

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 000 984**

51 Int. Cl.:

C07D 405/06 (2006.01)

A61K 31/4196 (2006.01)

A61P 31/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2020** **PCT/GB2020/053107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2021** **WO21111142**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2020** **E 20824979 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024** **EP 4069690**

54 Título: **Polimorfos del compuesto antifúngico de triazol PC945**

30 Prioridad:

06.12.2019 GB 201917867

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

04.03.2025

73 Titular/es:

PULMOCIDE LIMITED (100.00%)
Office Suite 3.01 44, Southampton Buildings
London WC2A 1AP, GB

72 Inventor/es:

WALLIS, CHRISTOPHER JOHN;
STEELE, GERALD;
BUTTAR, SUZANNE;
SULEIMAN, OSAMA;
NORTHEN, JULIAN;
MYKYTIUK, JOHN y
MARSHALL, JAMIE

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 3 000 984 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

Polimorfos del compuesto antifúngico de triazol PC945

5 Campo de la invención

La invención se refiere a manifestaciones polimórficas cristalinas de un compuesto útil en el tratamiento de micosis y a composiciones y usos de las mismas.

10 Antecedentes

La incidencia de las infecciones fúngicas ha aumentado sustancialmente a lo largo de las dos últimas décadas y las formas invasivas son las principales causas de morbilidad y mortalidad, especialmente entre pacientes inmunocomprometidos o inmunodeprimidos. La candidiasis diseminada, la aspergilosis pulmonar y los hongos oportunistas emergentes son los agentes más comunes que producen estas micosis graves. Una característica particular de los hongos es que son capaces de generar una matriz extracelular (MEC) que los une y les permite adherirse a sus sustratos *in vitro* o *in vivo*. Estas biopelículas sirven para protegerlos contra los entornos hostiles del sistema inmunitario del huésped y para resistir la actividad de los agentes antifúngicos (Kaur y Singh, 2013).

20 La aspergilosis pulmonar se puede segmentar en una afección no invasiva o invasiva. Se usa una subdivisión adicional para caracterizar la afección en pacientes que exhiben síntomas que tienen un componente alérgico a la aspergilosis (conocido como ABPA; aspergilosis broncopulmonar alérgica) en comparación con aquellos que no lo hacen. Los factores que precipitan la aspergilosis pulmonar pueden ser agudos, tales como la
25 exposición a altas dosis de medicamentos inmunosupresores o a la intubación en una unidad de cuidados intensivos. Alternativamente, pueden ser crónicos, resultantes de una infección anterior, tal como TB (Denning y col., 2011a). Las infecciones pulmonares crónicas con *Aspergillus* pueden dejar a los pacientes con daño pulmonar amplio y permanente, lo que requiere tratamiento de por vida con fármacos azólicos orales (Limper y col., 2011).

30 Un grupo de investigaciones creciente sugiere que la infección por *Aspergillus* puede desempeñar un papel importante en el asma clínico (Chishimba y col., 2012; Pasqualotto y col., 2009). Además, el trabajo publicado recientemente ha correlacionado la infección por *Aspergillus* con peores resultados clínicos en pacientes con EPOC (Bafadhel y col., 2013). De manera similar, estudios transversales similares han demostrado
35 asociaciones entre la presencia de *Aspergillus* spp. y *Candida* spp. en el esputo de pacientes y su función pulmonar empeorada (Chotirmall y col., 2010; Agbetele y col., 2012).

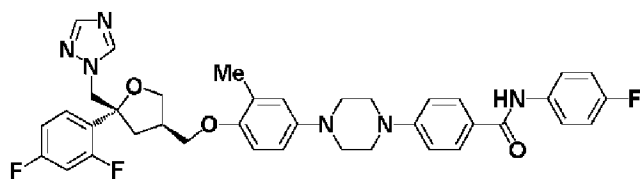
La aspergilosis invasiva (AI) presenta tasas altas de mortalidad en pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo, aquellos sometidos a trasplante alogénico de células madre o trasplantes de órganos sólidos (tales como trasplantes de pulmón). El primer caso de AI descrito en un paciente inmunocomprometido se produjo
40 en 1953. Este evento fue concurrente con la introducción de los corticosteroides y la quimioterapia citotóxica en los regímenes de tratamiento (Rankin, 1953). La aspergilosis invasiva es una preocupación importante en el tratamiento de la leucemia y otras malignidades hematológicas dada su alta incidencia y la mortalidad asociada. Las tasas de mortalidad por lo general superan el 50 % (Lin y col., 2001) y las tasas a largo plazo
45 pueden alcanzar el 90 % en receptores de trasplantes alogénicos de células madre hematopoyéticas, a pesar de la disponibilidad de medicamentos triazólicos orales (Salmeron y col., 2012). En pacientes sometidos a trasplantes de órganos sólidos, particularmente del pulmón, el uso de dosis altas de esteroides deja a los pacientes vulnerables a la infección (Thompson y Patterson, 2008). La enfermedad también se ha presentado en poblaciones de pacientes inmunocomprometidos menos gravemente. Estas incluyen aquellos que padecen
50 EPOC o cirrosis subyacente, pacientes que reciben dosis altas de esteroides e individuos provistos de catéteres venosos centrales o asistidos por ventilación mecánica (Dimopoulos y col., 2012).

Los medicamentos antifúngicos existentes se administran predominantemente oral o sistémicamente. Estas vías de administración utilizadas habitualmente son deficientes para tratar infecciones de las vías respiratorias
55 pulmonares, ya que las concentraciones de fármaco alcanzadas en el punto de infección tienden a ser inferiores a aquellas en los órganos no afectados. Esto es así especialmente para el hígado, que es un punto de toxicidad: hasta 15 % de los pacientes tratados con voriconazol padecen niveles elevados de transaminasas (Levin y col., 2007; Lat y Thompson, 2011). La exposición del hígado también da como resultado interacciones farmacológicas significativas que surgen de la inhibición de las enzimas hepáticas P450 (Jeong, y
60 col., 2009; Wexler y col., 2004).

Además, el uso generalizado de triazoles, tanto en la clínica como en la agricultura, ha conducido a una emergencia creciente y problemática de micosis resistentes en algunas ubicaciones (Denning y col., 2011b; Bowyer y Denning; 2014).

65 Los compuestos que tienen utilidad en el tratamiento de micosis se describen en WO2016/087878 A1 (Sunose

y col., 2016) y WO2016/087880 A1 (Colley y col., 2016). El Compuesto I se describe en las publicaciones de las solicitudes de patentes mencionadas anteriormente como: 4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-yl)methyl)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahydrofuran-3-yl)methoxy)-3-metilfenil)piperazin-1-yl)-N-(4-fluorofenil)benzamida:



Compuesto I

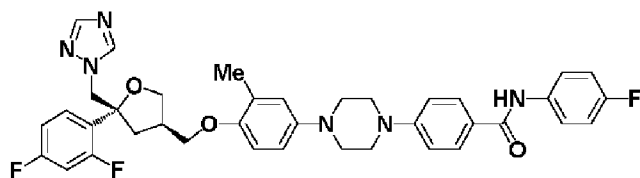
El Compuesto I es un potente inhibidor de la estero 14 α -desmetilasa de *Aspergillus fumigatus* (CYP51A y CYP51B) y se ha caracterizado como un potente agente antifúngico de acción prolongada *in vitro* e *in vivo* (Colley y col., 2017). Además, se ha revelado que el tratamiento tópico con el Compuesto I, en combinación con un agente triazólico sistémico conocido, demostró efectos antimifúngicos sinérgicos contra *Aspergillus fumigatus* en un modelo de bicapa alvéolo humano *in vitro* y en los pulmones de ratones neutropénicos e inmunocomprometidos (Colley y col., 2019). También se descubrió que el Compuesto I era un inhibidor más potente que el posaconazol, el voriconazol y el fluconazol de los aislamientos de *Candida auris* recolectados a nivel mundial (Shivaprakash y col., 2019). El análisis de biomarcadores, después de la administración intranasal del Compuesto I en ratones inmunocomprometidos, mostró que los efectos antifúngicos se acumularon tras la dosificación repetida y fueron persistentes (Kimura y col., 2017).

El polimorfismo es una consideración importante en el desarrollo de un medicamento debido a su influencia en las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas del compuesto. Esta característica surge siempre que una entidad, como una molécula pequeña, puede adoptar diferentes redes cristalinas. La variación resultante en el empaquetamiento del estado sólido puede generar diferencias en la estabilidad del almacenamiento, los perfiles de solubilidad y la densidad, afectando así la formulación y la fabricación del producto, así como las características de disolución: un factor importante para determinar la biodisponibilidad *in vivo*.

Sigue existiendo la necesidad de proporcionar formas polimórficas del Compuesto I para su uso en el tratamiento de micosis. En particular, existe el requisito de proporcionar el Compuesto I en una forma cristalina que tenga una estabilidad física y química apropiada y otras propiedades relacionadas con el fármaco pertinentes para su administración tópica al pulmón. Estas incluyen su susceptibilidad a la micronización, su formulación como suspensión acuosa fácilmente dispersable, además de una biodisponibilidad adecuada y propiedades farmacocinéticas aceptables.

Sumario de la Invención

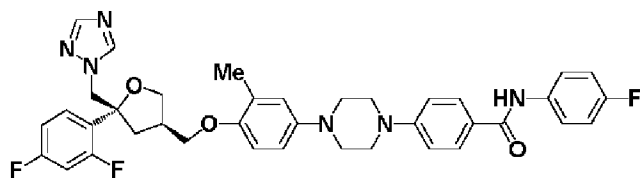
La invención proporciona un compuesto de fórmula (I):



Compuesto I

que es 4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-yl)methyl)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahydrofuran-3-yl)methoxy)-3-metilfenil)piperazin-1-yl)-N-(4-fluorofenil)benzamida en una forma cristalina donde la forma cristalina es la Forma polimórfica 1.

Además, la invención proporciona un compuesto de fórmula (I):



Compuesto I

que es 4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-yl)methyl)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahydrofuran-3-yl)methoxy)-3-

metilfenil)piperazin-1-il)-N-(4-fluorofenil)benzamida en una forma cristalina donde la forma cristalina es la Forma polimórfica 2.

El experto en la materia apreciará que, aunque arriba se muestra un tautómero específico, el compuesto puede existir en múltiples formas tautoméricas. La invención abarca todas estas formas tautoméricas.

El compuesto de fórmula (I) se denomina en este documento Compuesto I.

Como se describe en los Ejemplos, la Forma polimórfica cristalina 1 y la Forma polimórfica cristalina 2 poseen estructuras cristalinas claramente diferentes. En particular, las Formas polimórficas 1 y 2 de la invención tienen las siguientes características y propiedades que las hacen particularmente adecuadas para su uso como agentes terapéuticos. Los polimorfos muestran puntos de fusión altos [$\sim 202^\circ\text{C}$ (Forma 1) y $\sim 183^\circ\text{C}$ (Forma 2)]; son físicamente robustos (como se determina mediante análisis XRPD, TGA y DSC); tienen buenas estabildades químicas (como se determina mediante espectroscopia de RMN de ^1H y análisis de HPLC); se micronizan fácilmente a un tamaño de partícula respirable; y están biodisponibles cuando se administran como una suspensión acuosa por inhalación. Por lo tanto, se espera que el polimorfo de Forma 1 y el polimorfo de Forma 2 sean útiles en diversas aplicaciones terapéuticas como se describe en este documento.

Breve descripción de las figuras

- Figura 1: Patrón de XRPD de alta resolución de una muestra representativa de la Forma polimórfica 1.
 - Figura 2: Patrón de XRPD de alta resolución de una muestra representativa de la Forma polimórfica 2.
 - Figura 3: Alineación vertical de patrones XRPD de alta resolución de las Formas polimórficas 1 y 2.
 - Figura 4: Superposición de patrones XRPD de alta resolución de las formas polimórficas 1 y 2
 - Figura 5: Patrón de XRPD calculado para la Forma polimórfica 1.
 - Figura 6: Patrón de XRPD calculado para la Forma polimórfica 2.
 - Figura 7: Patrón de XRPD de una muestra de la técnica anterior de la Forma 3 comparado con patrones XRPD de muestras representativas de las Formas 1, 2 y 3.
 - Figura 8: Análisis térmico (DSC y TGA) del material de entrada crudo (Forma polimórfica 3).
 - Figura 9: Traza de DSC de la Forma polimórfica 1 obtenida a partir de acetona acuosa (5% H_2O).
 - Figura 10: Patrón de XRPD de la Forma polimórfica 1 obtenida a partir de acetona acuosa (5% H_2O) después de la micronización.
 - Figura 11: Traza de XRPD de la Forma polimórfica 2 obtenida a partir de THF/TBME.
 - Figura 12: Traza de DSC de la Forma polimórfica 2 obtenida a partir de THF/TBME.
 - Figura 13: Patrón de XRPD de alta resolución de la Forma polimórfica 2 obtenida a partir de THF/TBME, después de la micronización.
 - Figura 14: Estructura cristalina de la Forma polimórfica 1 vista a lo largo del eje a
 - Figura 15: Estructura cristalina de la Forma polimórfica 2 vista a lo largo del eje b
 - Figura 16: Traza de DSC de escaneo rápido de la Forma polimórfica 1 ($40^\circ\text{C}/\text{min}$).
 - Figura 17: Traza de DSC de escaneo rápido de la Forma polimórfica 2 ($40^\circ\text{C}/\text{min}$).
 - Figura 18: Análisis térmico (DSC y TGA) de la Forma polimórfica 2 obtenida a partir de MIBK.
 - Figura 19: Concentraciones plasmáticas medias del fármaco tras la administración por inhalación de la Forma polimórfica 1 a ratas macho en una dosis nominal de 2.2 mg/kg.
 - Figura 20: Concentraciones plasmáticas medias del fármaco tras la administración por inhalación de la Forma polimórfica 2 a ratas macho en una dosis nominal de 2.2 mg/kg.
- Descripción detallada de la invención

Un patrón de difracción de rayos X en polvo (XRPD) consiste en un gráfico de la intensidad del haz difractado frente a 2θ , el ángulo de difracción. Las posiciones del pico 2θ de un patrón de difracción de rayos X en polvo se relacionan directamente con la celda unitaria de la fase cristalina, lo que da como resultado un patrón que es único para cada forma polimórfica. Por lo tanto, un patrón XRPD es característico de cada polimorfo y puede utilizarse para distinguir un polimorfo de otro. Los patrones de difracción de rayos X en polvo se obtuvieron directamente de muestras de las Formas polimórficas 1 y 2, preparadas como se describe en este documento (Figs. 1 y 2). De la comparación visual de los dos patrones (Figs. 3 y 4) queda claramente claro que las Formas 1 y 2 del Compuesto I representan dos estados cristalinos distintos.

Las reflexiones en 2θ se consideran únicas (y por lo tanto características de la forma cristalina) siempre que no se observe ninguna reflexión dentro de $\pm 0.2^\circ$ 2θ cuando se comparan dos (o más) patrones de difracción. Las formas polimórficas 1 y 2 exhiben una serie de reflexiones únicas (Tabla 1).

Tabla 1: Reflexiones de XRPD únicas de las formas polimórficas 1 y 2.

Reflexiones en 2θ	
Forma 1	Forma 2
7.0	10.8
7.4	17.0
7.9	20.3
18.2	22.7
19.7	23.9
20.8	24.3
24.7	

La elucidación de las estructuras de las Formas polimórficas 1 y 2, utilizando cristalografía de rayos X con fuente de luz de sincrotrón, permitió calcular los patrones de XRPD de las Formas polimórficas 1 y 2 a partir de valores de difracción experimentales obtenidos del conjunto de datos de cristal único. Para ambos polimorfos se observa una correlación muy estrecha entre los datos experimentales (Figs. 1 y 2) y los patrones calculados (Figs. 5 y 6).

De este modo, se proporciona la forma cristalina del Compuesto I en la Forma polimórfica 1 que tiene el patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente como se muestra en la Fig. 1.

Adecuadamente, se proporciona la forma cristalina del Compuesto I en la Forma polimórfica 1 en donde dicha forma cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que contiene tres, cuatro, cinco, seis o siete picos seleccionados entre (± 0.2) 7.0, 7.4, 7.9, 18.2, 19.7, 20.8 y 24.7 grados 2θ .

Los picos del patrón de XRPD adicionales para la Forma polimórfica 1 se muestran en la Tabla 3. De este modo, se proporciona adecuadamente la forma cristalina del Compuesto I en la Forma polimórfica 1 en donde dicha forma cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que contiene los siguientes siete picos: (± 0.2) 7.0, 7.4, 7.9, 18.2, 19.7, 20.8 y 24.7 grados 2θ , y uno, dos, tres, cuatro o cinco picos seleccionados entre (± 0.2) 10.2, 16.7, 17.9, 23.3 y 24.2 grados 2θ .

Adecuadamente, se proporciona la forma cristalina del Compuesto I en la Forma polimórfica 1 en donde dicha forma cristalina tiene dimensiones de celda unitaria de 16.80 Å, 23.58 Å y 25.58 Å, y ángulos α , β y γ de 90° .

De este modo, se proporciona la forma cristalina del Compuesto I en la Forma 2 polimórfica que tiene el patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente como se muestra en la Fig. 2.

También se proporciona la forma cristalina del Compuesto I en la Forma polimórfica 2 en donde dicha forma cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que contiene tres, cuatro, cinco o seis picos seleccionados entre (± 0.2) 10.8, 17.0, 20.3, 22.7, 23.9 y 24.3 grados 2θ .

Los picos del patrón de XRPD adicionales para la Forma polimórfica 2 se muestran en la Tabla 3. De este modo, se proporciona adecuadamente la forma cristalina del Compuesto I en la Forma polimórfica 2 en donde dicha forma cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo que contiene los siguientes seis picos: (± 0.2) 10.8, 17.0, 20.3, 22.7, 23.9 y 24.3 grados 2θ , y uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis picos seleccionados entre (± 0.2) 16.6, 19.5, 20.3, 22.0, 26.6 y 26.9 grados 2θ .

Adecuadamente, se proporciona la forma cristalina del Compuesto I en la Forma polimórfica 2 en donde dicha forma cristalina tiene dimensiones de celda unitaria de 16.81 Å, 5.65 Å y 35.56 Å, y un ángulo α de 90° , un ángulo β de 101.54° y un ángulo γ de 90° .

Forma 3 (técnica anterior) Polimorfo

El Compuesto I se describe en la técnica anterior en las publicaciones de solicitud de patente WO2016/087878 A1 y WO2016/087880 A1. En estas solicitudes, el Compuesto I, preparado como se describe en ellas, se aisló mediante uno de los métodos que comprenden: (a) la adición de agua a una mezcla de reacción que comprende el Compuesto I en piridina para obtener el Compuesto I crudo y sólido, seguido de purificación por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con 0 a 3 % de MeOH en DCM; (b) la adición de agua a una mezcla de reacción enfriada que comprende el Compuesto I en DMF seguido de un enfriamiento adicional de la mezcla de reacción y recolección por filtración para obtener el Compuesto I sólido, seguido de la suspensión de la torta de filtrado en agua y la recolección de los sólidos por filtración o; (c) la adición de agua a una mezcla de reacción que comprende el Compuesto I en DMSO, seguida de la extracción del Compuesto I con EtOAc, evaporación de los compuestos volátiles *al vacío* y purificación del residuo por cromatografía en columna ultrarrápida, eluyendo con 0 a 2 % de MeOH en DCM y repurificación por cromatografía en columna ultrarrápida eluyendo con 0 a 50 % de EtOAc en DCM.

Para los fines de la presente divulgación, el Compuesto I como se divulgó previamente, resultante de las rutas sintéticas descritas en la misma, es una manifestación poco cristalina del Compuesto I al que se hace referencia en el presente documento como Forma 3. Una característica común de estas rutas es que la Forma 3 polimórfica resulta de la producción rápida del Compuesto I, ya sea por la adición de agua a una solución del Compuesto I en un disolvente orgánico miscible (tal como DMF o DMSO) o por evaporación de una mezcla de disolventes después de la purificación por cromatografía. Como se describe a continuación, el agua es un poderoso antidisolvente para el Compuesto I, lo que conduce a su rápida deposición, en estos casos, en un estado casi amorfo. El mismo principio se aplica a las muestras obtenidas de la cromatografía, donde la rápida evaporación del eluyente que contiene el Compuesto I da lugar a la Forma polimórfica 3, en lugar de una forma cristalina más ordenada como la Forma 1 o la Forma 2.

Sin limitarse a la teoría, los datos experimentales enseñan que la precipitación del Compuesto I por evaporación rápida de una solución en un disolvente volátil (tal como DCM) conduce a un estado sólido desordenado. Lo mismo se aplica a la precipitación (casi instantánea) del Compuesto I mediante la adición de un antidisolvente; por ejemplo, apagando una solución del Compuesto I en un disolvente orgánico miscible con agua. Ambos procesos, previamente descritos, no permiten el tiempo suficiente para que el compuesto de fórmula I alcance los estados cristalinos altamente ordenados y termodinámicamente más estables ejemplificados por las Formas polimórficas 1 y 2, descritas en este documento.

Se preparó una muestra representativa de la Forma 3 mediante el siguiente procedimiento. A una suspensión de ácido 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahydrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)benzoico (2.50 g, 4.24 mmol), EDCI (1.63 g, 8.48 mmol) y DMAP (0.03 g, 0.21 mmol) en piridina (30 ml) se añadió 4-fluoroanilina (0.41 ml, 4.32 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 h, después se enfrió a TA, se diluyó con agua (60 ml) y se agitó durante 5 min. El sólido resultante se recolectó mediante filtración, se lavó con agua (3 x 10 ml) y con dietil éter (2 x 15 ml) para proporcionar un polvo de color tostado. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (SiO₂, 40 g, 0 a 3 % de MeOH en DCM, elución por gradiente). El sólido amarillo resultante (2.37 g) se suspendió en DMSO (6.50 ml) y la mezcla se calentó a 60 °C hasta que se completó la disolución. La solución se enfrió a TA y a la solución agitada se le añadió agua (20 ml), lo que dio como resultado la precipitación de un sólido blanco. El sólido se recogió por filtración, se lavó con agua (3 x 10 ml) y con éter dietílico (3 x 5 ml) y después se secó al vacío a 50 °C durante 3 días para obtener el Compuesto I como un sólido blanquecino (2.25 g, 77 %).

La Fig. 7 muestra el patrón de XRPD del Compuesto I como Forma polimórfica 3 preparada como se describió anteriormente ("Muestra de la Técnica Anterior"), comparada con una muestra de Forma 3 típica de los lotes utilizados en los estudios actuales ("Forma 3 Referencia") y comparada con patrones de XRPD obtenidos a partir de los polimorfos de Forma 1 y Forma 2. Las trazas de XRPD del material de Forma 3 revelan que es poco cristalino y, en consecuencia, no se consideró una entidad fácilmente desarrollable. Como resultado, no se han obtenido datos comparativos de biodisponibilidad para esta forma polimórfica (véase Ejemplos).

Propiedades de la Forma polimórfica 1 y la Forma 2

Estabilidad termodinámica de las Formas polimórficas 1 y 2 a distintas temperaturas

Se ha determinado que los estados cristalinos, denominados en este documento Forma 1 y Forma 2, constituyen un par polimórfico enantiotrópico. Esta propiedad surge de una dependencia de la temperatura de sus estabildades termodinámicas relativas, por la cual uno de los polimorfos es la manifestación termodinámicamente más estable del material hasta una temperatura característica (determinada empíricamente); por encima de la cual su orden de estabilidad se invierte. En el presente caso, se maduraron suspensiones que comprendían cantidades iguales de los dos polimorfos, en uno de seis disolventes diferentes, a 50 °C, 70 °C y 135 °C (Tabla 6). En todos los experimentos realizados a 50 °C y 70 °C, las mezclas 1:1 se convirtieron en suspensiones que contenían solo el polimorfo de Forma 2. Por el contrario, todas las

mezclas mantenidas a una temperatura de 135 °C se transformaron en la Forma 1. Estos datos apoyan el postulado de que la relación termodinámica entre las Formas 1 y 2 es enantiotrópica y que la temperatura a la que se invierte la estabilidad (el punto de transición enantiotrópico) está en el rango de temperatura de 70 a 135 °C.

5

Se investigó la predisposición de la Forma 1 o la Forma 2 a generarse, a partir de diferentes entornos de acondicionamiento, a temperaturas por debajo del punto de transición enantiotrópico utilizando experimentos de siembra cruzada (véanse las Tablas 8 a 13 en este documento). En los sistemas de disolvente orgánico único, descritos en la Tabla 8, las mezclas que comprenden cantidades iguales de Forma 1 y Forma 2 se transformaron para dar suspensiones que comprenden únicamente el polimorfo de Forma 2. La excepción fue la mezcla binaria de IPA dopada con 5 % de agua, que siguió siendo una mezcla polimórfica. (Tabla 8, entradas 10-12). Es posible interpretar este resultado de dos maneras diferentes. Lo primero es concluir que en IPA acuoso la solubilidad del Compuesto I, en cualquiera de sus formas, es demasiado baja para que se produzca la interconversión polimórfica y que, por lo tanto, los factores cinéticos han determinado el resultado. Un segundo postulado es que la presencia de agua ejerce una influencia en la mezcla polimórfica, a favor de la Forma 1, a pesar de que sigue siendo el polimorfo metaestable en el rango de temperatura del experimento.

10

15

Esta hipótesis se investigó en una serie de experimentos de suspensión y siembra cruzada (Tablas 9 a 13) durante los cuales se determinó que la presencia de agua, en niveles bajos, actúa como un codisolvente que favorece el predominio del polimorfo de Forma 1. Esta característica se observó cuando el polimorfo de Forma 2 se suspendió en acetona y agua sola y en mezclas de los mismos (Tabla 9); en THF y THF acuoso (Tabla 10); en mezclas de dioxano/agua (Tabla 11) y en MEK que contenía proporciones crecientes de agua (Tabla 12).

20

De los datos era evidente que es la presencia de agua, añadida a estos disolventes, la que induce la transición polimórfica. Sin embargo, excepto en niveles bajos, el agua también es un potente antidisolvente y deprime notablemente la solubilidad de ambos polimorfos. La consecuencia de este perfil de solubilidad es que, en agua sola o en mezclas de disolventes ricas en agua, el proceso de transformación de la Forma 2 a la Forma 1 no ocurre o es inhibido por la solubilidad marginal (Tabla 11, Entradas 3, 6 y 8).

25

30

Se observó que la interconversión polimórfica se producía más fácilmente con el calentamiento (Tablas 9, 10 y 12) como se esperaba a partir de la dependencia de la tasa de transformación con la temperatura (según la ecuación de Arrhenius) y presumiblemente se incrementó mediante un aumento en la solubilidad de los sólidos suspendidos. Se descubrió que el destino de los polimorfos cuando se equilibran en MEK o THF enfriados depende no solo de la presencia o ausencia de agua en el sistema, sino que también está influenciado por su composición polimórfica inicial (Tabla 13). Las mezclas de los dos polimorfos se convirtieron en suspensiones de la Forma 2 en medios nominalmente secos, como se esperaba, mientras que los polimorfos individuales no cambiaron. Por el contrario, la presencia de agua nuevamente favoreció el estado de Forma 1 y hubo evidencia adicional de que la presencia inicial de este polimorfo en la mezcla inicial (actuando como semilla) promovió la interconversión.

35

40

Los datos de los experimentos de suspensión y siembra cruzada descritos en este documento revelan que la prevalencia de las Formas polimórficas 1 y 2 en la exposición a sistemas de disolventes está influenciada por la elección del disolvente orgánico, su contenido de agua, la temperatura de la suspensión, el tiempo de contacto y la pureza (es decir, su composición polimórfica). Sin embargo, los estudios descritos en este documento proporcionan una comprensión de estos parámetros que permiten su manipulación para generar y conservar la integridad física de la Forma 1 o la Forma 2, según se desee. Además, se determinó que, si bien el estado cristalino de Forma 1 es el preferido en medios orgánicos acuosos, aquellos en los que el agua es el componente principal son esencialmente inertes a la interconversión polimórfica.

45

50

El comportamiento de estos sistemas y la enseñanza que proporciona son importantes para diseñar formulaciones adecuadas mediante las cuales se pueda administrar el Compuesto I a los pacientes.

Los polimorfos de Forma 1 y 2 pueden micronizarse fácilmente. Esto significa que son adecuados para su uso en formulaciones destinadas a su administración al tracto respiratorio (por ejemplo, el pulmón).

55

Los estudios descritos en este documento indican sorprendentemente que el polimorfo de Forma 2, en particular, es una manifestación cristalina adecuada del Compuesto I para su formulación como una suspensión acuosa a pesar de la evidencia de que esta forma es metaestable en dichos entornos a temperaturas ambiente. Los datos obtenidos de los estudios descritos en este documento revelan que, en medios que comprenden una alta proporción de agua, la solubilidad extremadamente baja del Compuesto I en agua proporciona una barrera cinética eficaz contra la pérdida de integridad polimórfica. Las propiedades fisicoquímicas del Compuesto I (alto peso molecular y lipofiliidad) garantizan que las dos formas cristalinas principales no se interconviertan fácilmente en tales condiciones y, en consecuencia, conservan su composición polimórfica inicial. Como se demuestra en otra parte de este documento, el polimorfo de Forma 2 exhibe inesperada y ventajosamente una biodisponibilidad superior a la del polimorfo de Forma 1 cuando se formula como una suspensión acuosa y se

60

65

administra por inhalación. En consecuencia, el polimorfo de Forma 2 es una presentación preferida del Compuesto I para su uso como agente terapéutico inhalado en suspensiones acuosas nebulizadas.

- 5 Las propiedades de estabilidad polimórfica junto con la menor biodisponibilidad sistémica de la Forma 1, cuando se administra por inhalación, favorecen indicaciones y presentaciones alternativas para este polimorfo, que se analizan a continuación.

Métodos de síntesis generales

10 Solvatos

En un aspecto, se proporciona el Compuesto I en forma solvatada. Los solvatos adecuados se obtienen cuando el Compuesto I se madura en varios disolventes aromáticos, como anisol, acetofenona, alcohol bencílico, clorobenceno y cumeno. Alternativamente, se obtiene un solvato adecuado cuando el Compuesto I se madura en THF. Adecuadamente, el solvato del Compuesto I así obtenido contiene alrededor de 13-14 % en peso de disolvente cuando se analiza por TGA. Adecuadamente, la relación entre el Compuesto I y el disolvente es aproximadamente estequiométrica (1:1).

- 15 Se encontró que los solvatos del Compuesto I identificados se desolvataban térmicamente para producir el polimorfo cristalino de Forma 1. El solvato de anisol, por ejemplo, exhibió dos endotermas agudas bajo el análisis DSC. El primero, que se produjo a 112 a 114 °C, coincidió con una reducción de peso del 13.4 %, según se determinó a partir del perfil TGA, correspondiente a poco menos de un equivalente de disolvente y de acuerdo con los datos de RMN de ¹H. La segunda endoterma, que alcanzó su punto máximo a 202 °C, correspondió al punto de fusión de la Forma 1.

- 20 Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona un proceso para preparar el Compuesto I como la Forma polimórfica cristalina 1 que comprende calentar el Compuesto I en forma solvatada, por ejemplo, el solvato formado con anisol, acetofenona, alcohol bencílico, clorobenceno o cumeno, para eliminar el disolvente y producir de ese modo el Compuesto I como la Forma polimórfica cristalina 1. Adecuadamente, el Compuesto I en forma solvatada es un intermedio en la síntesis de la Forma polimórfica 1.

Polimorfo de Forma 1

- 35 En una realización, se proporciona un proceso para la preparación del Compuesto I como Forma polimórfica 1 que comprende el paso de cristalizar el Compuesto I como Forma polimórfica 1 a partir de una solución del Compuesto I en un disolvente, en donde el disolvente se selecciona del grupo que consiste en tolueno, 2-metoxietanol, IPA acuoso (por ejemplo, que contiene 3 a 6 % de H₂O v/v, tal como 5 % de H₂O v/v) y acetona acuosa (por ejemplo, que contiene 5 a 10 % de H₂O v/v).

- 40 Adecuadamente, el disolvente es acetona acuosa (que contiene 5% de H₂O v/v).

Polimorfo de Forma 2

- 45 En una realización, se proporciona un proceso para la preparación del Compuesto I como Forma polimórfica 2 que comprende la etapa de cristalizar el Compuesto I como Forma polimórfica 2 a partir de una solución del Compuesto I en un disolvente orgánico nominalmente seco, en donde el disolvente se selecciona del grupo que consiste en MIBK, THF, PrOAc, EtOH, DME, MeOH, MeCN, MeNO₂, n-heptano, Et₂O, IPA, MEK, acetona, TBME, i-BuOH o una mezcla de THF y TBME. Adecuadamente, el proceso comprende el paso de cristalizar el Compuesto I como Forma polimórfica 2 a partir de una solución del Compuesto I en una mezcla de disolventes orgánicos nominalmente secos, en donde la mezcla de disolventes comprende dos o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en MIBK, THF, PrOAc, EtOH, DME, MeOH, MeCN, MeNO₂, n-heptano, Et₂O, IPA, MEK, acetona, TBME e i-BuOH.

- 50 Para los fines de la presente invención, "nominalmente seco" significa que no se ha añadido agua al disolvente. Dependiendo de la hidrofiliidad del disolvente seleccionado, puede haber trazas de agua, aunque las condiciones experimentales están diseñadas para excluirla.

- 55 Adecuadamente el disolvente es MIBK. Alternativamente, el sistema disolvente es una mezcla de THF y tolueno, en donde adecuadamente la mezcla comprende entre 2:1 y 1:2 de THF:tolueno (tal como 10:5 v/v; 9:5 v/v; 8:4 v/v; 8:16 v/v de THF:tolueno respectivamente). Alternativamente, el sistema disolvente es una mezcla de THF y TBME, en donde adecuadamente la mezcla comprende entre 4:1 y 1:2 de THF:TBME (tal como 8:2 v/v; 8:2.5 v/v; 8:4 v/v; 8:6 v/v 8:8 v/v; 8:10 v/v o 8:12 v/v de THF:TBME respectivamente).

Formulaciones farmacéuticas

- 60 En una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención

opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

- 5 Adecuadamente, el compuesto de la invención se administra tópicamente al pulmón o la nariz, particularmente, tópicamente al pulmón. Por tanto, en una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos tópicamente aceptables. Adecuadamente, el compuesto de la invención se administra por inhalación.

Adecuadamente, el diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable es agua.

- 10 Las composiciones se pueden administrar convenientemente en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17a edición, Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Las composiciones también se pueden administrar convenientemente en forma de dosificación unitaria múltiple.

- 15 Las composiciones adecuadas para administración pulmonar o intranasal incluyen polvos, soluciones líquidas, suspensiones líquidas, suspensiones acuosas, gotas nasales, que comprenden soluciones o suspensiones, o aerosoles presurizados o no presurizados.

- 20 La administración tópica a la nariz o el pulmón se puede conseguir mediante el uso de una formulación no presurizada tal como una suspensión acuosa. Tales formulaciones se pueden administrar mediante nebulización, es decir, por medio de un nebulizador por ejemplo, que puede ser manual y portátil o no portátil y destinado para uso doméstico u hospitalario. Un ejemplo de tal dispositivo es un inhalador RESPIMAT.

- 25 Las formulaciones de líquido de suspensión y aerosol (ya sea presurizado o no presurizado) contendrán típicamente el compuesto de la invención en forma de partículas, por ejemplo, con un D_{50} de 0.5 a 10 μm , adecuadamente, alrededor de 1 a 5 μm , tal como 1 a 2 μm . Adecuadamente, el compuesto de la invención en forma de partículas tiene un D_{10} de 0.2 a 1 μm , tal como de 0.2 a 0.5 μm . Adecuadamente, el compuesto de la invención en forma de partículas tiene un D_{90} de 2 a 6 μm , tal como de 3 a 4 μm . La forma de partículas del
30 compuesto puede ser, por ejemplo, una forma micronizada. La micronización se puede realizar usando un molino de chorro tal como los fabricados por Hosokawa Alpine. La distribución del tamaño de partícula resultante se puede medir usando difracción láser (por ejemplo, con un instrumento Mastersizer 2000S de Malvern). Las distribuciones del tamaño de partícula se pueden representar usando los valores D_{10} , D_{50} y D_{90} . El valor mediano D_{50} de las distribuciones del tamaño de partícula se define como el tamaño de partícula en micras que divide la distribución por la mitad. La medición derivada a partir de difracción láser se describe con mayor exactitud como una distribución de volumen y, por consiguiente, el valor D_{50} obtenido usando este
35 procedimiento se denomina más convenientemente valor Dv_{50} (mediana para una distribución de volumen). Como se emplea en este documento, los valores Dv se refieren a distribuciones del tamaño de partícula medido usando difracción láser. De manera similar, los valores D_{10} y D_{90} , usados en el contexto de la difracción láser,
40 se toman para indicar los valores Dv_{10} y Dv_{90} y se refieren al tamaño de partícula mediante el cual el 10 % de la distribución se encuentra por debajo del valor D_{10} y el 90 % de la distribución se encuentra por debajo del valor D_{90} , respectivamente.

- 45 Según un aspecto específico de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención como una suspensión acuosa, es decir, en forma de partículas suspendidas en un medio acuoso.

- 50 El medio acuoso comprende típicamente agua y uno o más excipientes seleccionados entre tampones, agentes ajustadores de la tonicidad (tal como cloruro de sodio), agentes ajustadores del pH, modificadores de la viscosidad, codisolventes (tal como propilenglicol) y tensioactivos (tal como Lipoid S100).

Adecuadamente, el medio acuoso comprende al menos 40 % de agua, tal como al menos 60 % de agua, al menos 80 % de agua, al menos 95 % de agua, o al menos 99 % de agua, tal como al menos 99 % de agua.

- 55 Adecuadamente, cuando el Compuesto I se administra como una suspensión acuosa, el Compuesto I se emplea como Forma polimórfica cristalina 2. Adecuadamente, la concentración del Compuesto I en la formulación de suspensión acuosa es de 1 a 10 mg/ml tal como 4 a 6 mg/ml.

- 60 Por lo tanto, de acuerdo con una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Compuesto I, empleado como Forma polimórfica cristalina 2, en forma de partículas suspendida en un medio acuoso.

- La administración tópica a la nariz o al pulmón también se puede conseguir mediante el uso de una formulación de aerosol presurizado. Las formulaciones de aerosol comprenden típicamente el principio activo suspendido
65 o disuelto en un propelente de aerosol adecuado, tal como un clorofluorocarbono (CFC) o un hidrofluorocarbono (HFC). Los propelentes de CFC adecuados incluyen tricloromonofluorometano (propelente

- 11), diclorotetrafluorometano (propelente 114) y diclorodifluorometano (propelente 12). Los propelentes de HFC adecuados incluyen tetrafluoroetano (HFC-134a) y heptafluoropropano (HFC-227). El propelente comprende típicamente 40 % a 99.5 %, por ejemplo, 40 % a 90 % en peso de la composición de inhalación total. La formulación puede comprender excipientes que incluyen codisolventes (por ejemplo, etanol) y tensioactivos (por ejemplo, lecitina, trioleato de sorbitán y similares). Otros excipientes posibles incluyen polietilenglicol, polivinilpirrolidona, glicerina y similares. Las formulaciones de aerosol se envasan en recipientes metálicos herméticos y se administra una dosis adecuada por medio de una válvula dosificadora (por ejemplo, como las suministradas por Bepak, Valois o 3M o alternativamente por Aptar, Coster o Vari).
- 10 La administración tópica al pulmón también se puede conseguir mediante el uso de una formulación de polvo seco. Una formulación de polvo seco contendrá el compuesto de la descripción en forma de partículas, típicamente con un MMAD de 1 a 10 μm o un D_{50} de 0.5 a 10 μm , por ejemplo, alrededor de 1 a 5 μm . Los polvos del compuesto de la invención en forma de partículas se pueden preparar mediante un procedimiento de micronización o un procedimiento de reducción de tamaño similar. La micronización puede realizarse y medirse como se describe anteriormente. La formulación contendrá típicamente un diluyente tópicamente aceptable tal como lactosa, glucosa o manitol (preferiblemente lactosa), por lo general de tamaño de partícula comparativamente grande, por ejemplo, un MMAD de 50 μm o más, por ejemplo, 100 μm o más o un D_{50} de 40 a 150 μm . Como se emplea en este documento, el término "lactosa" se refiere a un componente que contiene lactosa, lo que incluye α -lactosa monohidratada, β -lactosa monohidratada, α -lactosa anhidra, β -lactosa anhidra y lactosa amorfa. Los componentes de lactosa se pueden procesar mediante micronización, tamizado, molienda, compresión, aglomeración o secado por pulverización. También están abarcadas las formas de lactosa comercialmente disponibles en diversas formas, por ejemplo, Lactohale® (lactosa de grado inhalatorio; DFE Pharma), InhaLac®70 (lactosa tamizada para inhalador de polvo seco; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) y Respitose® (lactosa de grado inhalatorio tamizada; DFE Pharma). En una realización, el componente de lactosa se selecciona del grupo que consiste en α -lactosa monohidratada, α -lactosa anhidra y lactosa amorfa. Preferiblemente, la lactosa es α -lactosa monohidratada.

Las formulaciones de polvo seco también pueden contener otros excipientes tales como estearato de sodio, estearato de calcio o estearato de magnesio.

- 30 Una formulación de polvo seco se administra típicamente utilizando un dispositivo inhalador de polvo seco (DPI). Los ejemplos de sistemas de administración de polvo seco incluyen SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS, SKYHALER, ACCUHALER y CLICKHALER. Otros ejemplos de sistemas de administración de polvo seco incluyen ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X- CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, inhalador de polvo seco ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR y PROHALER.
- 40 En formulaciones distintas de suspensiones acuosas, tales como cremas y pesarios, el Compuesto I se emplea adecuadamente como Forma polimórfica cristalina 1.

Usos médicos

- 45 El Compuesto I es útil en el tratamiento de micosis y para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a micosis.

En un aspecto de la invención se proporciona la Forma cristalina 1 o Forma cristalina 2 del Compuesto I para su uso en el tratamiento de micosis o para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a micosis.

En otro aspecto de la invención se proporciona una cantidad eficaz de Forma cristalina 1 o Forma cristalina 2 del Compuesto I para usar en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad asociada a una micosis del pulmón o de la nariz (particularmente el pulmón) en un sujeto cuando se administra a dicho sujeto, por inhalación.

Las micosis pueden ser causadas, en particular, por *Aspergillus* spp. tales como *Aspergillus fumigatus* o *Aspergillus pullulans* especialmente *Aspergillus fumigatus*. Las micosis también pueden ser causadas por *Candida* spp., por ejemplo, *Candida albicans* o *Candida glabrata*; por *Rhizopus* spp., por ejemplo, *Rhizopus oryzae*; *Cryptococcus* spp., por ejemplo, *Cryptococcus neoformans*; por *Chaetomium* spp., por ejemplo, *Chaetomium globosum*; por *Penicillium* spp., por ejemplo, *Penicillium chrysogenum* y por *Trichophyton* spp., por ejemplo, *Trichophyton rubrum*.

Una enfermedad asociada a una micosis es, por ejemplo, la aspergilosis pulmonar.

Adecuadamente, se proporciona el Compuesto I en forma del polimorfo de Forma 2 para su uso en el

tratamiento de micosis y enfermedades asociadas con una micosis.

Alternativamente, se proporciona el Compuesto I en forma del polimorfo de Forma 1 para su uso en el tratamiento de micosis y enfermedades asociadas con una micosis.

5

El Compuesto I de la invención se puede usar en un contexto profiláctico administrando el Compuesto I antes del inicio de la micosis. Por ejemplo, el Compuesto I se puede administrar profilácticamente a sujetos en riesgo de desarrollar una micosis, tal como lactantes prematuros, niños con defectos congénitos del pulmón o el corazón, sujetos inmunocomprometidos (por ejemplo, los que padecen infección por VIH), asmáticos, sujetos con fibrosis quística, sujetos ancianos y sujetos que padecen una afección médica crónica que afecta al corazón o al pulmón (por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

10

Adecuadamente, se proporciona el Compuesto I en forma del polimorfo de Forma 1 para su uso en la prevención de micosis y enfermedades asociadas con una micosis.

15

Alternativamente, se proporciona el Compuesto I en forma del polimorfo de Forma 2 para su uso en la prevención de micosis y enfermedades asociadas con una micosis.

20

Los sujetos incluyen sujetos humanos y animales, especialmente sujetos humanos.

El compuesto de la invención es especialmente útil para el tratamiento de micosis tales como infección por *Aspergillus fumigatus* y para la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a la micosis tales como infección por *Aspergillus fumigatus* en sujetos de riesgo. Los sujetos de riesgo se definen más arriba.

25

El compuesto de la invención también es útil para el tratamiento de micosis resistentes a azoles tales como infección por *Aspergillus fumigatus* resistente a azoles, particularmente en combinación con posaconazol.

30

El compuesto de la invención se pueden administrar en combinación con un segundo ingrediente activo o más. El segundo o más ingredientes activos se pueden seleccionar, por ejemplo, entre otros agentes antifúngicos (tales como voriconazol o posaconazol), anfotericina B, una equinocandina (tal como caspofungina) y un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (tal como lovastatina, pravastatina o fluvastatina).

35

El segundo o más ingredientes activos incluyen ingredientes activos adecuados para el tratamiento o la prevención de una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus* o una enfermedad asociada a una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus* o afecciones comórbidas con una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus*.

40

El compuesto de la invención se puede coformular con un segundo ingrediente activo o más, o el segundo o más ingredientes activos se pueden formular para ser administrados por separado por la misma vía o una diferente.

45

Por ejemplo, el compuesto de la invención se puede administrar a pacientes que ya están siendo tratados sistémicamente con un antifúngico, tal como voriconazol o posaconazol.

Por ejemplo, el compuesto de la invención se puede coadministrar, por ejemplo, coformular, con uno o más agentes seleccionados entre anfotericina B, una equinocandina, tal como caspofungina, y un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa, tal como lovastatina, pravastatina o fluvastatina.

50

El compuesto de la invención se puede coadministrar, por ejemplo, coformular, alternativamente (o además), con uno o más agentes seleccionados entre candicidina, filipina, hamicina, natamicina, nistatina, rimocidina, bifonazol, butoconazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, isoconazol, ketoconazol, luliconazol, miconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, albaconazol, efinaconazol, epoxiconazol, fluconazol, isavuconazol, itraconazol, propiconazol, ravuconazol, terconazol, abafungina, amorolfina, butenafina, naftifina, terbinafina, anidulafungina, micafungina, ácido benzoico, ciclopirox, flucitosina (5-fluorocitosina), griseofulvina, tolnaftato y ácido undecilénico.

55

Los compañeros de combinación preferidos incluyen intraconazol, voriconazol, caspofungina y posaconazol.

60

Según un aspecto de la invención se proporciona un kit de partes que comprende: (a) una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; (b) una composición farmacéutica que comprende un segundo ingrediente activo opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; (c) opcionalmente una o más composiciones farmacéuticas adicionales que comprende cada una un tercer ingrediente activo o más opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; y (d) instrucciones para la administración de las composiciones farmacéuticas a un sujeto con necesidad de las mismas. El sujeto con necesidad de las

65

mismas puede padecer, o ser susceptible de, una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus*.

El compuesto de la invención se puede administrar en un intervalo adecuado, por ejemplo, una vez a la semana, una vez cada dos días, una vez al día, dos veces al día, tres veces al día o cuatro veces al día.

5

Una cantidad de dosis adecuada para un humano de peso promedio (50 a 70 kg) se espera que sea de alrededor de 50 µg a 10 mg/día, por ejemplo, 500 µg a 5 mg/día, aunque la dosis exacta que se va a administrar puede ser determinada por un experto en la técnica.

10 Se espera que el Compuesto I en la forma cristalina de la Forma polimórfica 1 tenga uno o más de los siguientes atributos favorables:

- exhibir un amplio rango de estabilidad térmica, como lo demuestra un alto punto de fusión (>200 °C);

15 • ser susceptible a la micronización manteniendo al mismo tiempo su integridad polimórfica; y

- resistir la conversión a la Forma 2, en formulaciones destinadas a su administración tales como en formulaciones distintas de suspensiones acuosas.

20 Se espera que el Compuesto I en la forma cristalina de la Forma polimórfica 2 tenga uno o más de los siguientes atributos favorables:

- exhibir un amplio rango de estabilidad térmica, como lo demuestra un alto punto de fusión (>180 °C);

25 • poseer una biodisponibilidad eficaz para un medicamento tópico, en particular uno destinado a tratar enfermedades del pulmón y mostrar una biodisponibilidad mayor que la de la Forma 1 cuando se administra por inhalación como una suspensión acuosa;

- ser susceptible a la micronización manteniendo al mismo tiempo su integridad polimórfica; y

30

- resistir la conversión a la Forma 1 en suspensiones acuosas destinadas a ser utilizadas en su administración a pacientes.

Experimental

35

Abreviaturas

Cualquier abreviatura no definida está destinada a expresar su significado generalmente aceptado.

40

ac acuoso

AUC área bajo la curva

BW peso corporal promedio del grupo

45

conc. concentración

c-hexano ciclohexano

50

D duración de la exposición

DME 1,2-dimetoxietano

DMSO dimetilsulfóxido

55

DSC calorimetría diferencial de barrido

Et₂O éter dietílico

60

EtOH etanol

Exp experimento

Evap evaporación

65

	¹ H-NMR	(espectroscopía de) resonancia magnética nuclear de protón
	HPLC	cromatografía líquida a presión elevada
5	i-BuOH	iso-butanol (2-metil-1-propanol)
	IPA	alcohol isopropílico (2-propanol)
	K ₂ EDTA	ácido etilendiaminotetraacético dipotásico
10	KF	Karl Fischer (titulación)
	LC-MS/MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas
15	LGC	cromatografía líquido-gas
	2-ME	2-metoxietanol
	MeCN	acetonitrilo
20	MEK	metiletilcetona
	MeNO ₂	nitrometano
25	MIBK	metilisobutilcetona
	min	minuto(s)
	MMAD	diámetro aerodinámico mediano de masa
30	MTBE	metil <i>terc</i> -butil éter
	N/A	no aplica
35	NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
	No	número
	PLM	microscopio de luz polarizada
40	PrOAc	acetato de propilo
	HR	humedad relativa,
45	RSD	desviación estándar relativa
	TA	temperatura ambiente
	RV	fase inversa
50	TBME	metil éter de butilo terciario
	temp	temperatura
55	TGA	análisis termogravimétrico
	THF	tetrahidrofurano
	vol	volumen(es)
60	SC	monocristal
	TBME	metil éter de <i>terc</i> -butilo
65	s	segundo(s)

UPLC cromatografía líquida de eficacia ultra alta

TV temperatura variable

5 XRPD difracción de rayos X en polvo (cristalografía)

Instrumentos y metodología

10 Las siguientes descripciones de instrumentos, metodologías y procedimientos se refieren a experimentos que se realizaron en varios laboratorios y lugares diferentes, lo que hizo necesario el uso de una variedad de los mismos, equivalentes en su efecto. Los expertos en la materia apreciarán que muchos de estos parámetros pueden variarse sin impedir el resultado deseado. Por lo tanto, si bien dichos instrumentos, metodologías y procesos descritos a continuación se han utilizado en algunas circunstancias, también constituyen condiciones experimentales ejemplares que pueden utilizarse para poner en práctica la presente invención. Por lo tanto, los
15 instrumentos, metodologías y procesos que siguen no deben interpretarse como limitantes de la presente invención de ningún modo.

Difracción de rayos X en polvo

20 Los patrones de difracción de rayos X en polvo se recolectaron en un difractómetro PANalytical utilizando radiación Cu K α (45 kV, 40 mA), goniómetro $\theta - \theta$, espejo de enfoque, rendija de divergencia (1/2"), rendijas Soller tanto en el haz incidente como en el divergente (4 mm) y un detector PIXcel. El software utilizado para la recolección de datos fue X'Pert Data Collector, versión 2.2f y los datos se presentaron utilizando X'Pert Data Viewer, versión 1.2d. Los patrones XRPD se adquirieron en condiciones ambientales a través de una platina
25 de muestra de lámina de transmisión (poliimida - Kapton, película de 12.7 μ m de espesor) en condiciones ambientales utilizando un PANalytical X'Pert PRO. El rango de recolección de datos fue de 2.994-35°2 θ con una velocidad de escaneo continuo de 0.202 s⁻¹.

30 Como alternativa, se recolectaron patrones de difracción de rayos X en polvo en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), utilizando una platina XYZ automatizada, un microscopio de video láser para posicionamiento automático de muestras y un detector de área bidimensional HiStar. La óptica de rayos X consistía en un único espejo multicapa Göbel acoplado a un colimador de orificio de 0.3 mm. Se realizó una verificación de rendimiento semanal utilizando un corindón (placa plana) estándar certificado NIST 1976. La divergencia del haz fue de aproximadamente 4 mm. Se empleó un modo de escaneo continuo
35 $\theta - \theta$ con una distancia de muestra al detector de 20 cm, proporcionando así un rango 2 θ efectivo de 3.2° a 29.7°. Normalmente, las muestras se expusieron al haz de rayos X durante 120 segundos. El software utilizado para la recolección de datos fue GADDS para XP/2000 4.1.43 y los datos fueron analizados y presentados utilizando Diffrac Plus EVA v15.0.0.0.

40 Las muestras procesadas en condiciones ambientales se prepararon como especímenes de placa plana utilizando polvo, tal como se recibió, sin moler. Se presionaron ligeramente aproximadamente 1-2 mg de la muestra sobre un portaobjetos de vidrio para obtener una superficie plana. Las muestras procesadas en condiciones no ambientales se montaron en una oblea de silicio con un compuesto conductor de calor. Después, la muestra se calentó a la temperatura adecuada a 20 °C/min y posteriormente se mantuvo
45 isotérmicamente durante 1 minuto antes de iniciar la recopilación de datos.

Los patrones de difracción de rayos X en polvo se recolectaron en un difractómetro Bruker D8 usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), goniómetro $\theta - 2\theta$, y una divergencia de V4 y rendijas receptoras, un monocromador Ge y un detector Lynxeye. Se verificó el rendimiento del instrumento utilizando un estándar de corindón certificado
50 (NIST 1976). El software utilizado para la recolección de datos fue Diffrac Plus XRD Commander v2.6.1 y los datos se analizaron y presentaron utilizando Diffrac Plus EVA v15.0.0.0.

Las muestras se analizaron en condiciones ambientales como especímenes de placa plana usando polvo según se recibió. La muestra se colocó cuidadosamente en una cavidad perforada en oblea de silicio pulida sin blanco (510). La muestra se rota sobre su propio plano durante el análisis. Los datos se recolectaron de la
55 siguiente manera:

Rango angular: 2° a 42° 2 θ

60 Dimensión del paso 0.05 °2 θ :

Tiempo de recolección: 0.5 s/paso

Cristalografía de rayos X con fuente de luz de diamante

65 Los datos se recolectaron en un difractómetro de 3 círculos Fluid Film Devices utilizando un detector Dectris

Pilatus 2M. El cristal se montó en un bucle MiTeGen utilizando un aceite de perfluoropoliéter. La longitud de onda utilizada fue de 0.6889 Å. Todos los datos se recolectaron a 295 K. La estructura se resolvió mediante métodos directos automáticos de rutina y se refinó mediante el refinamiento de mínimos cuadrados en todos los valores únicos de F^2 medidos.

5

Espectroscopia de ^1H RMN

Los espectros de RMN se recolectaron en un instrumento Bruker de 400 MHz equipado con un muestreador automático y controlado por una consola DRX400. Los experimentos automatizados se adquirieron utilizando ICON-NMR v4.0.7 ejecutándose con Topspin v1.3 utilizando los experimentos cargados estándar de Bruker. Para la espectroscopia no rutinaria, los datos se adquirieron mediante el uso de Topspin únicamente. Las muestras se prepararon en $\text{DMSO}-d_6$, a menos que se indique lo contrario. El análisis fuera de línea se realizó utilizando el procesador ACD Spectrus 2012.

10

Calorimetría Diferencial de Barrido

Los datos de DSC se recolectaron en un instrumento TA Q2000 equipado con un muestreador automático de 50 posiciones. La calibración de capacidad térmica se realizó utilizando zafiro y la calibración de energía y temperatura se realizó utilizando indio certificado. Normalmente, se calentaron 0.5 a 3 mg de muestra, contenidos en una bandeja de aluminio perforada, a $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ desde $25\text{ }^\circ\text{C}$ hasta $300\text{ }^\circ\text{C}$ (para velocidades de escaneo lentas) o a $40\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ desde $25\text{ }^\circ\text{C}$ hasta $300\text{ }^\circ\text{C}$ (para velocidades de escaneo rápidas). Se mantuvo una purga de nitrógeno seco a 50 ml/min sobre la muestra. El software de control del instrumento fue Advantage for Q Series v2.8.0.394 y Thermal Advantage v5.5.3 y los datos se analizaron utilizando Universal Analysis v4.5A.

20

25

Análisis termogravimétrico

Los datos de TGA se recolectaron en un TA Instrument Q500 TGA, equipado con un muestreador automático de 16 posiciones. El instrumento fue calibrado en temperatura utilizando Alumel y Níquel certificados. Normalmente se cargaron 5 a 10 mg de muestra en una bandeja DSC de aluminio previamente tarada y se calentó a $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ desde temperatura ambiente hasta $350\text{ }^\circ\text{C}$. Se mantuvo una purga de nitrógeno seco a 60 ml/min sobre la muestra. El software de control del instrumento fue Advantage for Q Series v2.5.0.256 y Thermal Advantage v5.5.3 y los datos se analizaron utilizando Universal Analysis v4.5A.

30

Determinación de pureza química por HPLC

El análisis de pureza se realizó en un sistema Agilent serie HP1100 equipado con un detector de matriz de diodos utilizando el software ChemStation vB.04.03. Las muestras se prepararon mediante disolución en MeCN acuoso (mezcla 1:1) calentando a $50\text{ }^\circ\text{C}$ para obtener una solución de 0.5 mg/ml. Las muestras se procesaron utilizando los parámetros que se indican a continuación (Tabla 2).

40

Tabla 2: Parámetros de HPLC/Método para las determinaciones de la pureza química.

Columna	Supelco Ascentis Express C18	
Dimensión de la columna	100 x 4.6 mm x 2.7 μm	
Temp de la columna	25 °C	
Vol de inyección	5 μl	
Longitud de onda de detección	255 nm	
Caudal	2 ml/min	
Fase A	0.1 % de TFA en agua	
Fase B	0.085 % de TFA en MeCN	
Cronograma de elución por gradiente		
Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
0	95	5
6	5	95
6.2	95	5
8	95	5

Preparación de polimorfos de Forma 1 y Forma 2

La referencia a "material de entrada crudo" en este documento se entiende como la Forma 3 que se sintetizó y aisló de acuerdo con cualquiera de los métodos analizados anteriormente. En la Fig. 7 se muestra una traza de XRPD de referencia representativa de este material y es consistente con un material de baja cristalinidad.

Preparación de la Forma 1 micronizada mediante recristalización en acetona acuosa (5 % H₂O v/v)

Una muestra de material de entrada crudo (100 g, Forma 3) se suspendió en una mezcla de 5% de agua en acetona (1.00 l), se añadió una semilla de Forma 1 (100 mg) y la mezcla se agitó a TA durante la noche. La suspensión se filtró y la torta de filtración se lavó con una mezcla de 5% de agua en acetona (20 ml) y los sólidos se secaron a 40 °C para proporcionar la Forma polimórfica 1 como un polvo blanco (85.5 g, 85.5% de recuperación, 98.7 % de pureza por HPLC) como se determinó a partir de su traza de DSC (Fig. 9). La micronización del producto así obtenido proporcionó un polvo cuya distribución del tamaño de partícula, expresada en valores D, fue la siguiente: D₁₀ = 0.75 µm; D₅₀ = 1.59 µm y D₉₀ = 3.23 µm. La traza de XRPD del sólido micronizado (Fig. 10) confirmó que su integridad polimórfica se mantuvo durante este proceso.

Preparación del polimorfo de Forma 2 mediante maduración en MIBK

El material de entrada crudo (10 g) se suspendió en MIBK (30 vol, 300 ml) a TA. La suspensión se maduró entre 25 °C y 50 °C (ciclo de calor-frío, 8 horas por ciclo) durante 24 horas. Se recolectó una alícuota después de 3 horas a 50 °C, se filtró, se secó al aire y se analizó por XRPD. Después de 24 horas, el sólido restante se filtró a TA y se secó al aire durante 2 horas. El sólido obtenido se denominó polimorfo de Forma 2. El patrón de XRPD de una muestra representativa se muestra en la Fig. 2.

Preparación de la Forma 2 micronizada mediante recristalización a partir de THF/TBME

El material de entrada crudo (476.4 g) se tomó en THF (3.82 L) a 45 a 55 °C bajo nitrógeno. La solución tibia se clarificó a través de un filtro en línea mientras se mantenía una temperatura interna de 45 a 55 °C. Se añadió TBME (0.72 l) gota a gota durante un período de 1.5 horas mientras se mantenía una temperatura interna de 45 a 55 °C. Se añadieron semillas del polimorfo de Forma 2 (500 mg) seguido de la adición gota a gota de TBME clarificado (5.01 l) durante 10.5 horas a 45 a 55 °C. Una vez completada la adición, la mezcla se enfrió a 0 °C durante 3.5 horas. Se continuó agitando a esta temperatura durante 7.5 horas más y la suspensión resultante se filtró *al vacío* y los sólidos se lavaron con una mezcla de THF clarificado (380 ml) y TBME (570 ml). La torta de filtro se secó por succión y los sólidos aislados se secaron *al vacío* a 45 °C bajo nitrógeno durante 21 horas para obtener un sólido blanquecino (401.4 g, 84.2 %) que se confirmó como el polimorfo de Forma 2 mediante análisis de XRPD y DSC (Figs. 11 y 12 respectivamente).

La micronización del producto así obtenido proporcionó un polvo cuya distribución del tamaño de partícula, expresada en valores D, fue la siguiente: D₁₀ = 0.42 µm; D₅₀ = 1.24 µm y D₉₀ = 3.57 µm. Los expertos en la materia apreciarán que estas características son adecuadas para un producto destinado a ser administrado por inhalación. El mantenimiento de la integridad polimórfica durante la micronización se confirmó a partir de la traza de XRPD obtenida después de la molienda (Fig. 13) que no muestra cambios significativos en comparación con el obtenido antes de realizar la reducción del tamaño de partícula (Fig. 11). Por lo tanto, el polimorfo de Forma 2 es susceptible y estable al proceso de micronización necesario para obtener un material con las propiedades necesarias para el propósito previsto.

Caracterización de los polimorfos de Forma 1 y Forma 2

Cristalografía de rayos X en polvo

Las trazas de XRPD de alta resolución de la Forma polimórfica 1 (Fig. 1) y de la Forma 2 (Fig. 2) que se prepararon mediante los métodos descritos en este documento muestran patrones claramente diferentes que son característicos de los dos estados sólidos alternativos. Se encontró que los patrones determinados experimentalmente coincidían con los calculados a partir de datos recolectados en la fuente de sincrotrón (Figs. 5 y 6 respectivamente), de donde se derivaron las estructuras cristalinas. La comparación de los dos patrones (Figs. 3 y 4) demuestra la confiabilidad del análisis de XRPD para determinar la naturaleza polimórfica de una muestra dada. Los valores 2θ (en grados), el espaciado d y las intensidades relativas de los picos, derivados de sus respectivas trazas de XRPD, que caracterizan los polimorfos de Forma 1 y 2, se tabulan a continuación (Tabla 3).

Tabla 3: Picos de difracción de rayos X en polvo para las Formas polimórficas 1 y 2 del Compuesto I.

ES 3 000 984 T3

Forma 1			Forma 2		
Valor 2 θ	espaciado d (Å)	Intensidad Rel (%)	Valor 2 θ	espaciado d (Å)	Intensidad Rel (%)
5.06	17.46	12.95	5.37	16.44	4.84
5.65	15.65	6.09	10.75	8.23	16.17
6.99	12.64	12.06	11.54	7.67	8.23
7.35	12.02	5.80	11.85	7.47	3.04
7.91	11.18	6.55	12.77	6.93	3.63
8.15	10.85	3.43	14.41	6.15	2.05
10.17	8.70	21.46	15.88	5.58	8.28
11.13	7.95	2.80	16.19	5.48	3.95
11.60	7.63	7.57	16.61	5.33	94.97
12.84	6.89	2.75	17.02	5.21	22.15
13.11	6.75	3.15	17.45	5.08	10.17
14.51	6.10	3.51	17.91	4.95	3.92
15.28	5.80	2.80	18.72	4.74	22.45
15.88	5.58	2.71	19.08	4.65	31.18
16.28	5.45	10.51	19.52	4.55	24.12
16.66	5.32	25.57	20.05	4.43	7.78
17.49	5.07	13.92	20.29	4.38	13.83
17.85	4.97	37.53	21.28	4.18	82.09
18.17	4.88	14.59	21.66	4.10	73.31
18.82	4.71	10.26	22.00	4.04	21.08
19.38	4.58	13.53	22.38	3.97	38.28
19.70	4.51	100.00	22.65	3.93	100.00
20.43	4.35	8.01	23.16	3.84	7.67
20.83	4.26	8.72	23.43	3.80	9.21
21.26	4.18	6.69	23.89	3.73	8.79
21.53	4.13	6.81	24.43	3.64	11.18
21.00	4.04	13.99	24.94	3.57	12.45
22.52	3.95	14.36	25.20	3.53	8.40
22.87	3.89	5.00	25.89	3.44	8.37
23.32	3.81	21.62	26.56	3.36	36.79
24.20	3.68	15.27	26.88	3.32	25.43
24.67	3.61	12.85	27.35	3.26	7.51
25.00	3.56	2.49	27.83	3.21	6.36
25.46	3.50	1.14	28.23	3.16	3.86
25.90	3.44	1.80	30.37	2.94	1.53
26.26	3.39	2.58	31.04	2.88	1.93
26.69	3.34	12.65	31.78	2.82	2.51
27.44	3.25	8.81	32.92	2.72	3.62
28.10	3.18	4.18	33.30	2.69	3.08
28.37	3.15	3.22	34.23	2.62	1.65
29.50	3.03	1.69			

Forma 1			Forma 2		
Valor 2 θ	espaciado d (Å)	Intensidad Rel (%)	Valor 2 θ	espaciado d (Å)	Intensidad Rel (%)
30.52	2.93	0.62			
31.07	2.88	0.51			
31.70	2.82	0.80			
32.77	2.73	0.29			
33.10	2.71	0.32			
33.83	2.65	0.95			
34.15	2.63	1.52			

Determinación de la estructura de las Formas 1 y 2 mediante cristalografía de rayos X con fuente de luz de sincrotrón

- 5 Las determinaciones de la estructura de las Formas polimórficas 1 y 2 se llevaron a cabo en Diamond Light Source, Oxfordshire, Reino Unido. Los datos de Forma 1 se recolectaron de un monocristal de 7 x 12 x 140 μm en la línea de haz I19. Los datos cristalinos y los parámetros de refinamiento de la estructura para el polimorfo cristalino de Forma 1 se dan a continuación (Tabla 4) y se incluye aquí una imagen de la estructura resuelta vista a lo largo de su eje a (Fig. 14).

10

Tabla 4: Datos cristalinos y parámetros de refinamiento de la estructura para la Forma polimórfica 1.

Fórmula empírica	$\text{C}_{38} \text{H}_{37} \text{F}_3 \text{N}_6 \text{O}_3$	
Peso de la fórmula	682.73	
Temperatura	295(2) K	
Longitud de onda	0.6889 Å	
Sistema cristalino	Ortorrómbico	
Grupo espacial	Pág. 21 21 21	
Dimensiones de celda unitaria	$a = 16.7962(3) \text{ Å}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 23.5841(6) \text{ Å}$	$\beta = 90^\circ$
	$c = 25.5756(6) \text{ Å}$	$\gamma = 90^\circ$
Volumen	10131.1(4) Å ³	
Z	12	
Densidad (calculada)	1.343 mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0.059 mm ⁻¹	
F(000)	4296	
Tamaño del cristal	7 x 12 x 140 μm	
Rango Theta para recolección de datos	1.406 a 24.226°	

15

Los datos para la Forma 2 se recolectaron de un monocristal de 5 x 5 x 50 μm en la línea de haz I19. Los datos cristalinos y los parámetros de refinamiento de la estructura para el polimorfo cristalino de Forma 2 se dan a continuación (Tabla 5) y se incluye aquí una imagen de la estructura resuelta vista a lo largo de su eje b (Fig. 15).

20

Tabla 5: Datos cristalinos y parámetros de refinamiento de la estructura para la Forma polimórfica 2.

Fórmula empírica	$\text{C}_{38} \text{H}_{37} \text{F}_3 \text{N}_6 \text{O}_3$
Peso de la fórmula	682.73
Temperatura	295(2) K
Longitud de onda	0.6889 Å

Sistema cristalino	Monocíclico
Grupo espacial	P21
Dimensiones de celda unitaria	a = 16.8148(7) Å $\alpha = 90^\circ$ b = 5.6467(2) Å $\beta = 101.540(3)^\circ$ c = 35.5556(11) Å $\gamma = 90^\circ$
Volumen	3307.7(2) Å ³
Z	4
Densidad (calculada)	1.371 mg/m ³
Coeficiente de absorción	0.060 mm ⁻¹
F(000)	1432
Tamaño del cristal	5 × 5 × 50 µm
Rango Theta para recolección de datos	1.133 a 24.246°

Relaciones de estabilidad termodinámica

Estabilidad termodinámica de las Formas polimórficas 1 y 2 a distintas temperaturas

Se cargó una mezcla de cantidades iguales de las Formas 1 y 2 (100 mg) en tubos de cristalización seguido del disolvente seleccionado. Las suspensiones se calentaron a las temperaturas indicadas (Tabla 6) durante 72 horas, tiempo durante el cual se tomaron muestras a intervalos de 24 horas. Los sólidos se aislaron a la temperatura de maduración por filtración y después se secaron *al vacío* a 45 °C durante 20 horas. En dos casos (Tabla 6, Entradas 1 y 2) las suspensiones se mantuvieron a 135 °C y comprendían la Forma I desde el punto en el tiempo de 24 horas hasta la conclusión del experimento. En los casos restantes (Tabla 6, Entradas 4-6) las soluciones se habían formado a las 72 horas y los sólidos se recuperaron mediante un ligero enfriamiento; todos ellos se determinaron como Forma 1. Aquellos que maduraron a temperaturas más bajas dieron la Forma 2 en 24 horas.

Tabla 6: Análisis XRPD de suspensiones de las Formas 1 y 2 maduras a diferentes temperaturas.

Entrada	Disolvente	Polimorfo obtenido a la temperatura indicada ^a (°C)		
		50	70	135
1	xilenos	2	2	1
2	mesitileno	2	2	1
3	difenil éter	2	2	1 ^b
4	decalina	2	2	1 ^b
5	heptanol	2	2	1 ^b
6	p-cimeno	2	2	1 ^b

Notas a pie de página: a. Según lo determinado por análisis XRPD después de 72 horas; b. La disolución se produjo a esta temp; el sólido se obtuvo con un ligero enfriamiento.

Perfil mediante calorimetría diferencial de barrido

Las investigaciones de DSC se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

Una muestra de material de entrada crudo de 98.4 % de pureza se sometió a calorimetría diferencial de barrido que mostró una serie de eventos térmicos al calentar la muestra. Una pequeña endoterma a 166 °C precedió a una segunda endoterma más grande a 180 °C que fue seguida casi inmediatamente por una exoterma a -183 °C y una endoterma final a ~201 °C (véase Fig. 8). Estos análisis revelan que ocurren una serie de transformaciones inducidas térmicamente durante las cuales el material inicial, poco cristalino (Forma 3) se convierte en la Forma polimórfica 2 (pf 180 a 185 °C), que después se funde y se transforma en la Forma 1 (pf 201 a 202 °C).

Para obtener un valor preciso para el calor de fusión (ΔH_f) de la Forma polimórfica 1 y la Forma polimórfica 2, se utilizó DSC de barrido rápido (usando una tasa de calentamiento a 40 °C/min) para eliminar el evento de recristalización de la Forma 1 de la masa fundida de la Forma 2 que ocurre a tasas de barrido más lentas (10

C/min). El análisis de réplicas ($n = 10$) de las mismas muestras de los polimorfos mostró que las Formas 1 y 2 tenían calores de fusión medios de 72.28 J/g y 77.15 J/g respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7: Datos de fusión de trazas de DSC de escaneo rápido para las Formas 1 y 2.

Polimorfos	Temp. de inicio °C (% RSD)	Temperatura máxima °C (% RSD)	Entalpía lineal J/g (% RSD)
Forma 1	202.6 (0.08)	203.5 (0.10)	72.28 (0.89)
Forma 2	182.6 (0.05)	183.7 (0.12)	77.15 (0.61)

La Fig. 16 comprende una traza de DSC de escaneo rápido de esta muestra de Forma polimórfica 1 y revela que tiene un punto de fusión de 202.6 °C. De manera similar, la Fig. 17 muestra una traza de DSC de escaneo rápido de esta muestra de Forma polimórfica 2 y muestra que esta forma tiene un punto de fusión de 182.6 °C.

Las reglas de Burger y Ramburger (1979) establecen que "si la forma de mayor punto de fusión tiene el calor de fusión más bajo, las dos formas suelen ser enantiotrópicas; de lo contrario, son monotrópicas". El análisis DSC de múltiples lotes confirmó que el calor de fusión de la Forma 1 fue consistentemente menor que el de la Forma 2, de lo que se puede concluir que las Formas polimórficas 1 y 2 están relacionadas enantiotrópicamente. De ello se deduce que la Forma 2 es el estado termodinámicamente más estable (tiene la energía libre de Gibbs más baja) desde el cero absoluto hasta un punto de transición, que es la temperatura en la que las Formas 1 y 2 tienen la misma estabilidad termodinámica. Por encima de esta temperatura de transición, el polimorfo de Forma 1 es el más preferido termodinámicamente hasta que se alcanza su punto de fusión.

Análisis gravimétrico térmico (TGA)

La elaboración de perfiles TGA se llevó a cabo según los métodos descritos anteriormente y se utilizó para determinar la cantidad de disolventes residuales asociados con los polimorfos del Compuesto I. Además, se utilizó para medir la cantidad de disolvente liberado al calentar de las formas solvatadas del Compuesto I. Los niveles típicos de disolvente residual encontrados en muestras de los polimorfos del Compuesto I son los siguientes.

El polimorfo de Forma 1 preparado a partir de tolueno mostró una reducción de peso de 0.3 % p/p al calentar de 25 a 120 °C, en consonancia con la pérdida de 0.1 mol de agua. La degradación fue evidente a partir de 320 °C (datos no mostrados).

La muestra de la Forma 2 derivada de EtOH exhibió una caída de peso de 0.2 % p/p de 25 a 150 °C, atribuida a la pérdida de 0.03 moles de EtOH. La degradación del Compuesto I comenzó a 320 °C. El material polimórfico de Forma 2 aislado de MIBK no reveló pérdida de peso hasta que la muestra comenzó a degradarse a 320 °C (Fig. 18). El solvato de anisol experimentó una pérdida de 13.4 % p/p cuando la muestra se calentó entre 25 y 160 °C (datos no mostrados).

Experimentos de suspensión y siembra cruzada

Se preparó una mezcla de las Formas 1 y 2 (50 % p/p) y después se suspendió una muestra de la mezcla (20 mg) en un sistema disolvente (50 vol, 1.0 ml) y se agitó a diferentes temperaturas durante 96 horas. Los sólidos se filtraron, se secaron al aire y se analizaron mediante XRPD. Los resultados obtenidos (Tabla 8) revelan que, en todos los sistemas investigados excepto uno (Entradas 10-12), la mezcla de formas polimórficas se había transformado en la Forma 2 cuando se mantuvo tanto a TA como a 50 °C. Se observó que la transformación en acetato de propilo era especialmente fácil ya que la Forma 2 también se aisló de la suspensión que se había mantenido a 5 °C (Entrada 1). En particular, se observó que la conversión se producía no solo en este disolvente y en TBME (Entradas 4-6), sino también en el disolvente aromático tolueno (Entradas 7-9) que previamente había proporcionado la Forma 1 a partir del material de entrada crudo (Forma 3). Se encontró que el material recuperado del alcohol isopropílico acuoso era una mezcla de ambas formas (Entradas 10-12).

Tabla 8: Experimentos de siembra cruzada de las Formas 1 y 2 a 5°C, 25°C y 50°C.

Entrada	Sistema disolvente	Temp (°C)	Forma polimórfica por XRPD
1	PrOAc	5	2
2		25	
3		50	
4	TBME	5	1 y 2

Entrada	Sistema disolvente	Temp (°C)	Forma polimórfica por XRPD
5	Tolueno	25	2
6		50	
7		5	1 y 2
8	IPA: Agua (5 %)	25	2
9		50	
10		5	1 y 2
11		25	
12		50	

Nota a pie de página: Todas las muestras permanecieron como suspensiones durante la maduración.

Esta observación sugiere que la solubilidad del Compuesto I es demasiado baja en este sistema disolvente para que ocurra una transformación completa o que estas condiciones son intrínsecamente menos favorables para la transformación de la Forma I en la Forma 2. Para determinar la influencia del agua en la determinación del resultado de tales experimentos de acondicionamiento, se examinó el comportamiento del polimorfo de la Forma 2 en medios orgánicos nominalmente secos y también en mezclas acuosas monofásicas con disolventes miscibles en agua.

Cuando el sólido de Forma 2 se suspendió en heptano, TBME, tolueno o en ciclohexano, como único disolvente, a 25 o 50 °C durante un período de 24 horas, no se produjo ningún cambio perceptible en la estructura cristalina. El mismo resultado se obtuvo también cuando el medio de acondicionamiento fue acetona pura (Tabla 9, Entradas 1 y 6) o agua sola (Tabla 9, Entradas 5 y 10). Sin embargo, en mezclas de acetona-agua a 50 °C durante 24 horas hubo evidencia clara de que en dos casos la Forma 2 se había transformado en la Forma 1 (Tabla 9, Entradas 7 y 9). Este resultado fue inesperado dado que este polimorfo del Compuesto I es metaestable en este rango de temperatura en comparación con la Forma 2.

Tabla 9: El destino de la Forma 2 suspendida en acetona, agua y mezclas de acetona/agua.

Entrada	Contenido de agua (% vol)	Temp (°C)	Forma polimórfica por XRPD	
			1 y 4 horas	24 horas
1	0	25	2	2
2	10		2	2
3	20		2	2
4	40		2	2
5	100		2	2
6	0	50	2	2
7	10		2	1
8	20		2	2
9	40		2	1
10	100		2	2

Para investigar la generalidad de esta transformación imprevista se llevó a cabo un experimento similar en THF y en mezclas de THF/agua. De acuerdo con los datos descritos anteriormente, se encontró que la incubación del Compuesto I como Forma polimórfica 2 en THF solo, tanto a 25 como a 50 °C durante un período de al menos 4 horas, no tuvo efecto sobre la composición polimórfica de la mezcla. Sin embargo, la adición de agua mostró un efecto pronunciado en la conversión del polimorfo de Forma 2 en Forma 1, lo que se observó que tuvo lugar tanto a temperaturas más bajas como a temperaturas más altas (Tabla 10). A 25°C, las mezclas que comprendían 10 % y 20 % de agua volvieron a la Forma 1 después de 4 y 24 horas respectivamente (Tabla 10, Entradas 2 y 3). Sorprendentemente, a 50 °C todas las mezclas de THF acuoso dieron como resultado la generación del estado cristalino de Forma 1 (Tabla 10, Entradas 6-8).

Tabla 10: El destino de la Forma 2 suspendida en THF y mezclas de THF/agua.

Entrada	Contenido de agua (% vol)	Temp (°C)	Forma polimórfica por XRPD		
			1 hora	4 horas	24 horas
1	0	25	2	2	nd
2	10		2	1	1
3	20		2	2	1
4	40		2	2	2
5	0	50	2	2	nd
6	10		1	1	1
7	20		1	1	1
8	40		1	1	1

Nota al pie: nd indica no determinado (datos no recopilados)

Es evidente que la presencia de agua induce la transición polimórfica reportada anteriormente. Sin embargo, salvo en niveles bajos, el agua es un potente antidisolvente en estos sistemas y deprime notablemente la solubilidad del fármaco en la mezcla disolvente acuosa a medida que aumenta su proporción. La consecuencia de este perfil de solubilidad es que, en agua sola o en mezclas de disolventes ricas en agua, el proceso de transformación de la Forma 2 a la Forma 1 no ocurre o es inhibido por la solubilidad marginal, particularmente a temperatura ambiente. En el caso de la acetona y especialmente del THF, el aumento de la temperatura aumenta la solubilidad de la entrada de Forma 2 y acelera su transformación al estado de Forma 1.

- 10 Un patrón similar y revelador de interconversión se derivó de un experimento en el que la Forma 2 se suspendió en varias mezclas de dioxano y agua a temperaturas ambiente y elevadas (Tabla 11). En presencia de un 10 % de agua, el polimorfo de Forma 1 es evidente en la mezcla de suspensión en una hora a 25 °C. Sin embargo, cuando el contenido de agua se eleva al 40 %, la transición se retrasa hasta tal punto que solo la muestra tomada a las 24 horas resultó estar presente como Forma 1. Este sistema ternario se comportó de manera similar a 50 °C. Sin embargo, a una temperatura más alta de 65 °C, la tasa de transformación aumenta de tal manera que la Forma 1 se generó después de 3 horas. De acuerdo con los datos obtenidos de los experimentos descritos anteriormente, aumentar la proporción de agua al 80 % en este sistema fue suficiente para detener la interconversión polimórfica a 25 °C, 50 °C e incluso a 65 °C.
- 20 Tabla 11: El destino de la Forma 2 suspendida en mezclas de 1,4-dioxano/agua.

Entrada	1,4 Dioxano % agua	Temp °C	Forma polimórfica por XRPD			
			1 hora	3 horas	6 horas	24 horas
1	10	25	1†	1†	1†	1†
2	40		2	2	2	1
3	80		2	2	2	2
4	10	50	-	-	-	1
5	40		2	2	2	1
6	80		2	2	2	2
7	40	65	2	1	1	1
8	80		2	2	2	2

† Trazo de la Forma 2 restante

- 25 La interacción de la naturaleza del disolvente orgánico, la presencia de agua adventicia y la temperatura de la suspensión (y por inferencia el tiempo de contacto) se reveló mediante la maduración del sólido de Forma 2 en MEK en el que el contenido de agua aumentó progresivamente de 1 a 8 % en volumen tanto a 25 como a 50 °C (Tabla 12). Se observó que la integridad de la Forma 2 se mantuvo durante al menos 24 horas a la temperatura más baja hasta que el contenido de agua superó el 6 %, a pesar de un aumento en la solubilidad del Compuesto I de 19 a 30 mg/ml (datos no mostrados). Una vez que la proporción de agua alcanzó el 8 %, la mezcla de suspensión regresó al polimorfo de Forma 1 aunque la solubilidad del fármaco había disminuido a 23 mg/ml.
- 30

La elevación de la temperatura a 50 °C promovió el proceso de transformación de tal manera que se observó

una interconversión polimórfica en el punto de tiempo de 24 horas para mezclas en las que el contenido de agua supera el 2 %. De estos datos se desprende claramente que las condiciones ambientales a las que se expone el Compuesto I determinan no solo cuál de los dos polimorfos, 1 o 2, se produce, sino también la velocidad a la que se produce la interconversión.

5

Tabla 12: El destino de la Forma 2 suspendida en mezclas de MEK/agua.

Contenido de agua (% vol)	Temp °C	Forma polimórfica por XRPD
1	25	2
2		2
4		2
6		2
8		1
1	50	2
2		2
4		1
6		1
8		1

Se investigó la influencia de la composición polimórfica inicial sobre el destino de las muestras mediante el equilibrio de los polimorfos individuales o una mezcla igual de ambos en MEK y THF anhidros, así como en los mismos disolventes dopados con 5 % de agua.

10

Tabla 13: Equilibrio de las Formas 1 y 2, individualmente y como mezclas, en MEK y THF solos y en presencia de agua.

15

Entrada	Disolvente	Forma por XRPD	
		Entrada	Post Equilibrio ^a
1	MEK	1	1
2		2	2
3		1 + 2	2
4	THF	1	1 ^b
5		2	2
6		1 + 2	2
7	MEK/ 5 % agua	1	1
8		2	2
9		1 + 2	1
10	THF/ 5 % agua	1	1
11		2	1
12		1 + 2	1

a. Los resultados a ambas temperaturas de equilibrio son los mismos a menos que se indique lo contrario, b. Alguna evidencia de la Forma 2 presente a 10°C.

Los resultados obtenidos (Tabla 13) revelan que en medio anhidro los dos polimorfos conservan su integridad estructural, si están presentes de forma individual (Tabla 13, Entradas 1, 2, 4 y 5). Se observó cierta evidencia menor de transformación en THF a 10 °C (Tabla 13, Entrada 4), lo que puede atribuirse a la presencia de trazas de humedad en un disolvente altamente higroscópico. Sin embargo, las mezclas de los dos polimorfos se transformaron en la Forma 2 en MEK o THF a ambas temperaturas (Tabla 13, Entradas 3 y 6), lo que revela que esta forma es preferida en condiciones anhidras o casi anhidras.

20

Los resultados observados cuando se mezcló 5 % de agua a los dos disolventes indican que el predominio de las dos formas se invirtió en estas condiciones, teniendo en cuenta los factores cinéticos. En MEK acuoso (5 %

25

de agua) los polimorfos individuales nuevamente no cambiaron durante la duración del experimento (Tabla 13, Entradas 7 y 8). Por el contrario, la mezcla polimórfica binaria se convirtió en la Forma 1 en este medio (Tabla 13, Entrada 9). En THF acuoso (5 % de agua) el predominio de la Forma 1 como el polimorfo más preferido fue especialmente evidente. En este entorno, la suspensión de la Forma 1 se mantuvo sin cambios (Tabla 13, Entrada 10), en consonancia con el resultado observado para MEK ac en las mismas condiciones.

Sin embargo, en THF dopado con 5 % de agua, tanto la suspensión que comprendía la mezcla binaria, como la compuesta únicamente por el polimorfo de Forma 2, se transformaron en suspensiones que contenían únicamente la Forma 1 (Tabla 13, Entradas 11 y 12). Estos datos son particularmente sorprendentes ya que la presencia de agua, como componente menor en estas mezclas, anula la jerarquía de estabilidad, que favorece a la Forma 2 cuando está ausente. Este resultado es inesperado dado que se revela, en otra parte de este documento, evidencia de que el polimorfo de Forma 2 es el enantiótropo termodinámicamente más estable del Compuesto I en el rango de temperatura (5 a 10 °C) de este experimento y por debajo de una temperatura de al menos 70 °C.

Perfil farmacocinético comparativo de las Formas 1 y 2 mediante administración por inhalación a ratas.

Se realizó un estudio para comparar la evolución temporal de las concentraciones de fármaco sin cambios en el plasma después de una dosis de inhalación única de la Forma 1 o la Forma 2 en ratas.

La rata macho RccHanTM:WIST se consideró una especie y cepa adecuadas debido a su aceptación por parte de las agencias reguladoras. Se eligió la vía de administración por inhalación para simular las condiciones de administración clínica. Se utilizaron en el estudio un total de 14 animales (seis animales por grupo y dos animales de repuesto), de 10 a 12 semanas de edad y con un peso de 306 a 341 g al inicio del tratamiento farmacológico. El tratamiento consistió en una única exposición por inhalación de 2 horas con una formulación nebulizada de la Forma 1 micronizada (98.94 % de pureza) a los animales del Grupo 1 o de la Forma 2 micronizada (98.10 % de pureza) a los animales del Grupo 2. Se determinaron los parámetros farmacocinéticos de las dos formas polimórficas para respaldar estudios de farmacología y toxicología en animales y estudios clínicos en humanos.

Las suspensiones se fabricaron preparando primero una solución concentrada de los tensioactivos (solución humectante) y una solución salina. Estos después se utilizaron para construir el vehículo. Se preparó una solución salina de la siguiente manera. Se pesó cloruro de sodio (50 g) en un matraz volumétrico de 5000 ml, se completó con agua, se agitó con un agitador magnético durante 10 minutos y después se pasó a través de un filtro de membrana de 0.22 µm. La solución humectante se preparó de la siguiente manera. Se pesó Lipoid S100 (10 g) en una botella Duran de 2000 ml, se añadieron 1000 g de propilenglicol y la mezcla se agitó en un mezclador Silverson equipado con un tamiz de alta cizalla de 1" durante 1 minuto a 8000 rpm y después se pasó a través de un filtro de membrana de 0.22 µm. El vehículo fue preparado de la siguiente manera. La solución humectante (500 ml) se transfirió a un matraz volumétrico de 5000 ml, se completó con solución salina, se agitó con un agitador magnético durante 10 min y después se pasó a través de un filtro de membrana de 0.22 µm.

Se preparó un lote de 1000 ml de suspensión de 4 mg/ml del Compuesto I de la siguiente manera. El Compuesto I (4.00 g) se pesó en un vaso de precipitados pequeño, se añadieron 100 ml de solución humectante y la mezcla se agitó con un mezclador Silverson equipado con un tamiz de alta cizalla de 1" durante 5 minutos a 8000 rpm. Después, la mezcla se transfirió a una botella Duran de 5000 ml usando solución salina y se agitó usando un mezclador Silverson equipado con un tamiz de alta cizalla de 1" durante 5 minutos a 8000 rpm, después de lo cual se almacenó entre 2 y 8 °C. Se prepararon suspensiones de concentración mayor o menor (rango de 0.2 a 20 mg/ml) ajustando el peso de entrada de API según fuera apropiado para suspensiones de mayor mg/ml o diluyéndolo aún más con vehículo para suspensiones de menor mg/ml. Todas las formulaciones se agitaron magnéticamente durante al menos 30 minutos y se evaluaron visualmente antes de su administración.

Las ratas se aclimataron al procedimiento de dosificación por inhalación durante tres días consecutivos antes de la dosificación. Los animales fueron tratados con la sustancia de prueba mediante administración por inhalación de aerosol durante 120 minutos a través de la exposición únicamente por el hocico, a una concentración de aerosol objetivo de 25.2 µg/l. Las estimaciones de la dosis inhalada a partir de una duración de exposición de 2 horas y un peso corporal supuesto de 300 g se calcularon utilizando la fórmula:

$$\text{Dosis (mg/kg/día)} = \frac{C \times \text{RMV} \times D}{\text{BW} \times 10}$$

donde: C es la concentración de aerosol (µg/l); RMV es el volumen respiratorio por minuto (l/min); D es la duración de la exposición (120 minutos) y BW es el peso corporal medio del grupo (kg). A continuación se presentan las concentraciones medias de aerosol alcanzadas, la dosis inhalada estimada y los datos resumidos

de la distribución del tamaño de partículas (PSD). (Tabla 14).

Tabla 14: Concentraciones de aerosol en la cámara y dosis inhaladas estimadas del Compuesto I obtenidas durante la administración por inhalación de aerosol.

5

Grupo No	Concentración media de aerosol (µg/l)	Dosis inhalada estimada (mg/kg)	MMAD (µm)	σg
1	28.8	2.48	2.3	1.60
2	32.6	2.82	2.2	1.70

Notas a pie de página: MMAD. Diámetro aerodinámico mediano de masa; σg. Desviación geométrica estándar

Como se muestra en la Tabla 14, se seleccionaron concentraciones de aerosol objetivo de 25.2 µg/l para administrar dosis nominales de 2.2 mg/kg. Se logró una concentración real de aerosol de 28.8 µg/l de Forma 1, proporcionando una dosis inhalada estimada de aproximadamente 2.48 mg/kg a los animales del Grupo 1. La concentración de aerosol alcanzada para la Forma 2 fue de 32.6 µg/l, lo que supuso una dosis inhalada estimada de aproximadamente 2.82 mg/kg para los animales del Grupo 2.

10

Las concentraciones de aerosol alcanzadas estuvieron cerca del valor objetivo y las dosis inhaladas estimadas fueron 113 % y 128 % del objetivo para los Grupos 1 y 2 respectivamente. La distribución del tamaño de partículas confirmó que los aerosoles generados eran respirables para la rata.

15

Se tomaron muestras de sangre venosa (0.3 ml) de la vena de la cola de los animales y se recolectaron muestras después de la dosificación (2 horas desde el inicio de la administración de la dosis) y posteriormente en los momentos 3, 4, 6, 8, 12, 24, 28, 32, 36 y 48 horas después del tratamiento. Las muestras se trataron con anticoagulante K₂EDTA, se centrifugaron a 2000 g durante 10 minutos a 4 °C y después se almacenaron congeladas (-20 °C ±10) mientras se esperaba el análisis. Posteriormente, las muestras de plasma se analizaron para el Compuesto I mediante LGC utilizando un método LC-MS/MS validado.

20

Procedimientos de extracción y análisis

25

Las muestras de plasma de rata se mezclaron en un vórtex y se extrajo una alícuota de 25 µl y se trataron con 12.5 µl de solución de trabajo estándar interna (que comprendía 20 ng/ml del Compuesto 2) y 25 µl de solución ac de formiato de amonio 10 mM. La mezcla se agitó en un vórtex durante 5 min a 1400 rpm, después de lo cual se añadieron 300 µl de MTBE y después la muestra se mezcló en un tambor durante 10 min. Después de la centrifugación a 3500 g durante 5 min, se retiró una alícuota de 150 µl de la capa orgánica y se evaporó hasta sequedad bajo nitrógeno a 50 °C durante aproximadamente 15 min. El residuo se reconstituyó en 100 µl de una mezcla de acetonitrilo y agua (50:50) que contenía ácido fórmico al 0.1 % y se mezcló en un vórtex durante 5 min a 1400 rpm. Las muestras preparadas de esta manera se analizaron después utilizando un LC-MS/MS validado para determinar la concentración plasmática original del Compuesto I.

30

35

El sistema LC comprendía un Acquity Binary Solvent Manager equipado con una columna analítica Acquity UPLC C8 (50 x 2.1 mm), esta última mantenida a una temperatura nominal de 40 °C. Las muestras se analizaron durante un tiempo de ejecución de 2.3 minutos mediante elución en gradiente (Tabla 15) utilizando ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo (fase móvil A) y ácido fórmico al 0.1 % en agua (fase móvil B) a un caudal de 0.8 ml/min.

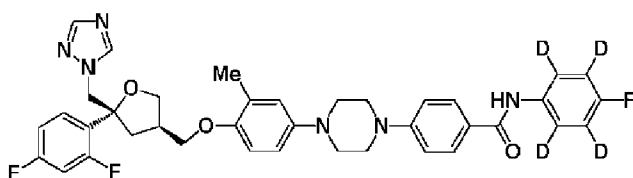
40

Tabla 15: Perfil de gradiente de eluyente de HPLC.

Tiempo (min)	% A	% B
0	30	70
0.2	30	70
1.4	95	5
1.9	95	5
2.0	30	70
2.3	30	70

El Compuesto I se utilizó como estándar de referencia y el derivado tetra deuterado de Compuesto 2 se empleó como estándar interno. El compuesto 2 es: 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-yl)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofuran-3-yl)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-yl)-N-(4-fluorofenil-2,3,5,6-d₄)benzamida.

45



Compuesto 2

5 Todo el control del instrumento, la recolección de datos, la integración del área del pico y el almacenamiento se realizaron utilizando MassLynx (versión 4.1). La respuesta del espectrómetro de masas (relación del área de pico del analito con el estándar interno) de cada estándar de calibración se calculó mediante Watson LIMS (versión 7.2) y se representó frente a la concentración nominal (preparada). Se utilizó un análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados ponderado ($1/x^2$) para calcular una ecuación de la curva de calibración. Las concentraciones del Compuesto 1 en las muestras se calcularon retrospectivamente a partir de las curvas de calibración hasta 3 cifras significativas. Para los cálculos posteriores se utilizó Microsoft Excel 2010. Todos los porcentajes se presentan con un decimal.

15 El análisis farmacocinético se realizó en Phoenix WinNonlin. Se determinaron las concentraciones plasmáticas medias máximas (C_{max}) y sus tiempos de aparición (T_{max}). Las áreas bajo las curvas de concentración plasmática media-tiempo hasta el momento de la última muestra cuantificable (AUCt) se estimaron mediante la regla trapezoidal lineal. No se observaron efectos adversos de la sustancia activa tras su administración y se tomaron muestras de sangre seriadas hasta 48 horas después del inicio de la exposición a la inhalación.

20 Los parámetros farmacocinéticos medios para los dos polimorfos después de su administración por inhalación a ratas se resumen en la Tabla 16 y se describen con más detalle a continuación.

Tabla 16: Parámetros farmacocinéticos medios de las Formas 1 y 2 del Compuesto 1 tras su administración por inhalación a ratas.

Parámetros farmacocinéticos	Media	
	Forma 1	Forma 2
Dosis nominal (mg/kg)	2.2	2.2
Dosis inhalada estimada (mg/kg)	2.48	2.82
C_{max} (ng/ml)	4.95	8.59
T_{max} (horas)	6	6
AUCt (ng.h/ml) ^a	122	230
AUCt dosis normalizada (ng.h/ml) ^b	122	202
Biodisponibilidad relativa	Referencia (100 %)	166 %

Notas a pie de página: a. Ambos valores de AUCt son de 0 a 48 horas; b. AUCt de la Forma 2 normalizada a la dosis alcanzada para la Forma 1 (2.48 mg/kg)

25 Concentraciones en plasma

30 Las concentraciones plasmáticas del fármaco después de la administración por inhalación de las Formas 1 y 2 permanecieron cuantificables hasta 48 horas después del inicio de la exposición para ambos grupos y se presentan a continuación (Tablas 17 y 18 respectivamente). Los perfiles de concentración plasmática media-tiempo derivados de ello se representan gráficamente (Figs. 19 y 20 para las Formas 1 y 2 respectivamente).

Tabla 17: Concentraciones plasmáticas de fármaco tras la administración por inhalación de la Forma 1 a ratas macho a un nivel de dosis nominal de 2.2 mg/kg.

Tiempo horas ^a	Concentración de fármaco (ng/ml) en animales por No.						Media	sd
	1	2	3	4	5	6		
IAD	1.16	0.826	1.35	-	-	-	1.11	0.27
3	-	-	-	5.31	4.35	2.41	4.02	1.48
4	4.73	6.32	3.78	-	-	-	4.94	1.28

Tiempo horas ^a	Concentración de fármaco (ng/ml) en animales por No.						Media	sd
	1	2	3	4	5	6		
6	-	-	-	5.38	3.97	5.49	4.95	0.85
8	3.28	NS	2.88	-	-	-	3.08	-
12	-	-	-	4.05	NS	3.64	3.85	-
24	2.47	3.00	3.85	2.75	2.02	3.03	2.85	0.62
28	1.85	2.22	3.92	1.87	NS	2.04	2.38	0.87
32	1.36	1.85	2.79	1.66	2.20	1.32	1.86	0.56
36	1.21	1.36	1.74	1.70	1.01	1.80	1.47	0.32
48	1.10	1.45	1.28	1.26	NS	1.19	1.26	0.13

Notas a pie de página: a. desde el inicio de la exposición por inhalación; IAD: inmediatamente después de la dosificación; NS: sin muestra.

Tabla 18: Concentraciones plasmáticas de fármaco tras la administración por inhalación de la Forma 2 a ratas macho a un nivel de dosis nominal de 2.2 mg/kg.

Tiempo horas ^a	Concentración de fármaco (ng/ml) en animales por No.						Media	sd
	1	2	3	4	5	6		
IAD	2.24	2.59	3.15	-	-	-	2.66	0.46
3	-	-	-	8.95	5.40	6.01	6.79	1.90
4	7.53	9.31	8.88	-	-	-	8.57	0.93
6	-	-	-	11.8	5.38	NS	8.59	-
8	6.85	5.90	6.79	-	-	-	6.51	0.53
12	-	-	-	10.7	4.57	5.84	7.04	3.24
24	11.5	3.24	4.22	5.26	3.58	3.24	5.17	3.19
28	8.15	3.17	3.32	4.15	2.94	2.93	4.11	2.03
32	7.72	3.50	3.33	4.05	2.75	2.51	3.98	1.91
36	6.28	2.43	2.54	3.59	2.49	2.43	3.29	1.53
48	3.78	1.79	1.89	2.52	1.83	1.91	2.29	0.78

Notas a pie de página: a. desde el inicio de la exposición por inhalación; IAD: inmediatamente después de la dosificación; NS: sin muestra.

5

Las concentraciones plasmáticas medias de la Forma 1 (Grupo 1) aumentaron hasta un máximo a las 6 horas después del inicio de la exposición y después disminuyeron de manera constante hasta el último momento de muestreo de 48 horas después del inicio de la exposición. La C_{max} media fue de 4.95 ng/ml y el valor AUC_t medio fue de 122 ng.h/ml para la Forma 1. Las concentraciones plasmáticas medias de la Forma 2 aumentaron hasta un máximo 6 horas después del inicio de la exposición y después disminuyeron de manera constante hasta 48 horas después del inicio de la exposición. La C_{max} media fue 8.59 ng/ml y el valor AUC_t medio fue de 230 ng.h/ml para la Forma 2. Ambos polimorfos tuvieron valores T_{max} similares pero las concentraciones plasmáticas medias individuales fueron de mayor magnitud en los 11 momentos de muestreo en el grupo de ratas dosificadas con la Forma 2, en comparación con los datos para la Forma 1. En consecuencia, los valores C_{max} y AUC_t normalizados por dosis fueron 1.5 y 1.7 veces mayores respectivamente para la Forma 2.

Biodisponibilidad relativa

20 La biodisponibilidad relativa (RF) de los dos polimorfos después de la administración por inhalación se calculó utilizando la fórmula:

$$RF = AUC_t (\text{Forma 2}) / AUC_t (\text{Forma 1}) \times \text{dosis alcanzada (Forma 1)} / \text{dosis alcanzada (Forma 2)}$$

25 Los valores de AUC_t normalizados de dosis para el polimorfo de Forma 2 (Tabla 16) indican una biodisponibilidad relativa del 166 % en relación con la Forma 1 después de la administración inhalada a ratas.

Este estudio revela que ambas formas cristalinas estaban disponibles sistémicamente a través de la vía de inhalación y que la exposición persistió durante un período de hasta 48 horas después del inicio de la administración. Sin embargo, es notable que la Forma 2 (Fig. 20) arrojó concentraciones sistémicas del fármaco consistentemente más altas a lo largo del perfil farmacocinético de 48 horas que la Forma 1 (Fig. 19). Los valores de C_{max} y AUC_t normalizados de la dosis para el polimorfo de Forma 2 son aproximadamente 1.5 y 1.7 veces mayores, respectivamente, que para la Forma 1.

En vista de su biodisponibilidad superior, se puede esperar que el polimorfo de Forma 2 tenga utilidad en el tratamiento de micosis en las que se requiere una rápida disolución y amplificación de la concentración del fármaco en el sitio de acción terapéutica. En una suspensión acuosa, parece que se evita que la Forma 2 pase a la Forma 1, aunque se cree que la Forma 2 es metaestable en este entorno, como se explicó anteriormente. Por lo tanto, el polimorfo de Forma 2 es especialmente adecuado para la administración por inhalación como suspensión acuosa.

También se puede esperar que la Forma 1 tenga utilidad en el tratamiento de micosis como lo ejemplifica la biodisponibilidad sistémica de esta forma polimórfica. Además, se puede esperar que el polimorfo de Forma 1 tenga utilidad en formulaciones distintas de las suspensiones acuosas, como cremas y pesarios. Esta administración puede tener utilidad en la prevención de micosis en individuos que corren el riesgo de infectarse con micosis, como las que afectan la piel y otros sitios que pueden administrarse por vía tópica.

Resumen de datos

La solicitud divulga dos nuevas formas polimórficas del Compuesto I: Forma 1 y Forma 2. Ambas formas tienen buena estabilidad térmica como lo evidencian sus altos puntos de fusión (véase Tabla 7). Además, ambos polimorfos tienen una biodisponibilidad aceptable cuando se administran como una suspensión acuosa por inhalación, aunque la de la Forma 2 es notablemente mayor que la de la Forma 1 (véanse los datos de biodisponibilidad relativa presentados anteriormente). Ambas formas cristalinas son susceptibles de micronización para proporcionar distribuciones de tamaño de partícula compatibles con la administración por inhalación (véase Figs. 10 y 13). Se espera que el polimorfo de Forma 1 sea particularmente adecuado para su uso en formulaciones distintas de suspensiones acuosas. El polimorfo de Forma 2 es particularmente adecuado para su uso en formulaciones de suspensión acuosa como aquellas destinadas a la administración por inhalación.

A lo largo de la memoria descriptiva, y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", deben entenderse como que implican la inclusión de un número entero, paso, grupo de números enteros o grupo de pasos indicados, pero no la exclusión de cualquier otro número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de pasos.

La invención abarca todas las combinaciones de grupos preferidos y más preferidos y grupos adecuados y más adecuados y realizaciones de los grupos enumerados anteriormente.

Referencias

Burger A. y Ramburger R. On the polymorphism of pharmaceuticals and other molecular crystals. I Theory of Thermodynamic Rules. *Microchim. Acta*, 1979, 72, 259-271.

Sunose M., Colley T.C., Ito K., Rapeport G. y Strong P. WO 2016/087878, 9 de junio de 2016; PCT/GB2015/053731 A1, 4 de diciembre de 2015.

Colley T.C., Ito K., Rapeport G., Strong P., Murray P.J., Onions S.T. y Sunose M., WO 2016/087880 A1, 9 de junio de 2016; PCT/GB2015/053733, 4 de diciembre de 2015.

Colley T., Sehra G., Daly L., Kimura G., Nakaoki T., Nishimoto Y., Kizawa Y., Strong P., Rapeport G. e Ito K. Antifungal synergy of a topical triazole, PC945, with a systemic triazole against respiratory *Aspergillus fumigatus* infection. *Nature Scientific Reports*, 2019, 9:9482.

Colley T., Alanio A., Kelly, S.L., Sehra G., Kizawa Y., Warrilow A.G.S., Parker J.E., Kelly D.E., Kimura G., Anderson-Dring L., Nakaoki T., Sunose M., Onions S., Crepin D., Lagasse F., Critall M., Shannon J., Cooke M., Bretagne S., King-Underwood J., Murray J., Ito K., Strong P., Rapeport G. In Vitro and In Vivo Antifungal Profile of a Novel and Long-Acting Inhaled Azole on *Aspergillus fumigatus* Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2017, 61:e02280-16.

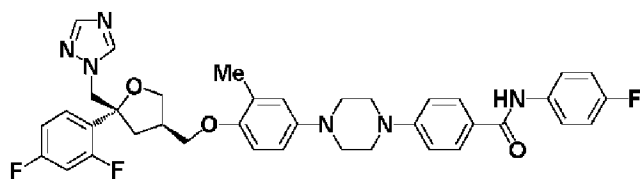
Shivaprakash M., Rudramurthy S.M., Colley T., Abdolrasouli A., Ashman J., Dhaliwal M., Kaur H., Armstrong-James D., Strong P., Rapeport G., Schelenz S., Ito K. y Chakrabarti A. In vitro antifungal activity of a novel

topical triazole PC945 against emerging yeast *Candida auris*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2019, 74(10); 2943-2949.

- 5 Kimura G., Nakaoki T., Colley T., Rapeport G., Strong P., Ito K., Kizawa Y. In vivo Biomarker Analysis of the Effects of Intranasally Dosed PC945, a Novel Antifungal Triazole, on *Aspergillus fumigatus* Infection in immunocompromised mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2017, 61:e00124-17.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I):



Compuesto I

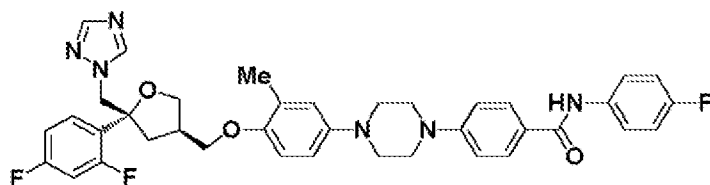
que es:

4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-yl)methyl)-5-(2,4-difluorophenyl)tetrahydrofuran-3-yl)methoxy)-3-metilfenil)piperazin-1-il)-N-(4-fluorofenil)benzamida en una forma cristalina en donde la forma cristalina es la Forma polimórfica 1, y en donde la forma cristalina tiene:

(a) un patrón de difracción de rayos X en polvo que contiene siete picos a (± 0.2) 7.0, 7.4, 7.9, 18.2, 19.7, 20.8 y 24.7 grados 2-theta medidos utilizando radiación Cu K α ; y/o

(b) dimensiones de celda unitaria de 16.80 Å, 23.58 Å y 25.58 Å, y ángulos α , β y γ de 90°.

2. Un compuesto de fórmula (I):



Compuesto I

que es:

4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-yl)methyl)-5-(2,4-difluorophenyl)tetrahydrofuran-3-yl)methoxy)-3-metilfenil)piperazin-1-il)-N-(4-fluorofenil)benzamida en una forma cristalina en donde la forma cristalina es la Forma polimórfica 2, y en donde la forma cristalina tiene:

(a) un patrón de difracción de rayos X en polvo que contiene seis picos a (± 0.2) 10.8, 17.0, 20.3, 22.7, 23.9 y 24.3 grados 2-theta medidos utilizando radiación Cu K α ; y/o

(b) dimensiones de celda unitaria de 16.81 Å, 5.65 Å y 35.56 Å, y un ángulo α de 90°, un ángulo β de 101.54° y un ángulo γ de 90°.

3. La forma cristalina del compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para su uso como un producto farmacéutico en combinación con un segundo ingrediente activo o más.

4. Una composición farmacéutica que comprende la forma cristalina del compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en donde la forma cristalina del compuesto de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 está en forma de partículas suspendida en un medio acuoso.

6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, en donde el medio acuoso comprende al menos 95 % de agua, preferiblemente al menos 99 % de agua.

7. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el medio acuoso comprende un agente de ajuste de tonicidad cargado, que es preferiblemente cloruro de sodio.

8. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde el medio acuoso comprende:

- (i) un codisolvente, preferiblemente propilenglicol; y/o
 - (ii) un tensioactivo, preferiblemente Lipoid S100.
- 5 9. La composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que comprende un segundo ingrediente activo o más.
- 10 10. La forma cristalina del compuesto para su uso según la reivindicación 3, en donde el segundo ingrediente activo o más se selecciona del grupo que consiste en: agentes antifúngicos (preferiblemente voriconazol o posaconazol), anfotericina B, una equinocandina (preferiblemente caspofungina), un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA reductasa (preferiblemente lovastatina, pravastatina o fluvastatina), candidicina, filipina, hamicina, natamicina, nistatina, rimocidina, bifonazol, butoconazol, clotrimazol, econazol, fenticonazol, isoconazol, ketoconazol, luliconazol, miconazol, omoconazol, oxiconazol, sertaconazol, sulconazol, tioconazol, albaconazol, efinaconazol, epoxiconazol, fluconazol, isavuconazol, itraconazol, propiconazol, ravuconazol,
- 15 11. La forma cristalina del compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 para su uso como medicamento.
- 20 12. La forma cristalina del compuesto según la reivindicación 1 o reivindicación 2, o la composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9 para su uso en el tratamiento de micosis o para uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a micosis.
- 25 13. La forma cristalina del compuesto o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en donde la micosis es causada por:
- (i) *Aspergillus spp.*;
 - 30 (ii) *Aspergillus fumigatus* o *Aspergillus pullulans*, preferiblemente *Aspergillus fumigatus*;
 - (iii) un *Aspergillus fumigatus* resistente a los azoles; o
 - (iv) *Candida spp.*, preferiblemente *Candida albicans* o *Candida glabrata*; *Rhizopus spp.*, preferiblemente *Rhizopus oryzae*; *Cryptococcus spp.*, preferiblemente *Cryptococcus neoformans*; *Chaetomium spp.*, preferiblemente *Chaetomium globosum*; *Penicillium spp.*, preferiblemente *Penicillium chrysogenum* o *Trichophyton spp.*, preferiblemente *Trichophyton rubrum*.
- 35 14. Un proceso para preparar el Compuesto I en forma cristalina, en donde la forma cristalina es la Forma polimórfica 2 según la reivindicación 2, que comprende los pasos de cristalizar el Compuesto I como Forma polimórfica 2 a partir de una solución del Compuesto I en un disolvente orgánico nominalmente seco en donde el disolvente es:
- (i) seleccionado del grupo que consiste en MIBK, THF, PrOAc, EtOH, DME, MeOH, MeCN, MeNO₂, n-heptano, Et₂O, IPA, MEK, acetona, TBME e i-BuOH;
 - 45 (ii) una mezcla que comprende dos o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en MIBK, THF, PrOAc, EtOH, DME, MeOH, MeCN, MeNO₂, n-heptano, Et₂O, IPA, MEK, acetona, TBME e i-BuOH;
 - 50 (iii) una mezcla de THF y tolueno; o
 - (iv) una mezcla de THF y TBME.
15. Un proceso según la reivindicación 14, en donde el disolvente es una mezcla de THF y TBME.

Figura 1

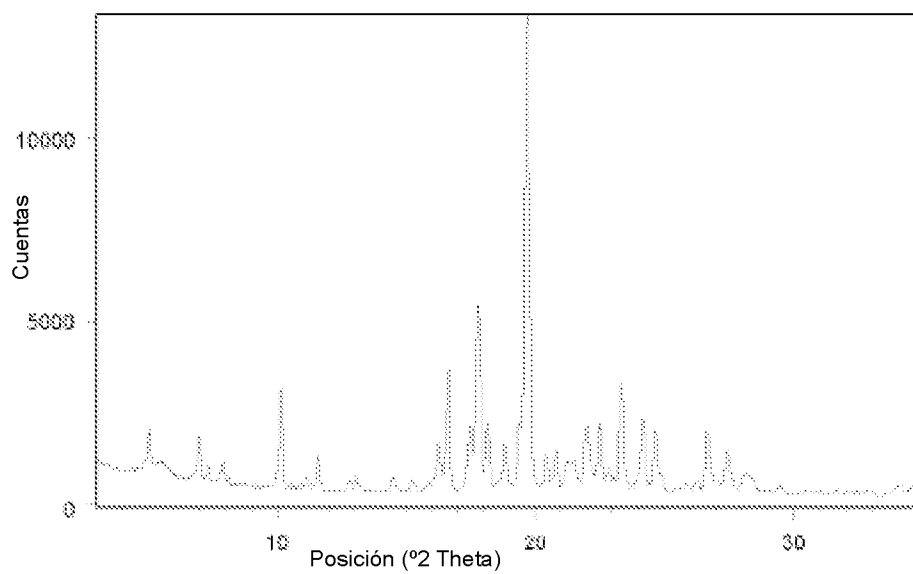


Figura 2

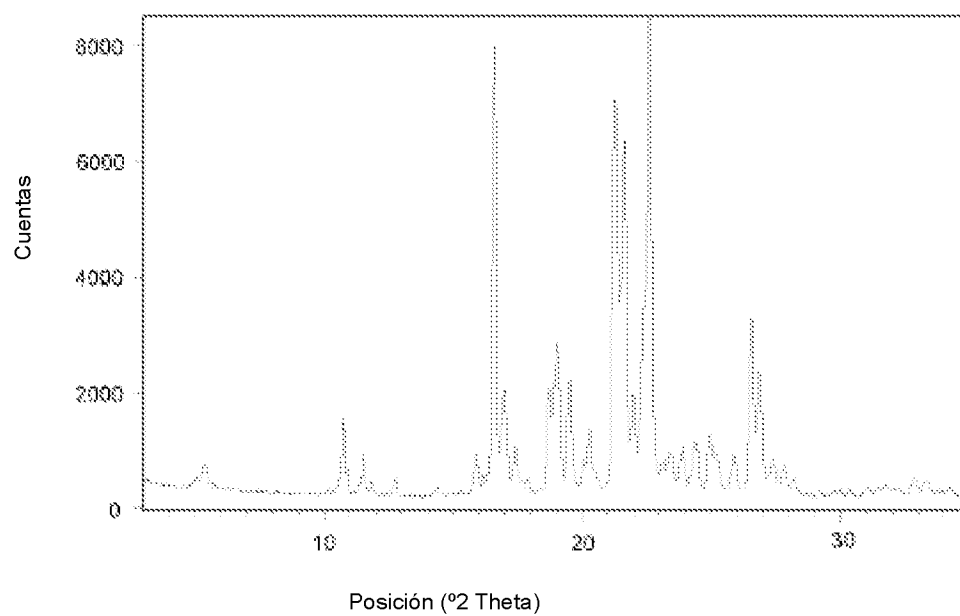


Figura 3

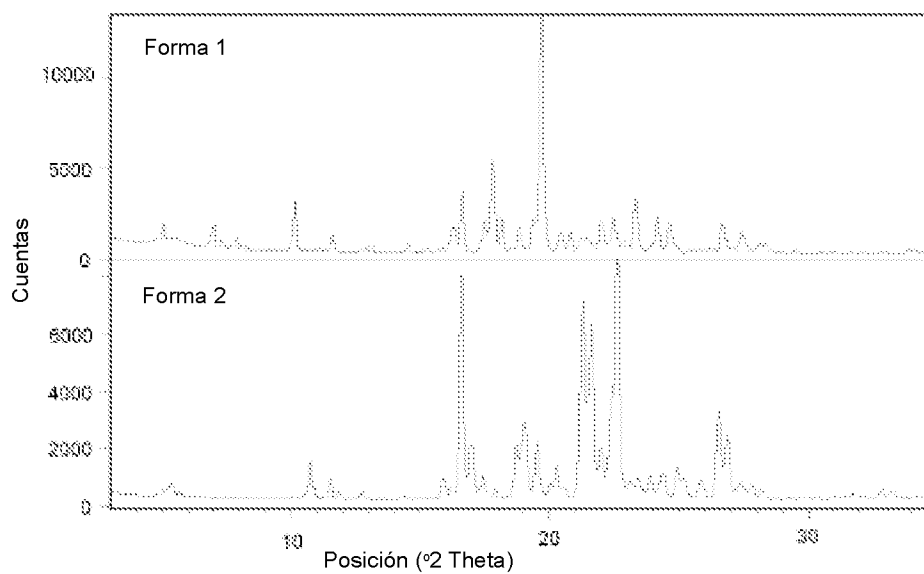


Figura 4

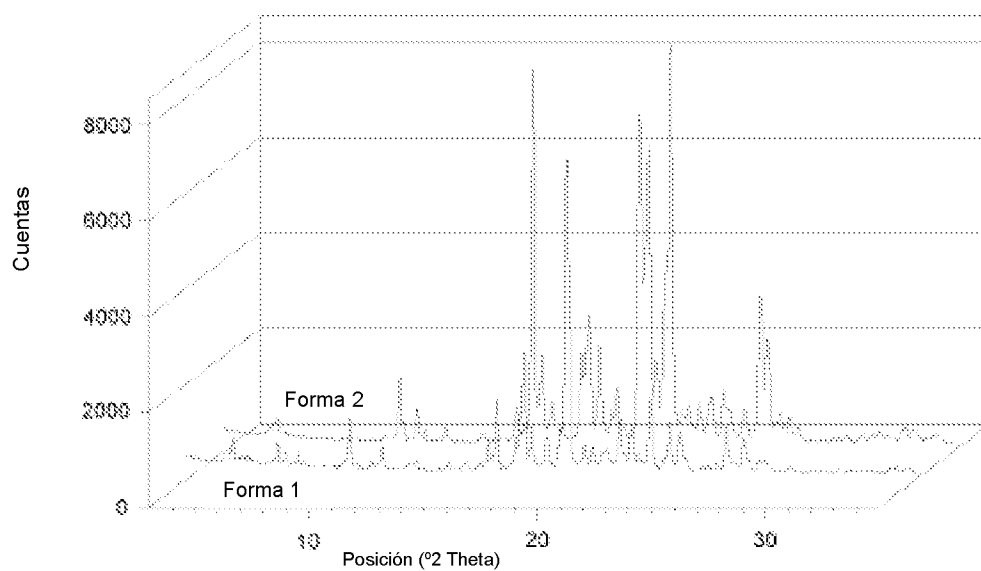


Figura 5

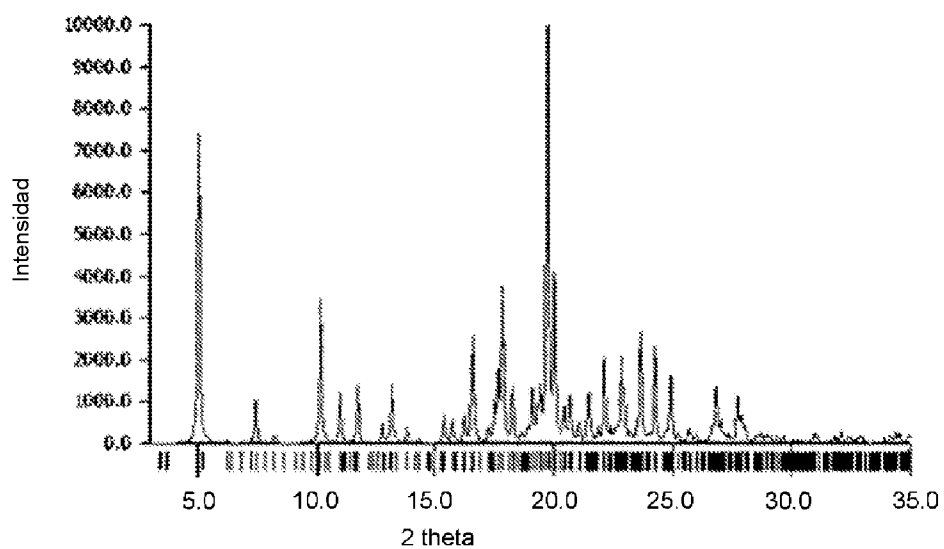


Figura 6

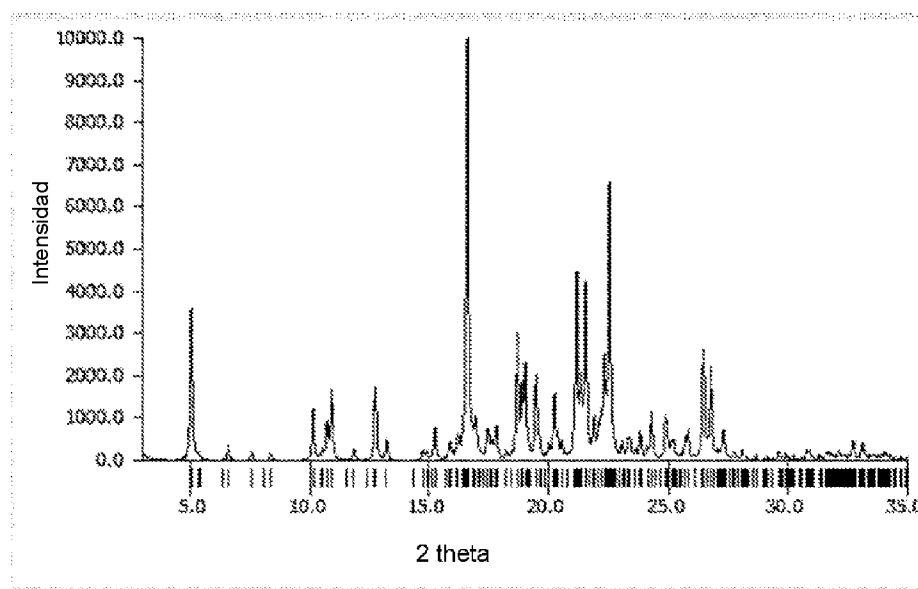


Figura 7

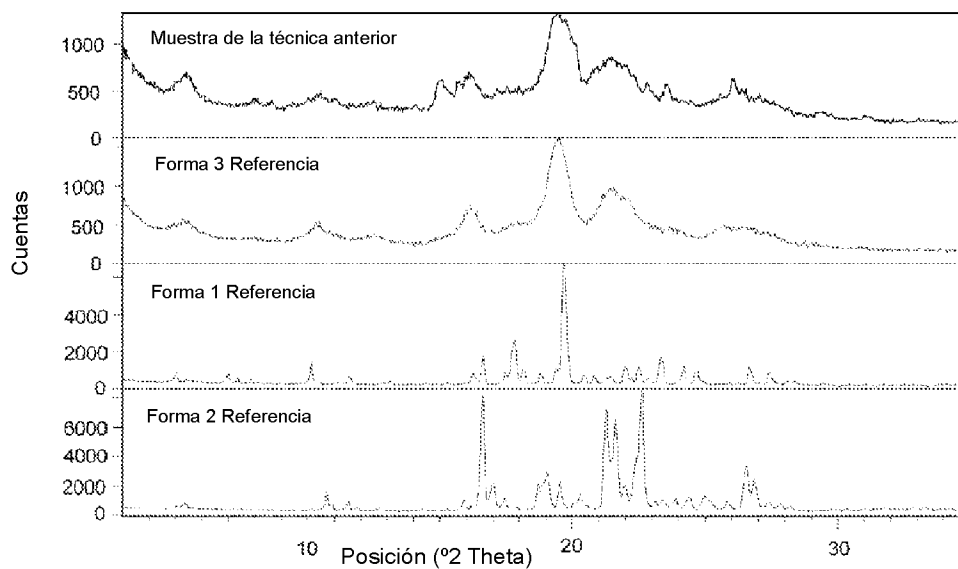


Figura 8

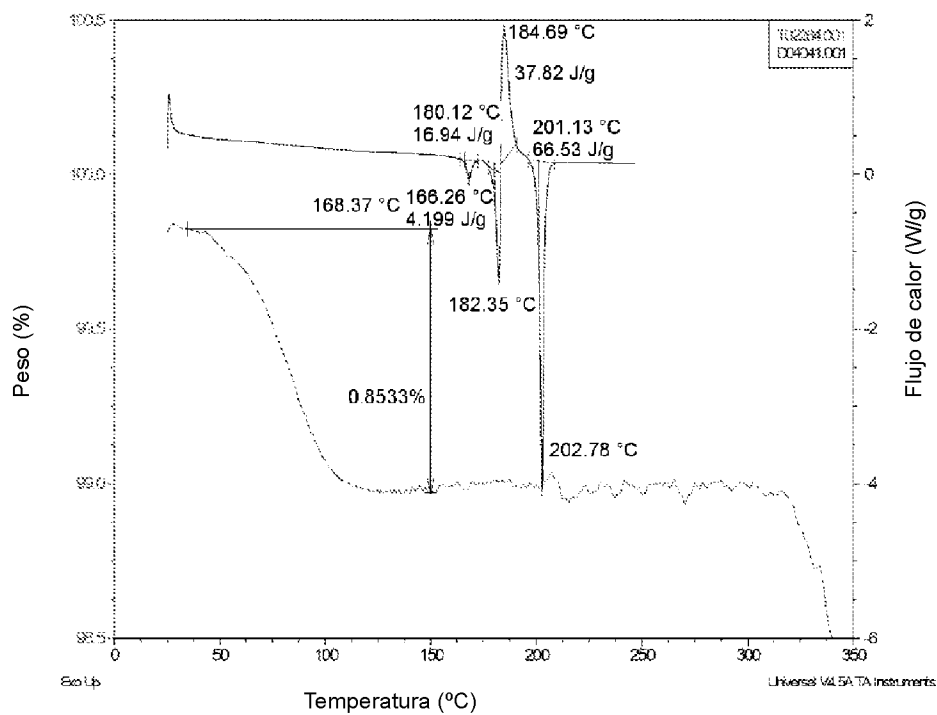


Figura 9

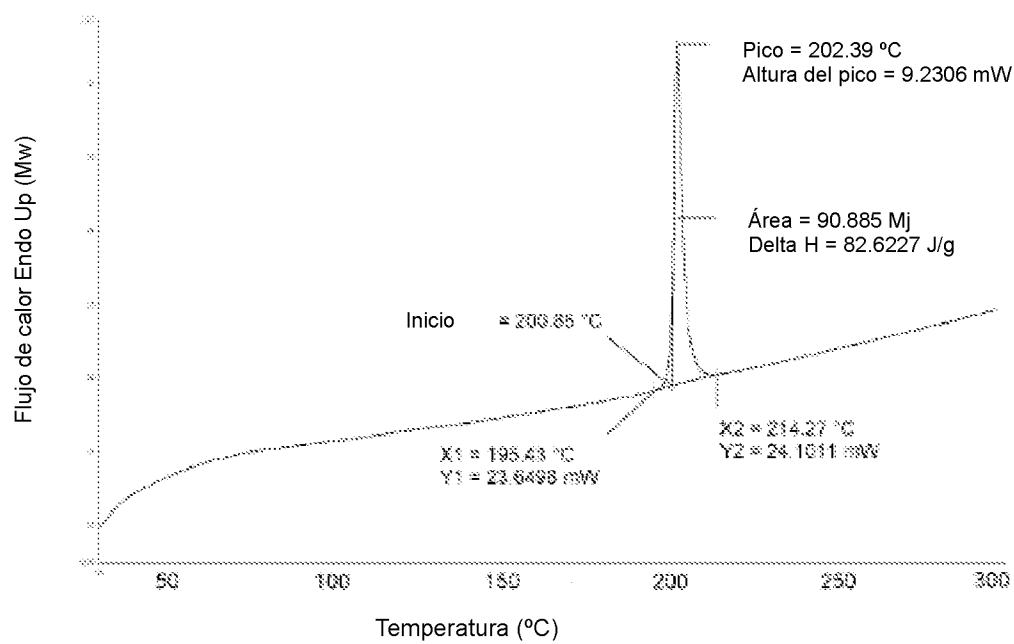


Figura 10

Cuentas

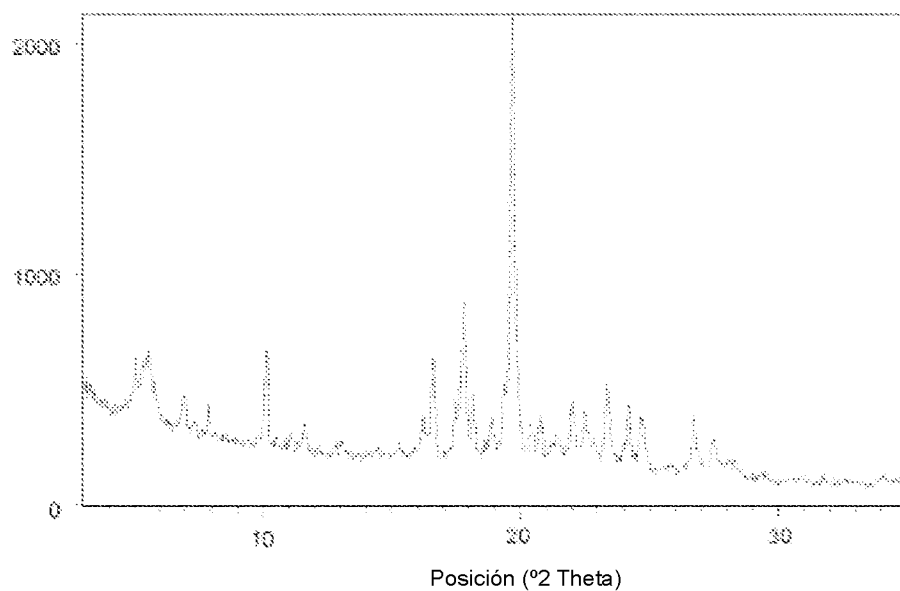


Figura 11

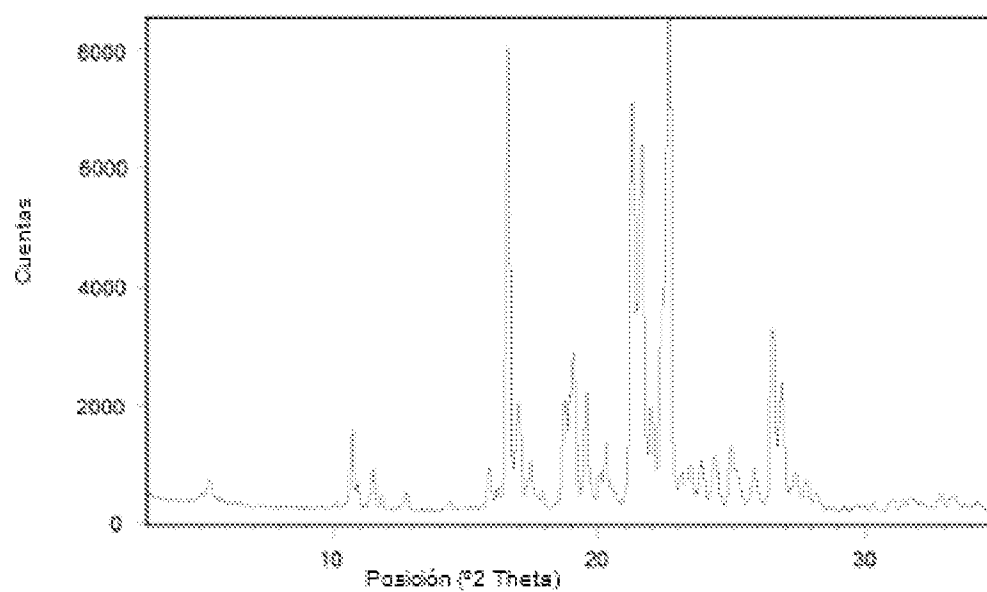


Figura 12

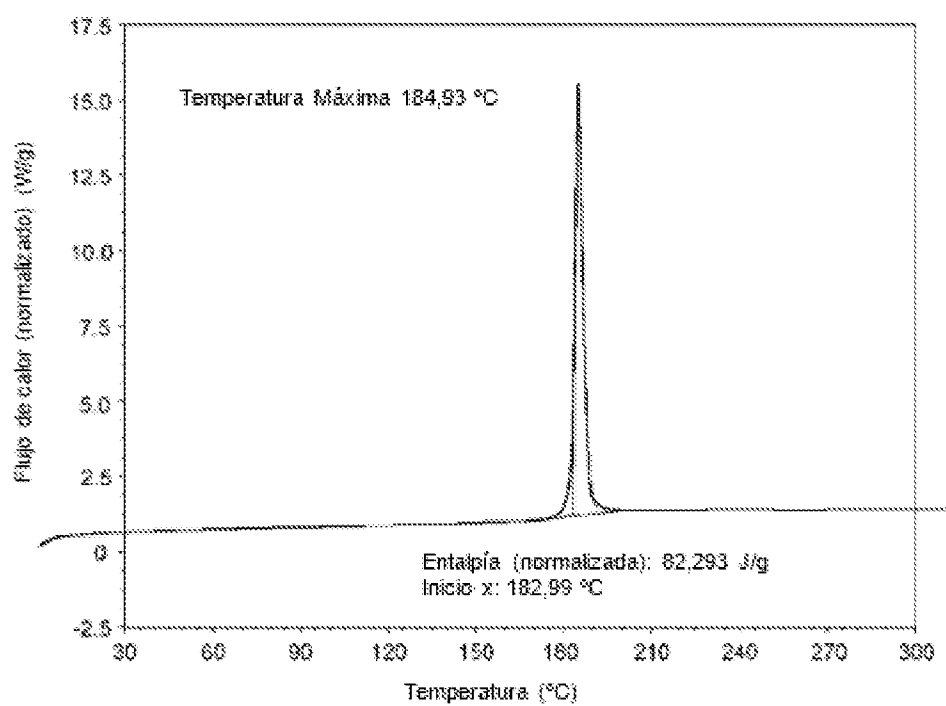


Figura 13

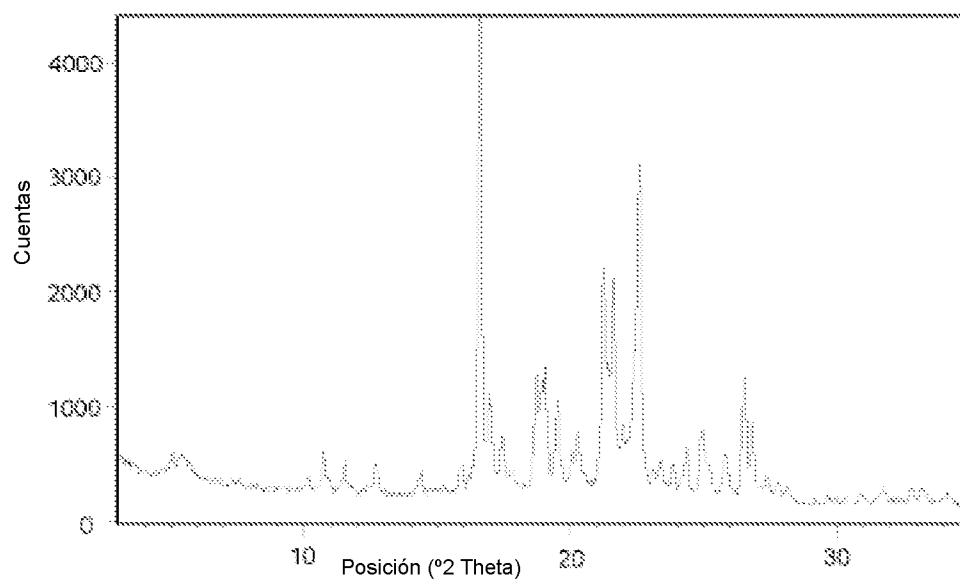


Figura 14

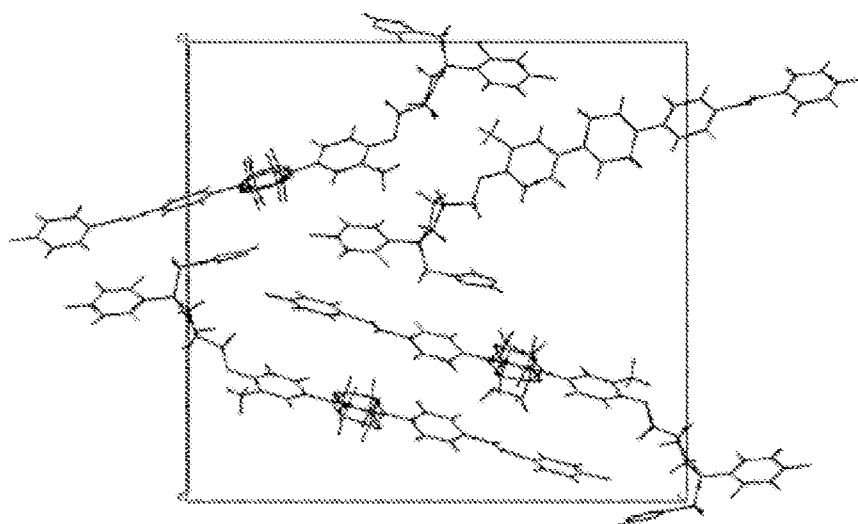


Figura 15

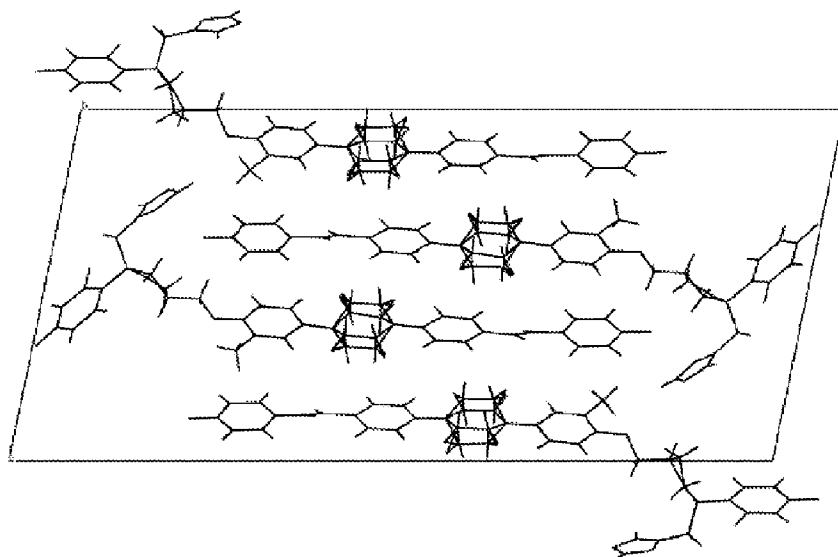


Figura 16

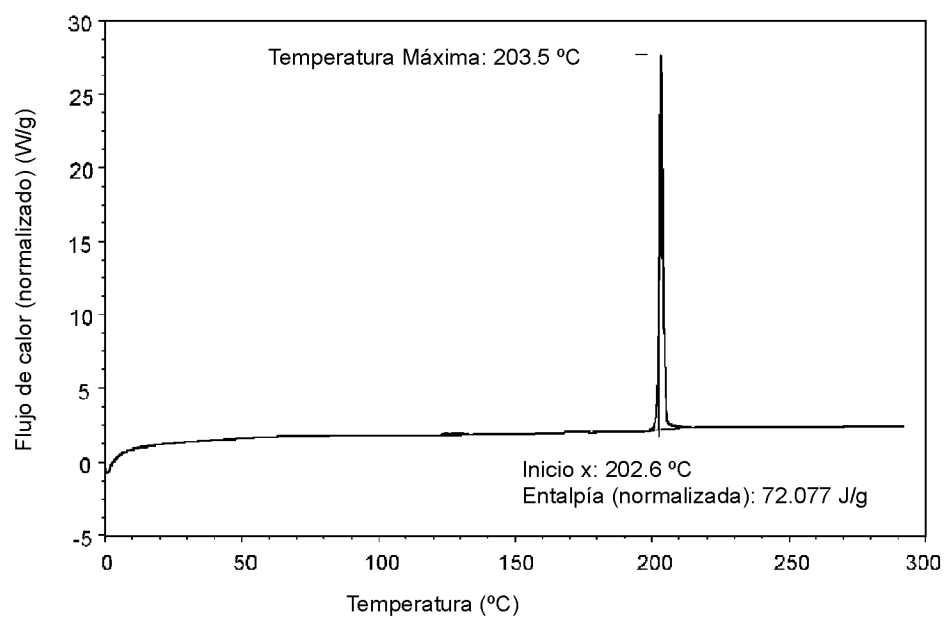


Figura 17

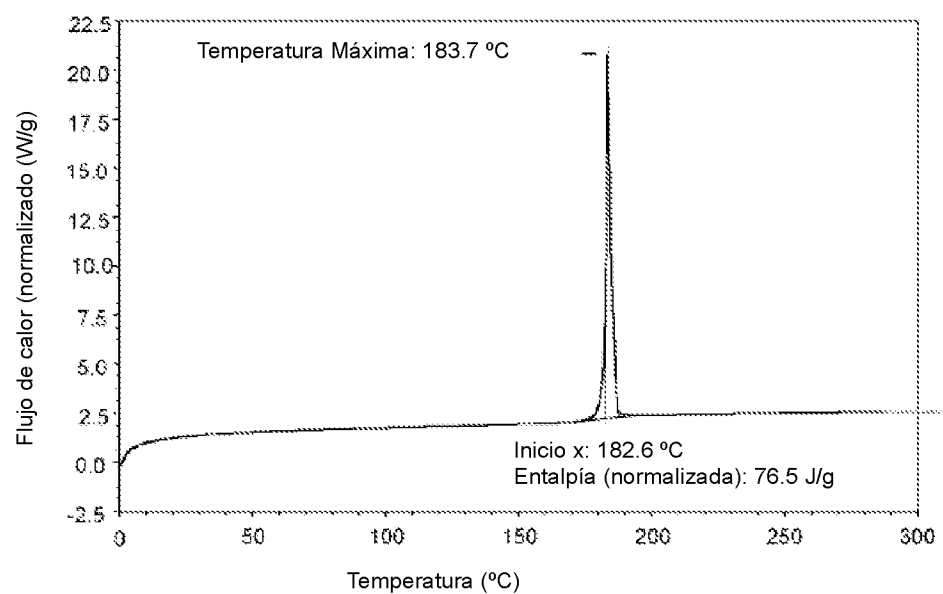


Figura 18

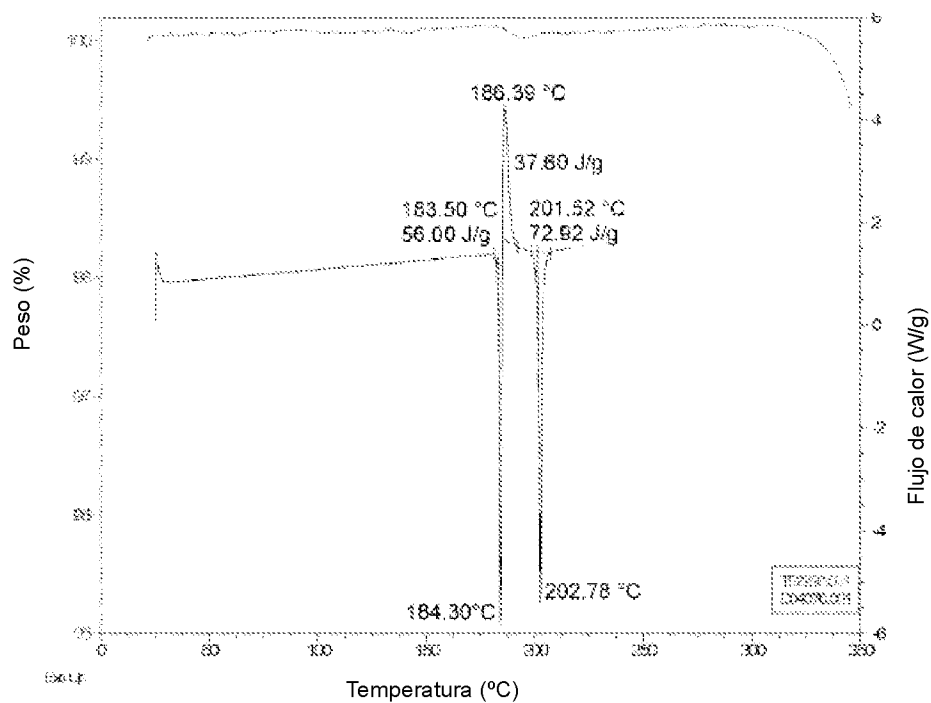


Figura 19

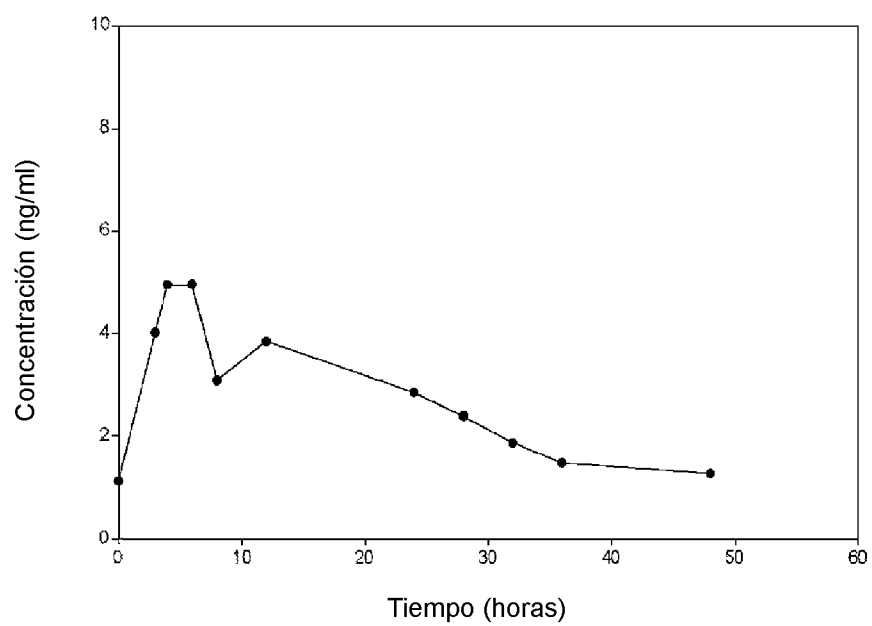


Figura 20

