las celdas presentan un volumen o se llenan hasta un volumen total de como máximo 1000, preferentemente como máximo 100, más preferentemente como máximo 10 microlitros.
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que las celdas contienen como máximo 100, preferentemente como máximo 10, más preferentemente como máximo 1 microgramo del análito.
- 60 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que el cambio en el comportamiento de la cristalización del análito comprende la formación de material cristalino del análito.
17. Procedimiento según la reivindicación 16, en el que la formación de material cristalino del análito comprende la formación de por lo menos una forma polimórfica del material cristalino.
- 65 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17, en el que el material cristalino del análito comprende cocrisales de dos o más análisis o de un análisis con una molécula pequeña, tal como una sal o un solvato.

ES 2 345 319 T3

19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, que comprende además una etapa en la que se provoca la nucleación mediante la adición de centros de nucleación, por agitación, vibraciones, tratamiento con microondas, tratamientos (ultra)sónicos o una combinación de los mismos.

5 20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que los centros de nucleación se encuentran en forma de cristalitas pequeños.

21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que los cristalitas pequeños son sales o complejos del anólito.

10 22. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que el anólito y/o componentes se añaden a las celdas mediante técnicas de dispensación piezoeléctrica, técnicas de dispensación en chorro, técnicas de dispensación de electropulverización, técnicas de microdispensación y nanodispensación, o sumersión o combinaciones de las mismas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Fig. 1: Esquema global de la microplaca de sustrato con 96 recipientes

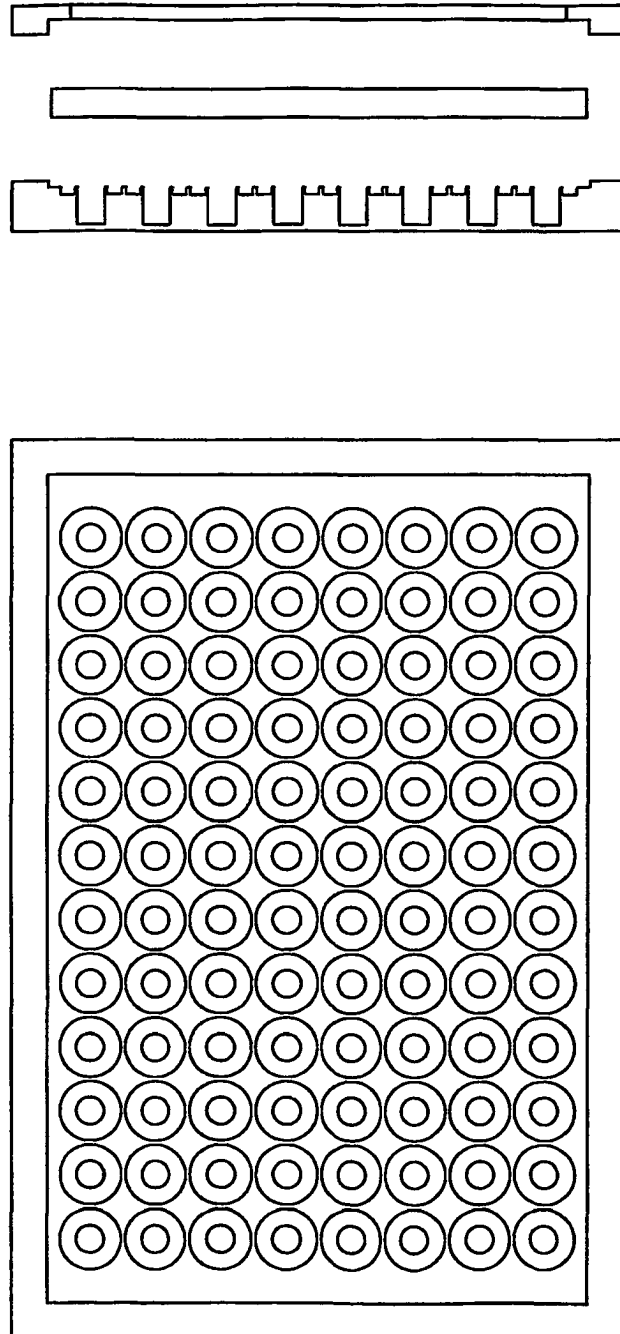


Fig. 1

Fig. 2: Soporte de filtro

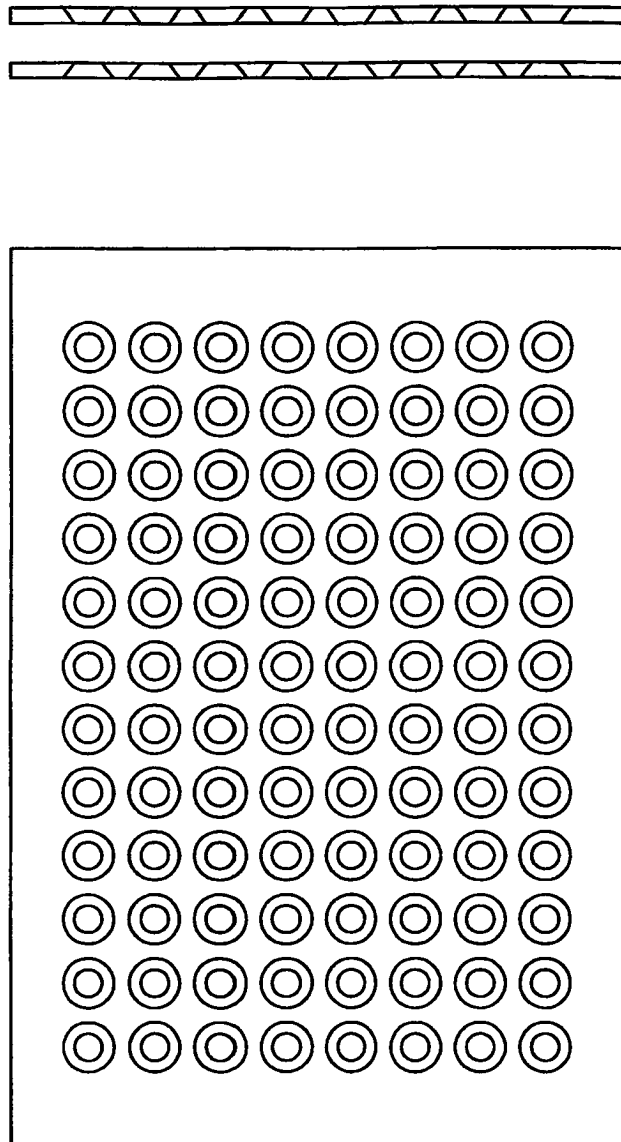


Fig. 2

Fig. 3: Tabla de traslación X - Y en el difractómetro

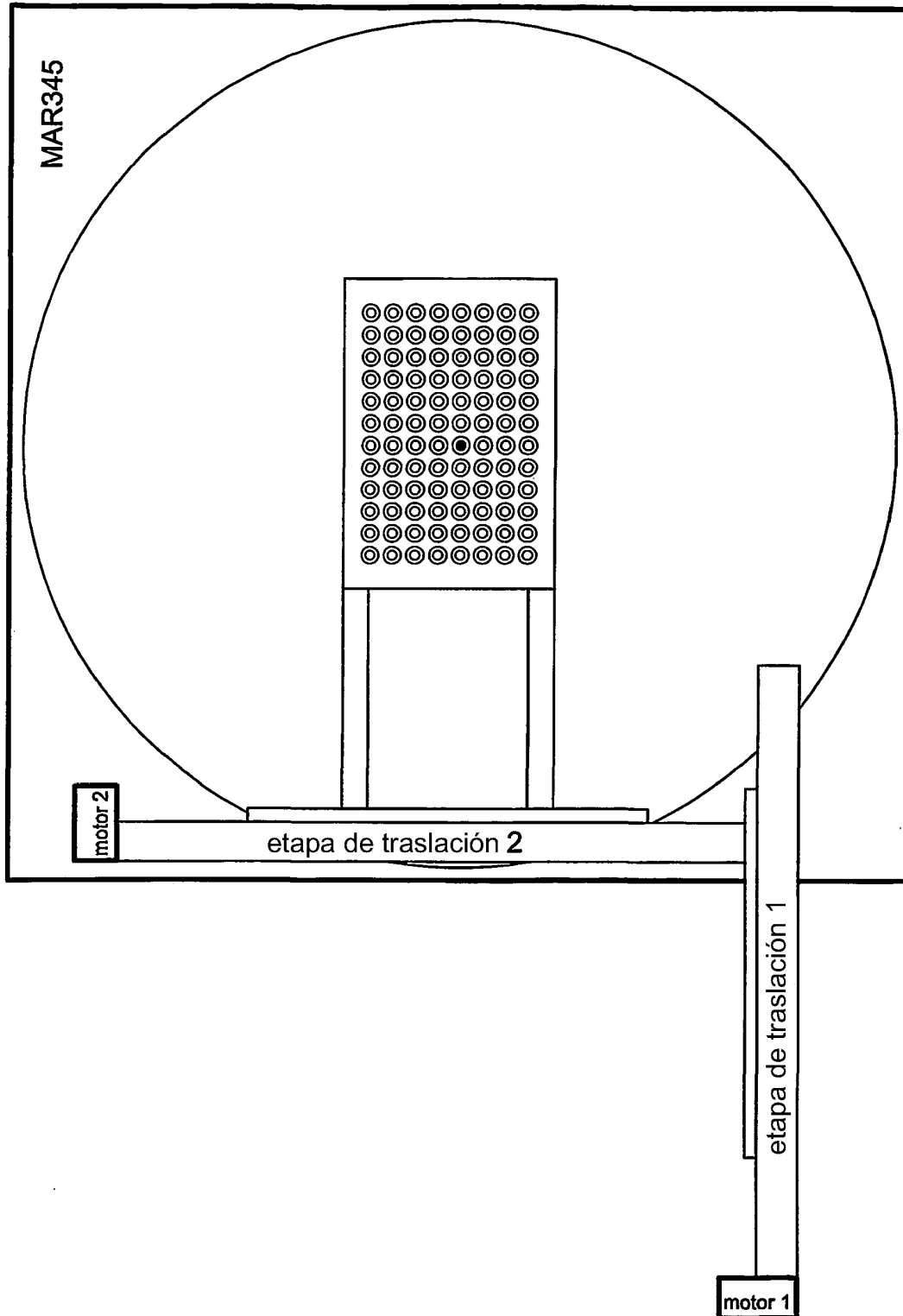


Fig. 3

Fig. 4: Espectros de difracción por rayos X de distintos polimorfos grabados en el conjunto de microrrecipientes

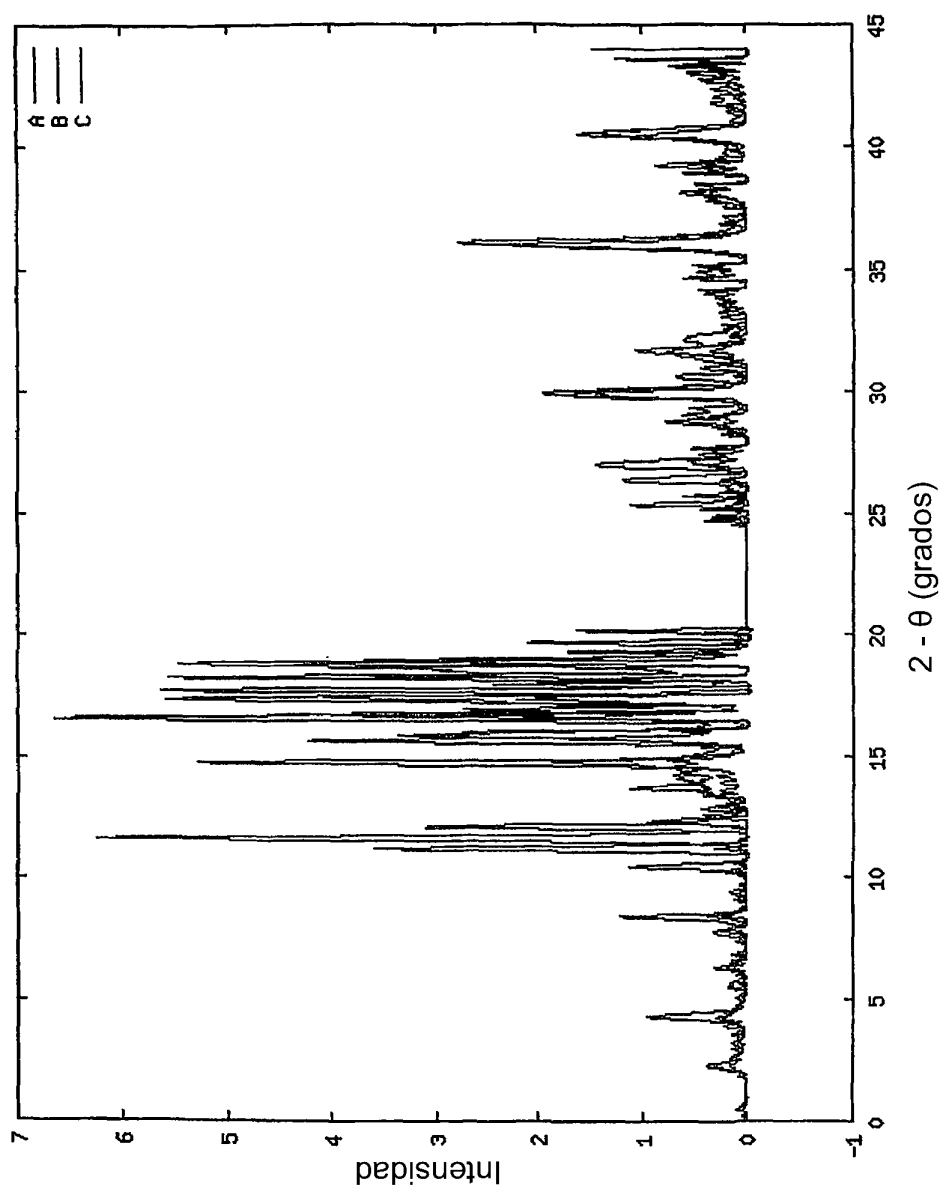


Fig. 4

Fig. 5

Fig. 5: Espectros de difracción de polvo por rayos X de los polimorfos A, B y C de BRL55834

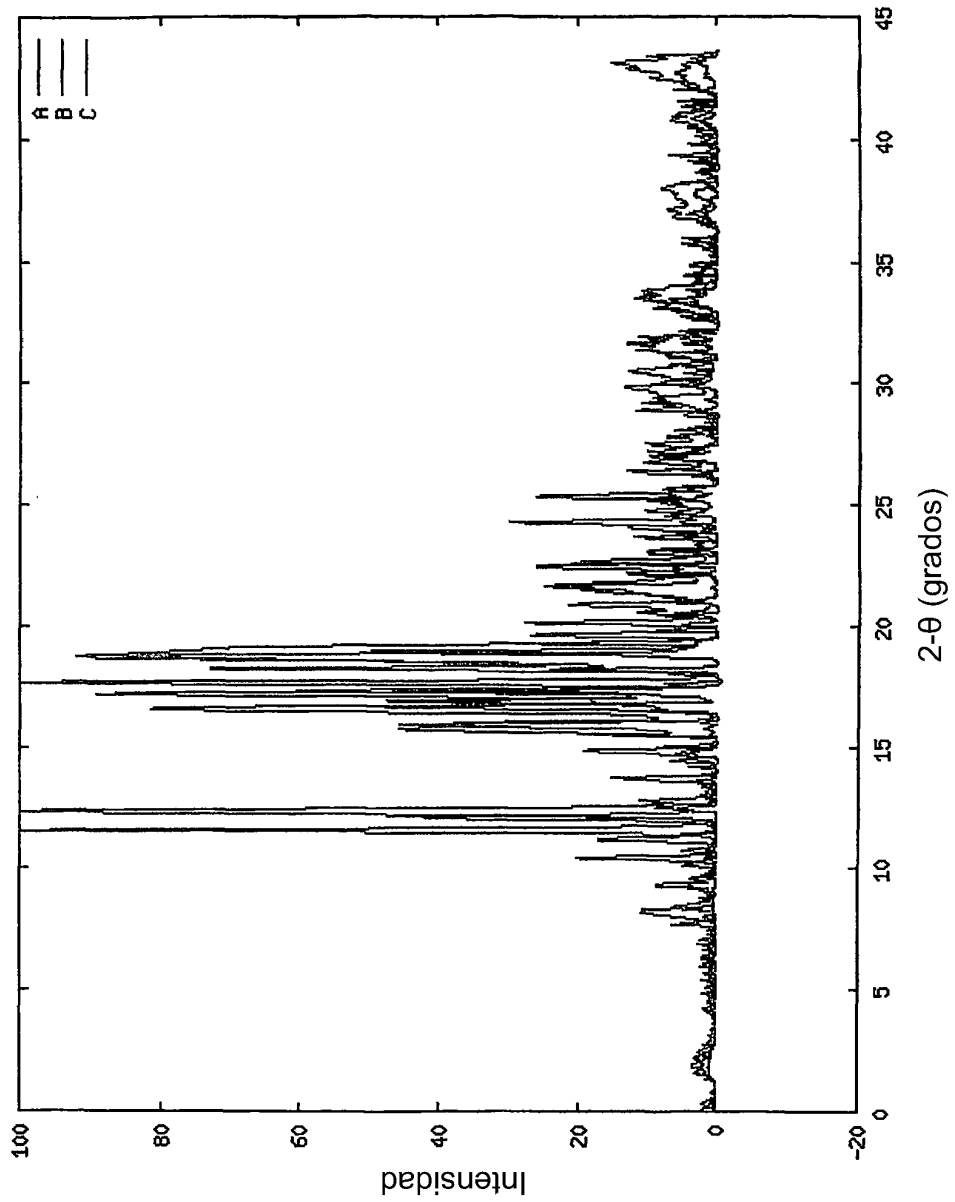


Fig. 6: Vía utilizada para producir los polimorfos B y C en masa a partir del polimorfo A de BRL55834

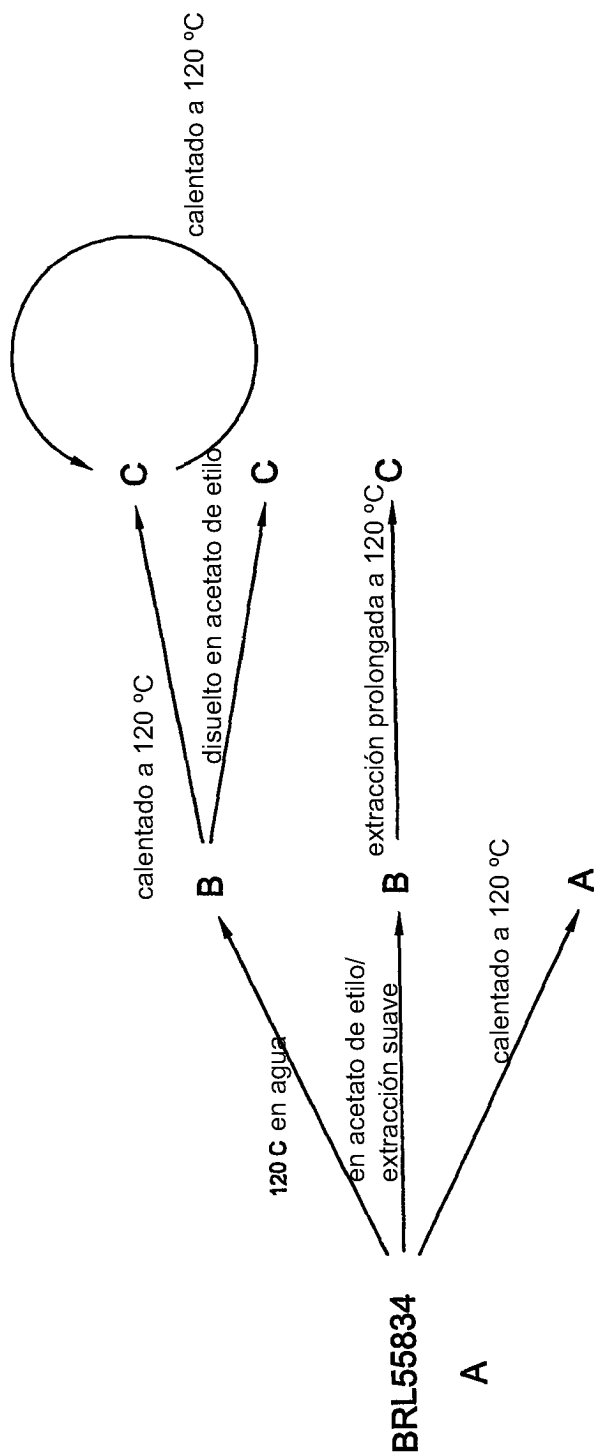


Fig. 6

Fig. 7



Fig. 7: Micropocillo que contiene un polimorfo de BRL55834