

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 896 674**

(51) Int. Cl.:

C07D 277/34 (2006.01)
C07D 277/36 (2006.01)
C07D 417/06 (2006.01)
A61K 31/425 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2016 PCT/US2016/037067**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16201356**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2016 E 16808465 (5)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.08.2021 EP 3307722**

(54) Título: **Formas sólidas de ácido (Z)-4-(5-((3-bencil-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-iliden)metil)furan-2-il)benzoico**

(30) Prioridad:

**12.06.2015 US 201562175066 P
06.01.2016 US 201662275655 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2022

(73) Titular/es:

**GB006, INC. (100.0%)
3013 Science Park Road, Suite 200
San Diego, CA 92121, US**

(72) Inventor/es:

BARBOSA, ANTONIO J.

(74) Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 896 674 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

Formas sólidas de ácido (Z)-4-(5-((3-bencil-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-iliden)metil)furan-2-il)benzoico

5 [0001] La presente solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Número 62/175.066, presentada el 12 de junio de 2015, la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. Número 62/275.655, presentada el 6 de enero de 2016.

10 DECLARACIÓN DE LOS DERECHOS DE INVENCIONES REALIZADAS BAJO LA INVESTIGACIÓN Y EL DESARROLLO CON SUBVENCIÓN FEDERAL

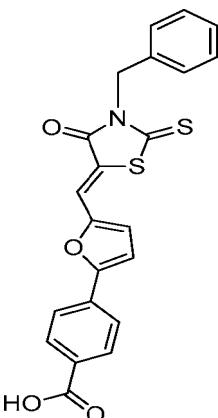
15 [0002] La presente invención se realizó con los fondos proporcionados por NIAID Advanced Technology SBIR (NIAID-AT-SBIR [R43/R44]) Concesión # 1 R43 AI100499-01A1. El gobierno de Estados Unidos tiene ciertos derechos sobre la invención.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

20 [0003] La activación, la migración y la captación de leucocito (es decir, glóbulo blanco) son importantes para la respuesta inmune a una lesión e infección, así como en diferentes trastornos inflamatorios y autoinmunes. Las integrinas β_2 , una subfamilia de receptores α/β de integrina heterodimérica que incluyen integrina CD11b/CD18 de alta expresión, son receptores específicos de leucocito que ajustan las funciones de leucocito que incluyen adhesión, migración, captación y activación celular. CD11b/CD18 reconoce el fragmento complementario iC3b, Fibrinógeno y ICAM-1 como ligandos, entre otros. CD11b/CD18 ha estado implicado en muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes, tales como lesión por isquemia-reperfusión (incluyendo insuficiencia renal aguda y aterosclerosis), lupus, enfermedad de intestino inflamado, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, nefritis lúpica, glomeruloesclerosis segmentaria focal, lesión renal, daño tisular, glaucoma, condiciones oftálmicas, rechazo de aloinjerto (tal como nefropatía), trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, derrame, engrosamiento neointimal en respuesta a lesión vascular y la resolución de procesos inflamatorios.

30 [0004] Las integrinas β_2 también contribuyen en los procesos que incluyen crecimiento tumoral, recrecimiento tumoral, metástasis tumoral, infiltración tumoral, potenciación de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, producción de especies de oxígeno reactivo y modulación de un número de genes pro y antiinflamatorios en células inflamatorias. El bloqueo de integrinas β_2 , que incluyen CD11b/CD18, y sus ligandos ha demostrado la disminución de la severidad de respuesta inflamatoria *in vivo* en determinados modelos experimentales. Sin embargo, tales agentes de bloqueo han tenido poco éxito en el tratamiento de enfermedades inflamatorias/autoinmunes en humanos.

40 [0005] Más recientemente, se han desarrollado nuevos compuestos y procedimientos antiinflamatorios utilizando compuestos que activan integrinas y reducen captación de células inmunes inflamatorias en tejidos aumentando adhesión celular dependiente de integrinas CD11b/CD18 a ligandos inmovilizados. Las leukadherinas son un grupo de tales agonistas de molécula pequeña que reconocen integrina CD11b/CD18 (Maiguel, et al. 2011. Sci. Signal. 4:1-14; Park, et al. 2007. J. Biomol. Screen. 12:406-417; Faridi, et al. 2009. Bioorg. Med. Chem. Lett. 19:6902-6906.). Leukadherinas también reducen activación de leucocito y vías de señalización proinflamatoria. Entre ellos, leukadherina 1 ("LA1;" ácido (Z)-4-(5-((3-bencil-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-iliden)metil)furan-2-il)benzoico; Fórmula I a continuación) ha demostrado eficacia antiinflamatoria particular. LA1 ha demostrado que reduce la captación de leucocitos durante peritonitis aguda en ratones, reduce engrosamiento neointimal después de lesión vascular en ratas y reduce lesión renal por isquemia-reperfusión en ratones. LA1 y las aplicaciones de la misma se ha descrito en la Patente de EE. UU. Número 9.023.876 así como US2004/002526, WO2012/005800 y WO2013/159082.



65 [0006] Se necesitan las formulaciones mejoradas de LA1 para potenciar más la utilidad que ha mostrado LA1 en los

estudios descritos anteriormente. Se espera que perfiles de disolución, perfiles farmacocinéticos y/o perfiles de estabilidad mejorados proporcionados por las nuevas formulaciones potencien la eficacia y permitan formas de administración favorables. La presente invención proporciona nuevas sales y formas cristalinas que responden a la necesidad de mejorar formulaciones de LA1.

- 5 BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN
- 10 [0007] En un aspecto, la presente invención proporciona sales de colina y meglumina de LA1 [ácido (Z)-4-(5-((3-bencil-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-iliden)methyl)furan-2-il)benzoico] y formas cristalinas de las mismas. Las formas cristalinas de sales de LA1 incluyen: una forma cristalina G de una sal de colina de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento; una forma cristalina O de una sal de colina de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento; una forma cristalina Q de una sal de colina de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento; una forma cristalina R de una sal de colina de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento; una forma cristalina S de una sal de colina de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento; una forma cristalina H de una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento; una forma cristalina L de una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento; una forma cristalina M de una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento; una forma cristalina N de una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento; una forma cristalina T de una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I como se describe en el presente documento. En los aspectos relacionados, la invención proporciona procedimientos para fabricar las sales y las formas cristalinas como se describe en el presente documento, así como formulaciones farmacéuticas que contienen como mínimo una sal o forma cristalina como se describe en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15
- 20
- 25 [0008] En otro aspecto, la divulgación proporciona procedimientos para tratar una enfermedad mediada por integrinas β_2 . Los procedimientos incluyen administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal o una forma cristalina como se describe en el presente documento a un paciente que lo necesita.
- 30 [0009] Las sales y las formas cristalinas de la invención, así como otros aspectos, objetos y ventajas asociados con ellos serán más evidentes al leer la descripción detallada y las figuras a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0010]

- 35 La Figura 1 muestra estructura cristalina de rayos X para un solvato de DMSO de LA1, Forma B.
- 40 La Figura 2 muestra un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) obtenido para ácido libre de LA1, Forma A. La Figura 3 muestra los datos de análisis diferencial termogravimétrico térmico (TG-DTA) para LA1 libre de ácido.
- 45 La Figura 4 representa un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) registrado para ácido libre de LA1.
- 50 La Figura 5 representa patrones de XRPD obtenidos para LA1 cristalina desordenada, Forma A (Figura 5A) y sal de colina de LA1, Forma G (Figura 5B).
- 55 La Figura 6 muestra patrones de XRPD para: sal de bicarbonato de LA1 (Figura 6 A); sal de meglumina de LA1, Forma H (Figura 6 B); sales de trometamina de LA1 (Figura 6 C y Figura 6 D); y sal de colina de LA1, Forma O (Figura 6E).
- 60 La Figura 7 representa un patrón de XRPD obtenido para sal de colina de LA1, Forma R.
- 65 La Figura 8 representa un patrón de XRPD obtenido para sal de colina de LA1, Forma S.
- 70 La Figura 9 muestra patrones de XRPD obtenidos para sólidos desordenados: sal de LA1 (Figura 9A); sal de calcio de LA1 (Figura 9B); sal de magnesio de LA1 (Figura 9C); sal de sodio de LA1 (Figura 9D); sal de potasio de LA1 (Figura 9E); sal de amonio de LA1 (Figura 9F); sal de calcio de LA1 (Figura 9G); sal de piperazina de LA1 (Figura 9H).
- 75 La Figura 10 muestra patrones de XRPD obtenidos para sales de colina y meglumina a escala pequeña: LA1 desordenada, Forma A (Figura 10A); sal de colina de LA1 a partir de etanol:metil *tert*-butil éter (Figura 10B); sal de colina de LA1 a partir de acetona (Figura 10C); sal de colina de LA1, Forma Q, a partir de acetato de etilo (Figura 10D); sal de meglumina de LA1, Forma T, a partir de etanol (Figura 10E).
- 80 La Figura 11 representa un patrón de XRPD obtenido para sal de meglumina de LA1, Forma L.
- 85 La Figura 12 muestra un patrón de XRPD obtenido para sal de meglumina de LA1, Forma M.
- 90 65 La Figura 13 muestra un patrón de XRPD obtenido para sal de meglumina de LA1, Forma N.

La Figura 14 representa patrones de XRPD obtenidos para sales de clorina y meglumina preparadas a gran escala: Sal de colina de LA1 a partir de etanol (Figura 14A); sal de colina de LA1 a partir de etanol (Figura 14B); sal de colina de LA1 a partir de acetona (Figura 14C); sal de meglumina de LA1 a partir de etanol (Figura 14D); sal de meglumina de LA1 a partir de etanol (Figura 14E).

- 5 La Figura 15 representa un patrón de XRPD obtenido para sales de meglumina de LA1 en diferentes disolventes.
- La Figura 16 representa un patrón de XRPD obtenido para sales colinas de LA1 en diferentes disolventes.
- 10 La Figura 17 muestra el perfil de concentración frente a tiempo de LA1 después de administración oral de LA1 micronizada (2 mg/kg) a ratas Sprague Dawley.
- 15 La Figura 18 muestra perfiles de concentración frente a tiempo de LA1 después de administración IP de LA1 (2 mg/kg), y LA1 liberada después de administración IP de colina de LA1 (2 mg/kg) y meglumina de LA1 (2 mg/kg) a ratas Sprague Dawley.
- 20 La Figura 19 muestra perfiles de concentración frente a tiempo de LA1 después de administración IV de LA1 (1 mg/kg), y LA1 liberada después de administración IV de colina de LA1 (1 mg/kg) y meglumina de LA1 (1 mg/kg) a ratas Sprague Dawley.
- 25 La Figura 20 muestra el perfil de concentración frente a tiempo de LA1 micronizada (1 mg/kg) administrada por la vía intravenosa a perros tipo beagle.
- La Figura 21 muestra el perfil de concentración frente a tiempo de LA1 micronizada (1 mg/kg) administrada por la vía oral a perros tipo beagle.
- 30 La Figura 22 muestra el perfil de concentración frente a tiempo de sal de colina de LA1 administrada por la vía oral (5 mg/kg) e intravenosa (0,5 mg/kg) a perros tipo beagle.
- La Figura 23 representa progresión de melanoma en ratones tratados con vehículo, sal de meglumina de LA1, anticuerpo de α -PD1 o sal de meglumina de LA1 + anticuerpo de α -PD1.
- 35 La Figura 24 muestra progresión de melanoma en ratones tratados con diferentes cantidades de sal de colina LA1.
- La Figura 25 muestra progresión de melanoma en ratones tratados con vehículo, sal de colina de LA1 (3 mg/kg, por vía oral, dos veces al día), anticuerpo de α -PD1 (100 μ g/ratón, i.p., cada cuarto días), o sal de colina de LA1 + anticuerpo de α -PD1.
- 40 La Figura 26 muestra progresión de melanoma en ratones tratados con vehículo, sal de colina de LA1 (3 mg/kg, por vía oral, dos veces al día), anticuerpo de α -CTLA-4 (100 μ g/ratón, i.p., cada cuarto días), o sal de colina de LA1 + anticuerpo de α -CTLA-4.
- DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**
- 45 **I. General**
- [0011] La presente invención proporciona sales de colina y meglumina y formas cristalinas de las mismas de leukadherina 1 (LA1; ácido (Z)-4-(5-((3-bencil-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-iliden)metil)furan-2-il)benzoico). Estas formas de sal de LA1 proporcionan un número de ventajas, que incluyen biodisponibilidad aumentada para formulaciones farmacéuticas administradas por la vía oral. Por consiguiente, la invención facilita procedimientos para tratar enfermedades mediadas por integrinas β 2.
- 50 **II. Definiciones**
- [0012] "LA1" hace referencia al compuesto ácido (Z)-4-(5-((3-bencil-4-oxo-2-tioxotiazolidin-5-iliden)metil)furan-2-il)benzoico como se muestra en la Formula I.
- [0013] «Sal» se refiere a una sal básica de adición preparada combinando ácido libre de LA1 con una base farmacéuticamente aceptable.
- 60 [0014] "Farmacéuticamente aceptable" se reconoce en la técnica y, como se utiliza en el presente documento, hace referencia a una composición, excipiente, adyuvante u otro material y/o forma de administración, se refiere a una sustancia que dentro del ámbito de buen juicio médico es adecuada para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación respuesta alérgica u otros problemas o complicaciones excesivos, es proporcional a una relación de beneficio/riesgo. Los ejemplos de bases farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, amoniaco, L-arginina, hidróxido de calcio, colina, meglumina, lisina, hidróxido de magnesio, hidróxido

de potasio, hidróxido de sodio.

[0015] "Colina" se refiere a 2-hidroxi-*N,N,N*-trimetiletanamonio. Una "sal de colina" es una sal que contiene como mínimo un catión de 2- hidroxi-*N,N,N*-trimetiletanamonio.

[0016] "Meglumina" se refiere a (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-6-(metilamino)hexano-1,2,3,4,5-pentol. Una "sal de meglumina" es una sal que contiene como mínimo un catión de (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-*N*-metilhexan-1-aminio.

[0017] "Forma cristalina" se refiere a una forma sólida de un compuesto en el que las moléculas constituyentes se cargan en un patrón regularmente ordenado, repetido. Una forma cristalina puede ser triclinica, monoclínica, ortorrómica, tetragonal, trigonal, hexagonal o cúbica. Una forma cristalina puede contener una o más regiones, es decir, granos, con límites diferentes de cristal. Un sólido cristalino puede contener dos o más geometrías de cristal.

[0018] "Integrina" se refiere a un receptor de superficie celular α/β -heterodimérico unido de manera no covalente que media la adhesión, la migración y la señalización celulares. Las integrinas se expresan en un amplio rango de organismos, que incluye *C. elegans*, *Drosophila* sp., anfibios, reptiles, pájaros y mamíferos, incluyendo humanos. Se ha identificado un número de subunidades α , designados, por ejemplo, αV , $\alpha 5$ y similares, y un número de subunidades β , designados, por ejemplo, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$ y similares, y se representan varias combinaciones de estas subunidades en la superfamilia de integrinas, que incluye $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$. Se puede subdividir la superfamilia de integrinas en familias, por ejemplo, como integrinas que contienen αV , que incluyen $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$, o las integrinas que contienen $\beta 1$, que incluyen $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 1$.

[0019] "Integrina $\beta 2$ " se refiere a una integrina específica de leucocito que tiene una subunidad $\beta 2$ (a la que se refiere también como CD18). Las integrinas $\beta 2$ tienen diferentes subunidades α seleccionadas de CD11a, CD11b, CD11c y CD11d. Las integrinas $\beta 2$ incluyen integrina CD11b/CD18 de alta expresión (también conocida como Mac-1, CR3 y $\alpha M\beta 2$), funciones de leucocito modulado, que incluyen adhesión, migración, captación y activación celular.

[0020] "Mediados por $\beta 2$ ", como se utiliza en el presente documento para hacer referencia a enfermedades y/o condiciones en un paciente significa que la enfermedad o la enfermedad es consecuencia (en su totalidad o en parte) de un proceso químico o físico que implica una integrina $\beta 2$. Las enfermedades y las condiciones mediadas por $\beta 2$ incluyen enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Los ejemplos de enfermedades y condiciones mediadas por $\beta 2$ incluyen, pero no se limitan a, lesión por isquemia-reperfusión (incluyendo insuficiencia renal aguda y aterosclerosis), lupus, enfermedad de intestino inflamado, enfermedad de Crohn, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, nefritis lúpica, glomeruloesclerosis segmentaria focal, lesión renal, glaucoma, condiciones oftálmicas, rechazo de aloinjerto (tal como nefropatía), trasplante, enfermedad de injerto contra huésped, desórdenes neurológicos, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dermatitis, daño tisular, derrame, engrosamiento neointimal en respuesta a lesión vascular, nefritis anti-GBM, dolor (incluyendo dolor crónico), y cánceres, incluyendo tumores primarios y tumores metastásicos, tales como cáncer de pecho, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y otros.

[0021] "Cáncer" se refiere a un estado o enfermedad anormal que se caracteriza por un crecimiento celular que se propaga rápidamente. Los estados de enfermedad con hiperpropagación y neoplásica pueden clasificarse como patológicos, es decir, que se caracterizan o constituyen un estado de enfermedad o pueden clasificarse como no patológicos, es decir, una desviación de uno normal, pero no asociada con un estado de enfermedad. Generalmente, un cáncer se asociará con la presencia de uno o más tumores, es decir, masas de células anormales. El término «tumor» pretende incluir todos los tipos de crecimientos cancerígenos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos con transformación maligna independientemente de tipo o estado patológico de invasividad.

[0022] Los ejemplos de cáncer incluyen malignidades de diferentes sistemas de órganos, tales como cánceres de pulmón, cánceres de pecho, cánceres de tiroides, cánceres de linfoides, cánceres gastrointestinales y cánceres de tracto genitourinario. El cáncer puede hacer referencia también a adenocarcinomas, que incluyen malignidades, tales como carcinoma de células renales, cáncer de próstata y/o tumores testiculares, carcinoma de células no pequeñas del pulmón, cáncer del intestino delgado y cáncer del esófago. Los carcinomas son malignidades de tejidos epiteliales o endocrinos, que incluyen carcinomas de sistema respiratorio, carcinomas de sistema gastrointestinal, carcinomas de sistema genitourinario, carcinomas testiculares, carcinomas de pecho, carcinomas de próstata, carcinomas de sistema endocrino y melanomas. Un «adenocarcinoma» se refiere a un carcinoma derivado de tejido glandular o en el que las células tumorales forman estructuras glandulares reconocidas. Un «sarcoma» se refiere a un tumor maligno de origen mesenquimal.

[0023] "Melanoma" se refiere a un tumor que surge de un melanocito. Más comúnmente los melanomas se hallan en la piel y con frecuencia se observa que se propagan ampliamente.

[0024] "Punto de control inmunitario" hace referencia a una secuencia reguladora que contribuye a un control coestimulante o inhibitorio de actividad de células T en un organismo. La interacción de «proteínas de puntos de control inmunitario» incluyen proteínas sobre las superficies de células que presentan抗igenos y células T, contribuye a la regulación y el mantenimiento de autotolerancia y la duración y la amplitud de respuestas fisiológicas inmunes en el

organismo. Véanse, por ejemplo, D.M. Pardoll. *Nature Reviews Cancer* 12, 252-264 (2012). Los ejemplos de proteínas de puntos de control inmunitario incluyen, pero no se limitan a, A2aR (receptor de adenosina A2a); BT LA, B, y T (atenuador de linfocitos); ICOS (coestimulador de células T inducible); KIR (receptor similar a la inmunoglobulina de células asesinas); LAG3 (gen 3 de activación de linfocitos); PD1 (proteína 1 de muerte celular programada); CTLA-4 (antígeno 4 asociado con linfocito T citotóxico); y TIM3 (proteína 3 de membrana de célula T).

[0025] "Inhibidor de punto de control inmunitario" hacer referencia a una molécula que en su totalidad o en parte reduce, inhibe, interfiere con o regula de otro modo la actividad de una o más proteínas de punto de control. Los inhibidores de puntos de control inmunitario pueden, por ejemplo, incluir anticuerpos o compuestos similares a péptidos que derivan de anticuerpos.

[0026] "PD1" se refiere a proteína 1 de muerte celular programada, también conocida como CD279, que se expresa por células T, células B y monocitos. PD-1 es una glicoproteína de superficie de tipo I que se caracteriza por un dominio de super familia de inmunoglobulina del grupo V (IgSF) acoplado a un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que contiene dos series de señalización con base en tirosina. PD1 une como mínimo dos ligandos: PD-L1 (expresada por células que incluyen células T, células B, células dendríticas, macrófagos y células madre mesenquimales) y PD-L2 (expresada por células que incluyen células dendríticas, macrófagos y mastocitos).

[0027] "CTLA-4" hace referencia a antígeno 4 asociado con linfocito T citotóxico, también conocido como CD152, que se expresa exclusivamente en células T. CTLA-4 incluye un dominio extracelular con pliegue único Ig con tres bucles similares a CDR, y se une a ligandos CD80 (B7.1) y CD86 (B7.2), entre otros, que se expresan de manera diferencial en células que representan antígeno.

[0028] "Marcador de leucocito" hace referencia a una biomolécula (por ejemplo, un polipéptido) que se encuentra sobre la superficie celular de un leucocito. Los marcadores de leucocito incluyen, pero no se limitan a, receptores de antígeno de células T; CD1; receptores de células NK; IDO1/2; TDO; CSF1R; VEGFR; SIRPa; moléculas de adhesión celular (por ejemplo, CD2, CD58 (LFA-3), CD3, CD4, CD5, CD7, CD8); integrinas β2 (por ejemplo, LeuCAM, CD11a (LFA-1), CD11b (MAC-1 (CR3)), CD11c (CR4), CD18, CD16 (FcR111), CD21 (CR2), CD23, CD25, CD30, CD35 (CR1)); integrinas β3 (por ejemplo, CD41, CDS1); receptores homing (por ejemplo, CD44, Mel-14); integrinas β1 (por ejemplo, CD49a-f (VLA-1), VLA-2, VLA-3, VLA-4); CD14; CD56; CD68; CD71; y CD163.

[0029] "Integrina" se refiere a un receptor de superficie celular α/β-heterodimérico unido de manera no covalente que media la adhesión, la migración y la señalización celulares. Las integrinas se expresan en un amplio rango de organismos, que incluye *C. elegans*, *Drosophila* sp., anfibios, reptiles, pájaros y mamíferos, incluyendo humanos. Se ha identificado un número de subunidades α, designados, por ejemplo, αV, α5 y similares, y un número de subunidades β, designados, por ejemplo, β1, β2, β3, β5 y similares, y se representan varias combinaciones de estas subunidades en la super familia de integrinas, que incluye α5β1, αVβ3 y αVβ5. Se puede subdividir la super familia de integrinas en familias, por ejemplo, como integrinas que contienen αV, que incluyen αVβ3 y αVβ5, o las integrinas que contienen β1, que incluyen α5β1 y αVβ1.

[0030] "Integrina β2" se refiere a una integrina específica de leucocito que tiene una subunidad β2 (a la que se refiere también como CD18). Las integrinas β2 tienen diferentes subunidades α seleccionadas de CD11a, CD11b, CD11c y CD11d. Las integrinas β2 incluyen integrina CD11b/CD18 de alta expresión (también conocida como Mac-1, CR3 y αMβ2), funciones de leucocito modulado, que incluyen adhesión, migración, captación y activación celular.

[0031] "Célula mieloide" generalmente hace referencia a cualquier glóbulo blanco (por ejemplo, leucocito) que no es un linfocito (por ejemplo, no es una célula asesina natural, célula T o célula B). Las células mieloides incluyen macrófagos, células dendríticas y células de granulocitica.

[0032] El término "tratar" como se utiliza en el presente documento, al menos que se indique lo contrario, significa revertir, mitigar, inhibir el progreso de o prevenir el trastorno o la enfermedad al cual se aplica tal término o uno o más síntomas de tal trastorno o enfermedad. El término «tratamiento» como se utiliza en el presente documento hace referencia a la acción de tratar, como "tratar" se define inmediatamente anterior.

[0033] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad de una sal o una forma cristalina de LA1 que se necesita para proporcionar un nivel deseado de fármaco en los tejidos, torrente sanguíneo u otros compartimentos físicos de un paciente, el nivel deseado que da lugar a una respuesta fisiológica anticipada o efecto biológico cuando se administra la sal o forma cristalina de LA1 utilizando la vía seleccionada de administración. La cantidad exacta dependerá de numerosos factores que incluyen, por ejemplo, la sal o forma cristalina particulares de LA1; la formulación farmacéutica específica o dispositivo de administración utilizado; la gravedad del estado de enfermedad; y la adherencia de paciente a un régimen de tratamiento. Las cantidades terapéuticamente eficaces de sales y formas cristalinas de LA1 pueden determinarse fácilmente por un experto en la técnica basándose en la información proporcionada en el presente documento.

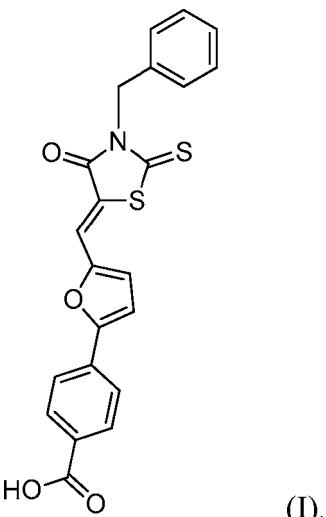
[0034] "Aproximadamente" y "alrededor de" como se utiliza en el presente documento para modificar un valor numérico, indica un rango definido en torno a aquel valor. Si "X" fuera el valor, "aproximadamente X" o "alrededor de

X" indicaría de manera general un valor entre 0,95X y 1,05X que incluye, por ejemplo, desde 0,98X hasta 1,02X o desde 0,99X hasta 1,01X. Cualquier referencia a "aproximadamente X" o "alrededor de X" indica específicamente como mínimo los valores X, 0,95X, 0,96X, 0,97X, 0,98X, 0,99X, 1,01X, 1,02X, 1,03X, 1,04X y 1,05X. Por consiguiente, «aproximadamente X» y «alrededor de X» intentan enseñar y proporcionar ayuda de descripción escrita para una limitación reivindicada de, por ejemplo, "0,98X". Cuando la cantidad «X» incluye únicamente los valores enteros (por ejemplo, «carbonos X»), «aproximadamente X» o «alrededor de X» indica desde (X-1) hasta (X+1). En tales casos, «aproximadamente X» o «alrededor de X» indica especialmente como mínimo los valores X, X-1 y X+1.

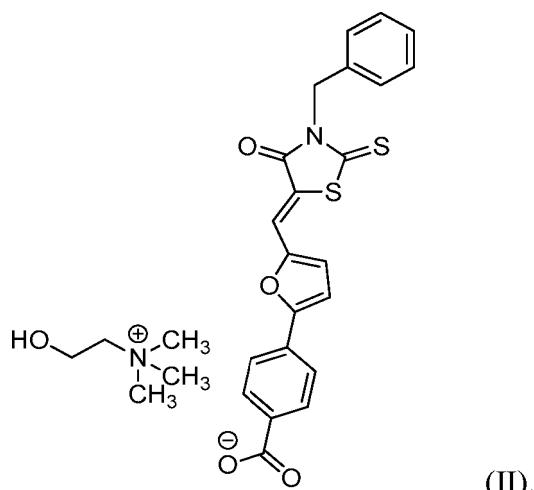
III. Sales de LA1

[0035] Un experto en la técnica apreciará que se puede utilizar un número de bases farmacéuticamente aceptables para preparar sales de LA1. Las bases farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, amoniaco, L-arginina, hidróxido de calcio, colina, meglumina, hidróxido de magnesio, benetamina, benzatina, betaína, deanol, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, hidrabamina, 1-(2-hidroxietil)-pirrolidina, t-butilamina, trometamina, piperazina, imidazol, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina. En determinadas realizaciones, la sal de LA1 comprende un catión derivado de una base farmacéuticamente aceptable seleccionada de amoniaco, L-arginina, hidróxido de calcio, colina, meglumina e hidróxido de magnesio.

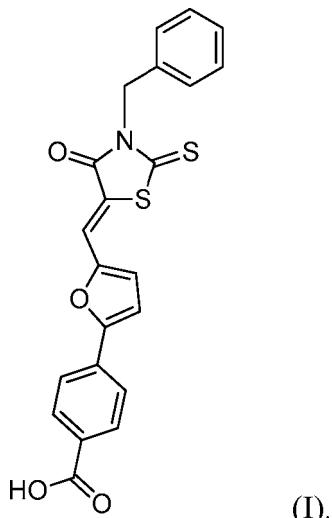
[0036] En un aspecto, la invención proporciona una sal de colina de un compuesto de Fórmula I:



[0037] Como se describe anteriormente, la Fórmula I corresponde a LA1. A la colina también se hace referencia mediante los sinónimos que incluyen (2-hidroxietil)trimetilamonio y 2-hidroxi-N,N,N-trimetiletanamonio. Como se utiliza en el presente documento una "sal de colina" hace una referencia a una sal que contiene como mínimo un catión de 2-hidroxi-N,N,N-trimetiletanamonio. En determinadas realizaciones, la sal de colina de LA1 es una sal según la Fórmula II:



[0038] En un aspecto, la invención proporciona una forma cristalina G de una sal de colina de un compuesto de Fórmula I:



5

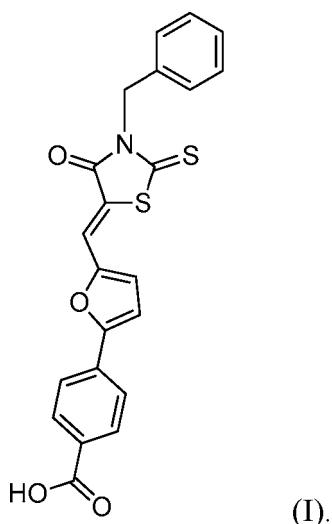
[0039] En algunas realizaciones, la forma cristalina G se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 5,6, 7,9, 11,2, 13,3, 15,0, 15,7, 16,1, 16,2, 16,5, 16,6, 17,8, 18,1, 18,5, 19,1, 19,8, 20,0, 21,1, 23,0, 24,6, 25,0, 25,6, 26,6, 26,8, 26,9, 29,3, 29,7, 30,6, 30,7 y 34,4 °2θ, ± 0,2 °2θ, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα. Por ejemplo, la forma cristalina G puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 tales picos.

10 [0040] En algunas realizaciones, la forma cristalina G se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 5,6, 11,2, 13,3, 15,0, 15,7, 16,1, 16,6, 19,1, 24,6, 25,0, 25,6 y 26,8 °2θ, ± 0,2 °2θ, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα.

15 [0041] En algunas realizaciones, la forma cristalina G se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo diez picos seleccionados de 5,6, 11,2, 13,3, 15,0, 15,7, 16,1, 16,6, 19,1, 24,6, 25,0, 25,6 y 26,8 °2θ, ± 0,2 °2θ, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα.

20 [0042] En algunas realizaciones, la forma cristalina G se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con la Figura 5B, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα.

25 [0043] En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina O de una sal de colina de un compuesto de Fórmula I:



30

35

40

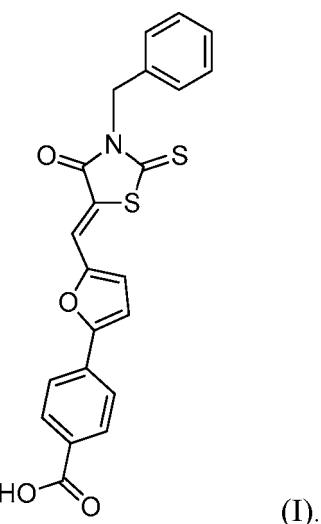
45

5 [0044] En algunas realizaciones, la forma cristalina O se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 8,4, 8,8, 9,3, 13,3, 14,3, 16,7, 17,0, 18,1, 19,4, 19,6, 19,9, 20,7, 20,9, 21,4, 21,7, 22,5, 23,4, 24,1 y 25,5 ° θ , ± 0,2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka. Por ejemplo, la forma cristalina O puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19 de tales picos.

10 [0045] En algunas realizaciones, la forma cristalina O se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 8,4, 8,8, 9,3, 16,7, 19,9, 20,7, 21,7, 22,5, 23,4 y 25,0 ° θ , ± 0,2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka.

15 [0046] En algunas realizaciones, la forma cristalina O se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con la Figura 6E, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka.

15 [0047] En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina O de una sal de colina de un compuesto de Fórmula I:



40 [0048] En algunas realizaciones, la forma cristalina Q se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 5,0, 5,2, 8,4, 9,6, 9,9, 11,5, 12,6, 12,8, 13,3, 14,4, 15,8, 16,1, 16,6, 17,5, 18,0, 19,3, 20,6, 20,7, 21,5, 21,7, 22,9, 23,7, 24,8, 25,1, 25,3, 25,3, 25,5, 26,3, 26,9, 27,0, 28,1, 28,8, 30,4, 31,2, 32,0, 35,7 y 37,4 ° θ ± 0,2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka. Por ejemplo, la forma cristalina Q puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 o 37 de tales picos.

45 [0049] En algunas realizaciones, la forma cristalina Q se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 5,0, 8,4, 9,6, 9,9, 11,5, 12,8, 13,3, 14,4, 18,0, 19,3, 23,7 y 25,5 ° θ ± 0,2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka.

50 [0050] En algunas realizaciones, la forma cristalina Q se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo diez picos seleccionados de 5,0, 8,4, 9,6, 9,9, 11,5, 12,8, 13,3, 14,4, 18,0, 19,3, 23,7, 25,5 ° θ ± 0,2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka.

55 [0051] En algunas realizaciones, la forma cristalina Q se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con D, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka.

60 [0052] En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina R de una sal de colina de un compuesto de Fórmula I:

5

10

15

20

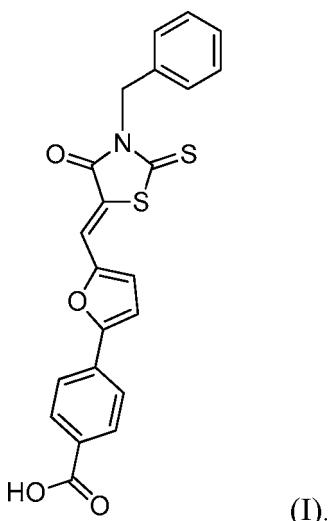
25

30

35

40

45



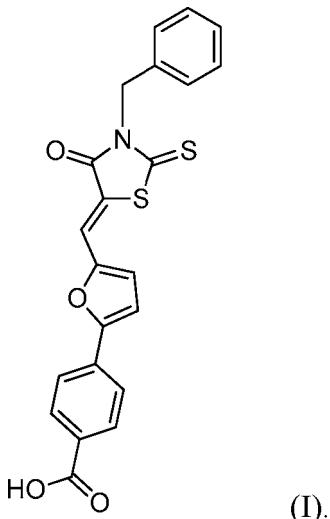
[0053] En algunas realizaciones, la forma cristalina R se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 5,1, 5,6, 8,0, 8,2, 8,4, 9,8, 11,2, 12,7, 13,4, 14,6, 15,1, 15,7, 16,1, 16,3, 16,7, 17,1, 17,8, 18,2, 18,5, 19,1, 19,9, 20,1, 21,1, 22,6, 23,0, 23,4, 24,0, 24,5, 24,7, 25,0, 25,6, 26,0, 26,6, 26,8, 27,1, 27,4, 27,7, 28,1, 29,3, 29,7, 30,6, 31,1, 31,7, 32,2, 32,8, 33,2, 33,5, 34,5, 34,8, 35,1, 35,4, 36,5, 37,6, 38,5, 39,5, 40,4, 41,3, 42,7 y 44,4 °2θ, ± 0,2 °2θ, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα. Por ejemplo, la forma cristalina R puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 o 59 tales picos.

[0054] En algunas realizaciones, la forma cristalina R se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 5,6, 11,2, 15,1, 16,3, 16,7, 16,7, 19,1, 20,1, 21,1, 23,0, 24,5, 25,0, 25,6 26,0, 31,1, 32,8 y 33,5 ± 0,2 °2θ como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα.

[0055] En algunas realizaciones, la forma cristalina R se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo nueve picos seleccionados de 5,6, 11,2, 15,1, 16,3, 16,7, 19,1, 20,1, 21,1, 23,0, 24,5, 25,0, 25,6, 26,0, 31,1, 32,8 y 33,5 ± 0,2 °2θ, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα.

[0056] En algunas realizaciones, la forma cristalina R se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con la Figura 7, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα. En algunas realizaciones, la forma cristalina R se caracteriza por un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende un pico endotérmico en torno a 224,5 °C.

[0057] En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina S de una sal de colina de un compuesto de Fórmula I:



[0058] En algunas realizaciones, la forma cristalina S se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 5,1, 8,4, 9,6, 10,0, 11,6, 12,9, 13,3, 14,4, 14,9, 15,8, 16,6, 17,4, 18,0, 19,2, 19,3, 20,6, 21,4, 21,7, 22,7, 23,7, 24,8, 25,4, 26,3, 26,8, 28,1, 28,7, 29,6, 30,3, 31,0, 31,9, 33,0, 34,0, 35,7, 37,4, 39,2, 40,5 y 41,7 ° θ , ± 0.2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α . Por ejemplo, la forma cristalina S puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,

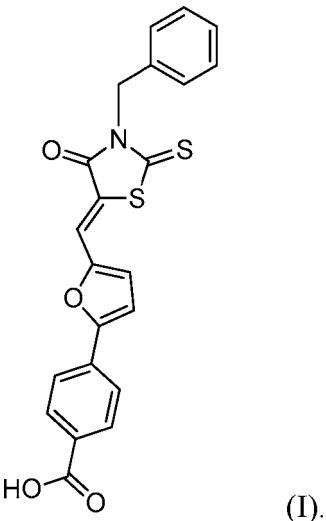
5 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 o 37 tales picos.

[0059] En algunas realizaciones, la forma cristalina S se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 5,1, 8,4, 9,6, 10,0, 12,9, 13,3, 16,6, 17,4, 18,0, 19,2, 10 20,6, 21,4 21,7, 23,7, 25,4 y 28,1 ° θ ± 0.2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

[0060] En algunas realizaciones, la forma cristalina S se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo diez picos seleccionados de 5,1, 8,4, 9,6, 10,0, 12,9, 13,3, 16,6, 17,4, 18,0, 19,2, 15 20,6, 21,4 21,7, 23,7, 25,4 y 28,1 ° θ ± 0,2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

[0061] En algunas realizaciones, la forma cristalina S se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con la Figura 8, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

20 **[0062]** En otro aspecto, la invención proporciona una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I:



[0063] A meglumina también se hace referencia a mediante los sinónimos que incluyen *N*-metil-D-glucamina y (2*R*,3*R*,4*R*,5*S*)-6-(metilamino)hexano-1,2,3,4,5-pentol. Como se utiliza en el presente documento, una "sal de meglumina" hace referencia a una sal que contiene como mínimo un catión de (2*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-2,3,4,5,6-pentahidroxi-*N*-metilhexan-1-aminio. En determinadas realizaciones, la sal de meglumina de LA1 es una sal según la Fórmula III:

25 30

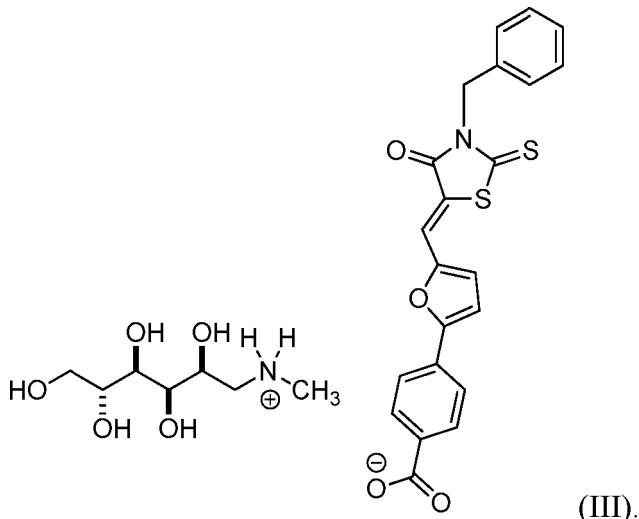
5

10

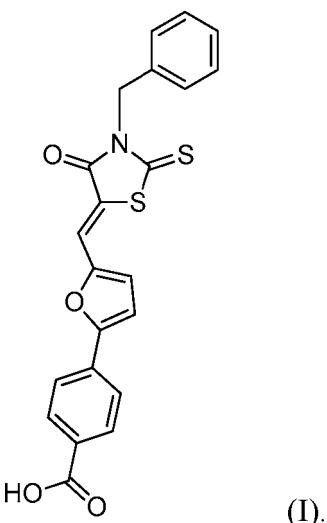
15

20

25



[0064] En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina H de una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I:



[0065] En algunas realizaciones, la forma cristalina H se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6,

24,9 y 27,2 ° $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α . Por ejemplo, la forma

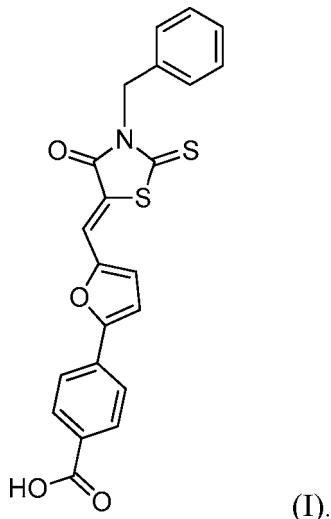
cristalina H puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 de tales picos.

[0066] En algunas realizaciones, la forma cristalina H se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9 y 27,2 ° $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

[0067] En algunas realizaciones, la forma cristalina H se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo diez picos seleccionados de 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9 y 27,2 ° $2\theta \pm 0,2^\circ 2\theta$, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

[0068] En algunas realizaciones, la forma cristalina H se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con la Figura 6B, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

[0069] En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina L de una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I:



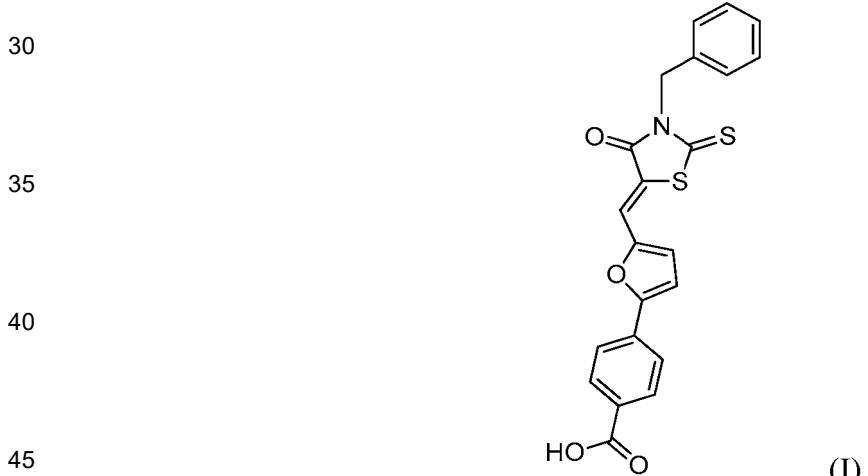
5 **[0070]** En algunas realizaciones, la forma cristalina L se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 5,3, 7,9, 8,5, 9,0, 9,9, 10,6, 10,9, 11,6, 12,0, 12,6, 13,1, 14,5, 14,8, 15,0, 15,3, 15,9, 16,2, 16,9, 17,4, 17,8, 18,0, 18,4, 18,8, 19,2, 20,2, 20,8, 21,3, 21,7, 22,1, 23,2, 23,8, 24,5, 25,2, 25,5, 26,3, 26,9, 27,3, 27,9, 28,4, 28,9, 29,2, 29,8, 30,3, 30,6, 31,1, 32,1, 32,8, 34,1, 34,5, 34,9, 35,1, 36,0, 36,5, 37,5, 38,0, 38,9, 39,6, 40,7, 41,7, 42,5 y 42,9 ° θ , ± 0,2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α . Por ejemplo, la forma cristalina L puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60 o 61 tales picos.

10 **[0071]** En algunas realizaciones, la forma cristalina L se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 8,5, 9,0, 10,9, 15,0, 16,9, 20,2, 21,7, 23,8, 24,5, 25,2, 26,3, 29,2 y 29,8 ° θ ± 0,2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

15 **[0072]** En algunas realizaciones, la forma cristalina L se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo diez picos seleccionados de 8,5, 9,0, 10,9, 15,0, 16,9, 20,2, 21,7, 23,8, 24,5, 25,2, 26,3, 29,2 y 29,8 ° θ ± 0,2 ° θ , tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

20 **[0073]** En algunas realizaciones, la forma cristalina L se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con la Figura 11, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α . En algunas realizaciones, la forma cristalina L se caracteriza por un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende un pico endotérmico en torno a 136,3 °C.

25 **[0074]** En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina M de una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I:



30 **[0075]** En algunas realizaciones, la forma cristalina M se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 6,5, 8,5, 9,0, 9,9, 10,6, 11,6, 14,4, 14,8, 15,0, 15,3,

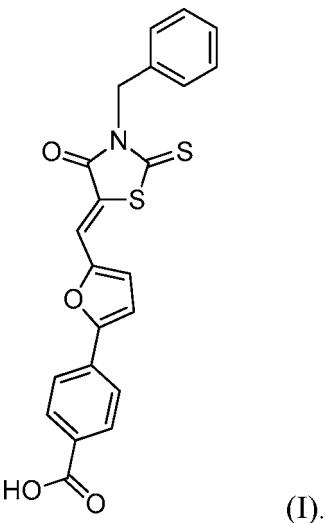
15,9, 16,1, 16,9, 17,8, 18,0, 19,0, 20,4, 20,8, 21,3, 21,7, 23,6, 24,5, 25,2, 26,3, 26,9, 27,5, 27,9, 28,5, 28,9, 29,8, 30,6, 32,1, 32,8, 33,8, 34,5, 36,0, 36,4, 37,1, 38,0, 39,7, 40,7, 41,7, 43,0 y 44,0 °20, ± 0,2 °20, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka. Por ejemplo, la forma cristalina M puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 o 44 tales picos.

5 [0076] En algunas realizaciones, la forma cristalina M se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 8,5, 9,0, 14,8, 15,0, 16,9, 18,0, 21,7, 24,5, 25,2, 26,3 y 29,8 °20 ± 0,2 °20, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka.

10 [0077] En algunas realizaciones, la forma cristalina M se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo nueve picos seleccionados de 8,5, 9,0, 14,8, 15,0, 16,9, 18,0, 21,7, 24,5, 25,2, 26,3 y 29,8 ± 0,2 °20, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka.

15 [0078] En algunas realizaciones, la forma cristalina M se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con la Figura 12, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka. En algunas realizaciones, la forma cristalina M se caracteriza por un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende un pico endotérmico en torno a 294,5 °C.

20 [0079] En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina N de una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I:



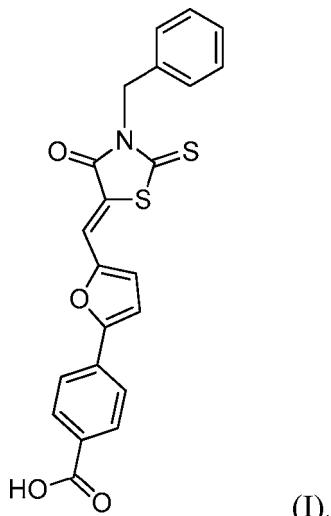
25 [0080] En algunas realizaciones, la forma cristalina N se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 4,3, 5,0, 5,4, 6,1, 7,5, 7,9, 8,9, 9,5, 10,0, 10,8, 11,4, 12,1, 12,5, 13,8, 14,3, 14,8, 15,6, 16,1, 16,7, 17,4, 18,1, 19,2, 19,5, 20,1, 20,9, 21,4, 21,5, 22,1, 22,5, 23,9, 24,6, 25,3, 26,3, 26,7, 27,1, 27,6, 28,2, 29,0, 30,4, 30,9, 32,0, 32,9, 33,9, 34,7, 36,9, 38,3, 39,1, 39,6, 40,2 y 41,4 °20, ± 0,2 °20, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka. Por ejemplo, la forma cristalina N puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 tales picos.

35 [0081] En algunas realizaciones, la forma cristalina N se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 6,1, 7,9, 8,9, 9,5, 10,0, 12,5, 14,3, 14,8, 15,6, 16,1, 17,4, 18,1, 19,5, 20,9, 21,4, 21,5, 23,9, 24,6, 25,3 y 29,0 °20 ± 0,2 °20, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka.

40 [0082] En algunas realizaciones, la forma cristalina N se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo diez picos seleccionados de 6,1, 7,9, 8,9, 9,5, 10,0, 12,5, 14,3, 14,8, 15,6, 16,1, 17,4, 18,1, 19,5, 20,9, 21,4, 21,5, 23,9, 24,6, 25,3 y 29,0 °20 ± 0,2 °20 como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka.

45 [0083] En algunas realizaciones, la forma cristalina N se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con la Figura 13, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Ka. En algunas realizaciones, la forma cristalina N se caracteriza por un termograma de calorimetría diferencial de barrido que comprende un pico endotérmico en torno a 139,9 °C.

[0084] En otro aspecto, la invención proporciona una forma cristalina T de una sal de meglumina de un compuesto de Fórmula I:



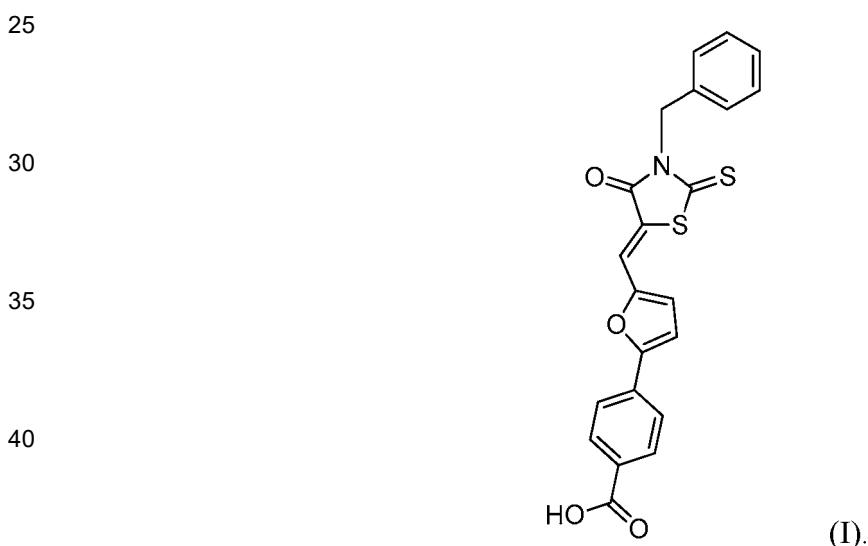
5 [0085] En algunas realizaciones, la forma cristalina T se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 6,9, 8,2, 8,4, 9,4, 11,6, 15,0, 15,1, 15,5, 17,2, 17,8, 18,1, 20,5, 21,3 21,9, 22,3, 25,0 y 26,7 $^{\circ}\text{2}\theta \pm 0.2 ^{\circ}\text{2}\theta$, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α . Por ejemplo, la forma cristalina T puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o 18 tales picos.

10 [0086] En algunas realizaciones, la forma cristalina T se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 6,9, 8,4, 9,4, 11,6, 15,5, 17,2, 21,3, 21,9, 22,3, 23,5, 25,0 y 26,7 $^{\circ}\text{2}\theta \pm 0.2 ^{\circ}\text{2}\theta$, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

15 [0087] En algunas realizaciones, la forma cristalina T se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo diez picos seleccionados de 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5, 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9 y 27,2 $^{\circ}\text{2}\theta \pm 0.2 ^{\circ}\text{2}\theta$, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

20 [0088] En algunas realizaciones, la forma cristalina T se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con la Figura 10 E, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

[0089] En otro aspecto, la divulgación proporciona una forma sólida A de un compuesto de Fórmula I:



45 [0090] En algunas realizaciones, la forma sólida A se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo tres picos seleccionados de 5,3, 7,8, 15,2, 18,7, 19,8, 20,3, 20,8, 25,7, 26,3, 26,5 y 26,9 $^{\circ}\text{2}\theta, \pm 0,2 ^{\circ}\text{2}\theta$, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α . Por ejemplo, la forma

sólida A puede incluir 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 11 de tales picos.

5 [0091] En algunas realizaciones, la forma sólida A se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo seis picos seleccionados de 5,3, 7,8, 15,2, 18,7, 19,8, 20,3, 20,8, 25,7, 26,3, 26,5 y 26,9 $^{\circ}2\theta \pm 0,2 ^{\circ}2\theta$, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

10 [0092] En algunas realizaciones, la forma sólida A se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye como mínimo diez picos seleccionados de 5,3, 7,8, 15,2, 18,7, 19,8, 20,3, 20,8, 25,7, 26,3, 26,5 y 26,9 $^{\circ}2\theta \pm 0,2 ^{\circ}2\theta$, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

15 [0093] En algunas realizaciones, la forma sólida A se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de manera sustancial de acuerdo con la Figura 2, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

20 [0094] En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona procedimientos para preparar las sales y las formas cristalinas de LA1. En general, una sal de LA1 se prepara formando una mezcla (es decir, una mezcla de formación de sal) que contiene el ácido libre de LA1 y como mínimo un equivalente molar de una base adecuada bajo las condiciones suficientes para formar la sal. Típicamente la mezcla contiene un disolvente que es el ácido libre de LA1 y/o la base es parcialmente soluble o totalmente soluble. Los ejemplos de disolventes que son útiles para producir sales de LA1 incluyen, pero no se limitan a, tetrahidrofurano, dioxano, metanol, etanol, isopropanol, N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, metil *tert*-butil éter, acetona, acetato de etilo, diclorometano, agua y mezclas de los mismos. En algunas realizaciones, la mezcla de formación de sal contiene como mínimo un disolvente seleccionado de tetrahidrofurano y metanol. En algunas realizaciones, la mezcla contiene tetrahidrofurano. En algunas realizaciones, la mezcla contiene tetrahidrofurano y metanol. En algunas realizaciones, la mezcla contiene acetona. En algunas realizaciones, la mezcla contiene etanol.

25 [0095] La mezcla de formación de sal contiene ácido libre de LA1 y la base puede formarse bajo o permanecer a cualquier temperatura adecuada. Típicamente, la mezcla permanece a una temperatura que oscila entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 80°C durante un periodo de tiempo suficiente para formar sal. La mezcla puede permanecer a, por ejemplo, entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 80°C desde aproximadamente 15 minutos hasta aproximadamente 72 horas o más. La mezcla puede permanecer a entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 60°C durante un periodo desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 48 horas, o entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 50°C durante un periodo desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 16 horas.

30 [0096] En algunas realizaciones, la mezcla de formación de sal contiene ácido libre de LA1, hidróxido de colina, tetrahidrofurano y metanol. En algunas realizaciones, la proporción de tetrahidrofurano con metanol es 3:1 v:v. En algunas realizaciones, la forma cristalina G se prepara mediante un proceso que incluye formar una mezcla que contiene un equivalente molar de ácido libre de LA1, un equivalente molar de hidróxido de colina y combinación de tetrahidrofurano y metanol en una proporción de 3:1 v:v. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina G incluye además agitar la mezcla a entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 50°C durante un periodo desde aproximadamente 24 horas hasta aproximadamente 48 horas. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina G incluye agitar la mezcla a aproximadamente 50°C durante un periodo de como mínimo aproximadamente 24. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina G incluye eliminar la combinación de tetrahidrofurano y metanol de la mezcla utilizando evaporación después de formación de la forma cristalina G.

35 [0097] En algunas realizaciones, la mezcla de formación de sal contiene ácido libre de LA1, hidróxido de colina y tetrahidrofurano. En algunas realizaciones, la proporción de tetrahidrofurano con metanol es 3:1 v:v. En algunas realizaciones, la forma cristalina O se prepara mediante un proceso que incluye formar una mezcla que contiene un equivalente molar de ácido libre de LA1, un equivalente molar de hidróxido de colina y tetrahidrofurano. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina O incluye además agitar la mezcla a entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 30°C durante un periodo desde aproximadamente 24 horas hasta aproximadamente 48 horas. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina O incluye agitar la mezcla a no más de aproximadamente 30°C durante un periodo de como mínimo aproximadamente 24 horas.

40 [0098] En algunas realizaciones, la mezcla de formación de sal contiene ácido libre de LA1, hidróxido de colina y acetato de etilo o acetona. En algunas realizaciones, la forma cristalina O se prepara mediante un proceso que incluye formar una mezcla que contiene un equivalente molar de ácido libre de LA1, un equivalente molar de hidróxido de colina y acetato de etilo. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina Q incluye agitar la mezcla a entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 30°C durante un periodo desde aproximadamente 12 horas hasta aproximadamente 48 horas. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina Q incluye agitar la mezcla a no más de aproximadamente 30°C durante un periodo de como mínimo aproximadamente 12 horas. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina Q incluye eliminar el acetato de etilo o acetona utilizando filtración al vacío después de formación de la forma cristalina Q.

[0099] La preparación de formas cristalinas de sal de colina de LA1 puede incluir también recristalización de las sales colinas de LA1. Se puede llevar a cabo la recristalización utilizando cualquier disolvente adecuado, que incluye un disolvente próctico (por ejemplo, metanol, etanol, alcohol isopropílico (IPA), *n*-butanol y agua), un disolvente aprótico (por ejemplo, acetato de isopropilo, acetato de etilo y acetona) o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones,

5 la preparación de una forma cristalina de sal de colina de LA1 incluye la recristalización de sal de colina de LA1 a partir de un disolvente próctico. En algunas realizaciones, la preparación de una forma cristalina R de sal de colina de LA1 incluye la recristalización de sal de colina de LA1 a partir de *n*-butanol. En algunas realizaciones, la preparación de una forma cristalina S de sal de colina de LA1 incluye la recristalización de sal de colina de LA1 a partir de metanol.

10 [0100] En algunas realizaciones, la mezcla de formación de sal contiene ácido libre de LA1, meglumina, tetrahidrofurano y metanol. En algunas realizaciones, la proporción de tetrahidrofurano con metanol es 2:1 v:v. En algunas realizaciones, la forma cristalina H se prepara mediante un proceso que incluye formar una mezcla que contiene un equivalente molar de ácido libre de LA1, un equivalente molar de meglumina y una combinación de tetrahidrofurano y metanol en una proporción de 2:1 v:v. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma 15 cristalina H incluye además agitar la mezcla a entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 50°C durante un periodo desde aproximadamente 24 horas hasta aproximadamente 48 horas. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina H incluye agitar la mezcla a aproximadamente 50°C durante un periodo de como mínimo aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina H incluye eliminar la combinación de tetrahidrofurano y metanol de la mezcla utilizando evaporación después de formación de 20 la forma cristalina H.

[0101] En algunas realizaciones, la mezcla de formación de sal contiene ácido libre de LA1, meglumina y etanol. En algunas realizaciones, la forma cristalina T se prepara mediante un proceso que incluye formar una mezcla que contiene un equivalente molar de ácido libre de LA1, un equivalente molar de meglumina y etanol. En algunas 25 realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina T incluye además agitar la mezcla a entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 50°C durante un periodo desde aproximadamente 24 horas hasta aproximadamente 48 horas. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina T incluye agitar la mezcla a aproximadamente 40°C durante un periodo de como mínimo aproximadamente 24 horas. En algunas 30 realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina T incluye eliminar el etanol de la mezcla utilizando filtración al vacío después de formación de la forma cristalina T y aislar como mínimo una parte de forma cristalina T. En algunas realizaciones, el proceso de preparación de forma cristalina T incluye además lavar la forma cristalina T aislada con *terc-butil* metil éter.

[0102] La preparación de formas cristalinas de sal de meglumina de LA1 puede incluir también recristalización de las 35 sales de meglumina de LA1. Se puede llevar a cabo la recristalización utilizando cualquier disolvente adecuado, que incluye un disolvente próctico (por ejemplo, metanol, etanol, alcohol isopropílico (IPA), *n*-butanol y agua), un disolvente aprótico (por ejemplo, *N,N*-dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de isopropilo, acetato de etilo y acetona) o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, la preparación de una forma cristalina de sal de meglumina de LA1 incluye la recristalización de sal de meglumina de LA1 a partir de un disolvente aprótico. En algunas 40 realizaciones, la preparación de una forma cristalina L de sal de meglumina de LA1 incluye la recristalización de sal de colina de LA1 a partir acetato de isopropilo. En algunas realizaciones, la preparación de una forma cristalina M de sal de meglumina de LA1 incluye la recristalización de sal de colina de LA1 a partir acetona. En algunas realizaciones, la preparación de una forma cristalina N de sal de meglumina de LA1 incluye la recristalización de sal de colina de LA1 a partir DMF.

45 IV. Composiciones farmacéuticas

[0103] En un aspecto relacionado, la invención proporciona composiciones farmacéuticas para la administración de las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas pueden 50 prepararse utilizando cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia y administración de medicamentos. En general, los procedimientos de preparación de las composiciones incluyen la etapa de asociación del principio activo con un portador que contiene uno o más ingredientes auxiliares. Típicamente las composiciones farmacéuticas se preparan utilizando la asociación uniforme e íntima del principio activo con un portador líquido o un portador sólido dividido con precisión o ambos, si es necesario, formando el producto en la formulación deseada. Las composiciones 55 pueden prepararse y/o envasarse de manera conveniente en una forma de unidad de toma.

[0104] Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles. Las preparaciones inyectables estériles pueden formularse utilizando vehículos no tóxicos aceptables parenteralmente que incluyen agua, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónico y disolventes aceptables, tales como 1,3-butanodiol. Adicionalmente, se utilizan de manera convencional aceites fijos como un disolvente o un medio de suspensión. Con este fin se puede utilizar cualquier aceite fijo blando que incluye mono o diglicéridos sintéticos. Adicionalmente, los ácidos grasos, tales como ácido oleico, se utilizan en la preparación de inyectables.

65 [0105] Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en la mezcla con excipientes que incluyen, pero no se limitan a: agentes de suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, oleagino-

propilmethylcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes dispersantes o humidificantes, tales como, lecitina, estearato de polioxietileno y monooleato de sorbitano de polietileno; y conservantes, tales como etilo, *n*-propilo y *p*-hidroxibenzoato.

5 [0106] Las suspensiones oleosas pueden formularse suspendiendo el principio activo en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco o en un aceite mineral, tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abejas, parafina sólida o alcohol cetílico. Se puede conservar estas composiciones añadiendo un antioxidante, tal como ácido ascórbico.

10 [0107] Los polvos y los gránulos dispersables (adecuados para la preparación de una suspensión acuosa añadiendo agua) pueden contener el principio activo en la mezcla con un agente dispersante, agente humidificador, agente de suspensión o combinaciones de los mismos. También pueden estar presentes los excipientes adicionales.

15 [0108] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden estar también en forma de emulsiones aceite en agua. La fase aceitosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de oliva o aceite de cacahuete o un aceite mineral, por ejemplo, parafina líquida o mezclas de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas de origen natural, tales como goma arábiga o goma tragacanto; fosfolípidos de origen natural, tales como lecitina; ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitano; y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de sorbitano de polioxietileno.

20 [0109] Las composiciones farmacéuticas que contienen sales y formas cristalinas descritas en el presente documento pueden estar en forma adecuada para el uso oral. Las composiciones adecuadas para la administración oral incluyen, pero no se limitan a, comprimidos, pastillas, tabletas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispensables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, siropes, elixires, soluciones, parches bucales, geles orales, masticables, comprimidos masticables, polvos efervescentes y comprimidos efervescentes. Las composiciones para la administración oral pueden formularse de acuerdo con cualquier procedimiento conocido por un experto en la técnica. Tales composiciones pueden contener uno o más agentes seleccionados de agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes colorantes, agentes antioxidantes y conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente elegantes y agradables.

25 [0110] Generalmente los comprimidos contienen el principio activo en la mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, que incluyen: diluyentes inertes, tales como celulosa, dióxido de silicona, óxido de aluminio, carbonato de calcio, carbonato de sodio, glucosa, manitol, sorbitol, lactosa, fosfato de calcio y fosfato de sodio; agentes de granulación y desintegrantes, tales como almidón de maíz y ácido algínico; agentes de unión, tales como polivinilpirrolidona (PVP), celulosa, polietilenglicol (PEG), almidón, gelatina y acacia; y agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, ácido esteárico y talco. Los comprimidos pueden ser no recubiertos o recubiertos, entéricamente o de otra manera utilizando técnicas conocidas para retrasar la desintegración y la absorción en el tracto gastrointestinal y, de este modo, proporcionar una acción sostenida durante un periodo más largo de tiempo. Por ejemplo, se puede utilizar un material con retraso temporal, tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo. Los comprimidos pueden estar recubiertos con una membrana semipermeable y osmogentes poliméricos opcionales de acuerdo con técnicas conocidas para formar composiciones de bomba osmótica para liberación controlada.

30 [0111] Las composiciones para la administración oral pueden formularse como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (tal como carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín) o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio aceitoso (tal como aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva).

35 [0112] Las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento pueden administrarse también como una solución, ungüento, crema, gel, suspensión, lavados bucales, gotas oculares y similares. Todavía más, la administración transdérmica de las sales y las formas cristalinas se puede llevar a cabo utilizando parches ionotróficos y similares. Se puede administrar el compuesto en forma de supositorios para la administración rectal del fármaco. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que es un sólido a temperaturas ordinarias, pero líquido a la temperatura rectal y, por lo tanto, se derretirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao y polietilenglicoles.

40 [0113] En algunas realizaciones, una sal o una forma cristalina descrita en el presente documento se administra mediante inyección intraperitoneal. En algunas realizaciones, la sal o la forma cristalina se administran por vía oral. En algunas realizaciones, la sal o la forma cristalina se administran por la vía intravenosa.

45 [0114] LA1 puede utilizarse en combinación con otros fármacos seleccionados del, pero no limitados al, grupo que consiste en 5-fluorouracilo, AZD8055, bevacizumab, bortezomib, cetuximab, ciclofosfamida, docetaxel, gemcitabina, imatinib, ipilimumab, lapatinib, paclitaxel, pertuzumab, rapamicina, sipuleucel-T, sorafenib, sunitinib, trastuzumab, temsirolimus, vemurafenib, taxol, paclitaxel, abiraterona, esteroides, corticoesteroides, prednisona, NSAID,

mitomicina, andrógenos, antiandrógenos, estrógenos, antiestrógenos, estatinas, inhibidores de CTLA-4, anticuerpos anti-CTLA-4, moduladores B7, abatacept, rituximab, belatacept, benlumimab, moduladores de PD-1, anticuerpos anti-PD1, moduladores de PDL1, anticuerpos anti-PDL1, inhibidores y moduladores de IDO1, moduladores de CSF1, moduladores de CSF1R, anticuerpos anti-CSF1R, moduladores e inhibidores de CD47, moduladores e inhibidores de CD206, inhibidores y moduladores de TNFa, anticuerpos anti-TNFa, moduladores de citocinas, anticuerpos anti-citocina, moduladores e inhibidores de interleucina, anticuerpos anti-interleucina, anti-CCL2, anti-CCL4, inhibidores de CXCR-4, anti-CXCR4, anti-IL17 y anti-IL23.

[0115] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir también LA1 micronizada o una sal de LA1 micronizada o una forma cristalina micronizada de una sal de LA1. En general, las composiciones que contienen LA1 micronizada contienen partículas que consisten esencialmente en LA1 con diámetros promedios inferiores a 50 µm. El diámetro promedio de las partículas de LA1 puede ser, por ejemplo, inferior a 45 µm, inferior a 40 µm, inferior a 35 µm, inferior a 30 µm, inferior a 25 µm, o inferior a 20 µm. El diámetro promedio de las partículas de LA1 puede ser desde aproximadamente 10 µm hasta aproximadamente 49 µm, o desde aproximadamente 10 µm hasta aproximadamente 45 µm, o desde aproximadamente 15 µm hasta aproximadamente 40 µm, o desde aproximadamente 20 µm hasta aproximadamente 35 µm, o desde aproximadamente 25 µm hasta aproximadamente 30 µm. El diámetro promedio de las partículas de LA1 puede ser aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o aproximadamente 25 µm. En algunas realizaciones, las partículas consisten esencialmente en LA1 micronizada en su forma libre de ácido. En algunas realizaciones, las partículas consisten esencialmente en una sal de LA1 micronizada, como se describe en el presente documento en su forma amorfa o cristalina.

V. Procedimientos de tratamiento

[0116] Las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento pueden utilizarse para tratar una enfermedad o una enfermedad asociada con la actividad de integrinas β2. En determinadas realizaciones, tal enfermedad o enfermedad se selecciona de inflamación (que incluye, pero no se limita a, inflamación aguda y crónica), enfermedades inflamatorias de piel, trastornos relacionados con sistema inmune, enfermedades autoinmunes, quemadura, inmunodeficiencia, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), deficiencia de mieloperoxidasa, síndrome de Wiskott-Aldrich, enfermedad renal crónica, enfermedad granulomatosa crónica, síndromes de hyper-IgM, deficiencia de adhesión leucocitaria, deficiencia de hierro, síndrome de Chediak-Higashi, inmunodeficiencia combinada severa, diabetes, obesidad, hipertensión, VIH, curación de heridas, remodelación, formación de cicatrices, fibrosis, terapias con células madre, caquexia, encefalomielitis, esclerosis múltiple, psoriasis, lupus, artritis reumatoide, trastornos relacionados con sistema inmune, lesión por radiación, trasplante, trasplante de células, transfusión celular, trasplante de órganos, trasplante de médula ósea, preservación de órganos, preservación de células, asma, enfermedad de intestino irritable, síndrome de intestino irritable, colitis ulcerosa, colitis, enfermedad intestinal, cáncer, leucemia, lesión por isquemia-reperfusión, derrame, engrosamiento neointimal asociado con lesión vascular, penílope bulloso, nefropatía obstructiva neonatal, hipercolesterolemia familiar, aterosclerosis, dislipidemia, aneurismas aórticos, arteritis, oclusión vascular, que incluye oclusión de arteria cerebral, complicaciones de cirugía de bypass coronario, miocarditis, que incluye miocarditis autoinmune crónico y miocarditis viral, insuficiencia cardíaca, que incluye insuficiencia cardíaca crónica (ICC), caquexia por insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, estenosis, reestenosis después de cirugía cardíaca, isquemia miocárdica silenciosa, complicaciones después de implantación de dispositivos de asistencia de ventrículo izquierdo, tromboflebitis, vasculitis, que incluye vasculitis de Kawasaki, arteritis de células gigantes, granulomatosis de Wegener, lesión por traumatismo craneal, lesión post isquemia-reperfusión, inflamación cerebral post isquémica, lesión por isquemia-reperfusión después de infarto de miocardio, enfermedad cardiovascular, glaucoma, degeneración macular, uveítis y enfermedad de injerto contra huésped, condiciones neurológicas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dermatitis, dolor (incluyendo dolor crónico) y cáncer, que incluyen tumores primarios y tumores metastásicos, tales como cáncer de pecho, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de pulmón y cáncer de pancreático. En determinadas realizaciones, la enfermedad o la enfermedad asociada con la actividad de integrinas β2 se selecciona de enfermedad de riñón inflamado, una enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo y provoca insuficiencia renal y restenosis, un problema común en personas que se han sometido a angioplastia, uno de los procedimientos más comunes en cardiología de intervención. En determinadas realizaciones la integrina β2 es CD11b/CD18.

[0117] Las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento pueden utilizarse para tratar cáncer o tumores reducidos en pacientes. En determinadas realizaciones, las sales y las formas cristalinas regulan infiltración tumoral de leucocitos. Los tumores secretan citocinas inflamatorias para captar células que expresan integrinas β2, tales como CD11b/CD18, para facilitar neovascularización. Durante los tratamientos de cáncer, que incluyen quimioterapia y radiación, los tumores captan grandes números de leucocitos específicos o células derivadas de médula ósea que reparan vasculatura tumoral y permiten recrecimiento y recurrencia tumoral. Por lo tanto, los compuestos y los procedimientos de esta invención son útiles para reducir la actividad, tal como infiltración, de dichas células. Adicionalmente, la activación de CD11b puede potenciar respuestas inmunes antitumorales. Por consiguiente, los compuestos que agonizan Cd11b, incluyendo las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento, así como otros compuestos, pueden utilizarse para direccionamiento y aprovechamiento de secuencias inmunomoduladoras en terapia antitumoral. En algunas realizaciones, las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento son útiles para potenciar la respuesta de otros tratamientos de cáncer, tales como quimioterapia, terapia con anticuerpos, terapia de radiación y terapias basadas en células.

[0118] En algunas realizaciones, las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento se utilizan para disminuir captación de leucocitos después de lesión, inflamación, infección bacteriana, infección vírica u otras enfermedades y condiciones en mamíferos. En algunas realizaciones, las sales y las formas cristalinas pueden 5 utilizarse para reducir lesión de órganos, que incluye hiperplasia neointimal después de lesión arterial. En algunas realizaciones, las sales y las formas cristalinas pueden utilizarse para preservar la función de órganos después de lesión de órgano, tal como lesión por isquemia-reperfusión. Por ejemplo, las sales y las formas cristalinas pueden 10 preservar función renal después de lesión renal aguada. En algunas realizaciones, las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento pueden utilizarse para preservar la función renal después de nefritis o nefrosis glomerular.

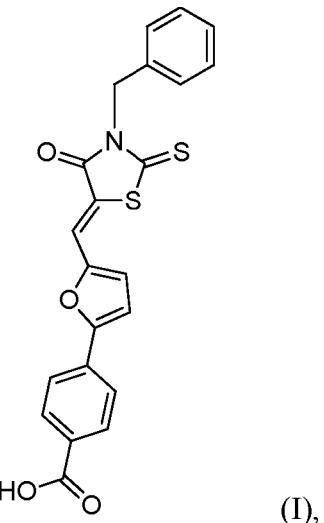
[0119] En algunas realizaciones, las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento pueden utilizarse 15 para regular la función de células inflamatorias, tales como linfocitos y leucocitos. Los compuestos pueden utilizarse para tratar inflamación medida por integrinas en un número de órganos y tejidos que incluyen, pero no se limitan a, inflamación mediada por integrinas del ojo, el cerebro, la piel, el hígado y el riñón. Por ejemplo, las sales y las formas 20 cristalinas pueden utilizarse para inducir tolerancia al injerto en un animal receptor. Los injertos pueden incluir médula ósea, células de médula ósea, células madre, células inmunes, células modificadas, órganos, tejidos u otras células. Del mismo modo, las sales y las formas cristalinas pueden reducir enfermedad de injerto contra huésped en el receptor. 25 Por los tanto, las sales y las formas cristalinas pueden mejorar resultados de trasplante.

[0120] Por consiguiente, la divulgación proporciona los procedimientos para prevenir y tratar una enfermedad o 20 enfermedad mediada por integrina $\beta 2$ en un paciente que comprende administrar a dicho paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal o una forma cristalina descrita en el presente documento. En determinadas 25 realizaciones, la enfermedad o la enfermedad mediada por integrina $\beta 2$ es una enfermedad o una enfermedad mediada por CD11b/CD18.

[0121] LA1 ha mostrado también eficacia en un ensayo de agonista de receptor A2A de adenosina y un ensayo de 30 agonista de receptor de glucocorticoides, indicando que la LA1 y las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento pueden utilizarse para tratar condiciones relacionadas con la actividad de aquellos receptores.

[0122] En un aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar cáncer. El procedimiento comprende 35 administrar a un sujeto que lo necesita:

una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de Fórmula I



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de punto de control inmunitario.

[0123] En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar al sujeto una sal farmacéuticamente 40 aceptable del compuesto de acuerdo con la Fórmula I. En algunas realizaciones, la sal es una sal de meglumina o una sal de colina. En algunas realizaciones, la invención incluye administrar una sal o una forma cristalina de LA1 como se describe en el presente documento.

[0124] En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario inhibe la actividad de una o más dianas 45 seleccionadas del grupo que consiste en CTLA-4, 4-1BB (CD137), 4-1BBL (CD137L), PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160, IDO1/IDO2 (indoleamina 2,3-

dioxigenasa) y CGEN-15049.

[0125] En algunas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario es una proteína que se une a una o más dianas seleccionadas del grupo que consiste en CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, TIM3, B7H3, B7H4, VISTA, KIR, 2B4, CD160 y CGEN-15049.

[0126] En algunas realizaciones, la proteína se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo que se une con antígeno. En algunas realizaciones, la proteína se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo CTLA-4, un anticuerpo OX40, un anticuerpo PD-L1, un anticuerpo Pd1y un anticuerpo BY55. En algunas realizaciones, la proteína es un anticuerpo CTLA-4. En algunas realizaciones, la proteína es un anticuerpo PD1.

[0127] En algunas realizaciones, la proteína se selecciona del grupo que consiste en tremelimumab, MEDI4736, MK-3475, nivolumab, CT-011, AMP224, BMS-936559, MPLDL3280A, MSB0010718C y ipilimumab.

[0128] En algunas realizaciones, el cáncer se asocia con la expresión de uno o más marcadores de leucocitos en el sujeto. En algunas realizaciones, los marcadores de leucocitos se seleccionan del grupo que consiste en CD11b/CD18, IDO1/2, TDO, CSF1R, CD14, CD16, CD68, VEGFR y SIRPa.

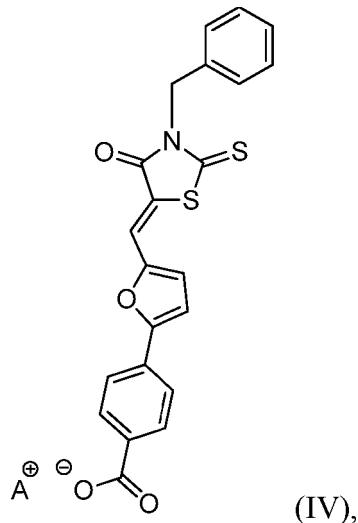
[0129] En algunas realizaciones, el cáncer se expresa en una o más dianas para integrinas $\beta 2$. En algunas realizaciones, las dianas se seleccionan del grupo que consiste en ICAM-1, VCAM-1, fibronectina, vironectina, fibrinógeno y fragmentos complementarios.

[0130] En algunas realizaciones, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en un melanoma, un sarcoma, un linfoma, un glioma, una leucemia, cáncer pancreático, un tumor de células gigantes tenosinoviales, cáncer de pecho, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de estómago y cáncer de pulmón. En algunas realizaciones, el cáncer es un melanoma. En algunas realizaciones, el paciente con cáncer ha sido diagnosticado con una enfermedad autoinmune (por ejemplo, esclerosis múltiple, lupus, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa).

[0131] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar melanoma. El procedimiento comprende administrar a un sujeto que lo necesita:

una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la Fórmula IV

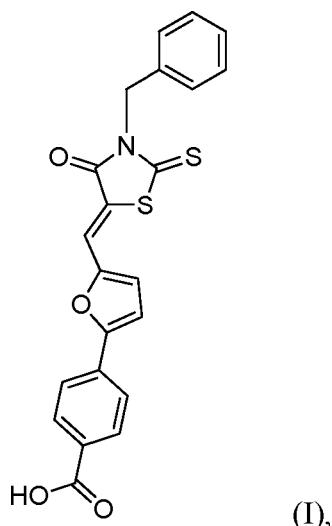
35



en donde A^+ se selecciona del grupo que consiste en un catión de colina y un catión de meglumina y una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo PD1.

[0132] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar cáncer que incluye administrar a un sujeto que lo necesita:

45 una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I



20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que se dirige a células mieloides.

25 [0133] En algunas realizaciones, el agente que se dirige a células mieloides inhibe la actividad de una o más dianas seleccionadas del grupo que consiste en CSF1R, IDO1/2, TDO, CCR2, CCL2, CXCR4, JAK1/2/3/4/5, PI3K γ , integrina β 1, integrina α 4 β 1 (VLA4), VEGFR.

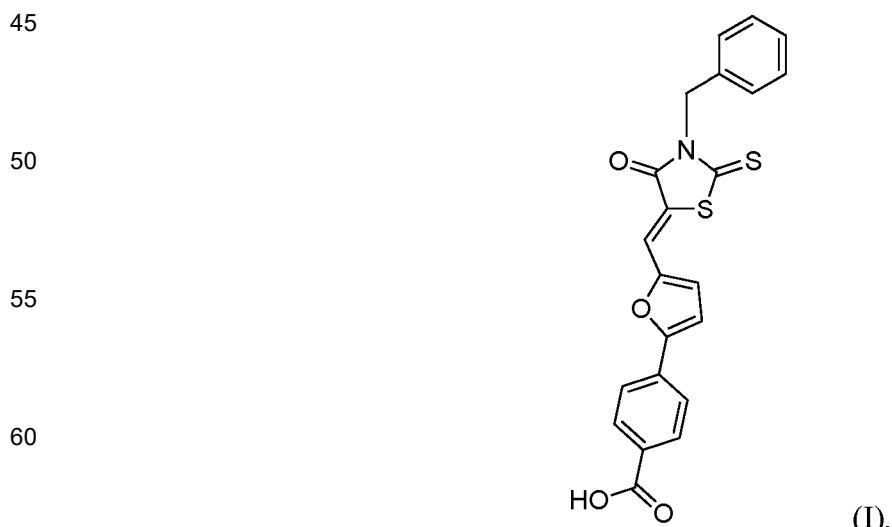
[0134] En algunas realizaciones, el agente que se dirige a células mieloides aumenta la actividad de SIRPa.

30 [0135] En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el procedimiento comprende además la detección de uno o más marcadores en una muestra obtenida del sujeto identificando, de este modo, al sujeto como el que necesita tratamiento. En algunas de estas realizaciones, los marcadores de leucocitos se seleccionan del grupo que consiste en CD11b/CD18, IDO1/2, TDO, CSF1R, CD14, CD16, CD68, VEGFR y SIRPa. En algunas de estas realizaciones, el marcador es CD11b/CD18.

35 [0136] En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el método comprende además la supervisión de eficacia de tratamiento utilizando escaneo de células tumorales con agentes de escaneo dirigidos a macrófago. En algunas realizaciones de cualquiera de los aspectos anteriores, el procedimiento comprende además la supervisión de eficacia utilizando la supervisión de niveles de uno o más marcadores de macrófagos en el sujeto.

40 [0137] En un aspecto relacionado, la divulgación proporciona un procedimiento para reducir leucocitos CD11b+ en un tumor. El procedimiento comprende administrar a un sujeto que lo necesita:

una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I



65 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y

una cantidad eficaz de un agente seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de punto de control inmunitario, un agente que se dirige a células mieloides y combinaciones de los mismos.

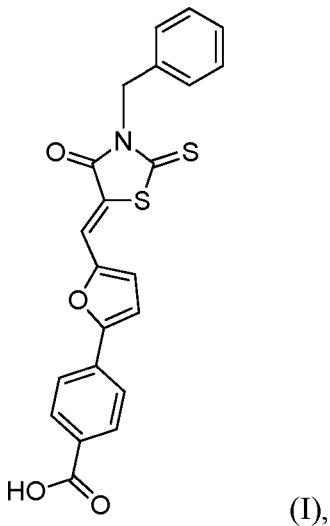
5 [0138] En algunas realizaciones, los leucocitos CD11b+ son células mieloides. En algunas realizaciones, los leucocitos CD11b+ son macrófagos. En algunas realizaciones, los leucocitos CD11b+ son neutrófilos.

[0139] En algunas realizaciones, la proporción de macrófagos anti-tumorigénicos con pro-tumorigénicos en el tejido tumoral se cambia.

10 [0140] En algunas realizaciones, la proporción de M1/M2 se cambia en el tumor. En algunas de estas realizaciones, los macrófagos se polarizan hacia un fenotipo M1.

15 [0141] En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un procedimiento para prevenir metástasis tumoral en un sujeto que tiene cáncer. El procedimiento incluye:

administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la Fórmula I



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
reducir la infiltración de leucocitos CD11b+ en un sitio de metástasis potencial en el sujeto.

40 [0142] En algunas realizaciones, el procedimiento para prevenir metástasis tumoral incluye además la administración de una cantidad eficaz de un agente seleccionado del grupo que consiste en un inhibidor de punto de control inmunitario, un agente que se dirige a células mieloides y combinaciones de los mismos.

45 [0143] Las sales y las formas cristalinas descritas en el presente documento pueden administrarse en cualquier dosis adecuada en los procedimientos de la divulgación. En general, una sal o una forma cristalina se administra en una dosis que oscila entre aproximadamente 0,1 miligramos y aproximadamente 2000 miligramos por kilogramo de un peso corporal de sujeto (es decir, aproximadamente 0,1-2000 mg/kg). La dosis de la sal o la forma cristalina puede ser, pro ejemplo, aproximadamente 0,1-1000 mg/kg, o aproximadamente 1-500 mg/kg, o aproximadamente 25-250 mg/kg, o aproximadamente 50-100 mg/kg, o aproximadamente 10-100 mg/kg. La dosis de la sal o la forma cristalina puede ser aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550, 1600, 1650, 1700, 1750, 1800, 1850, 1900, 1950 o 2000 mg/kg. La dosis de la sal o la forma cristalina puede administrarse en una dosis inferior a aproximadamente 1, inferior a aproximadamente 2, inferior a aproximadamente 3, inferior a aproximadamente 4, inferior a aproximadamente 5, inferior a aproximadamente 10, inferior a aproximadamente 15, inferior a aproximadamente 20, inferior a aproximadamente 25, inferior a aproximadamente 30, inferior a aproximadamente 35, inferior a aproximadamente 40, inferior a aproximadamente 45, inferior a aproximadamente 50, inferior a aproximadamente 55, inferior a aproximadamente 60, inferior a aproximadamente 65, inferior a aproximadamente 70, inferior a aproximadamente 75, inferior a aproximadamente 85, inferior a aproximadamente 90, inferior a aproximadamente 95, inferior a aproximadamente 100, inferior a aproximadamente 150, inferior a aproximadamente 200, inferior a aproximadamente 250, inferior a aproximadamente 300, inferior a aproximadamente 350, inferior a aproximadamente 400, inferior a aproximadamente 450, inferior a aproximadamente 500, inferior a aproximadamente 550, inferior a aproximadamente 600, inferior a aproximadamente 650, inferior a aproximadamente 700, inferior a aproximadamente 750, inferior a aproximadamente 800, inferior a aproximadamente 850, inferior a aproximadamente 900, inferior a aproximadamente 950, o inferior a aproximadamente 1000 mg/kg. En algunas realizaciones, la sal o la forma cristalina se administran en una dosis inferior

a 200 mg de un compuesto por kg del peso corporal de sujeto (200 mg/kg). En algunas realizaciones, la sal o la forma cristalina se administran en una dosis inferior a 100 mg/kg. En algunas realizaciones, la sal o la forma cristalina se administran en una dosis inferior a 50 mg/kg. En algunas realizaciones, la sal o la forma cristalina se administran en una dosis inferior a 20 mg/kg.

5 [0144] Los inhibidores de punto de control inmunitario pueden administrarse en cualquier dosis adecuada en los procedimientos de la divulgación. En determinadas realizaciones, un inhibidor de punto de control inmunitario de anticuerpo se administra en una dosis que oscila entre aproximadamente 0,1 miligramos y aproximadamente 100 miligramos por kilogramo de un peso corporal de sujeto (es decir, aproximadamente 0,1-100 mg/kg). La dosis de inhibidor de punto de control inmunitario de anticuerpo puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,1-50 mg/kg, o aproximadamente 1-10 mg/kg. La dosis del inhibidor de punto de control inmunitario de anticuerpo puede ser aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 mg/kg.

10 [0145] Las dosis pueden variar dependiendo de los requisitos del paciente, la gravedad del trastorno o la enfermedad mediado por integrina β2 que se trata y la formulación particular que se administra. La dosis administrada a un paciente debería ser suficiente para llevar a una respuesta beneficiosa terapéutica en el paciente. El tamaño de la dosis se determinará por la existencia, el origen y el alcance de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración del fármaco en un paciente particular. La determinación de la dosis correcta para una situación particular está dentro de la habilidad del médico. La dosis total puede dividirse y administrarse en porciones durante 20 un periodo de tiempo adecuado para tratar la enfermedad mediada por integrinas.

25 [0146] La administración de una sal o una forma cristalina descrita en el presente documento se puede llevar a cabo durante un periodo de tiempo que variará dependiendo del origen del trastorno o la enfermedad particular mediado por integrinas β2, su gravedad y la enfermedad general del paciente. La administración se puede llevar a cabo, por ejemplo, cada hora, cada 2 horas, tres horas, cuatro horas, seis horas, ocho horas o dos veces al día que incluye cada 12 horas o cualquier intervalo intermedio de la misma. La administración se puede llevar a cabo una vez al día o una vez cada 36 horas o 48 horas o una vez al mes o varios meses. Después del tratamiento, se pueden supervisar en un paciente los cambios en su enfermedad y la mitigación de los síntomas del trastorno o la enfermedad mediada por integrinas β2. Se puede incrementar la dosis de la sal o de la forma cristalina en el caso de que el paciente no responda de manera significante a un nivel de dosis particular o se puede disminuir la dosis si se observa una mitigación de los 30 síntomas del trastorno o la enfermedad mitigado por integrinas β2, o si el trastorno o la enfermedad se ha extirpado, o si se observan efectos secundarios inaceptables con una dosis particular.

35 [0147] Se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una sal o una forma cristalina descrita en el presente documento al sujeto en un régimen de tratamiento que comprende intervalos de como mínimo 1 hora, o 6 horas, o 12 horas, o 24 horas, o 36 horas, o 48 horas entre las dosis. La administración se puede llevar a cabo en intervalos de como mínimo 72, 96, 120, 168, 192, 216 o 240 horas o la cantidad equivalente de días. El régimen de dosificación puede constar de dos o más conjuntos de intervalos diferentes. Por ejemplo, se puede administrar una primera parte del régimen de dosificación a un sujeto múltiples veces al día, cada día, cada dos días o cada tres días. 40 El régimen de dosificación puede empezar con la administración de dosis al sujeto cada dos días, cada tres días, cada semana, cada dos semanas o cada mes. La primera parte del régimen de dosificación puede administrarse, por ejemplo, hasta 30 días, tal como 7, 14, 21 o 30 días. Una segunda parte posterior del régimen de dosificación con un intervalo diferente de administración que se administra cada semana, cada 14 días o cada mes puede seguir opcionalmente ininterrumpido 4 semanas hasta dos años o más, tal como 4, 6, 8, 12, 16, 26, 32, 40, 52, 63, 68, 78 o 45 104 semanas. Alternativamente, si el trastorno o la enfermedad mediados por integrinas β2 entra en remisión o mejora de manera general, la dosis se puede conservar o mantener en una cantidad inferior a la máxima. Si el trastorno o la enfermedad reaparece, se puede retomar el primer régimen de dosificación hasta que se vea una mejora, y se puede volver a poner en práctica el segundo régimen de dosificación. Este ciclo se puede volver a repetir múltiples veces 50 como sea necesario.

55 [0148] En determinadas realizaciones, una sal de LA1 y un inhibidor de punto de control inmunitario se administran en cantidades sinérgicas; en tales casos el efecto de los agentes cuando se administran en combinación es mayor que el efecto añadido de la composición cuando se administra sola como un agente único. En algunas realizaciones, el efecto sinérgico se obtiene mediante la administración de la sal de LA1 y el inhibidor de punto de control en concentraciones inferiores a la concentración con eficacia máxima de los fármacos cuando se administran como agentes únicos. Las cantidades sinérgicas pueden depender de factores que incluyen, pero no se limitan a, la sal de LA1 o la forma cristalina particular, el inhibidor de punto de control inmunitario particular, la enfermedad (por ejemplo, tipo de cáncer) que se trata y la vía y la frecuencia de administración. Se puede observar la sinergia en términos de toxicidad baja, efecto anti-proliferativo y/o anti-infeccioso aumentado o algún otro efecto beneficioso de la combinación 60 en comparación con los componentes individuales.

65 [0149] En algunas realizaciones, la LA1 o una sal de LA1 como se describe anteriormente se administra al sujeto en una cantidad que se oscila entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 2000 mg/kg. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario se administra en una cantidad sinérgica con la LA1 o la sal de LA1. En algunas de estas realizaciones, la LA1 o la sal de LA1 se administra al sujeto por la vía oral.

[0150] En algunas realizaciones, la LA1 o una sal de LA1 se administra al sujeto en una cantidad que se oscila entre aproximadamente 2 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg. En algunas de estas realizaciones, el inhibidor de punto de control inmunitario se administra en una cantidad sinérgica con la LA1 o la sal de LA1. En algunas de estas realizaciones, la LA1 o la sal de LA1 se administra al sujeto por la vía oral.

[0151] La LA1 puede modular la liberación de uno o más factores de secreción que incluyen, pero no se limitan a citocinas y quimiocinas a partir de leucocitos. Las citocinas incluyen citocinas proinflamatorias (por ejemplo, interleucina (IL)-1, factor de necrosis tumoral (TNF)) y citocinas antiinflamatorias (por ejemplo, IL-4, IL-10, IL-13). En determinadas realizaciones, la administración de una sal o una forma cristalina descrita en el presente documento da lugar a una modulación de expresión de citocinas (u otro factor soluble) mediante LA1. En algunas realizaciones, la citocina se selecciona de IL-1 β , IL-6 y IL-10. En algunas realizaciones, el factor soluble se selecciona de TNF- α , interferón a (IFNa), interferón b (IFNb) e interferón (IFN)- γ . Los factores solubles, tales como citocinas son marcadores inflamatorios y pueden ponerse a prueba en suero de paciente o células o tejidos derivados de paciente para probar la eficacia de LA1 (o la eficacia de una sal o una forma cristalina de LA1) en el tratamiento de una enfermedad particular. Un número de ensayos diagnósticos de citocinas, tales como IL-1 β y TNF- α se conocen en la técnica y pueden utilizarse para conseguir la eficacia antiinflamatoria de una sal o una forma cristalina de LA1. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) y sistemas de conjuntos de microesferas para captación de citocinas utilizando anticuerpos unidos a resina y detección utilizando citometría de flujo.

[0152] En otro aspecto, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar cáncer, en el que el procedimiento incluye: determinar el nivel de expresión de una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en CD11b, CD18, IDO1, IDO2, TDO, CSF1R, CD14, CD16, CD68, VEGFR, SIRPa, ARG1, UPAR, CD114, CD11a, CD11c, CD11d, CD45, CD4, CD8, FOXP3, CD3, ICAM1, CD31, DESMIN, alfa actina de músculo liso y CD64, CD32, CD89 en el sujeto y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de LA1 o una sal o una forma cristalina de la misma, al sujeto. En algunas realizaciones, la determinación del nivel de expresión de las proteínas incluye obtener un biomuestra (tal como una biopsia) del paciente y determinar el nivel de expresión de las proteínas en el biomuestra. En algunas de estas realizaciones, el procedimiento incluye además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de punto de control inmunitario al sujeto. En algunas de estas realizaciones, el procedimiento comprende además determinar de manera periódica el nivel de expresión de la proteína a lo largo de un periodo de evaluación y ajustar el tratamiento si se observa que el nivel de expresión de la proteína se cambia a lo largo del periodo de evaluación.

[0153] En algunas realizaciones, el procedimiento incluye determinar que el nivel de expresión de una proteína en un biomuestra, tal como una biopsia, obtenido de un sujeto es superior al nivel de expresión de la proteína en una muestra de biomuestra obtenida de un sujeto sano. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye determinar que el nivel de expresión de una proteína en una muestra de biopsia obtenida de un sujeto es superior al nivel de expresión de la proteína en una muestra de tejido no canceroso obtenida del sujeto. En algunas de estas realizaciones, se determina el nivel de expresión de más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en CD11b, CD18, IDO1, IDO2, TDO, CSF1R, CD14, CD16, CD68, VEGFR, SIRPa, ARG1, UPAR, CD114, CD11a, CD11c, CD11d, CD45, CD4, CD8, FOXP3, CD3, ICAM1, CD31, DESMIN, alfa actina de músculo liso, CD64, CD32 y CD89.

[0154] En algunas realizaciones, el procedimiento incluye determinar que el nivel de expresión de una proteína en un biomuestra, tal como una biopsia, obtenido de un sujeto es inferior al nivel de expresión de la proteína en una muestra de biomuestra obtenida de un sujeto sano. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye determinar que el nivel de expresión de una proteína en una muestra de biopsia obtenida de un sujeto es inferior al nivel de expresión de la proteína en una muestra de tejido no canceroso obtenida del sujeto. En algunas de estas realizaciones, se determina el nivel de expresión de más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en CD11b, CD18, IDO1, IDO2, TDO, CSF1R, CD14, CD16, CD68, VEGFR, SIRPa, ARG1, UPAR, CD114, CD11a, CD11c, CD11d, CD45, CD4, CD8, FOXP3, CD3, ICAM1, CD31, DESMIN, alfa actina de músculo liso, CD64, CD32 y CD89.

[0155] En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un procedimiento para tratar cáncer, en el que el procedimiento incluye: determinar el nivel de una o más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en factor estimulante de colonias 1 (CSF1); proteína C reactiva (PCR); receptor de uroquinasa (uPAR); receptor soluble de activador del plasminógeno tipo uroquinasa (suPAR); Glipican-1; CD11b; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptor de VEGF; una metaloproteína de matriz, tal como MMP-9 y similares; TNF α ; una interleucina, tal como IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-17, IL-23, y similares; TGF β ; interferones que incluyen IFN- α , IFN- β y similares; triptófano; lisina; arginina; lactato; y un microARN en el sujeto, y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de LA1 o una sal o una forma cristalina de la misma al sujeto que tiene el biomarcador. En algunas realizaciones, la determinación del nivel de las sustancias incluye obtener una muestra de sangre, plasma, orina o saliva del paciente y determinar el nivel de expresión de las proteínas en la muestra. En algunas de estas realizaciones, el procedimiento incluye además administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de punto de control inmunitario al sujeto. En algunas de estas realizaciones, el procedimiento comprende además determinar de manera periódica el nivel de expresión de la sustancia a lo largo de un periodo de evaluación y ajustar el tratamiento si se observa que el nivel de la sustancia se cambia a lo largo del periodo de evaluación.

[0156] En algunas realizaciones, el procedimiento incluye determinar que el nivel de la sustancia en una muestra de

sangre, plasma, orina o saliva obtenida de un sujeto es superior al nivel de expresión de la proteína en una muestra similar de plasma obtenida de un sujeto sano. En algunas realizaciones, el procedimiento incluye determinar que el nivel de la sustancia en una muestra de sangre, plasma, orina o saliva obtenida de un sujeto es inferior al nivel de la sustancia en una muestra similar obtenida de un sujeto sano. En algunas de estas realizaciones, se determina el nivel de más sustancias seleccionadas del grupo que consiste en factor estimulante de colonias 1 (CSF1); proteína C reactiva (PCR); receptor de uroquinasa (uPAR); receptor soluble de activador del plasminógeno tipo uroquinasa (suPAR); Glipican-1; CD11b; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptor de VEGF; una metaloproteinasa de matriz, tal como MMP-9 y similares; TNF α ; una interleucina, tal como IL-6, IL-1 β , IL-10, IL-17, IL-23 y similares; TGF β ; interferones que incluyen IFN- α , IFN- β y similares; triptófano; lisina; arginina; lactato; y un microARN.

VI. Ejemplos y Ejemplos de Referencias

[0157] Los **Ejemplos de Referencias** están pensados para ser aquellos **Ejemplos** que cubren materia que no entra en el alcance de las reivindicaciones, pero sirven para ilustrar mejor las ventajas de la invención. Ejemplo 1. Preparación de la Forma I de Solvato de DMSO de leukadherina LA1

[0158] Se preparó un vapor de difusión de dietiléter (vial externo, cerrado) en una solución de DMSO (vial interno, abierto). Después de un día a temperatura ambiente, en el que se añadió una cantidad igual de cada uno al vial que contenía el DMSO, el vial se colocó en un congelador a -10 °C. El DMSO se congeló, pero existían placas cristalinas que crecieron en las zonas superiores del vial interno. Se describieron las placas cristalinas. ^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 8,10 (d, 2H, J = 8,2 Hz), 7,96 (d, 2H, J = 8,4 Hz), 7,74 (s, 1H), 7,50 (d, 1H, J = 3,8 Hz) 7,42 (d, 1H, J = 4 Hz), 7,37-7,26 (m, 5H), 5,25 (s, 1H), 3,31 (bs, 1H).

[0159] La forma cristalina de leukadherina LA1 se ha descrito utilizando espectroscopia de difracción de rayos X en polvo, que produce una huella de la forma cristalina particular. Las medidas de 2θ son precisas dentro de $\pm 0,2$ grados.

[0160] Los datos de difracción de rayos X para leukadherina LA1 cristalina se obtuvieron utilizando un difractómetro con plataforma Bruker SMART APEX II CCD para una recolección de datos a 100,0(5) K. Se calcularon un conjunto preliminar de constantes celulares y una matriz de orientación a partir de los reflejos recogidos de tres cuñas ortogonales del espacio recíproco. La recolección completa de datos se llevó a cabo utilizando radiación de MoK α (monocromador de grafito) con un marco temporal de 60 segundos y un detector de distancia de 3,99 cm. Se estudió una región orientada al azar del espacio recíproco: se recogieron cuatro secciones principales de marcos con medidas de 0,50° en ω en cuatro posiciones ϕ diferentes y un detector de posición de -38° en 2θ . Los datos de intensidad se corrigieron para la absorción. Los constantes celulares finales se calcularon a partir de centroides xyz de 4045 reflejos fuertes a partir de la recolección de datos reales después de la integración.

[0161] La Figura 1 muestra la estructura cristalina de rayos X determinada por la Forma I de Solvato de DMSO de leukadherina LA1, para la cual los datos se resumen en la Tabla 1 y la Tabla 2.

Tabla 1. Datos de cristal para la Forma I de Solvato en DMSO de LA1

| Datos de cristal y mejora estructural para la Forma I de Solvato en DMSO de leukadherina LA1 | |
|---|--|
| Código de Identificación | Forma I de Solvato en DMSO de leukadherina LA1 |
| Fórmula empírica | C24 H21 N O5 S3 |
| Peso de fórmula | 499,60 |
| Temperatura | 100,0(5) K |
| Longitud de onda | 0,71073 Å |
| Sistema cristalino | tricíclico |
| Grupo espacial | $P-1$ |
| Dimensiones de la celda unitaria | $\alpha = 8,1554(15)$ Å, $\alpha = 66,860(4)$ $b = 11,535(2)$ Å, $\beta = 86,581(4)$ ° $c = 14,091(3)$ Å, $\gamma = 70,621(4)$ ° |
| Volumen | 1146,1/4 Å3 |
| Z | 2 |
| Densidad (calculada) | 1,448 mg/m ³ |

| Datos de cristal y mejora estructural para la Forma I de Solvato en DMSO de leukadherina LA1 | |
|---|---|
| Coeficiente de absorción | 0,361 mm ⁻¹ |
| F(000) | 520 |
| Color de cristal, morfología | naranja, plata |
| Tamaño de cristal | 0,36 x 0,30 x 0,12 mm ³ |
| Intervalo theta para recopilación de datos | 2,023 hasta 35,010° |
| Intervalos de índice | -13 ≤ <i>h</i> ≤ 13, -18 ≤ <i>k</i> ≤ 18, -22 ≤ <i>l</i> ≤ 22 |
| Reflejos recogidos | 25036 |
| Reflejos independientes | 9940 [<i>R</i> (int) = 0,0562] |
| Reflejos observados | 6038 |
| Totalidad hasta theta = 34,970° | 98,7% |
| Transmisión máxima y mínima | 0,7469 y 0,6405 |
| Procedimiento de perfeccionamiento | Cuadrados mínimos de matriz entera en F ² |
| Datos/ limitaciones/ parámetros | 9940/ 0/ 304 |
| Bondad de ajuste en F ² | 1,001 |
| Índices de R final [R>2sigma(I)] | <i>R</i> 1 = 0,0553, w <i>R</i> 2 = 0,1174 |
| Índices R (todos los datos) | <i>R</i> 1 = 0,1054, w <i>R</i> 2 = 0,1372 |
| Pico de diferenciación y hueco más grande | 0,766 y -0,518 e.Å ⁻³ |

Tabla 2. Parámetros posicionales para la leukadherina LA1 a 100,0(5) K.

| Coordenadas atómicas (x 104) y parámetros de desplazamiento isotópico equivalente (Å2x 103) para la Forma I de Solvato de DMSO de leukadherina LA1. | | | | |
|--|----------|---------|---------|-------------------|
| | x | y | z | U _{eq} * |
| S1 | 2808(1) | 3734(1) | 6146(1) | 19(1) |
| S2 | 4823(1) | 4939(1) | 6943(1) | 23(1) |
| O1 | 7504(2) | -525(2) | 1974(1) | 32(1) |
| O2 | 8673(2) | 634(2) | 2520(1) | 28(1) |
| O3 | 1403(2) | 2458(1) | 5120(1) | 17(1) |
| O4 | -1385(2) | 5201(1) | 7265(1) | 22(1) |
| N1 | 1461(2) | 5146(1) | 7210(1) | 17(1) |
| C1 | 7429(2) | 155(2) | 2464(2) | 22(1) |
| C2 | 5898(2) | 544(2) | 3041(1) | 19(1) |
| C3 | 4530(2) | 71(2) | 3059(1) | 21(1) |
| C4 | 3046(2) | 465(2) | 3547(1) | 21(1) |
| C5 | 2937(2) | 1324(2) | 4047(1) | 17(1) |
| C6 | 4315(2) | 1794(2) | 4028(1) | 19(1) |
| C7 | 5772(2) | 1413(2) | 3530(1) | 20(1) |
| C8 | 1369(2) | 1744(2) | 4542(1) | 17(1) |
| C9 | -235(2) | 1618(2) | 4542(1) | 19(1) |

| Coordenadas atómicas (x 104) y parámetros de desplazamiento isotópico equivalente (Å2x 103) para la Forma I de Solvato de DMSO de leukadherina LA1. | | | | |
|--|----------|---------|----------|-------|
| C10 | -1252(2) | 2280(2) | 5141(1) | 20(1) |
| C11 | -218(2) | 2786(2) | 5478(1) | 18(1) |
| C12 | -535(2) | 3562(2) | 6086(1) | 18(1) |
| C13 | 607(2) | 4002(2) | 6381(1) | 17(1) |
| C14 | 57(2) | 4831(2) | 6989(1) | 17(1) |
| C15 | 3005(2) | 4676(2) | 6823(1) | 18(1) |
| C16 | 1272(2) | 5907(2) | 7860(1) | 18(1) |
| C17 | 1905(2) | 5017(2) | 8974(1) | 18(1) |
| C18 | 2607(3) | 5494(2) | 9560(2) | 25(1) |
| C19 | 3138(3) | 4721(2) | 10599(2) | 28(1) |
| C20 | 2976(3) | 3464(2) | 11065(2) | 26(1) |
| C21 | 2281(3) | 2984(2) | 10489(2) | 27(1) |
| C22 | 1744(2) | 3757(2) | 9451(1) | 23(1) |
| S3 | 7700(1) | 1389(1) | 8335(1) | 26(1) |
| O5 | 8762(2) | -62(1) | 8587(1) | 30(1) |
| C23 | 5936(3) | 1352(2) | 9147(2) | 36(1) |
| C24 | 8883(3) | 1978(2) | 8955(2) | 34(1) |

*U_{eq} se define como un tercio del trazo del tensor U_{ij} ortogonalizado

[0162] Datos de cristal y mejora estructural para leukadherina LA1: Se utilizaron los siguientes parámetros. Temperatura - 100,0(5) K, longitud de onda - 0,71073 Å, sistema de cristal - triclínico, grupo espacial - P-1, dimensiones de unidad celular - (a = 8,1554(15) Å, α = 66,860(4)°, b = 11,535(2) Å, β = 86,581(4)°, c = 14,091(3) Å, γ = 70,621(4)°), volumen - 1146,1(4) Å³, Z - 2, densidad (calculada) - 1,448 Mg/m³, coeficiente de absorción - 0,361 mm⁻¹, F(000) - 520, color de cristal & morfología - naranja & plata, tamaño de cristal - 0,36 x 0,30 x 0,12 mm³, proporción theta para recopilación de datos - 2,023 hasta 35,010°, intervalos de índice - (-13 ≤ h ≤ 13, -18 ≤ k ≤ 18, -22 ≤ l ≤ 22), reflejos recogidos - 25036, reflejo independiente - 9940 [R(int) = 0,0562], reflejos observados - 6038, totalidad hasta theta = 34,970° - 98,7%, corrección de absorción - multiescaneo, transmisión máxima y mínima - 0,7469 y 0,6405, procedimiento de perfeccionamiento - cuadrados mínimos de matriz entera en F2, bondad de ajuste en F2 - 1,001, índices de R final [$\bar{R} > 2\sigma(R)$] - (R1 = 0,0553, wR2 = 0,1174), índices R y wR2 (todos los datos) - (R1 = 0,1054, wR2 = 0,1372), pico de diferenciación y hueco más grande - 0,766 y -0,518 e.Å⁻³

[0163] La unidad asimétrica de la Forma I de leukadherina LA1 contiene una molécula diana y una molécula de disolvente de dimetilsulfóxido cocristalizado, ambas en posiciones generales. Los anillos de fenilo de las moléculas se apilan por pares a distancias planas de aproximadamente 3,5 y 3,6 Å para anillos C2-C7 y C17-C22, respectivamente (véanse la Figura 1). El enlace de hidrógeno une la molécula de disolvente con la molécula diana (véanse al Figura 1 y la Tabla 1).

20 Ejemplo 2. Caracterización del Ácido Libre de LA1

[0164] La forma libre de ácido de LA1 tiene una solubilidad acuosa de 0,78 µg/mL y un pKa calculado de 4,1. Un cribado limitado en sal se llevó a cabo previamente utilizando contraiones inorgánicos (Na, K, NH₄, Ca and Mg). Aunque las sales mostraron cristalinidad, la mayoría eran higroscópicas.

[0165] Valoración de solubilidad. Los alícuotas del disolvente testado se añadieron a una muestra pesada con precisión (~10 mg) de LA1 a una temperatura ambiente. Los volúmenes de alícuotas eran típicamente de 200-1000 µL. La disolución completa del material testado se determinó utilizando inspección visual. La solubilidad se valoró a partir de estos experimentos basándose en la totalidad de disolvente utilizado para proporcionar disolución completa. Debería señalarse que la solubilidad actual puede ser mayor que la calculada debido al uso de alícuotas de disolvente que eran demasiado grandes o debido a una velocidad baja de disolución.

[0166] Un número de muestras que no ha mostrado disolución mediante la adición de alícuotas se sometió a un régimen de ciclo de temperatura. Primero, las muestras se calentaron desde 20°C hasta a menos de 3°C de punto de

ebullición de disolvente (o 100°C, cualquiera era inferior) a 0,5°C/minuto; a continuación, se enfriaron hasta 20°C a 0,2°C/minuto mientras se agitaban a 800 rpm.

5 [0167] Se registraron datos de transmisión infrarroja (IR) de los viales de muestras, resultados de disolución y precipitación como el punto de transmisión completa de IRA y el comienzo de turbiedad por IR respectivamente. Las muestras seleccionadas se agitaron también en un agitador orbital a 50°C y se comprobaron visualmente para disolución.

10 [0168] **Determinación de solubilidad mediante equilibrio.** Se añadió una alícuota del disolvente de ensayo de agua de UHQ (1 mL) a una muestra pesada con precisión de las sales de LA1 y se agitaron a temperatura ambiente durante un periodo de 4 días. Se retiró una muestra, se filtró a través de un filtro PTFE de 0,2 µm y se analizó mediante HPLC.

15 [0169] **Difracción de rayos X en polvo (XRPD).** Los análisis de XRPD se realizaron utilizando un difractómetro panalítico Xpert Pro equipado con un tubo de rayos X de Cu y un sistema de detectores Pixcel. Las muestras isotérmicas se analizaron en modo de transmisión y se conservaron entre películas de polietileno de baja intensidad. Se recogieron secciones con medidas de 0,013° en ω , un detector de posición que oscila entre 3-40° en 2θ con un tiempo de recuento 99 segundos, y un tiempo de ejecución de ~22 minutos. Los patrones de XRPD se clasificaron y se manipularon utilizando software HighScore Plus 2.2c.

20 [0170] **Análisis Térmico Diferencial Termogravimétrico (TG/ATD).** Se llevaron a cabo los análisis termogravimétricos en Mettler Toledo TGA/DSC1 STARe. Los estándares de calibración eran indio y estaño. Las muestras se colocaron en un platillo de muestra de aluminio, se insertaron en el horno TG y se pesaron con precisión. La señal de flujo térmico se estabilizó durante un minuto a 30°C, antes de calentarse hasta 300°C en un flujo de nitrógeno a una velocidad de 10°C/minuto.

25 [0171] **Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Protones (RMN).** El análisis de RMN de protones se realizó en un instrumento Bruker 500MHz o 400MHz en d_6 -DMSO o MeOD. Se añadió una gota de D_2O y/o TFA a varias muestras para modificar el pico de agua de superposición con el pico debido a la base.

30 [0172] **Análisis de HPLC.** Se utilizó HPLC para determinar la solubilidad de equilibrio acuoso a temperatura ambiente. HPLC se realizó utilizando un Supelco Ascentis Express C18, 4,6 x 150 mm, columna de 2,7 µm; una fase móvil A que contenía 0,1% de ácido fosfórico en agua; una fase móvil B que contenía acetona; un gradiente de disolvente que oscila entre 10% B y 95% B durante 9 minutos; una velocidad de flujo de disolvente de 1,5 mL/min; un volumen de muestra 10 µL; y detección de UV a 264 nm. El tiempo de retención de LA1 fue típicamente de 8,4±0,2 minutos. Un estándar de análisis de HPLC se preparó inicialmente utilizando ácido libre de LA1 pero fue insoluble en DMSO:acetona:agua (1:1:1) y, por lo tanto, se preparó otro estándar utilizando sal de colina de LA1, que fue soluble en acetona:agua (1:1).

40 [0173] **Caracterización de LA1.** Cuando se recibió mediante el análisis de XRPD la LA1 era un sólido cristalino, pero contenía algún trastorno como se indicó mediante la ampliación de pico de algunos de los picos de difracción. (Figura 2). Se realizó un Análisis Térmico Diferencial/Termogravimétrico para determinar el perfil térmico y los cambios de peso % asociados de LA1. Se observó una pérdida de peso de <1% por debajo de 280°C sugiriendo que el material es anhídrido Figura 3. Se señaló una pequeña pérdida de peso de 0,5% a partir de 280-300°C, que correspondía a un endotermo pequeño en el resto de ATD acompañante, pero no se investigó más.

45 [0174] El termograma de DSC de la muestra indicó un comienzo de fusión de ~318°C Figura 4. Se señalaron las pequeñas desviaciones de referencia entre 260-280°C, pero no se investigaron más. Se registró el espectro de RMN de protones del API en d_6 -DMSO y se conformó con la estructura molecular. Poco después de la disolución del API en d_6 -DMSO, se observó una precipitación evidente en el tubo de RMN, probablemente debido a la formación del solvato conocido de DMSO.

50 [0175] **Solubilidad estimada de LA1.** La solubilidad aproximada de LA1 recibida se valoró en ocho disolventes utilizando el procedimiento de adición de alícuota para seleccionar disolventes adecuados para los estudios de sales (Tabla 3) y fue insoluble en todos los disolventes puntos a prueba. Se pusieron a prueba varias mezclas de disolventes, pero el API fue insoluble en todas las mezclas investigadas. Incluso al calentarla, el API se disolvió únicamente en DMF a 10 mg/mL a 73°C.

Tabla 3. Solubilidades aproximadas de LA1 a 20°C

| Disolvente | Acrónimo | Solubilidad aproximada (mg/ml) | Número de muestra (2116-) |
|--------------|----------|--------------------------------|---------------------------|
| acetona | - | <10 | 001-09 |
| acetonitrilo | ACN | <10 | 001-08 |
| anisol | - | <10 | 001-13 |

| Disolvente | Acrónimo | Solubilidad aproximada (mg/ml) | Número de muestra (2116-) |
|--------------------------|----------|--------------------------------|---------------------------|
| diclorometano | DCM | <10 | 001-10 |
| dimetilformamida | DMF | <10 | 001-12 |
| DMF:MeOH (1:1) | - | <10 | 001-19 |
| DMF:THF (1:1) | - | <7 | 001-18 |
| hexafluoroisopropanol | HFIPA | <10 | 001-11 |
| MeOH:ACN:dioxano (1:1:1) | MAD | <10 | 001-15 |
| MeOH:acetona (1:1) | - | <10 | 001-16 |
| metanol | MeOH | <10 | 001-06 |
| THF | THF | <10 | 001-07 |
| THF:Acetona (1:1) | - | <10 | 001-14 |
| THF:MeOH (1:1) | - | <10 | 001-17 |
| DMF:agua (1:1) | - | <10 | 001-20 |

[0176] Aquellos experimentos que no mostraron disolución en ~10 volúmenes ocurrieron en ciclos de temperatura o se licuaron a temperaturas elevadas como se describió anteriormente.

- 5 [0177] **Conclusiones de caracterización y estudio de disolvente.** El análisis de XRPD indicó que la LA1 era un material cristalino desordenado. Los datos de TG/ATD mostraron perdida de peso insignificante a partir de 30-280°C, sugiriendo humedad mínima o contenido de disolvente residual e indicando que la LA1 sigue térmicamente estable hasta 280°C. Se observó una pequeña perdida de peso de 0,5% con endotermo acompañante a partir de 280-300°C, pero no se investigó más. El termograma de DSC de la muestra indicó un comienzo de fusión de ~318°C. Se señalaron las pequeñas desviaciones de referencia entre 260-280°C, pero no se investigaron más. Se confirmó la estructura molecular mediante espectroscopía de ^1H RMN que utiliza d_6 -DMSO. Se observó la precipitación en el tubo de RMN después de disolución inicial del API y se debió probablemente a la formación del DMSO conocido. Se evaluó la solubilidad de LA1 utilizando la adición de alícuota y se mostró poca solubilidad en todos los disolventes testados. La disolución se consiguió únicamente en DMF con calentamiento (73°C) a ~10 mg/mL.

10 15 Ejemplo 3. Preparación y Caracterización de Sales de LA1

[0178] Se prepararon y se caracterizaron las sales de LA1 con solubilidad acuosa mejorada y higroscopiedad baja.

- 20 [0179] Todos los sólidos de los experimentos de cristalización se analizaron mediante XRPD y los patrones resultantes se compararon con aquel mostrado por el material inicial. A los modelos nuevos de XRPD se les asignó un descriptor alfabético en orden de descubrimiento (Patrón B, Patrón C, etc.). Cuando había suficiente material disponible, se llevaron a cabo análisis adicionales (por ejemplo, RMN o ATG) en sólidos con los nuevos modelos de XRPD para permitir asignación provisional a los nuevos modelos como un polimorfo, solvato, hidrato, degradante o mezclas de los mismos. Las bases utilizadas se resumen en la Tabla 4.

25 Tabla 4. Materiales y reactivos utilizados para estudios de sales

| Bases Utilizadas | Abreviatura | Bases Utilizadas | Abreviatura |
|------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 2-(dimetilamino)etanol | deanol | piperazina | - |
| 4-(2-hidroxietil) morfolina | - | carbonato de potasio | K ₂ CO ₃ |
| hidrógenocarbonato de amonio | NH ₄ HCO ₃ | hidrógenocarbonato de potasio | KHCO ₃ |
| hidróxido de amonio | NH ₄ OH | hidróxido de potasio | KOH |
| hidróxido de calcio | Ca(OH) ₂ | carbonato de sodio | Na ₂ CO ₃ |
| hidróxido de colina | - | hidrógenocarbonato de sodio | NaHCO ₃ |
| monohidrato de L-lisina | - | hidróxido de sodio | NaOH |
| hidróxido de magnesio | Mg(OH) ₂ | trometamina | TRIS |
| N-metil-D-glucamina | meglumina | - | - |

[0180] **Técnicas basadas en disolventes.** Los experimentos basados en solventes se realizaron inicialmente a una escala de aproximadamente 90 mg; sin embargo, esto se revisó hasta una escala de aproximadamente 20-30 mg en viales de vidrio debido a API limitado.

5 [0181] Los experimentos se realizaron a una escala de 20-30 mg con estequiométría equimolar y utilizando base en exceso. Las cantidades pesada de ácido y base se combinaron en viales de vidrio, seguidos de disolvente y se licuaron a temperatura ambiente o 40°C. Alternativamente, las cantidades pesada de ácido se combinaron con base en exceso en viales de vidrio y se añadieron disolventes. Las muestras se licuaron a temperatura ambiente o a 40°C/50°C durante 1 o 2 días. Los sólidos se aislaron utilizando filtración al vacío, centrifugación o secado mediante evaporación lenta, 10 se purgaron bajo el flujo de N₂ o desecación al vacío.

15 [0182] **Evaporación lenta.** En algunos de los experimentos configurados como licuados se permitió evaporación hasta secarse bajo condiciones ambientales, bajo el flujo de N₂ o bajo el desecador al vacío y se aislaron los sólidos y se analizaron utilizando XRPD. Una muestra de trometamina produjo una solución cuando API se combinó con la base en exceso y de este modo se evaporó bajo un flujo de N₂.

20 [0183] **Experimentos de licuado.** Se colocaron la LA1 y la base en un vial y se añadió un disolvente. La mezcla se agitó a temperatura seleccionada utilizando agitación magnética durante 1 o 2 días. Se aislaron los sólidos utilizando filtración al vacío/centrifugación y se secaron al aire antes de analizarse mediante XRPD.

25 [0184] **Sonicación.** Los sólidos seleccionados generados a partir de los experimentos de licuado se sometieron a ultrasonidos de 70% de intensidad durante aproximadamente 8 minutos utilizando un procesador ultrasónico Cole-Parmer 130W que utiliza un programa de pulsado. Todos los sólidos recuperados de estos experimentos se analizaron utilizando XRPD.

30 [0185] Las técnicas de evaporación, licuado prolongado (a temperaturas ambiente y elevadas) y sonicación se emplearon utilizando una estequiometría equimolar de API a base. También se utilizó la base en exceso para un número de experimentos como resultados iniciales para mezclas equimolares de varias bases que indicaron formaciones de sales incompletas.

35 [0186] **Evaporación en viales.** Las únicas muestras que se disolvieron por completo eran aquellas con colina en DMF o MeOH- THF, que formaban una solución roja oscura. La evaporación de estas soluciones generó aceites, que se secaron al vacío a continuación. Los sólidos se recuperaron a partir de una de las muestras después del secado, pero la otra muestra se quedó como aceite pegajoso y no se analizó (Tabla 5). El sólido estaba formado por material cristalino (Figura 5) y formación de sal se confirmó para sólidos utilizando espectroscopía de 1H RMN.

Tabla 5. Resultados de evaporación en viales

| Base | Condiciones | Evaporación lenta | |
|--------|---|--------------------|----------|
| | | Resultado | XRPD |
| colina | 1:1 base:API, suspensión a 50°C THF-MeOH (3:1). Evaporación lenta bajo N ₂ | Sólido rojo oscuro | Patrón G |
| colina | XS API + DMF, evaporación de solución, secado al vacío | Aceite pegajoso | - |

40 [0187] **Experimentos de licuado.** Las suspensiones de LA1 y base se agitaron en varios disolventes a temperatura ambiente o 40/50°C durante 1-2 días y se analizaron mediante XRPD (Tabla 6). Un número de licuados se evaporó hasta secarse destapados o bajo N₂. Se aislaron dos nuevas formas del API de un número de experimentos (Materiales de los Modelos C y D) y se tratan con más detalle en la sección 7. Se aislaron los sólidos cristalinos a partir de varios contraíones que incluían colina, meglumina, trometamina y sales colinas (Figura 6) y sólidos desordenados a partir de Ca, K, Mg, Na y piperazina (Figura 9), aunque muchas eran mezclas que contenían API. Se cristalizó una nueva forma de sal de colina y se aislaron dos formas de sales de Ca y trometamina. Se confirmó la formación de sal para los sólidos únicos utilizando espectroscopía de 1H RMN.

45 50 Tabla 6. Resultados de los experimentos de licuado

| Base | Muestra (2116-) | Condiciones | XRPD |
|---------------------|-----------------|--|------------------------|
| Ca(OH) ₂ | 011-24 | 1:2 base:API, suspensión a 40°C en agua- NMP (5:1) | Patrón N (desordenado) |
| colina OH | 011-26 | 1:1 base:API en suspensión en THF a TA | Patrón O |

| Base | Muestra (2116-) | Condiciones | XRPD |
|-------------|--------------------|--|----------|
| meglumina | 011-07_1 | 1:1 base:API, suspensión a 50°C en THF-MeOH (2:1). Evaporación lenta bajo N ₂ | Patrón H |
| piperazina | 011-28 | 1:1 base:API, suspensión a 40°C 1 día | Patrón P |
| trometamina | 011-23_2 | 2:1 base:API, suspensión a 40°C en NMP. Evaporación parcial bajo N ₂ Lavado 4x THF | Patrón M |

[0188] **Conclusiones a partir de los estudios de sales.** Se prepararon las sales de LA1 utilizando doce bases farmacéuticamente aceptables y empleando técnicas y condiciones de cristalización.

- 5 [0189] Se aislaron cinco sales que mostraron cristalinidad: colina, meglumina, calcio, piperazina y trometamina. La formación de sal de cada una se confirmaron utilizando el análisis de ¹H RMN y las sales de trometamina parecían ser solvatos de NMP. Se aislaron múltiples formas de sales para sales colina, de trometamina y calcio. Se aislaron los sólidos a partir de contraíones de Ca, Mg y Na que mostraron cristalinidad, pero al utilizar XRPD parecían ser una mezcla de API y supuestas sales. No se logró la conversión completa a sales, excepto para una muestra de sal de Ca, que se desordenó utilizando XRPD. Los sólidos aislados de otros contraíones se componían de mezclas de materiales iniciales.

Ejemplo 4. Higroscopiedad y solubilidad acuosa de sales cristalinas

- 15 [0190] **Estrés por humedad a 40°C/75% HR.** Las muestras de sales que mostraron cristalinidad se sometieron a estrés bajo condiciones de HR de 40°/75% durante 5-6 días para lograr delicuescencia y higroscopiedad. Se añadieron aproximadamente 5 mg de sales de LA1 que mostraron cristalinidad a viales de vidrio, que se colocaron destapados dentro de viales más grandes que contenían solución acuosa saturada de NaCl. Los viales más grandes se taparon, se sellaron con Parafilm y se colocaron dentro de un horno a 40°C durante un periodo de hasta 6 días. A continuación las sales se sacaron de estas condiciones y se observaron los cambios (por ejemplo, color, delicuescencia, etc.) antes de analizarse para cambios de peso y por XRPD. Las muestras se examinaron visualmente después del estrés, se confirmaron las composiciones de formas mediante el análisis de XRPD y se anotaron los cambios de peso (Tabla 7).

25 Tabla 7. Resultados de experimentos con estrés por humedad

| Sal | Muestra (2116-) | Resultado | Aumento de peso (%) | XRPD después del estrés |
|-------------|--------------------|--------------------------|---------------------|-------------------------|
| Ca | 021-04 | Sólido, no delicuescente | 1,7 | Más desordenado |
| colina | 021-01 | Sólido, no delicuescente | 8,9 | Nuevo patrón (Q) |
| meglumina | 021-02 | Sólido, no delicuescente | 1,4 | No hay cambio |
| piperazina | 021-05 | Sólido, no delicuescente | -5,5 | Nuevo patrón (R) |
| trometamina | 021-03 | Sólido, no delicuescente | N/D | Nuevo patrón (S) |

[0191] Ninguna de las muestras delicuescidas bajo las condiciones de humedad se analizó, pero tres de las muestra aumentaron del peso, particularmente para la sal de colina. Adicionalmente, el análisis de XRPD indicó que las sales colinas, de trometamina y piperazina atravesaron cambios de fases después del estrés, posiblemente a formas hidratadas. El aumento de peso grande observado para la sal de colina apoyaría la formación de hidrato, pero se observó una pérdida de peso para la sal de piperazina, cuya causa se desconoce.

- 30 [0192] **Solubilidades acuosas de sales seleccionadas.** Se determinaron las solubilidades acuosas de sales que mostraron cristalinidad y no delicuescieron mediante el análisis de HPLC a temperatura ambiente. Las muestras se licuaron en agua durante 4-5 días antes de analizarse. La solubilidad se resume en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de estimación de solubilidad acuosa

| Sal | Muestra (2116-) | Sal de entrada (2116-) | Solubilidad acuosa (mg/mL) ¹ | pureza de HPLC (%) | pH de solución | Aspecto |
|-------------|-----------------|------------------------|---|--------------------|----------------|-----------------------------------|
| calcio | 029-04 | 011-24 | 0,002 | 5,58 | 7 | No hay cambio |
| colina | 029-01 | 011-06 | 7,052 | 75,51 | 8 | Color rojo más oscuro |
| meglumina | 029-02 | 011-07_1 | 0,724 | 34,7 | 8 | No hay cambio |
| piperazina | 029-06 | 011-28 | 0,013 | 5,31 | 8 | No hay cambio |
| trometamina | 029-03 | 011-23 | 0,387 | 89,7 | 8 | Se observó precipitación amarilla |

Nota: Los valores de concentración se corrigieron para el peso de contracción, pureza de estándar (91,6%) y contenido volátil de estándar (4,8%).

[0193] La sal de colina era la más soluble a 7,1 mg/mL, seguida de meglumina y trometamina. Las sales de calcio y piperazina no eran muy solubles.

[0194] La sal de trometamina cambió de color durante el licuado a sólido amarillo. El análisis de XRPD indicó que se convirtió al API libre durante el licuado y por lo tanto no era físicamente estable en agua durante aquel periodo de tiempo. La valoración de solubilidad y pureza química mediante HPLC era aproximada, debido a que el procedimiento de HPLC no se validó. Los resultados sugieren que todas las sales no son químicamente estables cuando se licuan en un medio acuoso durante 4-5 días. Sin embargo, los datos se obtuvieron después de 4-5 días de licuado para conseguir solubilidad de equilibrio; es posible que las sales puedan ser estables durante periodos más cortos de tiempo en agua.

Ejemplo 5. Aumento de escala de Colina y Meglumina de Producción de Sal

[0195] **Producción a escala pequeña.** Ambas sales se prepararon a una pequeña escala licuando los componentes en etanol (Tabla 9). La sal de colina se licuó también en acetona y EtOAc debido a que el rendimiento de EtOH era bajo, debido a la solubilidad mejorada de la sal en EtOH.

[0196] El patrón de XRPD de la sal de colina de EtOH coincidió con aquel de la sal generada a partir de dioxano-THF pero las muestras de acetona y EtOAc mostraron patrón de polvo diferente que coincidía con aquel de la muestra del estés por HR a 40°/75%, véanse la sección 6.1 (Figura 10). La muestra de acetona se analizó mediante espectroscopía de ¹H RMN y se confirmó la formación de sal. Se añadió una gota de TFA para modificar el pico de agua de superposición con el pico debido a la colina. No se detectó la acetona en el espectro.

[0197] Los sólidos a partir de la preparación de sal de meglumina mostraron un patrón de polvo único (Figura 10). Se confirmó la formación de sal mediante espectroscopía de ¹H RMN y etanol estaba presente en 1 eq. molar sugiriendo formación de solvato.

Tabla 9. Resultados de cristalización de sales colinas y de meglumina

| Base/ID | Disolvente | Procedimiento | XRPD | Comentario |
|----------------------------|---------------------|--|--|-------------------|
| colina/ 2116- 031-01 | EtOH, MTBE (2:1) | 1:1 base:API en emulsión a 40°C ~ ~2 horas. Alícuota extraída, filtro del vacío, lavado MtBE | Patrón G, coincide 011- 06 | Sólido naranja |
| colina/ 2116- 031-03 | acetona | 1:1 base:API en emulsión a TA d/n. Alícuota extraída, filtro del vacío | Patrón Q, coincidencias de sales estresadas a 40C/75% de HR (021-01) | Sólido rojo |
| colina/ 2116- | EtOAc | 1:1 base:API en emulsión a TA durante la noche. | Patrón Q | Sólido naranja |

| Base/ID | Disolvente | Procedimiento | XRPD | Comentario |
|--|------------|--|------------------|---------------------------|
| 031-04 | | Alícuota extraída, filtro del vacío | | |
| meglumina/ 2116-031-02 | EtOH | 1:1 base:API en emulsión a 40°C ~ 2 horas. Alícuota extraída, filtro del vacío, lavado MtBE | Nuevo patrón (T) | Sólido naranja - amarillo |
| D/n = durante la noche, TA = temperatura ambiente, vac = vacío | | | | |

[0198] **Preparación de sal de meglumina de LA1 a gran escala (2116-033-02).** Se pesaron la LA1 (203,3 mg) y N-metil-D-glucamina (94,16 mg) en un vial de vidrio, seguidos de adición de EtOH (0,6 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Los sólidos se aislaron utilizando la filtración al vacío y se lavaron con t-BME y después con EtOH. A continuación los sólidos se colocaron en un horno al vacío y se secaron a 40-47°C durante la noche. Se recogió un polvo rojo/naranja, rendimiento = 71%.

[0199] **Preparación de sal de colina de LA1 a mayor escala (2116-033-04).** Se combinaron la LA1 (201,3 mg) y ~46% de solución de hidróxido de colina en agua (117,3 µL) en un vial de vidrio, seguidos de adición de acetona (0,7 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se aislaron los sólidos utilizando filtración al vacío y se secaron al aire. Se recogió un polvo rojo oscuro, rendimiento = 73%.

[0200] Ambas sales se prepararon inicialmente a una escala mayor a partir de etanol. Los análisis de XRPD de sólidos a partir de licuado de sal de colina indicaron que la sal se formó, pero contenía una cantidad pequeña de API (Figura 14). Se observaron algunos picos únicos de difracción indicando la presencia de una cantidad menor de un componente adicional. La formación de sal se confirmó mediante espectroscopía de ^1H RMN. El rendimiento para la sal de colina era pobre debido a la solubilidad aumentada en etanol y por lo tanto la preparación se repitió. La muestra repetida se secó al vacío para eliminar el etanol residual, pero el análisis de XRPD indicó que era desordenada y era diferente a la forma original (Figura 14). La muestra contenía también una cantidad considerable de API. La formación de sal se confirmó mediante espectroscopía de ^1H RMN.

[0201] La preparación se repitió de nuevo utilizando acetona para mejor rendimiento y los sólidos cristalinos se componían del material del Patrón Q (Figura 14). La formación de sal se confirmó mediante espectroscopía de ^1H RMN.

[0202] La sal de meglumina se prepara a una escala mayor con rendimiento razonable y el patrón de XRPD era consistente con aquel de la sal generada a una escala menor a partir de etanol (Figura 14). Una cantidad menor de API estaba también presente mediante el análisis de XRPD. La muestra se secó para eliminar el disolvente residual y el análisis de XRPD indicó que el sólido estaba desordenado, pero contenía la misma forma (Figura 14). La formación de sal se confirmó mediante espectroscopía de ^1H RMN con una estequiometría equimolar y contenía 0,5 eq. mol. de etanol.

Ejemplo 6. Preparación de la Forma H de Sal de Meglumina de leukadherina LA1

[0203] Se pesaron LA 1 de Leukadherina (203,3 mg) y N-metil-D-glucamina (94,16 mg) en un vial de vidrio. Se añadió etanol (0,6 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Los sólidos se aislaron utilizando la filtración al vacío y se lavaron con t-butil metil éter y después con etanol. A continuación los sólidos se colocaron en un horno al vacío y se secaron a 40-47°C durante la noche. Se recogió un polvo rojo/naranja, rendimiento = 71%. Alternativamente, se pesaron LA 1 de Leukadherina (~200 mg) y N-metil-D-glucamina en una proporción de 1: 1 en un vial de vidrio. Se añadió Tetrahidrofurano:Metanol (2:1, 0,6mL) y la mezcla se agitó a 50 °C con una evaporación lenta bajo atmósfera de nitrógeno. Se recogió un sólido rojo/naranja. ^1H RMN (500 MHz, DMSO) δ 8,04 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 7,87 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 7,74 (s, 1H), 7,41 (ABq, 2H, J_{AB} = 3,9 Hz), 7,27-7,37 (m, 5H), 5,26 (s, 2H), 3,84 (dt, 1H, J = 4,4, 3,9 Hz), 3,68 (dd, 1H, J = 4,9, 1,5 Hz), 3,60 (dd, 1H, J = 10,9, Hz), 3,50 (m, 1H) 3,44 (dd, 1H, J = 8,1, 1,7 Hz), 3,41 (dd, 1H, J = 10,8, 5,8 Hz), 3,31 (bs, 7H), 2,91 (dd, 1H, J = 12,5, 3,8 Hz), 2,84(dd, 1H, J = 11,3, 7,8 Hz), 2,47 (s, 3H).

[0204] La forma H produce un patrón de difracción de rayos X en polvo único (Figura 6B; Tabla 10).

Tabla 10. Las posiciones y las intensidades de pico de difracción de rayos X en polvo para la Forma H de Sal de Meglumina de leukadherina LA1.

| Posición de Pico 2θ (Cobre) | Intensidad | Posición de Pico 2θ (Cobre) | Intensidad |
|--------------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| 5,334 | 1574 | 23,092 | 1135 |
| 7,128 | 3086 | 23,326 | 732 |
| 9,221 | 985 | 23,56 | 1443 |
| 9,611 | 871 | 23,82 | 787 |
| 10,716 | 2414 | 23,859 | 716 |
| 10,716 | 2414 | 24,86 | 1360 |
| 10,911 | 2184 | 25,302 | 795 |
| 11,847 | 1077 | 27,2 | 1554 |
| 12,315 | 995 | 28,019 | 504 |
| 14,109 | 922 | 29,761 | 511 |
| 14,876 | 804 | 30,021 | 420 |
| 16,085 | 1271 | 30,268 | 419 |
| 16,488 | 1653 | 30,359 | 433 |
| 17,047 | 963 | 31,074 | 685 |
| 17,658 | 1285 | 32,14 | 363 |
| 18,477 | 1127 | 33,141 | 291 |
| 18,828 | 837 | 33,453 | 283 |
| 19,166 | 819 | 33,713 | 436 |
| 19,322 | 994 | 33,804 | 389 |
| 19,725 | 1062 | 34,181 | 298 |
| 19,855 | 784 | 34,701 | 408 |
| 20,31 | 1438 | 35,715 | 318 |
| 20,817 | 852 | 36,118 | 285 |
| 20,856 | 866 | 36,287 | 337 |
| 21,545 | 726 | 36,508 | 301 |
| 22,078 | 617 | 38,419 | 372 |
| 22,377 | 640 | 38,536 | 343 |

5 Ejemplo 7. Preparación de la Forma T de Sal de Meglumina de leukadherina LA1

[0205] Se pesaron LA 1 de Leukadherina (~200 mg) y N-metil-D-glucamina en una proporción de 1:1 en un vial de vidrio. Se añadió etanol (0,6 mL) y la mezcla se agitó a 50 °C durante 2 horas. Los sólidos se aislaron utilizando la filtración al vacío y se lavaron con t-butil metil éter. Se recogió un sólido rojo/naranja. 1H RMN (500 MHz, DMSO) δ 8,04 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 7,87 (d, 2H, J = 8,6 Hz), 7,74 (s, 1H), 7,41 (ABq, 2H, J_{AB} = 3,9 Hz), 7,27-7,37 (m, 5H), 5,26 (s, 2H), 3,84 (dt, 1H, J = 4,4, 3,9Hz), 3,68 (dd, 1H, J = 4,9, 1,5 Hz), 3,60 (dd, 1H, J = 10,9, Hz), 3,50 (m, 1H) 3,44 (dd, 1H, J = 8,1, 1,7 Hz), 3,41 (dd, 1H, J = 10,8, 5,8 Hz), 3,31 (bs, 7H), 2,91 (dd, 1H, J = 12,5, 3,8 Hz), 2,84(dd, 1H, J = 11,3, 7,8 Hz), 2,47 (s, 3H).

15 [0206] La forma H produce un patrón de difracción de rayos X en polvo único (Tabla 11).

Tabla 11. Las posiciones y las intensidades de pico de difracción de rayos X en polvo para la Forma T de Sal de Meglumina de leukadherina LA1

| Posición 2θ (Cobre) | Intensidad |
|---------------------|------------|
| 6,907 | 1088 |
| 8,233 | 882 |
| 8,376 | 1295 |
| 9,416 | 723 |
| 11,587 | 672 |
| 14,98 | 518 |
| 15,058 | 526 |
| 15,5 | 593 |
| 17,229 | 958 |
| 17,84 | 557 |
| 18,061 | 579 |
| 20,531 | 506 |
| 21,285 | 838 |
| 21,909 | 751 |
| 22,312 | 684 |
| 23,508 | 546 |
| 24,964 | 587 |
| 26,719 | 579 |

5 Ejemplo 8 Purificación de polimorfos de sal de Meglumina de LA1 (NMDG).

[0207] Las sales de NMDG se purificaron a través de recristalización utilizando calentamiento a diferentes temperaturas o a temperatura ambiente en diferentes disolventes como se muestra en la Tabla 12-Tabla 13. La Tabla 10 12 muestra cribado de polimorfo de sal de meglumina en disolventes próticos, y la Tabla 13 muestra cribado de polimorfo de sal de meglumina en disolventes próticos. Los disolventes próticos incluyen metanol, etanol, alcohol 15 isopropílico, n-butanol y agua. Los disolventes apróticos incluyen acetona, acetato de etilo, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), alcohol isopropílico (API), tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo (ACN) y N-metil pirrolidona (NMP). La precipitación se llevó a cabo a temperatura ambiente. No se observó ninguna solución clara durante el calentamiento. La Figura 15 representa un patrón de XRPD obtenido para sales de meglumina de LA1 en diferentes disolventes.

[0208] La forma cristalina L se obtuvo en acetato de isopropilo, a 70°C, y se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de acuerdo con la Figura 11, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα. La forma cristalina M se obtuvo en acetona a 70°C, y se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de acuerdo con la Figura 12, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα. La forma cristalina N se obtuvo en DMF a 70°C, y se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de acuerdo con la Figura 13, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-Kα.

25 Tabla 12. Cribado de polimorfo de sal de meglumina en disolventes próticos

| Disolvente | Condición | Observación | Notas | XPRD |
|------------|-----------------------------------|--|---|------|
| Metanol | 1:30 Sal: Disolvente a 70°C | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad durante el calentamiento | Se observa desintegración completa de sal basada en patrón de RMN | ND |
| Etanol | 1:30 Sal: Disolvente | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad | Se observa desintegración completa de sal basada en | ND |

| | | | | |
|------------------|---------------------------------------|--|---|----|
| | a 70°C | durante el calentamiento | patrón de RMN | |
| API | 1:30 Sal: Disolvente a 70°C | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad durante el calentamiento | Se observa desintegración completa de sal basada en patrón de RMN | ND |
| n-Butanol | 1:30 Sal: Disolvente a 100°C | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad durante el calentamiento | Se observa desintegración completa de sal basada en patrón de RMN | ND |
| Metanol | 1:30 Sal: Disolvente a 25- 30°C | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad durante el calentamiento | Se observa desintegración completa de sal basada en patrón de RMN | ND |
| Etanol | 1:30 Sal: Disolvente a 25- 30°C | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad durante el calentamiento | Se observa desintegración parcial de sal basada en patrón de RMN | ND |
| H ₂ O | 1:30 Sal: Disolvente a 25- 30°C | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad durante el calentamiento | Se observa desintegración completa de sal basada en patrón de RMN | ND |

Tabla 13: Cribado de polimorfo de sal de meglumina en disolventes apróticos

| Disol- vente | Condición | Observación | Notas | XPRD | HPLC Pureza (A%) |
|-----------------|---------------------------------------|---|--|---|---------------------|
| DMF | 1:10 Sal: Disolvente a 70°C | Se observa solución clara. Apareció precipitado tras enfriamiento a temperatura ambiente. Se utilizó MTBE para transferencia & filtración | RMN coincide con auténtico, DSC muestra punto de fusión amplio de 139,9 °C, Forma Cristalina N | Véanse, Figura 15I, Figura 13 | 98,72 |
| DMF | 1:10 Sal: Disolvente a 25- 30°C | Se observa solución clara. Apareció precipitado bajo durante el enfriamiento a temperatura ambiente. Se utilizó MTBE para transferencia & filtración. | RMN coincide con auténtico, DSC muestra punto de fusión amplio de 139,3 °C | Véanse, Figura 15B | 98,65 |
| DMSO | 1:10 Sal: Disolvente a 70°C | Se observa solución clara. Se añadió metanol a TA para precipitación | Se observa desintegración de sal basada en patrón de RMN | ND | |
| DMSO | 1:5 Sal: Disolvente a 70°C | Se observa solución clara. Se añadió metanol a TA para precipitación | Se observa desintegración de sal basada en patrón de RMN. | ND | |
| DMSO | 1:5 Sal: Disolvente a 70°C | Se observa solución clara. Se añadió THF durante enfriamiento como anti disolvente | No tuvo lugar la precipitación | ND | |
| DMSO | 1:5 Sal: Disolvente a 70°C | Se observa solución clara. Se añadió ACN durante enfriamiento como anti disolvente y se observó precipitación | RMN coincide con auténtico | Véanse, Figura 15J | |

| | | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|---|--|---|-------|
| DMSO | 1:5 Sal: Disolvente a 70°C | Se observa solución clara. Se añadió Acetona durante enfriamiento como anti disolvente | No tuvo lugar la precipitación | ND | |
| THF | 1:30 Sal: Disolvente a 70°C | Se observa solución clara. Precipitación apareció durante el enfriamiento | RMN coincide con auténtico | Véanse, Figura 15H (Amorfo) | 97,80 |
| ACN | 1:30 Sal: Disolvente a 70°C | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad durante el calentamiento | RMN coincide con auténtico | Véanse, Figura 15C | |
| Acetona | 1:30 Sal: Disolvente a 70°C | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad durante el calentamiento | Se observa desintegración parcial de sal basada en patrón de RMN, DSC muestra un espectro con un punto de fusión de 294,5 °C, Forma cristalina M | Véanse, Figura 15D, Figura 12 | 98,53 |
| Acetato de etilo | 1:30 Sal: Disolvente a 70°C | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad durante el calentamiento | RMN coincide con auténtico, DSC muestra punto de fusión amplio de 114,5 °C | Véanse, Figura 15G | 98,76 |
| Acetato de isopropilo | 1:30 Sal: Disolvente a 70°C | No se observó ninguna solución clara. Se observó esponjosidad durante el calentamiento | RMN coincide con auténtico, DSC muestra punto de fusión de 136,3 °C, Forma Cristalina L | Véanse, Figura 15F, Figura 11 | 98,99 |
| NMP | 1:10 Sal: Disolvente a 70°C | Se observa solución clara. Se añadió MTBE durante el enfriamiento para precipitación | Se observa desintegración parcial de sal basada en patrón de RMN | Véanse, Figura 15E | 93,74 |

Ejemplo 9. Preparación de la Forma G de Sal de colina de leukadherina LA1

- 5 [0209] leukadherina LA1 (~200 mg) y ~46% de solución de hidróxido de colina en agua en una proporción de 1:1 se licuaron en una solución de tetrahidrofurano:metanol (3:1, 0,7mL) en un vial de vidrio y la mezcla se agitó a 50 °C con una evaporación lenta bajo atmósfera de nitrógeno. Se recogió un sólido rojo oscuro.
- 10 [0210] Alternativamente, LA1 Leukadherina (~200 mg) y ~46% de solución de hidróxido de colina en agua en una proporción de 1:1 se licuaron en una solución de etanol:t-butil metil éter (2:1, 0,7 mL) en un vial de vidrio y la mezcla se agitó a 40 °C durante 2 horas. Los sólidos se aislaron mediante filtración al vacío, se lavaron con metil t-butil éter y se secaron al aire. Se recogió un sólido rojo oscuro. 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7,95 (d, 2H, J = 6,8 Hz), 7,75 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 7,72 (s, 1H), 7,40 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 7,37-7,27 (m, 6H), 5,26 (s, 2H), 3,87-3,83 (m, 2H), 3,42-3,39 (m, 2H), 3,11 (s, 9H).
- 15 [0211] La forma G produce un patrón de difracción de rayos X en polvo único (Tabla 14).

Tabla 14. Las posiciones y las intensidades de pico de difracción de rayos X en polvo para la Forma G de Sal de colina de leukadherina LA1

| Posición 2θ (Cobre) | Intensidad | Posición 2θ (Cobre) | Intensidad |
|---------------------|------------|---------------------|------------|
| 5,555 | 1684 | 20,024 | 603 |
| 7,869 | 685 | 21,051 | 557 |

| | | | |
|--------|------|--------|------|
| 11,158 | 1298 | 22,949 | 509 |
| 13,329 | 769 | 24,639 | 1051 |
| 15,045 | 1133 | 24,964 | 1146 |
| 15,656 | 825 | 25,575 | 1881 |
| 16,072 | 1512 | 26,641 | 461 |
| 16,202 | 639 | 26,823 | 613 |
| 16,475 | 793 | 26,901 | 539 |
| 16,644 | 1734 | 29,28 | 368 |
| 17,801 | 509 | 29,683 | 334 |
| 18,113 | 520 | 30,58 | 286 |
| 18,49 | 683 | 30,697 | 332 |
| 19,062 | 1192 | 34,415 | 215 |
| 19,829 | 600 | | |

Ejemplo 10. Preparación de la Forma O de Sal de colina de leukadherina LA1

[0212] LA 1 de Leukadherina (~200 mg) y ~46% de solución de hidróxido de colina en agua en una proporción de 1:1 se licuaron en una solución de THF (0,7 mL) en un vial de vidrio y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se aislaron los sólidos utilizando filtración al vacío y se secaron al aire. Se recogió un sólido rojo oscuro. 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7,95 (d, 2H, J = 6,8 Hz), 7,75 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 7,72 (s, 1H), 7,40 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 7,37-7,27 (m, 6H), 5,26 (s, 2H), 3,87-3,83 (m, 2H), 3,42-3,39 (m, 2H), 3,11 (s, 9H).

10 [0213] La forma O produce un patrón de difracción de rayos X en polvo único (Tabla 15).

Tabla 15. Las posiciones y las intensidades de pico de difracción de rayos X en polvo para la Forma O de Sal de colina de leukadherina LA1

| Posición 2θ (Cobre) | Intensidad | Posición 2θ (Cobre) | Intensidad |
|---------------------|------------|---------------------|------------|
| 8,35 | 1010 | 19,907 | 777 |
| 8,792 | 1057 | 20,661 | 765 |
| 9,286 | 998 | 20,934 | 605 |
| 13,251 | 806 | 21,402 | 609 |
| 14,304 | 826 | 21,727 | 850 |
| 16,735 | 1365 | 22,52 | 661 |
| 17,008 | 826 | 23,417 | 669 |
| 18,074 | 731 | 24,145 | 722 |
| 19,426 | 784 | 25,458 | 610 |
| 19,647 | 735 | 25,549 | 587 |

Ejemplo 11. Preparación de la Forma Q de Sal de colina de leukadherina LA1

[0214] leukadherina LA1 (~200 mg) y ~46% de solución de hidróxido de colina en agua en una proporción de 1:1 se licuaron en una solución de acetona (0,7 mL) en un vial de vidrio y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se aislaron los sólidos utilizando filtración al vacío y se secaron al aire. Se recogió un sólido rojo oscuro. Alternativamente, leukadherina LA1 (~200 mg) y ~46% de solución de hidróxido de colina en agua en una proporción de 1:1 se licuaron en una solución de acetato de etilo (0,7 mL) en un vial de vidrio y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se aislaron los sólidos utilizando filtración al vacío y se secaron al aire. Se recogió un sólido rojo oscuro. 1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7,95 (d, 2H, J = 6,8 Hz), 7,75 (d, 2H, J = 7,3 Hz), 7,72 (s, 1H), 7,40 (d, 1H, J = 3,8 Hz), 7,37-7,27 (m, 6H), 5,26 (s, 2H), 3,87-3,83 (m, 2H), 3,42-3,39 (m, 2H), 3,11 (s, 9H).

25 [0215] La forma Q produce un patrón de difracción de rayos X en polvo único (Tabla 16).

Tabla 16. Las posiciones y las intensidades de pico de difracción de rayos X en polvo para la Forma Q de Sal de colina de leukadherina LA1

| Posición 2θ (Cobre) | Intensidad | Posición 2θ (Cobre) | Intensidad |
|---------------------|------------|---------------------|------------|
| 4,996 | 2333 | 21,74 | 1114 |
| 5,23 | 932 | 22,884 | 925 |
| 8,35 | 2283 | 23,703 | 1447 |
| 9,585 | 1626 | 24,847 | 1082 |
| 9,91 | 1604 | 25,094 | 793 |
| 11,548 | 1112 | 25,263 | 800 |
| 12,64 | 1272 | 25,302 | 813 |
| 12,822 | 1947 | 25,341 | 812 |
| 13,303 | 2639 | 25,497 | 2964 |
| 14,369 | 1193 | 26,329 | 749 |
| 15,812 | 937 | 26,927 | 728 |
| 16,085 | 834 | 26,979 | 727 |
| 16,579 | 1095 | 28,136 | 803 |
| 17,541 | 1074 | 28,773 | 560 |
| 17,957 | 1194 | 30,424 | 505 |
| 19,283 | 2225 | 31,204 | 534 |
| 20,557 | 857 | 31,958 | 409 |
| 20,726 | 1096 | 35,702 | 386 |
| 21,467 | 1046 | 37,392 | 335 |

5

Calorimetría Diferencial de Barrido

[0216] La Tabla 17 muestra las temperaturas de fusión de varias formas de sales colinas y de meglumina.

10

Tabla 17: Lecturas de termograma de CDB de diferentes formas de sales

| Tipo de forma | Comienzo de Fusión (°C) | Pico de Fusión (°C) | Entalpía (J/g) |
|---------------|-------------------------|---------------------|----------------|
| Forma A | | | |
| Forma G | | | |
| Forma H | | | |
| Forma O | | | |
| Forma R | 221,45 | 224,48 | 157,5 |
| Forma S | | | |
| Forma L | 132,13 | 136,32 | 59,29 |
| Forma M | 276,23 | 294,45 | 46,18 |
| Forma N | 130,18 | 139,87 | 84,91 |

Ejemplo 12. Purificación de polimorfos de sal de colina de LA1

15

[0217] Las sales colinas se purificaron a través de recristalización utilizando calentamiento a diferentes temperaturas o a temperatura ambiente en disolventes próticos y apróticos como se muestra en la Tabla 18 y la Tabla 19. La Tabla

18 muestra cribado de polimorfo de sal de colina en disolventes próticos, y la Tabla 19 muestra cribado de polimorfo de sal de colina en disolventes apróticos. Los disolventes próticos incluyen metanol, etanol, alcohol isopropílico, n-butanol y agua. Los disolventes apróticos incluyen acetona, acetato de etilo, dimetilformamida (DMF), dimetilsulfóxido (DMSO), alcohol isopropílico (API), tetrahidrofurano (THF), acetonitrilo (ACN) y N-metil pirrolidona (NMP). La precipitación se llevó a cabo a temperatura ambiente. No se observó ninguna solución clara durante el calentamiento. La Figura 16 representa un patrón de XRPD obtenido para sales de colina de LA1 en diferentes disolventes por separado. La forma cristalina R se obtuvo en n-butanol a 70°C, y se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de acuerdo con la Figura 7, tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α . La forma cristalina S se obtuvo en metanol a 70°C, y se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) de acuerdo con la Figura 8 (Figura 8, 16L), tal como se determina por un difractómetro que utiliza radiación Cu-K α .

Tabla 18. Cribado de polimorfo de sal de colina en disolventes próticos

| Disolvente | Condición | Observación | Notas | XPRD | Pureza HPLC (A%) |
|------------------|-----------------------------------|--|---|-----------------------------|------------------|
| Metanol | 1:20 Sal:Disolvente a 70 °C | Se observa una solución clara. Se produce precipitación después de enfriamiento | RMN coincide con el auténtico | Véase la figura 16B, Fig. 8 | 99,93 |
| Etanol | 1:20 Sal:Disolvente a 70 °C | Se observa una solución clara. Se produce precipitación después de enfriamiento | RMN coincide con el auténtico | -- | |
| IPA | 1:20 Sal:Disolvente a 70 °C | No se observa una solución clara | RMN coincide con el auténtico | Véase la figura 16F | |
| IPA | 1:20 Sal:Disolvente a 25-30 °C | No se observa una solución clara | RMN coincide con el auténtico | Véase la figura 16E | |
| n-Butanol | 1:20 Sal:Disolvente a 120 °C | Se observa una solución clara. Se observa precipitación después de enfriamiento a TA | RMN coincide con el auténtico, Forma cristalina R | Véase la figura 16A, Fig. 7 | >99 (por CL-EM) |
| Metanol | 1:20 Sal:Disolvente a 25-30 °C | Se observa una solución clara. Se produce precipitación después de envejecimiento | RMN coincide con el auténtico, Forma cristalina S | Véase la figura 16L, Fig. 8 | 99,47 |
| Etanol | 1:20 Sal:Disolvente a 25-30 °C | No se observa una solución clara | RMN coincide con el auténtico | Véase la figura 16G | 99,75 |
| H ₂ O | 1:20 Sal:Disolvente a 25-30 °C | Se observa una solución turbia | No filtrable | - | |

Tabla 19 Cribado de polimorfo de sal de colina en disolventes apróticos

| Disolvente | Condición | Observación | Notas | XPRD | Pureza HPLC (A%) |
|-------------------|-----------------------------------|--|-------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Isopropyl acetate | 1:20 Sal:Disolvente a 70 °C | No se observa una solución clara. Se observa naturaleza esponjosa durante el calentamiento | RMN coincide con el auténtico | Véase la figura 16D | 89,61 |
| Isopropyl acetate | 1:20 Sal:Disolvente a 25-30 °C | No se observa una solución clara. Se observa naturaleza esponjosa durante el calentamiento | RMN coincide con el auténtico | Véase la figura 16C | 97,85 |
| Acetona | 1:20 Sal:Disolvente a 70 °C | No se observa una solución clara. Se observa naturaleza esponjosa durante el calentamiento | RMN coincide con el auténtico | Véase la figura 16K | 99,62 |
| Acetona | 1:20 Sal:Disolvente a 25-30 °C | No se observa una solución clara. Se observa naturaleza esponjosa durante el calentamiento | RMN coincide con el auténtico | Véase la figura 16J | 99,44 |
| Acetato de etilo | 1:20 Sal:Disolvente a 70 °C | No se observa una solución clara. Se observa naturaleza esponjosa durante el calentamiento | RMN coincide con el auténtico | Véase la figura 16I | 98,56 |
| Acetato de etilo | 1:20 Sal:Disolvente a 25-30 °C | No se observa una solución clara. Se observa naturaleza esponjosa durante el calentamiento | RMN coincide con el auténtico | Véase la figura 16H | 98,77 |

Ejemplo 13. Caracterización de las propiedades farmacocinéticas del ácido libre de LA1 en ratas.

- 5 [0218] Se evaluó la biodisponibilidad oral e intraperitoneal absoluta de LA1 en ratas Sprague Dawley (SD) después de una única administración por vía oral e IP (2 mg/kg) e IV (1 mg/kg) de LA1.
- 10 [0219] En un primer experimento, la solución de dosificación se preparó en 30% p:v 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina preparada en PBS a 2 mg/kg. La depuración (ml/min/kg) y la biodisponibilidad (AUC en mM*h) se resumen en la Tabla 20. Se necesitaba una biodisponibilidad mejorada.

Tabla 20. Datos farmacocinéticos para el ácido libre de LA1 para administración PO

| DMPK PO - 2 mg/kg | Ácido libre de LA1 |
|--------------------------|---------------------------|
| Cl rata (ml/min/kg) | 11,1 |
| F% rata (AUC en mM*h) | 15,1% (8,7) |
| Vss (l) | 0,59 |
| t _{1/2} (h) | 2,03 |
| MRT (h) | 3,49 |

- 15 [0220] En un segundo experimento, la solución de dosificación se preparó en Tween-80 (0,02%) y 0,5% de metilcelulosa en agua Milli-Q. Se prepararon soluciones de dosificación IP (2 mg/kg) e IV (1 mg/kg) en 5% de DMSO y 95% de PEG-200. La PK de rata muestra una depuración razonable de 20 ml/min/kg, tal como se muestra en la Tabla 21. La dosificación PO no logró una exposición significativa para producir datos para los cálculos. La dosificación IP produjo un 82% de biodisponibilidad (3,5 mM * h) PO (2 mg / kg).
- 20

Tabla 21. Datos PK para ácido libre de LA1 para administración PO e IP

| DMPK | | Ácido libre de LA1 |
|--------------|-----------------------|---------------------------|
| PO - 2 mg/kg | Cl rata (ml/min/kg) | 19,7 |
| | F% rata (AUC en mM*h) | Exposición demasiado baja |
| | Vss (l/kg) | 4,19 |
| | t _{1/2} (h) | Exposición demasiado baja |
| | MRT (h) | Exposición demasiado baja |
| IP - 2 mg/kg | Cl rata (ml/min/kg) | 19,7 |
| | F% rata (AUC en mM*h) | 81,6% (3,5) |
| | Vss (l/kg) | 4,19 |
| | t _{1/2} (h) | 0,78 |
| | MRT (h) | 3,44 |

Ejemplo 14. Caracterización de las propiedades farmacocinéticas de ácido libre de LA1 micronizado en ratas

5 [0221] Se preparó la solución de dosificación PO (2 mg/kg) en Tween-80 (0,02%) y 0,5% de metilcelulosa en agua Milli-Q. La solución de dosificación IV (1 mg/kg) se preparó en una solución de 5% de DMSO y 95% de PEG-200. La PK de rata muestra una depuración razonable de 23,4 ml/min/kg, tal como se muestra en la Tabla 22. La dosificación PO produjo una biodisponibilidad del 23% (0,76 μ M * h).

10 [0222] Después de la administración IV de LA1, se encontró que la t_{1/2} y la depuración fueron de 1,16 h y 19,7 ml/min/kg, respectivamente. El volumen medio de distribución fue de 2,39 l/Kg. Tras la administración IP de LA1, la C_{max} media fue de 1284 ng/ml alcanzada a las 0,25 h (t_{max}). Se encontró que la t_{1/2} fue de 0,78 h. La biodisponibilidad IP absoluta fue del 82%.

15 Tabla 22. Datos PK para la administración PO de ácido libre de LA1 micronizado

| DMPK PO - 2 mg/kg | Ácido libre de LA1 (Micronizado) |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Cl rata (ml/min/kg) | 23,4 |
| F% rata (AUC en mM*h) | 23% (0,76) |
| Vss (l/kg) | 2,14 |
| t _{1/2} (h) | 1,10 |
| MRT (h) | 2,04 |

Ejemplo 15. Caracterización de las propiedades farmacocinéticas de las sales de LA1 en ratas

20 [0223] La biodisponibilidad oral e intraperitoneal absoluta de LA1 se evaluó en ratas SD después de una única dosis oral (*per os*, PO) e intraperitoneal (IP) (2 mg/kg) y la administración por vía intravenosa (IV) (1 mg/kg) de LA1, sal de colina de LA1 y sal de meglumina de LA1. Los estudios se realizaron con la sal de colina Forma Q y la sal de meglumina Forma T preparadas según el Ejemplo 5.

25 [0224] Se realizaron estudios PK como según protocolo aprobado IAEC interno no. IAEC/JDC/2012/27. Las rutas de administración fueron concretamente, PO (sonda), IP (bolo) e IV (bolo a través de la vena de la cola). Se utilizaron un

total de cuatro ratas macho SD con edades comprendidas entre 5-6 semanas. El régimen de alimentación incluyó 12 horas de ayuno y la alimentación se proporcionó 2 horas después de la inoculación de la dosis y se proporcionó agua *ad libidum*. La programación de extracción de sangre para PO/IP fue de 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 10 y 24 h, y para IV fue de 0,12, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 h. Para la dosificación PO, se utilizaron como vehículos tween-80 (0,02%) y 0,5% de metilcelulosa preparada en agua mili-Q; para la dosificación IP e IV se utilizaron como vehículos 5% de DMSO y 95% de PEG-200.

[0225] **Procedimiento de preparación de dosis LA1:** Para la dosificación PO, 2,00 mg de LA1 se humedecieron con ~ 30 μ l de Tween-80 y se trituraron en un mortero y mano de mortero, y a continuación se añadió lentamente 0,5% de metil celulosa para completar el volumen final a 10,0 ml. Para la dosificación IP, se disolvieron 2,050 mg de LA1 en 100 μ l de DMSO, se agitaron en vórtex y finalmente se añadieron 1,90 ml de PEG-200. Para la dosificación IV, se disolvieron 2,010 mg de LA1 en 200 μ l de DMSO, se agitaron en vórtex y finalmente se añadieron 3,80 ml de PEG-200.

[0226] **Procedimiento de preparación de dosis de colina de LA1:** Para la dosificación PO, 3,670 mg de la sal de colina de LA1 se humedecieron con ~ 30 μ l de Tween-80 y se trituraron en un mortero y mano de mortero, y a continuación se añadió lentamente 0,5% de metil celulosa para completar el volumen final a 13,90 ml. Para la dosificación IP, se disolvieron 4,286 mg de sal de colina de LA1 en 162 μ l de DMSO, se agitaron en vórtex y finalmente se añadieron 3,078 ml de PEG-200. Para la dosificación intravenosa, se disolvieron 2,025 mg de sal de colina de LA1 en 153 μ l de DMSO, se agitaron en vórtex y finalmente se añadieron 2,907 ml de PEG-200.

[0227] **Procedimiento de preparación de dosis de colina de LA1:** Para la dosificación PO, 3,600 mg de la sal de meglumina de LA1 se humedecieron con ~ 30 μ l de Tween-80 y se trituraron en un mortero y mano de mortero, y a continuación se añadió lentamente 0,5% de metil celulosa para un volumen final de 11,760 ml. Para la dosificación IP, se disolvieron 4,134 mg de sal de meglumina de LA1 en 135 μ l de DMSO, se agitaron en vórtex y se añadieron 2,565 ml de PEG-200. Para la dosificación intravenosa, se disolvieron 2,066 mg de sal de meglumina de LA1 en 135 μ l de DMSO, se agitaron en vórtex y finalmente se añadieron 2,565 ml de PEG-200.

[0228] La solución madre (178 μ g/ml) en metanol se diluyó adicionalmente usando metanol:agua (80:20, v/v) para obtener soluciones de trabajo en el intervalo de 10,4 a 20745 ng/ml.

[0229] **Metodología para la preparación de muestras CC/QC:** Se dividieron en alícuotas 50 μ l de la muestra en viales etiquetados previamente. Se le añadieron 200 μ l de tetrahidrofurano al 10% que contenía IS (100 ng/ml; tolbutamida) y se mezclaron bien, se agitaron con vórtex durante 5 min, seguido de centrifugación durante 5 min a 14000 rpm durante a 4°C. Se separó el sobrenadante y se inyectaron 5 μ l del mismo en CL-EM/EM.

[0230] Análisis de datos: los datos de concentración-tiempo individuales se analizaron usando WinNonlin (Versión 5.3) mediante el método de análisis no compartimental (NCA).

40 Resultados:

[0231] La PK de rata mostró una depuración razonable de 18 ml/min/kg, tal como se muestra en la Tabla 23. La dosificación PO produjo una biodisponibilidad del 41% (1,5 mM * h). La dosificación IP produjo una biodisponibilidad del 84% (3,2 mM * h). Se preparó una solución de dosificación PO (2 mg/kg) en Tween-80 (0,02%) y 0,5% de metilcelulosa en agua Milli-Q. Las soluciones de dosificación IP (2 mg/kg) e IV (1 mg/kg) se prepararon en 5% de DMSO y 95% de PEG-200.

[0232] Los resultados para la sal de colina de LA1 se muestran en la Tabla 23. Después de la administración oral de la sal de colina de LA1, la concentración plasmática máxima para LA1 (Cmáx: 477 ng/ml) se alcanzó a las 0,50 h (tmáx). Se encontró que la t_{1/2} fue de 1,57 h. La biodisponibilidad oral absoluta fue del 41%. Después de la administración IP de la sal de colina de LA1, la Cmáx media para LA1 fue de 1590 ng/ml, que se alcanzó a las 0,25 h (tmáx). Se encontró que la t_{1/2} fue de 1,60 h. La biodisponibilidad IP absoluta fue del 84%. Después de la administración intravenosa de sal de colina de LA1, se encontró que la t_{1/2} y la depuración fueron de 1,21 h y 17,6 ml/min/kg, respectivamente, para LA1. El volumen promedio de distribución fue de 1,78 litros/kg.

Tabla 23. Datos PK de sal de colina de LA1 para administración PO e IP

| DMPK | | sal de colina de LA1 |
|--------------|-----------------------|----------------------|
| PO - 2 mg/kg | Cl rata (ml/min/kg) | 17,6 |
| | F% rata (AUC en mM*h) | 41,0% (1,5) |
| | Vss (l/kg) | 0,73 |
| | t _{1/2} (h) | 1,57 |
| | MRT (h) | 1,81 |
| IP - 2 mg/kg | Cl rata (ml/min/kg) | 17,6 |
| | F% rata (AUC en mM*h) | 83,9% (3,2) |
| | Vss (l/kg) | 0,73 |
| | t _{1/2} (h) | 1,60 |
| | MRT (h) | 1,02 |

5 [0233] La PK de rata mostró una depuración razonable de 18 ml/min/kg, tal como se muestra en la Tabla 24. La dosificación PO de la sal de meglumina de LA1 produjo una excelente biodisponibilidad del 37% (1,2 mM * h). La sal de meglumina de LA1 mostró una biodisponibilidad superior al 100% (167%, 5,3 mM * h) para la administración intraperitoneal (IP). Una posible causa de biodisponibilidad >100% es la circulación enterohepática. La circulación enterohepática se refiere a la circulación de ácidos biliares, bilirrubina, fármacos u otras sustancias desde el hígado hacia la bilis, seguido de la entrada al intestino delgado y la reabsorción por el enterocito y el transporte de regreso al torrente sanguíneo.

10 [0234] Los resultados para la sal de meglumina de LA1 se muestran en la Tabla 24. Después de la administración oral de la sal de meglumina de LA1, la Cmax media (463 ng/ml) para LA1 se alcanzó a las 0,50 h (tmax). Se encontró que la t_{1/2} fue de 1,60 h. La biodisponibilidad oral absoluta fue del 37%. Después de la administración IP de la sal de meglumina de LA1, la Cmax media para LA1 fue de 2865 ng/ml, que se alcanzó a las 0,25 h (tmax). Se encontró que la t_{1/2} fue de 1,95 h. La biodisponibilidad IP absoluta media fue > 100%. Después de la administración intravenosa de la sal de meglumina de LA1, se encontró que la t_{1/2} y la depuración fueron de 1,41 h y 17,5 ml/min/kg, respectivamente para LA1. El volumen medio de distribución fue de 1,85 l/Kg.

Tabla 24. Datos PK de sal de meglumina de LA1 para administración PO e IP

| DMPK | | Sal de meglumina de LA1 |
|--------------|-----------------------|-------------------------|
| PO - 2 mg/kg | Cl rata (ml/min/kg) | 17,5 |
| | F% rata (AUC en mM*h) | 37,1% (1,2) |
| | Vss (l/kg) | 0,74 |
| | t _{1/2} (h) | 1,60 |
| | MRT (h) | 1,54 |
| IP - 2 mg/kg | Cl rata (ml/min/kg) | 17,5 |
| | F% rata (AUC en mM*h) | 167% (5,3) |
| | Vss (l/kg) | 0,74 |
| | t _{1/2} (h) | 1,95 |
| | MRT (h) | 1,54 |

5 [0235] Tanto la sal de colina de LA1 como la sal de meglumina de LA1 mostraron una biodisponibilidad similar después de la administración oral. La biodisponibilidad IP para la sal de meglumina de LA1 fue mayor que la biodisponibilidad IP para la sal de colina LA1 y LA1. LA1, la sal de colina de LA1 y la sal de meglumina de LA1 exhibieron perfiles farmacocinéticos similares después de la administración intravenosa.

10 [0236] Se evaluó la farmacocinética de LA1, meglumina de LA1 y colina de LA1 en ratas Sprague Dawley (SD) después de la administración intravenosa, intraperitoneal y oral a 1, 2 y 2 mg/kg, respectivamente.

15 [0237] La Tabla 25 proporciona una descripción comparativa de los parámetros farmacocinéticos de LA1 en ratas SD después de una dosis oral de LA1, colina de LA1 y meglumina de LA1 a 2 mg/kg. La Fig. 17 muestra el perfil de concentración frente al tiempo de LA1 liberado tras la administración oral de sal de colina de LA1 (2 mg/kg) y sal de meglumina de LA1 (2 mg/kg) a ratas SD.

Tabla 25. Comparación de los datos PK para la administración oral de varias sales

| Parámetro PK | | LA1 | | Colina de LA1 | | Meglumina de LA1 | |
|--|-----------|--|------|---------------|------|------------------|----|
| | | Media | SD | Media | SD | Media | SD |
| t _{1/2,B} AUC _{0-t} AUC _{0-∞} C _{max} t _{max} MRT T _{último} | (h) | Los parámetros PK no se pudieron calcular debido a baja exposición | 1,57 | 0,30 | 1,60 | 0,35 | |
| | (ng·h/ml) | | 808 | 555 | 722 | 109 | |
| | (ng·h/ml) | | 814 | 560 | 726 | 110 | |
| | (ng/ml) | | 477 | 388 | 463 | 168 | |
| | (h) | | 0,50 | 0,00 | 0,50 | 0,00 | |
| | (h) | | 1,81 | 0,45 | 1,54 | 0,28 | |
| | (h) | | 10,0 | 0,00 | 10,0 | 0,00 | |
| F | (%) | NA | 41,0 | | | 37,1 | |

20 [0238] La Tabla 26 proporciona una descripción comparativa de los parámetros farmacocinéticos de LA1 en ratas SD después de una dosificación IP de LA1, sal de colina de LA1 y sal de meglumina de LA1 a 2 mg/kg. La figura 18 muestra el perfil de concentración frente a tiempo de LA1 tras la administración intraperitoneal de LA1 (2 mg/kg) y LA1 liberado tras la administración intraperitoneal de colina de LA1 (2 mg/kg) y meglumina de LA1 (2 mg/kg) a ratas SD.

Tabla 26. Comparación de los parámetros PK para la administración IP de varias sales

| Parámetro PK | | LA1 | | Colina de LA1 | | Meglumina de LA1 | |
|---------------------|-----------|-------|------|---------------|------|------------------|------|
| | | Media | SD | Media | SD | Media | SD |
| t _{1/2,B} | (h) | 0,78 | 0,17 | 1,60 | 0,10 | 1,95 | 0,24 |
| AUC _{0-t} | (ng·h/ml) | 1481 | 255 | 1657 | 115 | 3252 | 191 |
| AUC _{0-∞} | (ng·h/ml) | 1499 | 268 | 1666 | 122 | 3270 | 183 |
| C _{max} | (ng/ml) | 1284 | 258 | 1590 | 190 | 2865 | 87,2 |
| t _{max} | (h) | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,00 | 0,25 | 0,00 |
| MRT | (h) | 3,44 | 3,58 | 1,02 | 0,09 | 1,54 | 0,27 |
| T _{último} | (h) | 20,5 | 7,00 | 10,0 | 0,00 | 17,0 | 8,08 |
| % F | | 81,6 | | 83,9 | | >100 | |

5 [0239] La Tabla 27 proporciona una descripción comparativa de los parámetros farmacocinéticos de LA1 en ratas SD después de una dosis intravenosa de LA1, sal de colina de LA1 y sal de meglumina de LA1 a 1 mg/kg. La figura 19 muestra el perfil de concentración frente al tiempo de LA1 después de la administración intravenosa de LA1 (1 mg/kg) y LA1 liberado después de la administración intravenosa de colina de LA (1 mg/kg) y meglumina de LA1 (1 mg/kg) a ratas SD.

10 Tabla 27. Comparación de los parámetros PK para administración IV de diversas sales

| Parámetro PK | | LA1 | | Colina de LA1 | | Meglumina de LA1 | |
|---------------------|-------------|-------|------|---------------|------|------------------|------|
| | | Media | SD | Media | SD | Media | SD |
| t _{1/2,B} | (h) | 1,16 | 0,34 | 1,21 | 0,20 | 1,41 | 0,33 |
| C _{max} | (ng/ml) | 952 | 143 | 1418 | 266 | 1445 | 314 |
| C ₀ | (ng/ml) | 1317 | 270 | 1856 | 392 | 2142 | 410 |
| AUC _{0-t} | (ng·h/ml) | 903 | 339 | 985 | 249 | 967 | 168 |
| AUC _{0-∞} | (ng·h/ml) | 918 | 335 | 993 | 245 | 978 | 173 |
| CL | (ml/min/kg) | 19,7 | 5,90 | 17,6 | 4,30 | 17,5 | 3,08 |
| Vd | (l/kg) | 2,39 | 1,31 | 1,78 | 0,60 | 1,85 | 0,46 |
| Vss | (l/kg) | 4,19 | 1,80 | 0,73 | 0,17 | 0,74 | 0,27 |
| MRT | (h) | 3,38 | 1,45 | 0,72 | 0,03 | 0,91 | 0,39 |
| T _{último} | (h) | 20,0 | 8,00 | 7,00 | 2,00 | 8,00 | 0,00 |

Ejemplo 16. Caracterización de las propiedades farmacocinéticas de las formulaciones de LA1 en ratas

15 [0240] Las rutas de administración fueron concretamente PO (sonda) y IV (bolo a través de la vena de la cola). Se utilizaron un total de cuatro ratas macho SD con edades comprendidas entre 5-6 semanas. El régimen de alimentación incluyó 12 horas de ayuno y la alimentación se proporcionó 2 horas después de la inoculación de la dosis y se proporcionó agua ad libitum. La programación de extracción de sangre para PO fue a las 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 10 y 24 h, y para IV fue a las 0,12, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8 y 24 h. Para la dosificación PO, se utilizaron como vehículos tween-80 (0,02%) y 0,5% de metilcelulosa preparada en agua mili-Q; para la dosificación intravenosa, se utilizaron como vehículos 10% de DMSO y 90% de PEG-200.

20 [0241] **Preparación de la dosis:** Para la dosificación PO, se humedecieron 2,582 mg de LA1 con ~30 µL de Tween-80 y se trituraron en un mortero y a continuación se añadió lentamente 0,5% de metilcelulosa para completar el volumen final a 12,910 ml. Para la dosificación intravenosa, se disolvieron 2,196 mg de LA1 en 440 µL de DMSO, se agitaron en vórtex y finalmente se añadieron 3,952 ml de PEG-200.

Resultados:

25 [0242] La Tabla 28 muestra una descripción comparativa de los parámetros farmacocinéticos de LA1 micronizado en ratas SD después de una dosis oral de 2 mg/kg de colina de LA1 y meglumina de LA1.

Tabla 28. Comparación de los datos PK para la administración oral de formulaciones de LA1

| PK parameter | *LA1 | | LA1 (micronizado) | | Sal de colina de LA1 | | Sal de meglumina de LA1 | |
|------------------------------|-------|------|-------------------|------|----------------------|------|-------------------------|----|
| | Media | SD | Media | SD | Media | SD | Media | SD |
| $t_{1/2,\beta}$ (h) | | 1,10 | 0,27 | 1,57 | 0,30 | 1,60 | 0,35 | |
| AUC _{0-t} (ng·h/ml) | | 319 | 79,0 | 808 | 555 | 722 | 109 | |
| AUC _{0-∞} (ng·h/ml) | | 336 | 93,4 | 814 | 560 | 726 | 110 | |
| C _{max} (ng/ml) | | 123 | 3,40 | 477 | 388 | 463 | 168 | |
| t _{max} (h) | | 0,88 | 0,75 | 0,50 | 0,00 | 0,50 | 0,00 | |
| MRT obs (h) | | 2,04 | 3,00 | 1,81 | 0,45 | 1,54 | 0,28 | |
| T _{last} (h) | | 6,50 | 3,00 | 10,0 | 0,00 | 10,0 | 0,00 | |
| F (%) | NA | 23,0 | | 41,0 | | 37,1 | | |

*- Los parámetros PK no se pudieron calcular debido a la baja exposición.

5 [0243] La Tabla 29 muestra una descripción comparativa de los parámetros PK de LA1 micronizado en ratas SD después de una dosis IV de 1 mg/kg de colina de LA1 y meglumina de LA1.

Tabla 29. Comparación de los datos PK para administración IV de formulaciones de LA1

| Parámetro PK | LA1 | | LA1 (micronizado) | | sal de colina de LA1 | | sal de meglumina de LA1 | |
|------------------------------|-------|------|-------------------|------|----------------------|------|-------------------------|------|
| | Media | SD | Media | SD | Media | SD | Media | SD |
| $t_{1/2,\beta}$ (h) | 1,16 | 0,34 | 1,36 | 0,57 | 1,21 | 0,20 | 1,41 | 0,33 |
| C _{max} (ng/ml) | 952 | 143 | 822 | 160 | 1418 | 266 | 1445 | 314 |
| C ₀ (ng/ml) | 1317 | 270 | 1025 | 217 | 1856 | 392 | 2142 | 410 |
| AUC _{0-t} (ng·h/ml) | 903 | 339 | 715 | 126 | 985 | 249 | 967 | 168 |
| AUC _{0-∞} (ng·h/ml) | 918 | 335 | 729 | 131 | 993 | 245 | 978 | 173 |
| CL (ml/min/kg) | 19,7 | 5,90 | 23,4 | 3,96 | 17,6 | 4,30 | 17,5 | 3,08 |
| Vd (l/kg) | 2,39 | 1,31 | 2,63 | 1,07 | 1,78 | 0,60 | 1,85 | 0,46 |
| Vss (l/kg) | 4,19 | 1,80 | 2,14 | 0,45 | 0,73 | 0,17 | 0,74 | 0,27 |
| MRT obs (h) | 3,38 | 1,45 | 1,47 | 0,17 | 0,72 | 0,03 | 0,91 | 0,39 |
| T _{last} (h) | 20,0 | 8,00 | 12,0 | 8,00 | 7,00 | 2,00 | 8,00 | 0,00 |

10 [0244] Se evaluó la biodisponibilidad oral e intraperitoneal absoluta de LA1 en ratas SD después de una única administración oral e intravenosa (1 mg/kg) de LA1 micronizado. Después de la administración oral de LA1 micronizado, las concentraciones plasmáticas máximas para LA1 (C_{max}: 123 ng/ml) se alcanzaron a las 0,88 h (t_{max}). Se encontró que la t_{1/2} fue de 1,10 h y la biodisponibilidad oral absoluta fue del 23%. Despues de la administración intravenosa de LA1 micronizado, se encontró que la t_{1/2} y la depuración fueron de 1,36 h y 23,4 ml/min/kg, respectivamente. Además, el volumen medio de distribución fue de 2,63 litros/kg.

15 [0245] Se concluye que el LA1 micronizado muestra mejor exposición sistémica cuando se compara con LA1 después de la administración oral. Sin embargo, LA1 y LA1 micronizado han mostrado un perfil farmacocinético similar después de la administración intravenosa.

20 Ejemplo 17. Caracterización de las propiedades farmacocinéticas del ácido libre de LA1 en perros.

25 [0246] La PK de los perros muestra una gran depuración de 2,1 ml/min/kg, tal como se muestra en la Tabla 30. La dosificación oral produjo una excelente biodisponibilidad del 50%. (6,1 mM[•]h). La solución de dosis PO (2 mg/kg) de LA1 micronizado se preparó en 0,1% de Tween-80 al 0,5% (p/v) y metilcelulosa en agua. Las soluciones de dosis IV (0,5 mg/kg) se prepararon en 5% de DMSO, 90% de PEG-200 y 5% de etanol.

Tabla 30. Datos PK para administración oral de ácido libre de LA1 en perros

| DMPK | | Ácido libre de LA1 |
|--------------|------------------------|--------------------|
| PO - 2 mg/kg | Cl perro (ml/min/kg) | 2,1 |
| | F% perro (AUC en mM*h) | 50 (6,1) |
| | Vd _{ss} (ml) | 0,72 |
| | t _{1/2} (h) | 2,11 |
| | MRT (h) | No Calculado |

[0247] El objetivo del estudio fue investigar el perfil farmacocinético preclínico de LA1 (polvo micronizado) en el perro Beagle. Para delinear la curva de concentración plasmática frente a tiempo y caracterizar los parámetros farmacocinéticos relevantes para generar datos sobre las propiedades farmacocinéticas, a saber, biodisponibilidad, semivida (t_{1/2}), volumen de distribución, C_{max}, T_{max}, AUC y constante de velocidad de eliminación de LA1 en perro Beagle.

[0248] LA1 era un material grueso que se micronizó utilizando un molino de bolas a escala de laboratorio. En los procesos, el tamaño de partícula de LA1 se redujo a ~ 20 micras. El LA1 micronizado se recuperó, se pesó y se almacenó en un recipiente de vidrio a temperatura ambiente. Para la administración de fármacos por vía intravenosa, se llevó a cabo un ensayo de compatibilidad de excipientes de LA1 para la dosificación en perros. A partir de los resultados de la prueba, se obtuvo una solución clara usando la mezcla de formulación; 5% de DMSO + 90% de polietilenglicol 400 (PEG-400) + 5% de etanol.

[0249] Micronización del producto de ensayo LA1: El tamaño de partícula de LA1 se redujo ~ 20 micras utilizando molino de bolas a escala de laboratorio. En resumen, se cargó una cantidad conocida de LA1 en un recipiente cilíndrico con tapa hecho de acero inoxidable, seguido de la adición de bolas de acero inoxidable. Los molinos de bolas se hicieron girar sobre su eje durante un total de 60 minutos (6 ciclos X 10 minutos). El LA1 micronizado se recuperó, se pesó y se almacenó en una botella de vidrio a temperatura ambiente.

[0250] Sistema de ensayo: se utilizaron perros Beagle sanos con un peso de 10-12 kg (edad 10 meses) para el estudio. Se adoptó un diseño cruzado para los experimentos en los que se utilizaron 02 perros en el estudio para la administración oral e intravenosa. Ambos animales se alojaron en una jaula de acero inoxidable provista de una tolva para contener la alimentación en gránulos y una tolva de agua separada. La temperatura y la humedad se mantuvieron a 22 ± 3 °C y 40-70%, respectivamente. La iluminación se controló para dar una secuencia de ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Todos los animales se adaptaron a las condiciones experimentales durante al menos 5 días antes de la dosificación. A todos los animales se les proporcionó alimento en gránulos estándar Pedigree™, excepto de 10 a 12 h antes del tratamiento y 4 h después de la administración del fármaco. Se proporcionó agua *ad libidum*.

[0251] Formulación y administración del fármaco: Se pesaron exactamente 90 mg del producto de ensayo LA1 (polvo micronizado) y se transfirieron a un mortero y se trituraron brevemente con mano de mortero. A continuación, se añadió lentamente un pequeño volumen de vehículo [0,5% (p/v) de carboximetilcelulosa con 0,1% de Tween-80] en agua con trituración continua hasta que se obtuvo una suspensión uniforme. A continuación, el contenido se transfirió a la probeta. El mortero se enjuagó hasta que se aseguró la transferencia completa del producto de ensayo a la probeta. A continuación, el volumen final se completó hasta 225 ml con vehículo para obtener una suspensión uniforme con la concentración deseada de 0,4 mg/ml. Las formulaciones de dosificación se administraron por sonda oral a un volumen de dosis que no excedía los 5 ml/kg.

[0252] Formulación de fármaco intravenoso: se empleó un ensayo de hemólisis usando sangre completa de perro para evaluar el daño de los glóbulos rojos para la selección del excipiente para la dosificación intravenosa. En base a los resultados obtenidos, se adoptó el procedimiento descrito. Se pesaron exactamente 22,5 mg del producto de ensayo (polvo micronizado) en un tubo graduado. Se añadieron gota a gota 2,25 ml de DMSO y se mezclaron mediante vórtex. A continuación, se añadieron 40,50 ml de polietilenglicol 400 (PEG-400) en dos o tres fragmentos y se agitó en vórtex intermitentemente. A continuación, se añadieron gota a gota 2,25 ml de etanol y se agitó para obtener una solución transparente. La formulación se sometió a ultrasonidos durante 5 minutos. La administración de la dosis se realizó utilizando una bomba de infusión y se infundió a una velocidad de 0,33 ml/kg/min. El volumen de dosis no excedió de 1 ml/kg.

[0253] Recogida de muestras: se utilizó un método en serie para la toma de muestras de sangre. Se recogieron muestras de sangre como se menciona en la sección de diseño del estudio (7). La muestra de sangre (~ 1,5 ml) se

recogió de la vena safena en tubos etiquetados que contenían una solución de K₂EDTA al 2% p/v, como anticoagulante. La sangre completa se almacenó a -20 °C hasta que se usó para el bioanálisis.

[0254] Procedimiento de extracción: El plasma separado de la sangre completa se utilizó para bioanálisis. El analito LA1 se extrajo del plasma mediante el método de precipitación con acetonitrilo. El sobrenadante de ambas capas se mezcló y se agitó durante 10 minutos. Todas las muestras (incluidos CC, QC) se inyectaron en el sistema CL-EM/EM.

[0255] Análisis de datos: A partir de las concentraciones plasmáticas anteriores, se realizó un análisis farmacocinético usando un PK solver.

10 *Resultados:*

[0256] Los datos farmacocinéticos sugirieron que la absorción de LA1 fue moderada con una concentración máxima que tiene lugar a las 4 horas después de la dosis. La fase de absorción mostró un acumulación constante de los niveles de LA1 para alcanzar su concentración máxima. Se encontró que la concentración máxima era 685,47 ng/ml. La fase de eliminación de LA1 mostró una disminución constante inmediatamente después de que se alcanzó la concentración máxima. La semivida oral de LA1 es de aproximadamente 2 horas y el AUC₀₋₁₂ es de 2572,24 h * ng/ml. El volumen de distribución de LA1 fue de 0,72 ml con una depuración de 0,39 ml/h. Se encontró que la biodisponibilidad oral absoluta de LA1 (polvo micronizado) fue del 50,62% (0,5 mg iv frente a 2 mg oral).

[0257] Se detectaron concentraciones del producto de ensayo en el plasma en ambos animales tratados. El perfil farmacocinético de LA1 ha mostrado una semivida de 2 h, $T_{max} = 4$ h, $C_{max} = 685,47$ ng/ml y $AUC_{0-12} = 2572,24$ h*ng/ml. La Tabla 31 proporciona las concentraciones plasmáticas de LA1 (polvo micronizado) en ng/ml en dosis iv.

25 Tabla 31. Concentraciones plasmáticas de LA1 micronizado para administración intravenosa a diferentes intervalos de tiempo

| IV – 0,5 mg/kg de peso corporal (n=03) | | | | | |
|--|-----------------------|---------|---------|---------|--------|
| Tiempo (h) | Concentración (ng/ml) | | | Media | ± SD |
| Animal No. | 1 | 2 | 3 | | |
| Pre-dosis | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,05 | 1567,58 | 1336,59 | 1083,05 | 1329,07 | 242,35 |
| 0,1 | 897,32 | 830,40 | 949,27 | 892,33 | 59,59 |
| 0,25 | 716,65 | 632,69 | 709,29 | 686,21 | 46,50 |
| 0,5 | 504,90 | 416,91 | 501,66 | 474,49 | 49,89 |
| 1 | 405,11 | 313,73 | 349,30 | 356,05 | 46,06 |
| 2 | 322,73 | 132,37 | 192,17 | 215,76 | 97,35 |
| 3 | 246,29 | 60,85 | 96,99 | 134,71 | 98,31 |
| 4 | 68,79 | 55,50 | 26,76 | 50,35 | 21,48 |
| 6 | 71,62 | 16,42 | 9,53 | 32,52 | 34,03 |
| 8 | 24,37 | 12,59 | 4,17 | 13,71 | 10,14 |
| 12 | 7,93 | 4,80 | 4,78 | 5,84 | 1,81 |

[0258] La Tabla 32 proporciona las concentraciones plasmáticas de LA1 (polvo micronizado) en ng/ml en dosis oral.

Tabla 32. Concentraciones plasmáticas de LA1 micronizado para administración oral a diferentes intervalos de tiempo

| Oral – 0,5 mg/kg de peso corporal (n=03) | | | | | |
|---|------------------------------|----------|----------|--------------|-------------|
| Tiempo (h) | Concentración (ng/ml) | | | Media | ± SD |
| Animal No. | 1 | 2 | 3 | | |
| Pre-dosis | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 0,5 | 102,75 | 35,26 | 44,77 | 60,93 | 36,53 |
| 1 | 410,51 | 70,30 | 84,94 | 188,59 | 192,33 |
| 1,5 | 438,29 | 202,64 | 90,83 | 243,92 | 177,37 |
| 2 | 471,76 | 197,65 | 154,03 | 274,48 | 172,24 |
| 3 | 503,29 | 236,15 | 309,30 | 349,58 | 138,05 |
| 4 | 659,92 | 769,83 | 626,66 | 685,47 | 74,93 |
| 6 | 210,79 | 203,53 | 210,23 | 208,19 | 4,04 |
| 8 | 118,18 | 65,17 | 65,10 | 82,82 | 30,63 |
| 12 | 37,49 | 43,15 | 34,94 | 38,52 | 4,21 |

5 [0259] La Tabla 33 proporciona parámetros farmacocinéticos resumidos de LA1 (polvo micronizado) en perro Beagle.

Tabla 33. Comparación de parámetros PK IV y oral en perros Beagle

| Ruta de administración | Semivida (h) | Co/ C_{max} (ng/mL) | Vdss (mL) | Cl (ml/h) | T_{max} (h) | AUC_{0-12h} (h*ng/ml) | AUC_{0-inf} (h*ng/ml) |
|---|---------------------|------------------------------------|------------------|------------------|----------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Intravenosa (0,5 mg/kg) | 2,15 | 2041,83 | 0,72 | 0,39 | --- | 1332,79 | 1350,43 |
| Oral (3mg/kg) | 2,11 | 685,47 | --- | --- | 4,0 | 2572,24 | 2689,56 |
| Biodisponibilidad oral absoluta de LA1 (polvo micronizado) es del 50,62% (0,5 mg i.v vs 2 mg oral). | | | | | | | |

10 [0260] La Tabla 34 proporciona los parámetros farmacocinéticos de animales individuales de LA1 (polvo micronizado) a 0,5 mg/kg de peso corporal, dosis intravenosa en perros beagle. La figura 20 es un gráfico del perfil PK para LA1 en perros beagle a una dosis intravenosa de 1 mg/kg.

Tabla 34. Comparación de los parámetros PK entre varios perros beagle para administración IV

| Animal No. | K_{el} (1/h) | Semivida (h) | C₀ (ng/ml) | AUC_{inf} (h*ng/ml) | AUC_{0-12h} (h*ng/ml) | Vd_{ss} (ml) | Cl (mL/h) | Biodisponibilidad absoluta F% |
|-------------------|-----------------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------|--------------------------------------|
| 1 | 0,38 | 1,82 | 1567,58 | 1798,33 | 1777,48 | 0,65 | 0,28 | 45,93 |
| 2 | 0,21 | 3,30 | 1336,59 | 1101,33 | 1078,51 | 0,88 | 0,45 | 56,88 |
| 3 | 0,52 | 1,34 | 1083,05 | 1151,64 | 1142,39 | 0,64 | 0,43 | 49,03 |
| Media | 0,37 | 2,15 | 1329,07 | 1350,43 | 1332,79 | 0,72 | 0,39 | 50,62 |
| SD | 0,15 | 1,02 | 242,35 | 388,70 | 386,43 | 0,14 | 0,10 | 5,64 |

5 [0261] La Tabla 35 proporciona parámetros farmacocinéticos de animales individuales de LA1 (polvo micronizado) con tratamiento oral de 2 mg/kg de peso corporal en perros beagle. La Fig. 21 muestra un gráfico del perfil PK para LA1 en perros beagle a una dosis oral de 2 mg/kg.

Tabla 35. Comparación de los parámetros PK entre varios perros beagle para administración oral

| Animal No | K_{el} (1/h) | Semivida (h) | C_{max} (ng/ml) | AUC_{inf} (h*ng/ml) | T_{max} (h) | AUC₀₋₁₂ (h*ng/ml) |
|------------------|-----------------------------|---------------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| 1 | 0,29 | 2,41 | 659,92 | 3304,18 | 4,00 | 3173,88 |
| 2 | 0,35 | 1,99 | 769,83 | 2505,84 | 4,00 | 2382,10 |
| 3 | 0,36 | 1,94 | 626,66 | 2258,65 | 4,00 | 2160,72 |
| Media | 0,33 | 2,11 | 685,47 | 2689,56 | 4,00 | 2572,24 |
| SD | 0,04 | 0,26 | 74,93 | 546,44 | 0,00 | 532,67 |

10 Ejemplo 18. Caracterización de las propiedades farmacocinéticas para la sal de colina de LA1 en perros.

15 [0262] Sistema de ensayo: se utilizaron perros Beagle sanos con un peso de 10-12 kg (edad 10 meses) para el estudio. Se adoptó un diseño cruzado para los experimentos en los que se utilizaron 03 perros en el estudio para la administración oral e intravenosa. Los animales se alojaron en una jaula de acero inoxidable provista de una tolva para contener la alimentación en gránulos y una tolva de agua separada. La temperatura y la humedad se mantuvieron a $23 \pm 5^\circ\text{C}$ y 30-70%, respectivamente. La iluminación se controló para dar una secuencia de ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Todos los animales se adaptaron a las condiciones experimentales durante al menos 5 días antes de la dosificación. A todos los animales se les proporcionó alimento en gránulos estándar Pedigree™, excepto de 10 a 20 12 h antes del tratamiento y 4 h después de la administración del fármaco. Se proporcionó agua *ad libidum*.

25 [0263] Formulación y administración del fármaco: 251,02 mg del producto de ensayo se transfirieron a un mortero limpio. El producto de ensayo se molió uniformemente usando un mortero. Se añadieron 1,235 ml de Tween 80 y se mezcló el material. Se añadió una pequeña cantidad de metilcelulosa al 0,5% (p/v) en agua y se trituró la mezcla. Se añadió metilcelulosa al 0,5% para obtener un volumen final de 190 ml. Finalmente, la formulación anterior se transfirió a un vaso de precipitados previamente etiquetado y se sonó durante cinco minutos. La suspensión se dosificó en condiciones de agitación colocándola en un agitador magnético.

30 [0264] La formulación de dosificación de colina de LA-1 se administró por sonda oral usando un tubo de alimentación por sonda. El volumen requerido de formulación de dosificación (5 ml/kg de peso corporal) se extrajo en una jeringa graduada. El perro se sujetó adecuadamente con la ayuda de otra persona para restringir el movimiento. El tubo de alimentación se insertó lentamente en la boca a través del espacio entre la mejilla y los dientes hacia el esófago hasta el estómago. La colocación adecuada del tubo se confirmó sumergiendo el extremo exterior del tubo en un recipiente con agua y buscando burbujas de aire. La ausencia de burbujas de aire confirmó la ubicación del tubo en el estómago. El volumen de dosis requerido de suspensión de colina de LA-1 se administró lentamente a través del tubo de alimentación. Se empujó aire a través del extremo para asegurar el vaciado del tubo. El tubo se sacó lentamente y

se desecharó.

[0265] Formulación de fármaco intravenosa: 27,49 mg pesados de manera precisa del producto de ensayo se transfirieron al tubo limpio. Se añadió un volumen de 0,417 ml de DMSO y se mezcló hasta que la prueba se disolvió por completo. Se añadió un volumen de 0,417 ml de Solutol:alcohol (1:1, v/v) y se mezcló, a esto se le añadieron 7,496 ml de solución salina normal y se agitó con vórtex. Finalmente, se utilizó la formulación anterior para la dosificación.

[0266] Se extrajo el volumen requerido de formulación de dosificación (0,2 ml/kg de peso corporal) de colina de LA-1 en una jeringa graduada. Se eliminaron las burbujas de aire de la jeringa antes de la dosificación. El perro fue inmovilizado en posición de pie. La parte superior del sitio de inyección de la vena cefálica se comprimió y la aguja del catéter de vena en mariposa de tamaño 22G se insertó lentamente en la vena. Una vez que la sangre llegó al final del tubo del catéter, se conectó a la jeringa. La formulación de dosificación se inyectó inmediatamente lentamente. Al final de la administración, se inyectaron aproximadamente 0,5 ml de solución salina normal a través de un catéter para asegurar que se administraba el volumen de dosis requerido. Por último, se retiró la aguja.

[0267] Recogida de muestras: después de la dosificación, se recogieron ~1,5 ml de muestra de sangre de cada perro para los siguientes puntos de tiempo 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 5, 8, 10 y 24 h de la vena yugular en tubos de centrífuga vacutainer previamente etiquetados que contenían K₂EDTA. El plasma se obtuvo centrifugando muestras de sangre a 2500 g durante 10 min. en refrigeración (2-4 °C) dentro de las 0,5 h posteriores al muestreo. Las muestras de plasma obtenidas se transfirieron a tubos de microcentrífuga previamente etiquetados (aproximadamente ~300 µl) y se almacenaron por debajo de -70 ± 10 °C. Las etiquetas de las muestras incluyen detalles como el número de estudio, el código del producto de ensayo y el grupo de dosis y/o el día del muestreo, el número de animal y el punto de tiempo.

[0268] Procedimiento de extracción: El plasma separado de la sangre completa se utilizó para bioanálisis. El analito LA1 se extrajo del plasma mediante el método de precipitación con acetonitrilo. El sobrenadante de ambas capas se mezcló y se agitó durante 10 minutos. Todas las muestras (incluidos CC, QC) se inyectaron en el sistema CL-EM/EM.

[0269] Análisis de datos: A partir de las concentraciones en plasma anteriores se realizó un análisis farmacocinético usando PK solver.

[0270] Los datos de PK del perro para la sal de colina se resumen en la Tabla 36. Los datos farmacocinéticos muestran que la concentración máxima de sal de colina de LA1 tuvo lugar a las 1,5 horas después de la dosis. La fase de absorción mostró una acumulación constante de los niveles de LA1 para alcanzar su concentración máxima. Se encontró que la concentración máxima era de 2068 ng/ml. La fase de eliminación de LA1 mostró una disminución constante inmediatamente después de que se alcanzó la concentración máxima. La semivida oral de LA1 es de aproximadamente 3,4 horas y el AUC₀₋₁₂ es de 9184 h * ng/ml. El volumen de distribución de LA1 fue de 0,83 l/kg con una depuración de 3,92 ml/min/kg. Se encontró que la biodisponibilidad oral absoluta de sal de colina de LA1 fue del 43,4% (0,5 mg iv frente a 5 mg oral).

40 Tabla 1. Datos PK para la administración de la sal de LA1 en perros beagle

| DMPK | | Sal de colina de LA1 |
|--------------|-------------------------|----------------------|
| PO - 5 mg/kg | CI Perro (ml/min/kg) | 3,9 |
| | F% perro (AUC en mM*h) | 43,4 (22) |
| | Vd _{ss} (L/kg) | 0,83 |
| | t _{1/2} (h) | 3,41 |

[0001] La Tabla 37 muestra las concentraciones en plasma de sal de colina de LA1 en ng/ml resultante de la administración i.v.

45 Tabla 2. Concentraciones en plasma de sal de colina de LA1 para la administración IV a diferentes intervalos de tiempo

| Animal no. | Punto de tiempo (h)/Concentración (ng/mL) | | | | | | | | | |
|------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|
| | 0,25 | 0,5 | 1 | 1,5 | 2 | 3 | 5 | 8 | 10 | 24 |
| 30595 | 987 | 874 | 721 | 571 | 483 | 711 | 182 | 61.9 | 51.1 | 15.8* |
| 4635 | 843 | 548 | 405 | 300 | 206 | 289 | 77.2 | 26.1 | 12.0 | BLQ |
| 30507 | 723 | 501 | 397 | 276 | 203 | 265 | 67.7 | 44.4 | 19.8 | BLQ |

| | | | | | | | | | | |
|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|
| Conc. media (ng/mL) | 851 | 641 | 508 | 382 | 297 | 421 | 109 | 44.1 | 27.6 | ND |
| SD | 132 | 203 | 185 | 164 | 161 | 251 | 64 | 17.9 | 20.7 | ND |
| % CV | 15,5 | 31,7 | 36,4 | 42,9 | 54,1 | 59,5 | 58,4 | 40,6 | 74,9 | ND |

BLQ = Por debajo del límite de cuantificación

[0272] La tabla 38 muestra las concentraciones en plasma de sal de colina de LA1 en ng/ml resultante de la administración oral.

5 Tabla 3. Concentraciones en plasma de sal de colina de LA1 para la administración oral a diferentes intervalos de tiempo

| Animal no. | Punto de tiempo (h)/Concentration (ng/mL) | | | | | | | | | |
|----------------------------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | 0.25 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 | 3 | 5 | 8 | 10 | 24 |
| 30595 | 1003 | 1869 | 1662 | 1199 | 1485 | 1812 | 442 | 240 | 164 | 25,9 |
| 4635 | 1628 | 2776 | 2706 | 2609 | 2055 | 2510 | 429 | 104 | 62,2 | BLQ |
| 30507 | 659 | 999 | 1312 | 1055 | 1015 | 1558 | 370 | 107 | 158 | 7,88 |
| Conc. media (ng/mL) | 1097 | 1882 | 1894 | 1621 | 1518 | 1960 | 414 | 150 | 128 | 16,9 |
| SD | 491 | 889 | 725 | 859 | 521 | 493 | 38,3 | 77,9 | 57,1 | ND |
| % CV | 44,8 | 47,2 | 38,3 | 53,0 | 34,3 | 25,2 | 9,26 | 51,8 | 44,6 | ND |

BLQ = Por debajo del límite de cuantificación

10 [0273] La Tabla 33 proporciona parámetros farmacocinéticos resumidos de sal de colina de LA1 en perros Beagle.

Tabla 4. Comparación de parámetros PK IV y oral en perros beagle

| Ruta de administración | Semivida (h) | Co/ C _{max} (ng/mL) | Vdss (mL) | Cl (ml/h) | T _{max} (h) | AUC _{0-12h} (h*ng/ml) | AUC _{0-inf} (h*ng/ml) |
|-------------------------|--------------|------------------------------|-----------|-----------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Intravenosa (0,5 mg/kg) | 2,15 | 2041,83 | 0,72 | 0,39 | --- | 1332,79 | 1350,43 |
| Oral (3 mg/kg) | 2,11 | 685,47 | --- | --- | 4,0 | 2572,24 | 2689,56 |

La Biodisponibilidad oral absoluta de sal de colina de LA1 es del 50,62% (0,5 mg i.v vs 2 mg oral).

15 [0274] La Fig. 22 muestra un gráfico del perfil PK para LA1 en perros beagle a una dosificación IV de 0,5 mg/kg y dosificación oral (PO) de 5 mg/kg.

20 Ejemplo 19. Evaluación de la eficacia *in vivo* de LA1 para el tratamiento del aloinjerto de melanoma murino B16F10 en ratones C57BL/6

25 [0275] Se usó una línea celular de tumor de melanoma de ratón, B16-F10, para desarrollar un modelo de tumor subcutáneo. Se inyectaron $0,1 \times 10^6$ células por vía subcutánea en la región del flanco derecho del animal. Cuando los tumores alcanzaron $\sim 45 \text{ mm}^3$, los animales se distribuyeron aleatoriamente en varios grupos, cada grupo con 10 animales, de modo que el volumen tumoral promedio de todos los grupos fuera similar. Los animales se trataron desde el día de la aleatorización (día 1). Se midieron las dimensiones del tumor (longitud y diámetro) para todos los animales tres veces por semana, incluido el día de finalización del estudio. Además, durante todo el período de estudio, los ratones fueron controlados diariamente para detectar afecciones clínicas. El día 15, se recogieron muestras de sangre y de tumores de todos los ratones a T_{max}(0,5 h) para evaluar la exposición. Se utilizaron porciones de las muestras de sangre para análisis de sangre y química clínica. También se recogieron pulmón, corazón, hígado, bazo y riñones y se realizó un análisis histopatológico.

30 [0276] CÉLULAS TUMORALES. Se cultivaron células B16-F10 en medio de cultivo celular DMEM suplementado con FBS al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%. Las células se mantuvieron a 37°C en ausencia de CO₂. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 75-80%, se recogieron mediante tripsinización, se lavaron y se contaron. A

continuación, las células se resuspendieron en medio sin suero a una concentración de 0,1 millones de células/75 µl.

[0277] INOCULACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES. Las células se inocularon por vía subcutánea en el flanco de ratones negros. Antes de la inoculación, se recortó el pelo y se limpió la piel del lugar de la inyección (flanco dorsal derecho) con alcohol. Se mezclaron células en medio sin suero (0,1 millones de células/75 µl) con Matrigel en una proporción de 3:1 y se inyectó un volumen total de 100 µl en cada animal con una jeringa BD de 1 ml unida a una aguja de 26 G.

[0278] ALEATORIZACIÓN. Los tumores fueron palpables alrededor del día 7 de la inoculación. Una vez que el volumen del tumor alcanzó alrededor de 45 mm³, los animales se aleatorizaron en varios grupos con 10 animales en todos los grupos para que el volumen tumoral promedio de cada grupo fuera similar.

| | |
|----------------------|--|
| Vehículo | 5% DMSO+5% Solutol:Etanol (1:1) + 20% Tween20 + 70 % N-Solución salina |
| Artículo de ensayo 1 | Ácido libre de LA1 |
| Artículo de ensayo 2 | Sal de meglumina de LA1 |
| Artículo de ensayo 3 | Anticuerpo anti-PD1 (RMP1-14; BioXCell) |
| Artículo de ensayo 4 | Anticuerpo anti-CTLA4 (BioXCell) |

[0279] FORMULACIÓN. LA1 se combinó con una solución que contenía 5% de DMSO, 5% de Solutol:etanol (1:1), 20% de Tween20 y 70% de N-solución salina. La sal de meglumina de LA1 se combinó con una solución que contenía 5% de DMSO, 5% de Solutol:etanol (1:1) y 90% de N-solución salina.

[0280] CÁLCULOS ESTADÍSTICOS. Todos los cálculos estadísticos se realizaron utilizando Prism 5.0 (GraphPad Software Inc, EE. UU.). Se realizaron comparaciones de las medidas del tamaño del tumor durante y al final del estudio entre los grupos de tratamiento y los respectivos grupos de control del vehículo usando ANOVA de una vía seguido de las pruebas de comparación múltiple de Dunnett. Se consideró significativo un valor de p inferior a 0,05.

[0281] EXPOSICIÓN DE LA1. Al final del estudio, LA1 mostró una exposición de 383 ± 450 ng/ml y 24,7 ± 17,6 ng/ml en sangre y tumor, respectivamente. De manera similar, la sal de meglumina de LA1 a 3 y 30 mg/kg mostró una exposición de 1519 ± 613 ng/ml y 3744 ± 1755 ng/ml en plasma y 1017 ± 510 ng/ml y 1659 ± 611 ng/ml en el tumor, respectivamente.

[0282] HISTOPATOLOGÍA. El examen histopatológico se realizó utilizando muestras de hígado, riñón, pulmón, bazo, corazón y estómago. El examen microscópico de los tejidos hepáticos reveló una necrosis hepatocelular mínima a moderada en un animal de cada uno de los grupos de control, el grupo de sal de LA1, el grupo de α-PD1, el grupo de α-CTLA4 y el grupo de α-CTLA4/sal de LA1. Se observó metástasis tumoral en tejido pulmonar de un animal en cada uno de los grupos de control, el grupo de sal de LA1 y el grupo de α-PD1.

[0283] Cuando se dosificó a 3 o 30 mg/kg al día durante 15 días, el tratamiento con sal de meglumina de LA1 dio lugar a la inhibición del crecimiento de aproximadamente un 58-66% de los tumores melanoma murino B16-F10 en comparación con el control del vehículo. El tratamiento con un primer inhibidor del punto de control inmunitario (anticuerpo α-CTLA4, 100 µg/ratón cada tercer día) solo dio como resultado una inhibición del crecimiento de aproximadamente un 42%. El tratamiento de combinación usando anticuerpo α-CTLA4 y LA1 dio como resultado una mayor inhibición del crecimiento tumoral, en comparación con α-CTLA4 solo. Sin embargo, el tratamiento de combinación que usa un segundo inhibidor del punto de control inmunitario (anticuerpo α-PD1) y la sal de meglumina de LA1 o LA1 dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral más fuerte que cualquier agente usado solo. Véase, Fig. 23. El tratamiento con anticuerpo α-PD1 mostró aproximadamente un 64% de inhibición del tumor, pero la combinación dio como resultado aproximadamente el 81% de inhibición tumoral en estos ensayos.

Ejemplo 20. Evaluación de la eficacia *in vivo* de LA1 para el tratamiento del aloinjerto de melanoma murino B16F10 en ratones C57BL/6

[0284] Los ratones se inocularon con tumores B16F10, como se describe anteriormente. Una vez que el volumen del tumor alcanzó alrededor de 45 mm³, los animales se aleatorizaron en varios grupos con 10 animales en todos los grupos para que el volumen tumoral promedio de cada grupo fuera similar.

| | |
|----------------------|--|
| Vehículo | 5% DMSO+5% Solutol:Etanol (1:1) + 20% Tween20 + 70 % N-Solución salina |
| Artículo de ensayo 1 | LA1 |
| Artículo de ensayo 2 | Sal de colina de LA1 |
| Artículo de ensayo 3 | Anticuerpo anti-PD1 (RMP1-14; BioXCell) |
| Artículo de ensayo 4 | Anticuerpo anti-CTLA4 (BioXCell) |

[0285] FORMULACIÓN. LA1 se combinó con una solución que contenía 5% de DMSO, 5% de Solutol:etanol (1:1),

20% de Tween20 y 70% de N-solución salina. La sal de colina de LA1 (recristalizada en n-butanol; Forma R) se combinó con una solución que contenía 5% de DMSO, 5% de Solutol:etanol (1:1) y 90% de N-solución salina.

5 [0286] ADMINISTRACIÓN. La sal de colina de LA1, el anticuerpo anti-PD1 y el anticuerpo anti-CTLA4 se administraron como se muestra a continuación.

| Grupo | Tratamiento | Ruta | Pauta de dosificación | Dosis (mg/kg) | n/grupo |
|-------|-----------------------|------|-----------------------|---------------|---------|
| 1 | Vehículo de control | | | - | 10 |
| 2 | Sal de colina de LA1 | p.o. | b.i.d | 3 | 10 |
| 3 | Sal de colina de LA1 | | | 10 | 10 |
| 4 | Sal de colina de LA1 | | | 30 | 10 |
| 5 | Sal de colina de LA1 | | | 100 | 10 |
| 6 | Anticuerpo anti-PD1 | i.p. | cada 4º día | 0,1 mg/ratón | 10 |
| 7 | Anticuerpo anti-CTLA4 | i.p. | cada 4º día | 0,1 mg/ratón | 10 |
| 8 | Sal de colina de LA1 | p.o. | b.i.d | 3 mg/kg | 10 |
| | Anticuerpo anti-PD1 | i.p. | cada 4º día | 0,1 mg/ratón | |
| 9 | Sal de colina de LA1 | p.o. | b.i.d | 10 mg/kg | 10 |
| | Anticuerpo anti-PD1 | i.p. | cada 4º día | 0,1 mg/ratón | |
| 10 | Sal de colina de LA1 | p.o. | b.i.d | 3 mg/kg BID | 10 |
| | Anticuerpo anti-CTLA4 | i.p. | cada 4º día | 0,1 mg/ratón | |
| 11 | Sal de colina de LA1 | p.o. | b.i.d | 10 mg/kg BID | 10 |
| | Anticuerpo anti-CTLA4 | i.p. | cada 4º día | 0,1 mg/ratón | |

10 [0287] EXPOSICIÓN DE LA1. Al final del estudio, la administración oral de ácido libre de LA1 dio lugar a una exposición por debajo del límite de cuantificación en sangre y tumor. La sal de colina de LA1 dosificada a 3, 10, 30 y 100 mg/kg por vía oral dio como resultado una exposición de $314 \pm 77,7$ ng/ml, 996 ± 401 ng/ml, 3518 ± 1483 ng/ml y $21,827 \pm 5628$ ng/ml en plasma. La administración de la sal de colina por vía oral a las dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg dio como resultado concentraciones tumorales de $118 \pm 83,1$ ng/ml, 254 ± 146 ng/ml, 855 ± 312 ng/ml y 2093 ± 1997 ng/ml en tejido tumoral, respectivamente.

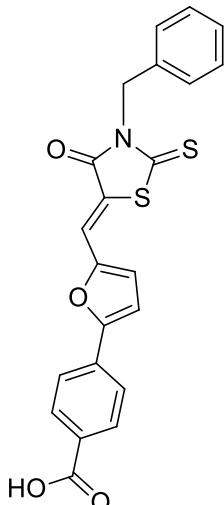
15 [0288] La sal de colina de LA1 disminuyó el volumen del tumor de una manera dependiente de la dosis. Véase la Fig. 24. El tratamiento con la sal de colina de LA1, cuando se dosificó a 3-100 mg/kg, dio como resultado una inhibición del crecimiento de aproximadamente 43-68 % de los tumores de melanoma murino B16-F10 en comparación con el control del vehículo. El tratamiento con un primer inhibidor del punto de control inmunitario (anticuerpo α-CTLA4) solo dio como resultado una inhibición del crecimiento de aproximadamente un 53 %. El tratamiento de combinación usando anticuerpo α-CTLA4 y sal de colina de LA1 (3 mg/kg y 10 mg/kg) dio como resultado una mayor inhibición del crecimiento tumoral, 60 % y 67 %, respectivamente, en comparación con α-CTLA4 solo. Véase la Fig.25.

20 [0289] El tratamiento usando un segundo inhibidor del punto de control inmunitario (anticuerpo α-PD1) dio como resultado aproximadamente un 56 % de inhibición del tumor. El tratamiento combinado de anticuerpo α-PD1 y sal de colina de LA1 (3 mg/kg y 10 mg/kg) dio como resultado una inhibición adicional del crecimiento tumoral, 66 % y 68 %, respectivamente, en comparación con el anticuerpo α-PD1 solo. Véase la Fig.26.

25 [0290] Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en este documento son solo para fines ilustrativos y que se sugerirán a los expertos en la técnica diversas modificaciones o cambios a la vista de los mismos y se incluirán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Sal de colina o meglumina de un compuesto de Fórmula I:



(I).

5

2. Forma cristalina G de una sal de colina, según la reivindicación 1, que se **caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que comprende al menos tres picos seleccionados del grupo que consiste en 5,6, 7,9, 11,2, 13,3, 15,0, 15,7 , 16,1, 16,2, 16,5, 16,6, 17,8, 18,1, 18,5, 19,1, 19,8, 20,0, 21,1, 23,0, 24,6, 25,0, 25,6, 26,6, 26,8, 26,9, 29,3, 29,7, 30,6, 30,7 y 34,4 °2θ, ± 0,2 °2θ, según se determina en un difractómetro usando radiación Cu-Kα.

10

3. Forma cristalina O de una sal de colina, según la reivindicación 1, que se **caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que comprende al menos tres picos seleccionados del grupo que consiste en 8,4, 8,8, 9,3, 13,3, 14,3, 16,7, 17,0, 18,1, 19,4, 19,6, 19,9, 20,7, 20,9, 21,4, 21,7, 22,5, 23,4, 24,1 y 25,5 °2θ, ± 0,2 °2θ, según se determina en un difractómetro usando radiación Cu-Kα.

15

4. Forma cristalina Q de una sal de colina, según la reivindicación 1, que se **caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que comprende al menos tres picos seleccionados del grupo que consiste en 5,0, 5,2, 8,4, 9,6, 9,9, 11,5, 12,6, 12,8, 13,3, 14,4, 15,8, 16,1, 16,6, 17,5, 18,0, 19,3, 20,6, 20,7, 21,5, 21,7, 22,9, 23,7, 24,8, 25,1, 25,3, 25,5, 26,3, 26,9, 27,0, 28,1, 28,8, 30,4, 31,2, 32,0, 35,7 y 37,4 °2θ, ± 0,2 °2θ, según se determina en un difractómetro usando radiación Cu-Kα.

20

5. Forma cristalina R de una sal de colina, según la reivindicación 1, que se **caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que comprende al menos tres picos seleccionados del grupo que consiste en 5,1, 5,6, 8,0, 8,2, 8,4, 9,8, 11,2, 12,7, 13,4, 14,6, 15,1, 15,7, 16,1, 16,3, 16,7, 17,1, 17,8, 18,2, 18,5, 19,1, 19,9, 20,1, 21,1, 22,6, 23,0, 23,4, 24,0, 24,5, 24,7, 25,0, 25,6, 26,0, 26,6, 26,8, 27,1, 27,4, 27,7, 28,1, 29,3, 29,7, 30,6, 31,1, 31,7, 32,2, 32,8, 33,2, 33,5, 34,5, 34,8, 35,1, 35,4, 36,5, 37,6, 38,5, 39,5, 40,4 , 41,3, 42,7 y 44,4 °2θ, ± 0,2 °2θ, según se determina en un difractómetro usando radiación Cu-Kα.

25

30. 6. Forma cristalina S de una sal de colina, según la reivindicación 1, que se **caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye al menos tres picos seleccionados entre 5,1, 8,4, 9,6, 10,0, 11,6, 12,9, 13,3, 14,4, 14,9, 15,8, 16,6, 17,4, 18,0, 19,2, 19,3, 20,6, 21,4, 21,7, 22,7, 23,7, 24,8, 25,4, 26,3, 26,8, 28,1, 28,7, 29,6, 30,3, 31,0, 31,9, 33,0, 34,0, 35,7, 37,4, 39,2, 40,5 y 41,7 °2θ, ± 0,2 °2θ, según se determina en un difractómetro usando radiación Cu-Kα,

35

7. Sal de meglumina, según la reivindicación 1.

40

8. Forma cristalina H de una sal de meglumina, según la reivindicación 7, que se **caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que comprende al menos tres picos seleccionados del grupo que consiste en 5,3, 7,1, 10,7, 10,9, 16,1, 16,5 , 17,7, 18,5, 20,3, 23,6, 24,9 y 27,2 °2θ, ± 0,2 °2θ, según se determina en un difractómetro usando radiación Cu-Kα.

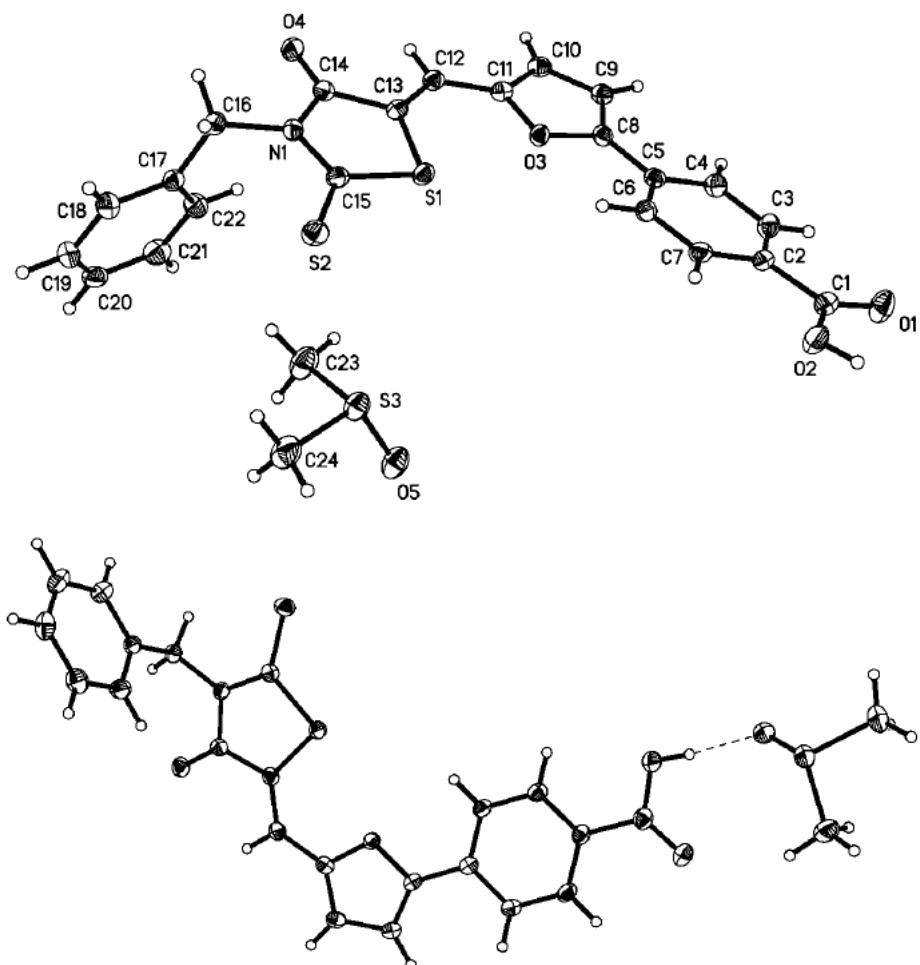
45

9. Forma cristalina L de una sal de meglumina, según la reivindicación 7, que se **caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye al menos tres picos seleccionados entre 5,3, 7,9, 8,5, 9,0, 9,9, 10,6, 10,9, 11,6, 12,0, 12,6, 13,1, 14,5, 14,8, 15,0, 15,3, 15,9, 16,2, 16,9, 17,4, 17,8, 18,0, 18,4, 18,8, 19,2, 20,2, 20,8, 21,3, 21,7, 22,1, 23,2, 23,8, 24,5, 25,2, 25,5, 26,3, 26,9, 27,3, 27,9, 28,4,

28,9, 29,2, 29,8, 30,3, 30,6, 31,1, 32,1, 32,8, 34,1, 34,5, 34,9, 35,1, 36,0, 36,5, 37,5, 38,0, 38,9, 39,6, 40,7, 41,7, 42,5, y 42,9 ° θ , \pm 0,2 ° θ , según se determina en un difractómetro usando radiación Cu-K α .

- 5 10. Forma cristalina M de una sal de meglumina, según la reivindicación 7, que se **caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye al menos tres picos seleccionados entre 6,5, 8,5, 9,0, 9,9, 10,6, 11,6, 14,4, 14,8 , 15,0, 15,3, 15,9, 16,1, 16,9, 17,8, 18,0, 19,0, 20,4, 20,8, 21,3, 21,7, 23,6, 24,5, 25,2, 26,3, 26,9, 27,5, 27,9, 28,5, 28,9, 29,8, 30,6, 32,1, 32,8, 33,8, 34,5, 36,0, 36,4, 37,1, 38,0, 39,7, 40,7, 41,7, 43,0 y 44,0 ° θ , \pm 0,2 ° θ , según se determina en un difractómetro usando radiación Cu-K α .
- 10 11. Forma cristalina N de una sal de meglumina, según la reivindicación 7, que se **caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que incluye al menos tres picos seleccionados entre 4,3, 5,0, 5,4, 6,1, 7,5, 7,9, 8,9, 9,5, 10,0, 10,8, 11,4, 12,1, 12,5, 13,8, 14,3, 14,8, 15,6, 16,1, 16,7, 17,4, 18,1, 19,2, 19,5, 20,1, 20,9, 21,4, 21,5, 22,1, 22,5, 23,9, 24,6, 25,3, 26,3, 26,7, 27,1, 27,6, 28,2, 29,0, 30,4, 30,9, 32,0, 32,9, 33,9, 34,7, 36,9, 38,3, 39,1, 39,6, 40,2 y 41,4 ° θ , \pm 0,2 ° θ , según se determina en un difractómetro usando radiación Cu-K α .
- 15 12. Forma cristalina T de una sal de meglumina, según la reivindicación 7, que se **caracteriza por** un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) que comprende al menos tres picos seleccionados del grupo que consiste en 6,9, 8,2, 8,4, 9,4, 11,6, 15,0, 15,1, 15,5, 17,2, 17,8, 18,1, 20,5, 21,3, 21,9, 22,3, 23,5, 25,0 y 26,7 ° θ , \pm 0,2 ° θ , según se determina en un difractómetro usando radiación Cu-K α .
- 20 13. Formulación farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y una sal o una forma cristalina, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12.
- 25 14. Sal o forma cristalina, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, o una formulación farmacéutica, según la reivindicación 13, para su uso en el tratamiento de un paciente que tiene una enfermedad mediada por integrina β 2, en la que la enfermedad mediada por integrina β 2 se selecciona del grupo que comprende inflamación aguda, inflamación crónica, enfermedad renal crónica, engrosamiento de la neoíntima asociado con lesión vascular, lesión tisular, peritonitis, nefropatía diabética, una enfermedad autoinmune, cáncer, glaucoma, enfermedad de injerto contra huésped, degeneración macular y uveítis.
- 30

Fig. 1



ES 2 896 674 T3

Fig. 2

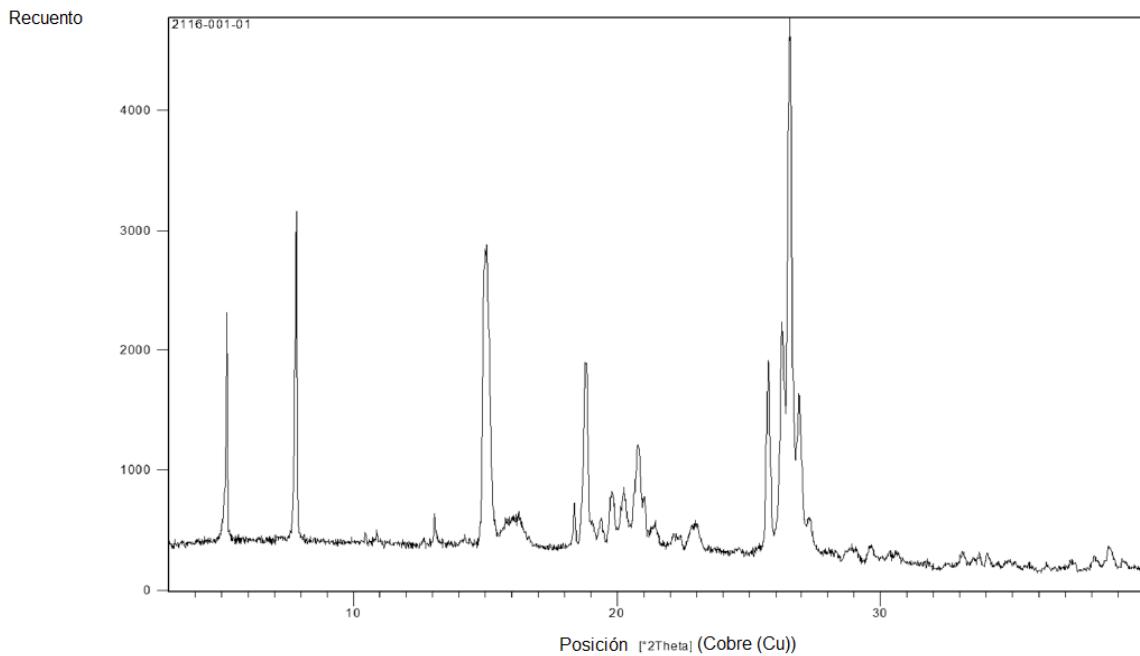
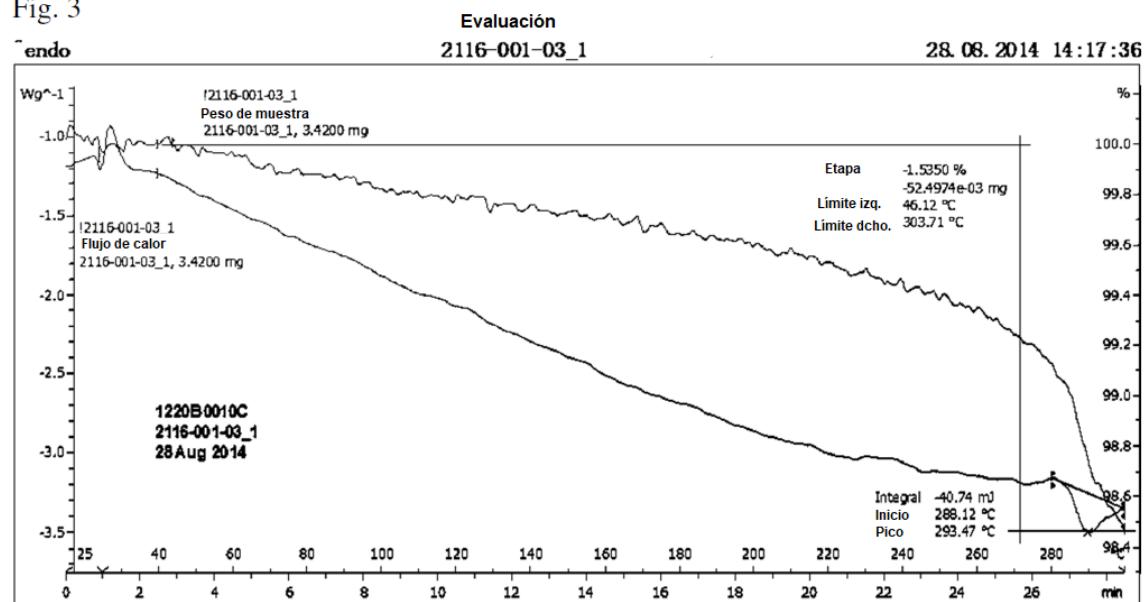


Fig. 3



ES 2 896 674 T3

Fig. 4

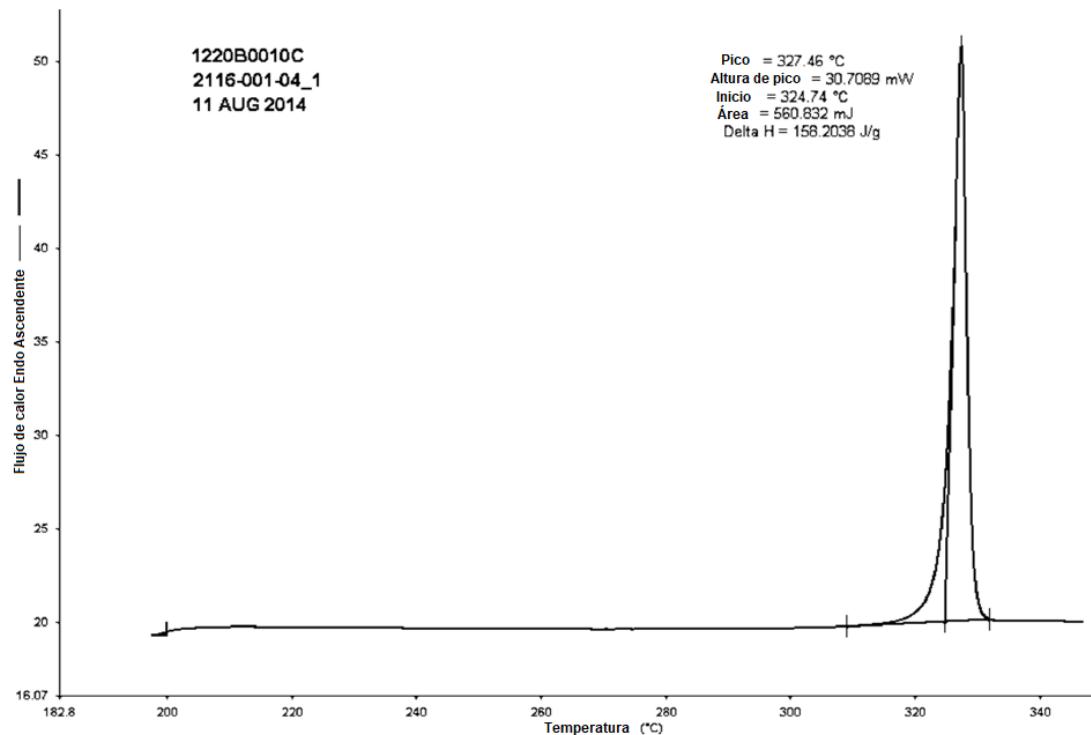
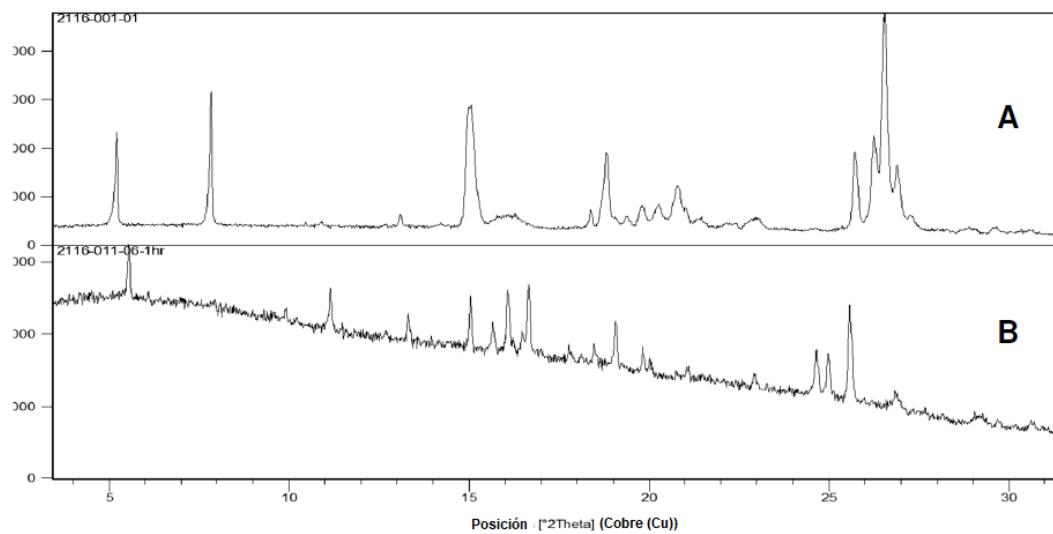


Fig. 5



ES 2 896 674 T3

Fig. 6

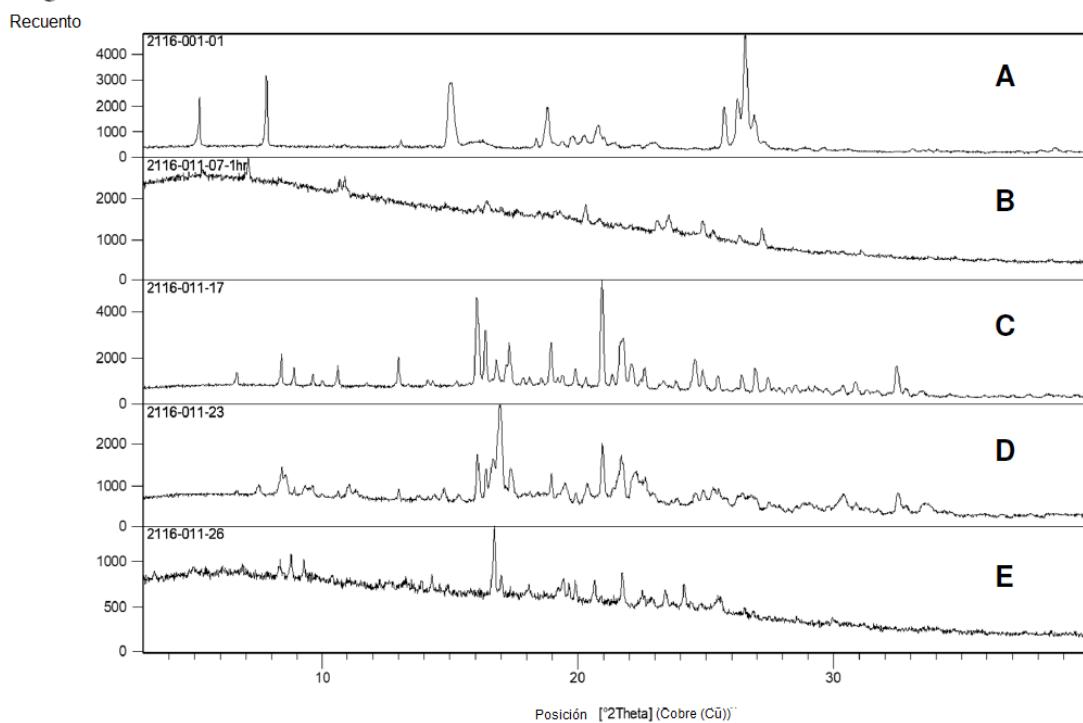


Fig. 7

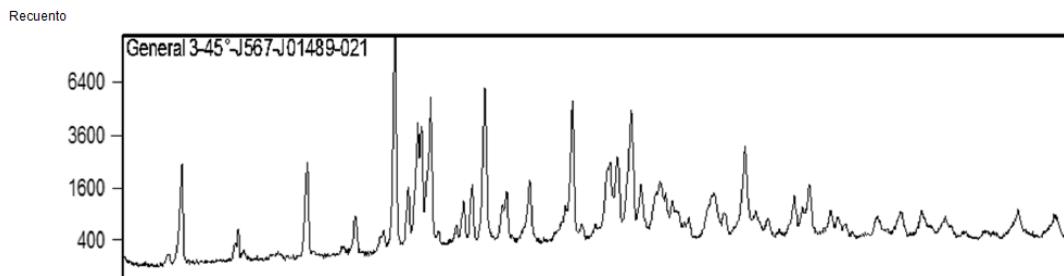
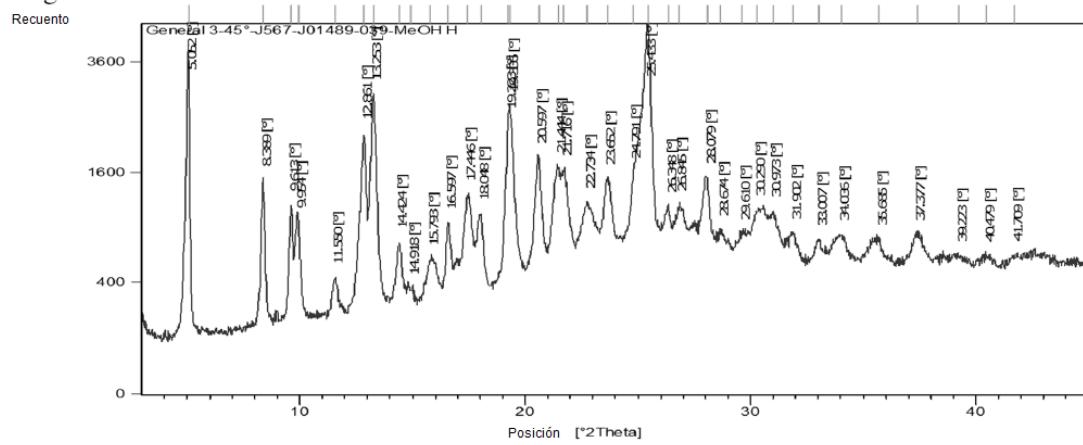


Fig. 8



ES 2 896 674 T3

Fig. 9

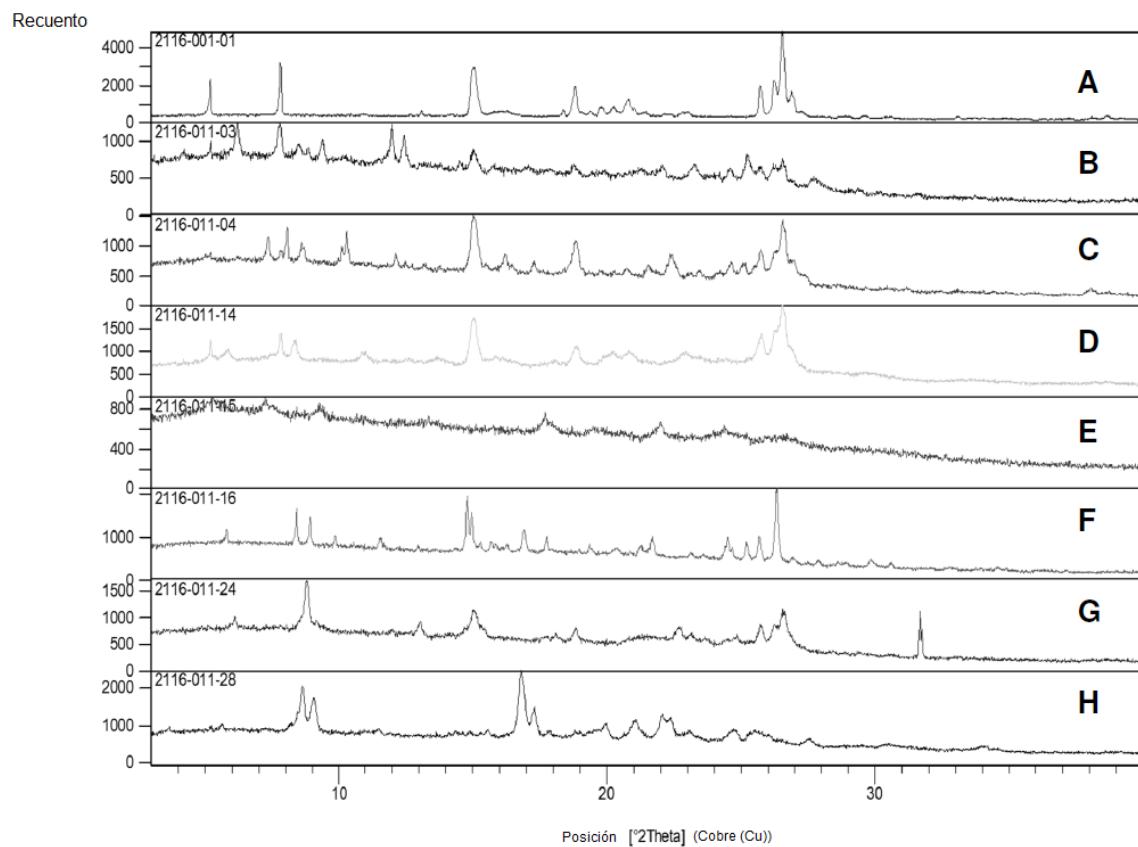
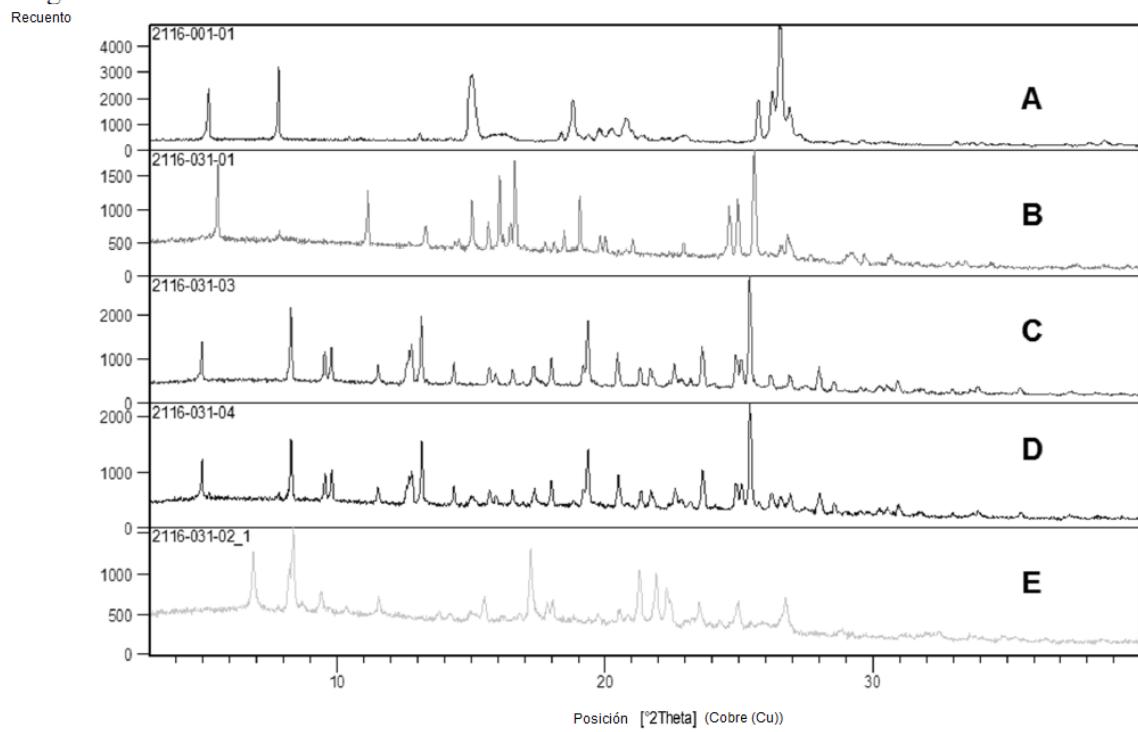


Fig. 10



ES 2 896 674 T3

Fig. 11

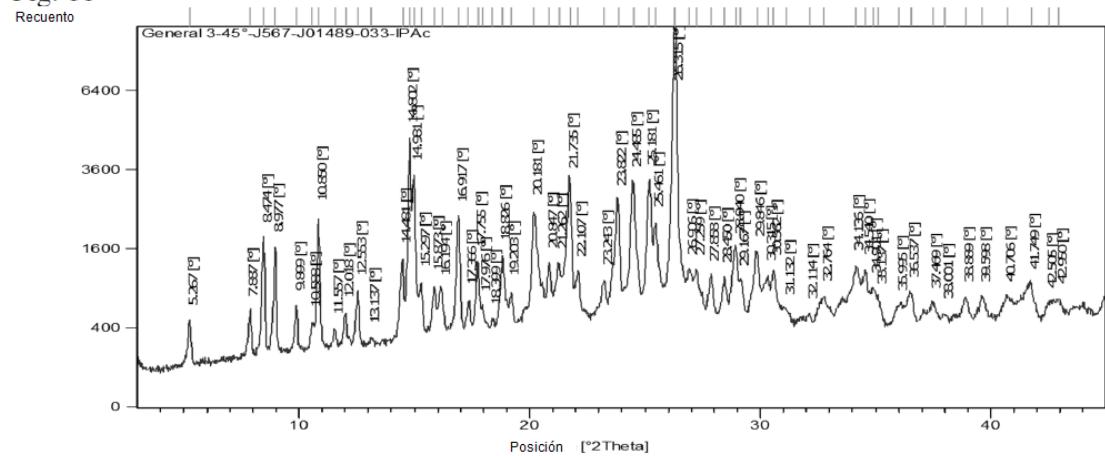


Fig. 12

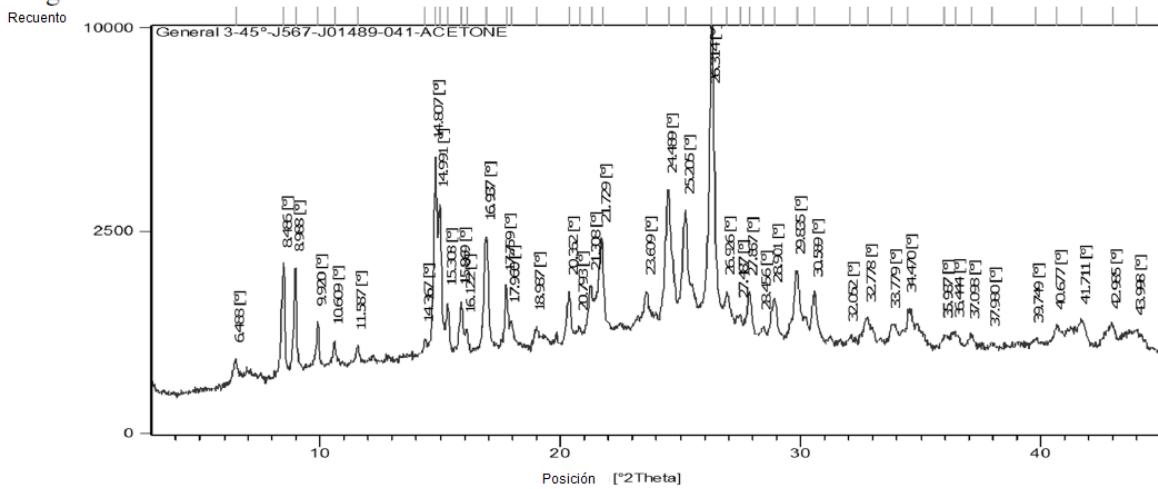


Fig. 13

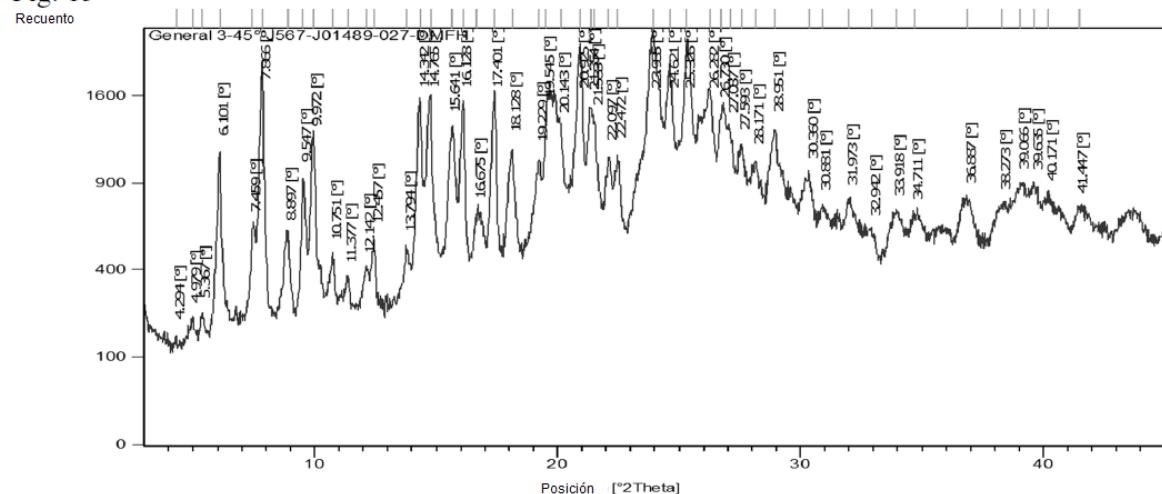


Fig. 14

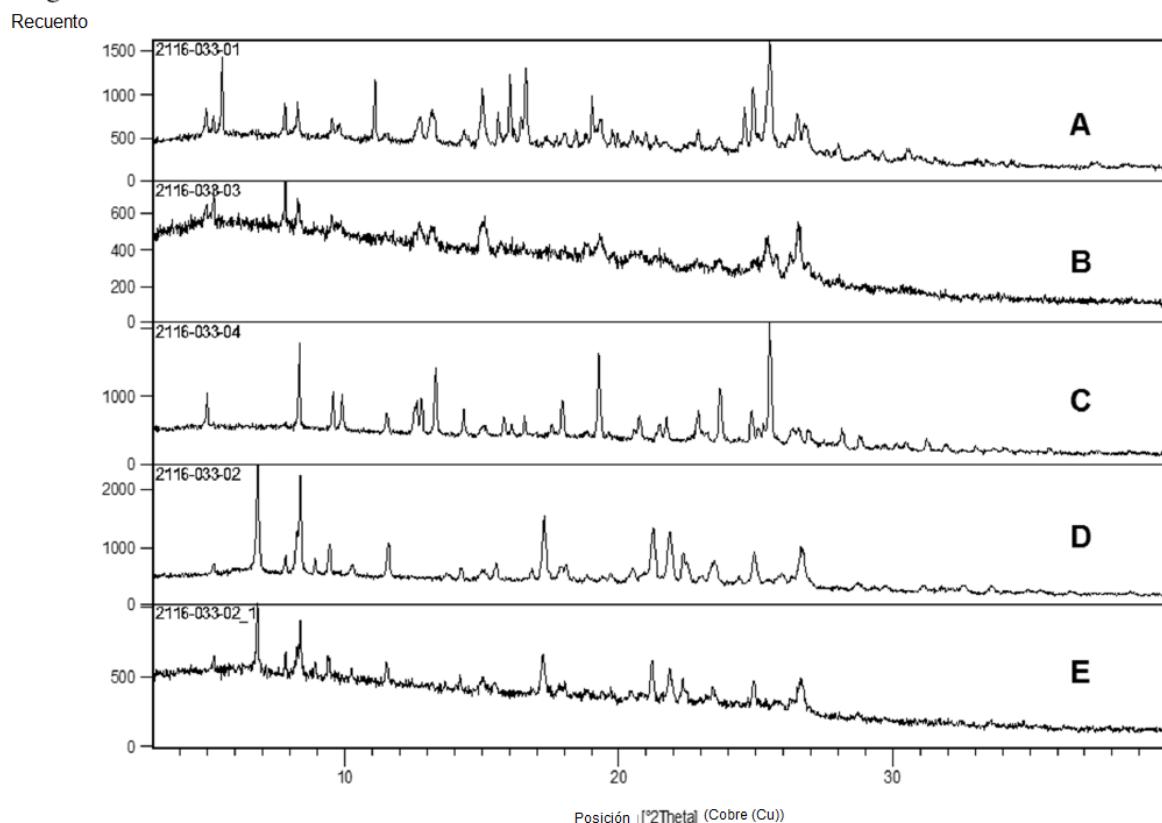
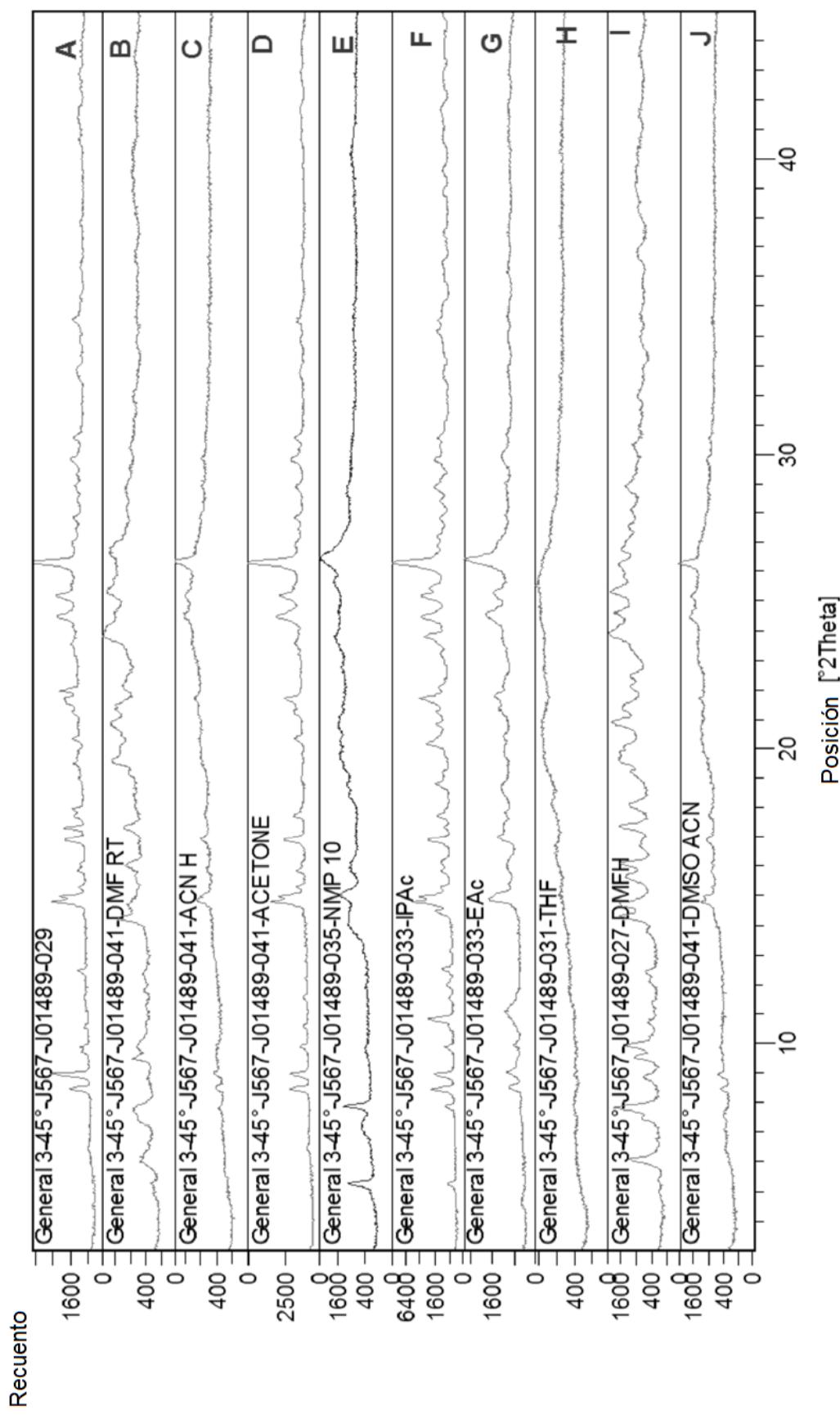


Fig. 15



ES 2 896 674 T3

Fig. 16

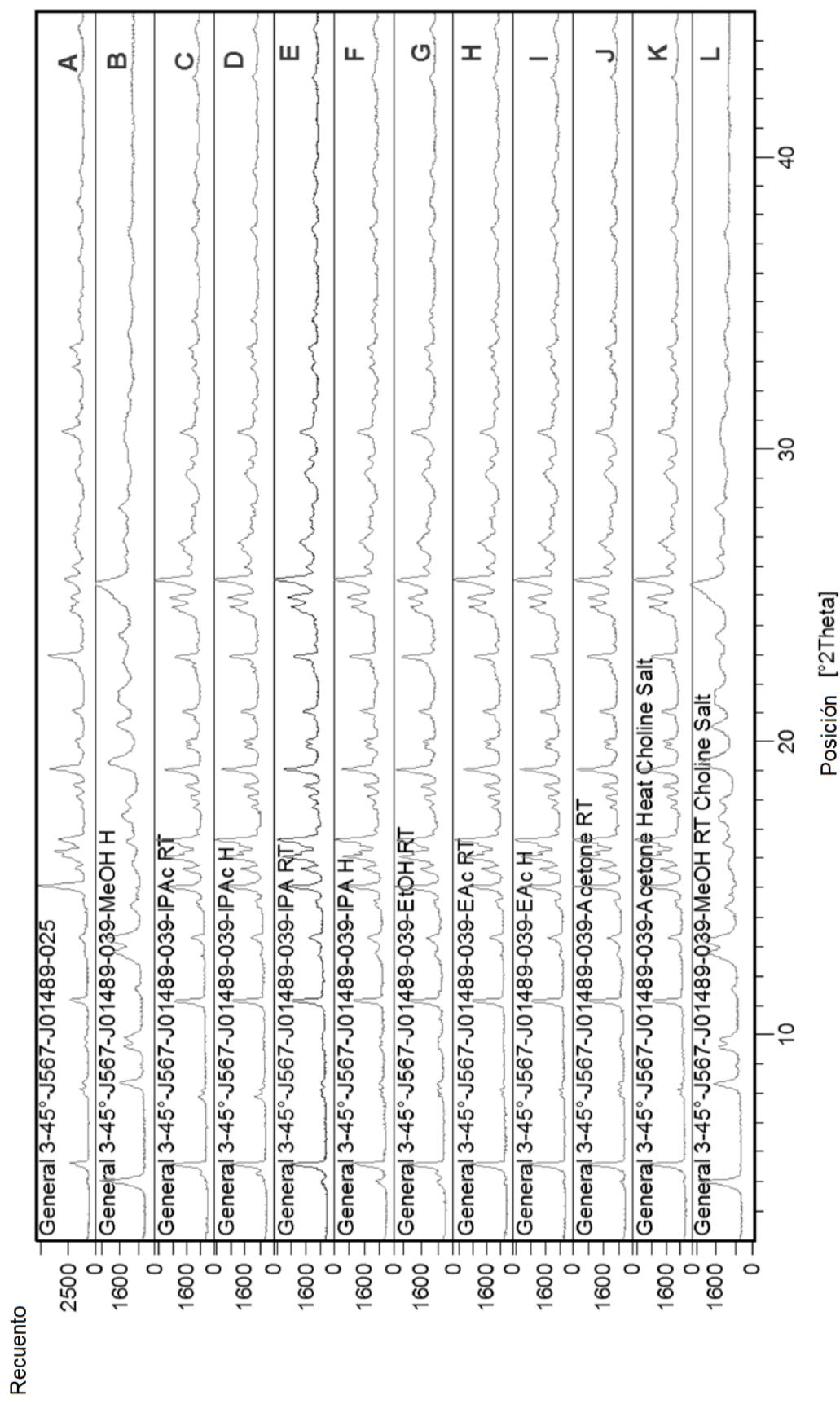


Fig. 17

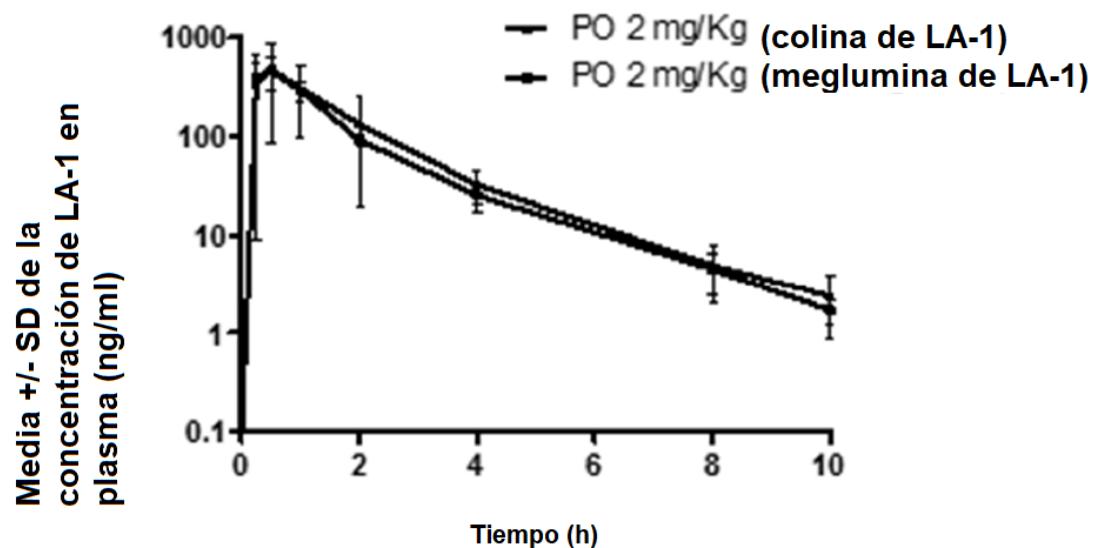


Fig. 18

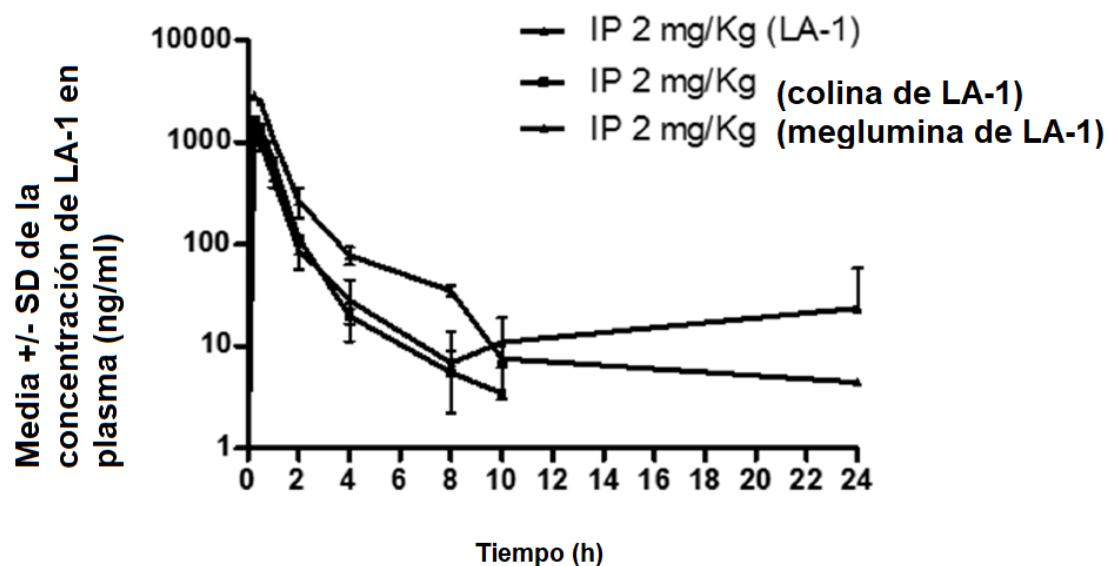


Fig. 19

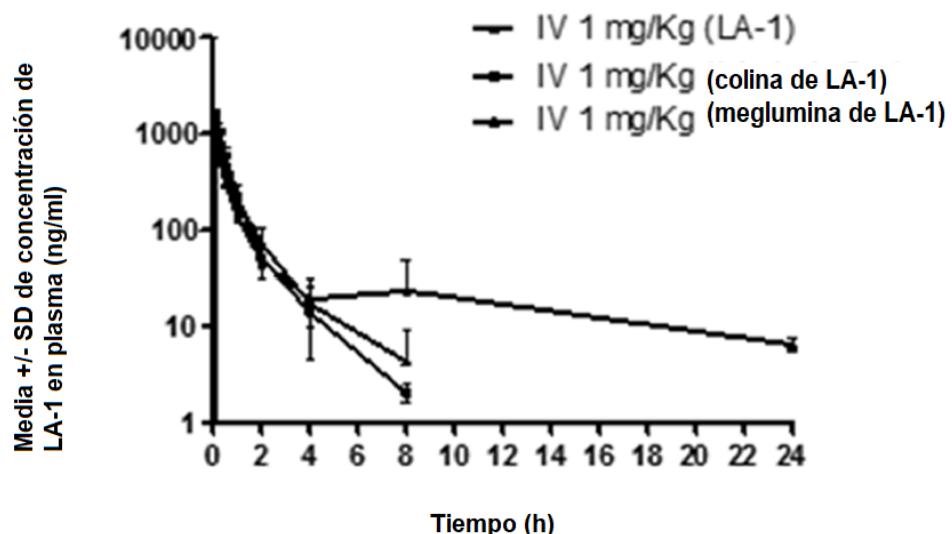


Fig. 20

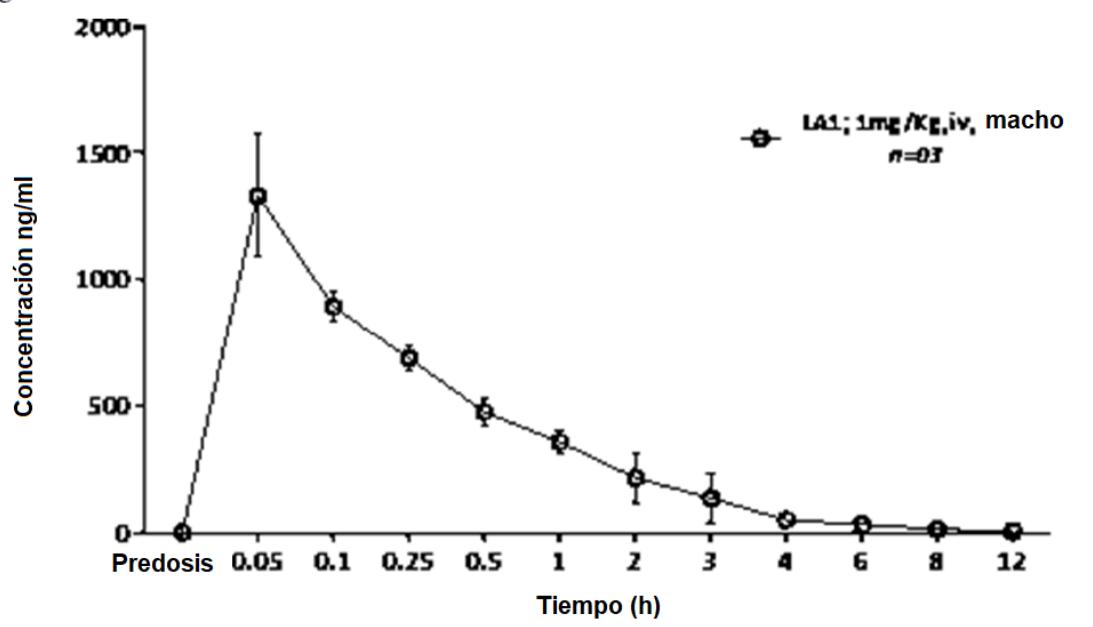


Fig. 21

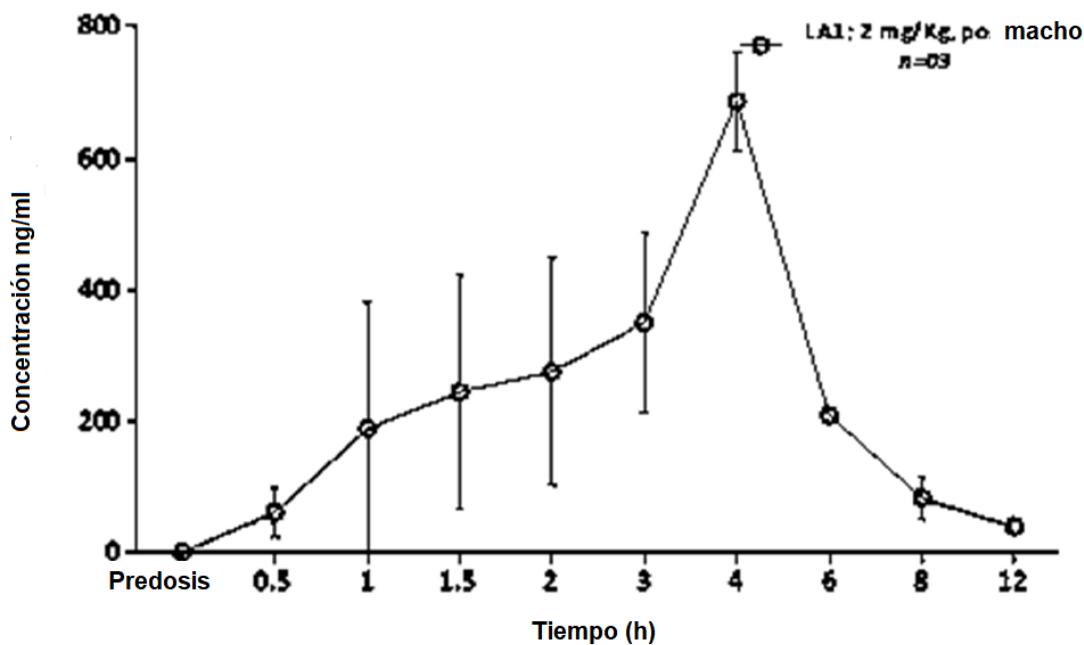


Fig. 22

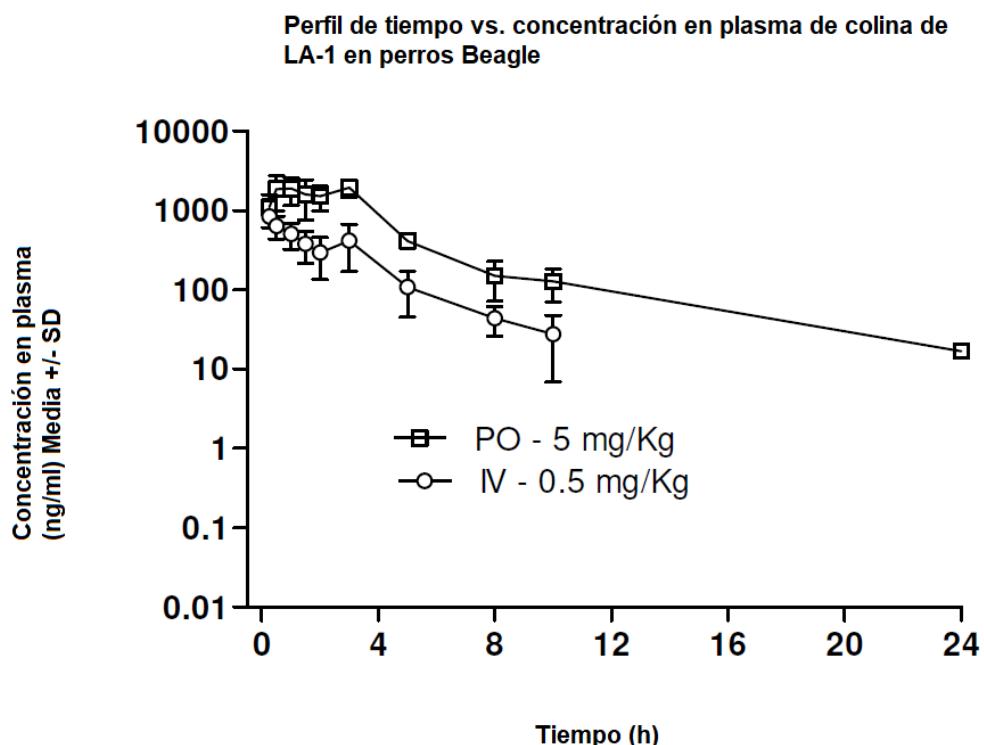


Fig. 23

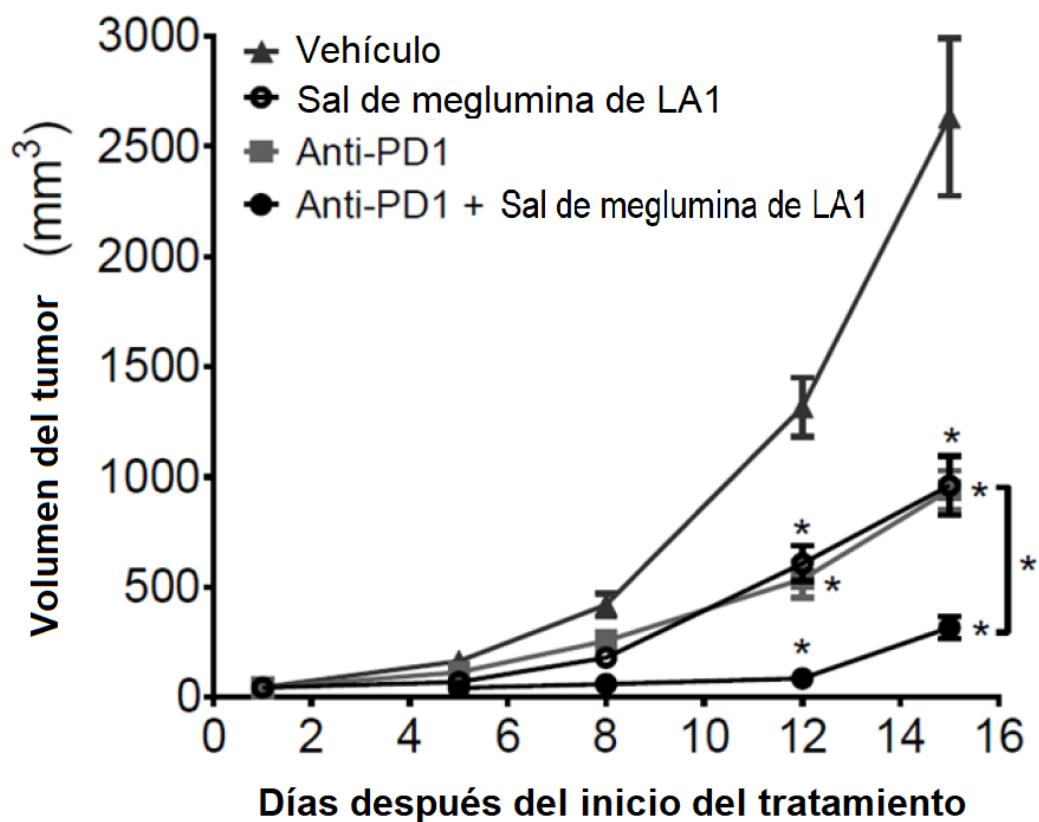


Fig. 24

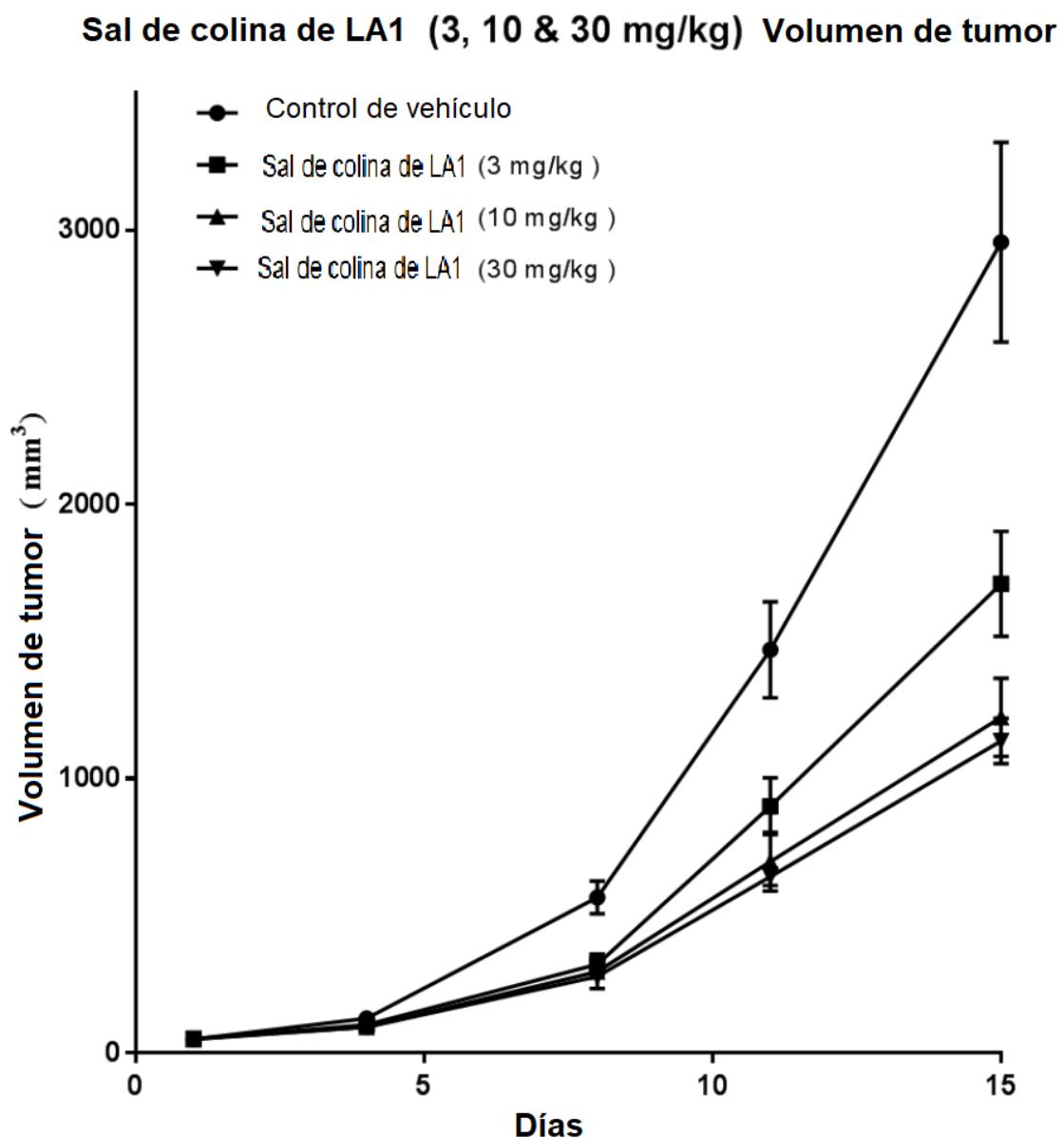


Fig. 25

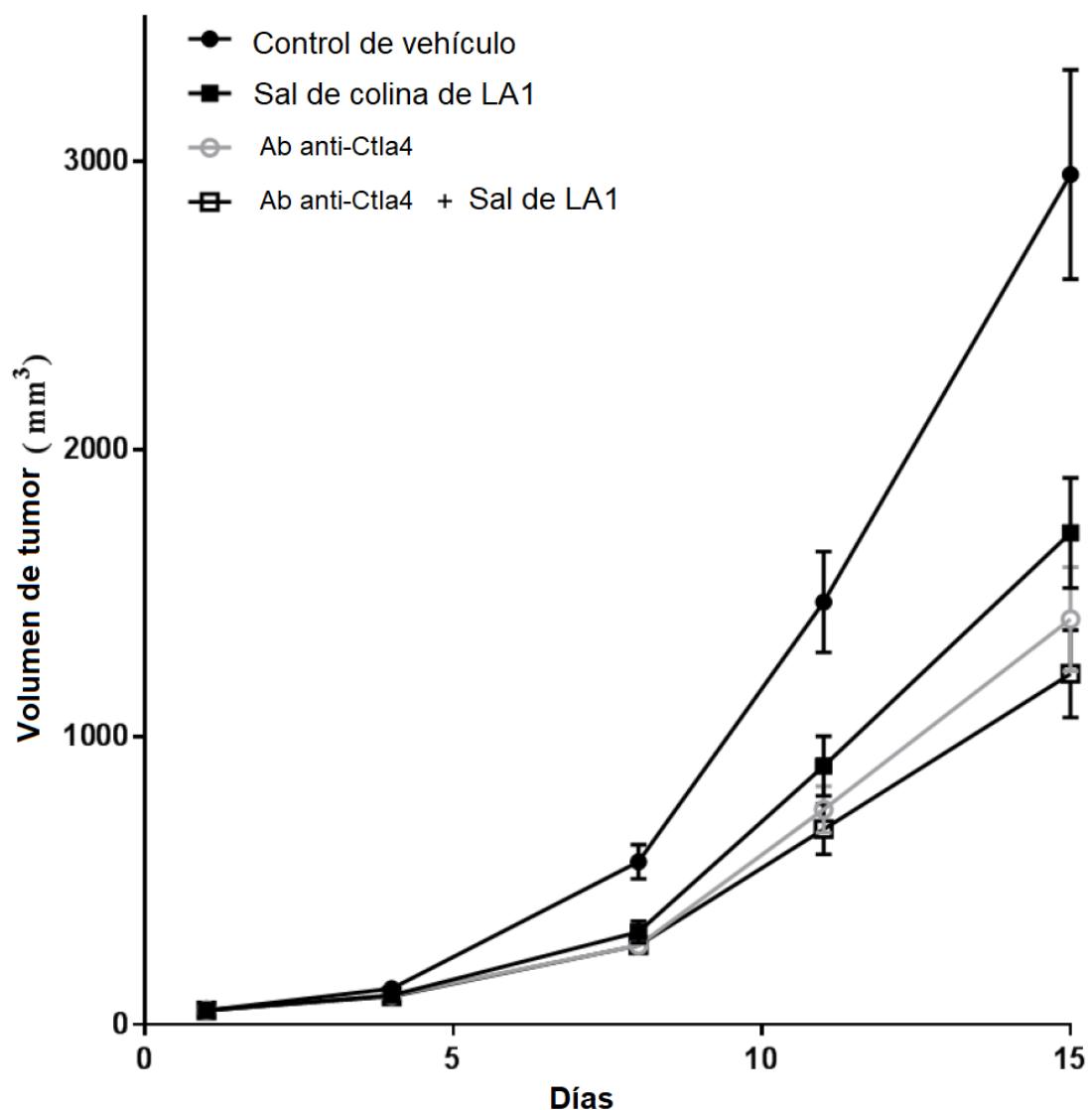
Sal de colina de LA1 + Ab anti-CTLA-4 Volumen de tumor

Fig. 26

Sal de colina de LA1 + Ab anti-PD-1 Volumen de tumor