(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 026 433**

(51) Int. Cl.:

G01N 30/04 (2006.01)
G01N 30/88 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.01.2021 PCT/KR2021/001191**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.08.2021 WO21154019**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2021 E 21747330 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2025 EP 4099010**

(54) Título: **Método para evaluar la calidad de ácido (3s)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico**

(30) Prioridad:

31.01.2020 KR 20200012027

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.06.2025

(73) Titular/es:

HYUNDAI PHARM CO., LTD. (100.00%)
55 Jandari-gil Pungse-myeon Dongnam-gu
Cheonan-si, Chungcheongnam-do 31213, KR

(72) Inventor/es:

HWANG, JEONG UN;
LEE, KYU HWAN;
KIM, EUN YOUNG y
CHOI, SU KYOUNG

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Método para evaluar la calidad de ácido (3s)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico

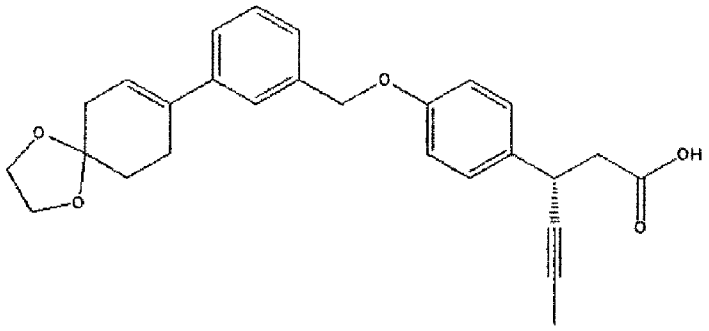
[Campo técnico]

La presente invención se refiere a una sustancia relacionada de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico y un método para evaluar la calidad del ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico usando el mismo.

[Antecedentes de la técnica]

Un compuesto de la siguiente Fórmula Química 1, esto es, ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaspiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico es un fármaco desarrollado como un agente terapéutico agente para enfermedades metabólicas (Documento de Patente 1, Patente coreana N.º 10-1569522; Documento de Patente 2, Patente coreana n.º 10-1728900).

[Fórmula química I]



Aunque se prefiere que un principio farmacéutico activo ("API") se prepare con alta pureza, es muy raro que la mezcla de productos de reacción sea un solo compuesto puro en un proceso de preparación del principio farmacéutico activo, y una mezcla de productos de reacción incluya impurezas tales como subproductos de reacción y reactivos usados en la reacción. Además, dado que el principio farmacéutico activo puede modificarse incluso durante el proceso de formulación o el proceso de almacenamiento de una formulación, una parte del principio farmacéutico activo puede descomponerse o modificarse y convertirse de esta manera en una impureza. Por lo tanto, el contenido de un principio farmacéutico activo presente en un producto farmacéutico debe medirse durante la preparación, el almacenamiento y el uso de un principio farmacéutico activo o sustancia farmacéutica o un producto farmacéutico terminado, y la pureza de un principio farmacéutico activo generalmente se analiza mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía de gases (GC). Una impureza incluida en los productos farmacéuticos también se denomina impureza relacionada o sustancia relacionada, y también es fundamental para el control de calidad de los productos farmacéuticos analizar la presencia o ausencia de sustancias relacionadas con un contenido superior al valor convencional (por ejemplo, el 0,1 % o más).

Las impurezas están asociadas a una posición de máximo en un cromatograma (manchas en placas de cromatografía de capa fina (TLC)) (Strobel p.953) (Strobel, H.A.; Heineman, W.R., "Chemical Instrumentation: A Systematic approach, 3Rd dd. (Wiley & Sons: Nueva York 1989)).

Por lo tanto, la impureza puede identificarse por su posición en el cromatograma, que normalmente se mide en el tiempo de varios minutos entre la inyección de una muestra en la columna y la elución de un ingrediente específico a través de un detector, conocido como "tiempo de retención". El período de tiempo varía diariamente según la condición del equipo y muchos otros factores. Para mitigar el efecto que tales variaciones tienen sobre la identificación precisa de una impureza, los expertos en la materia identifican las impurezas usando el "tiempo de retención relativo" (RRT) (Strobel p.922). El RRT de una impureza es el tiempo de retención de la impureza dividido por el tiempo de retención de cualquier patrón de referencia. Teóricamente, el propio principio farmacéutico activo puede usarse como patrón de referencia, pero tiende a estar presente en una mezcla en una proporción excesiva como sustancia sustancial y saturar la columna, dando como resultado un tiempo de retención irreproducible. Por lo tanto, a veces se prefiere que el principio farmacéutico activo se añada o esté presente en una cantidad suficientemente significativa para ser detectable o se selecciona un compuesto alternativo con un contenido lo suficientemente bajo como para no saturar la columna y dicho compuesto se usa como un patrón de referencia.

Los investigadores y desarrolladores de la fabricación de fármacos entienden que un compuesto en un estado relativamente puro puede usarse como un "patrón de referencia" para cuantificar la cantidad de un compuesto en una mezcla desconocida. Cuando el compuesto se usa como un "patrón externo", una solución de una concentración

conocida del compuesto se analiza por la misma técnica que la mezcla desconocida (Strobel p.924, Snyder p.549) (Snyder, L.R.; Kirkland, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2ª edición (John Wiley & Sons: Nueva York 1979)). La cantidad del compuesto en la mezcla puede determinarse comparando la magnitud de la respuesta del detector.

El compuesto patrón de referencia también puede usarse para cuantificar la cantidad de otro compuesto en la mezcla cuando un "factor de respuesta", que compensa las diferencias en la sensibilidad del detector a los dos compuestos, ha sido predeterminado (Strobel p.894). Para este fin, el compuesto patrón de referencia se agrega directamente a la mezcla y se denomina "patrón interno" (Strobel p. 925, Snyder p.552).

El compuesto patrón de referencia se puede usar como patrón interno cuando una mezcla desconocida incluye algún compuesto patrón de referencia usando una técnica conocida como "adición de patrón" y aquí, se preparan al menos dos muestras añadiendo cantidades conocidas y diferentes del patrón interno (Strobel pp.391-393, Snyder pp.571,572). La proporción de la respuesta del detector debida al compuesto patrón de referencia originalmente presente en la mezcla puede determinarse representando gráficamente la respuesta del detector frente a la cantidad del compuesto patrón de referencia añadido a cada una de las muestras y extrapolando el gráfico a la concentración cero del patrón de referencia (por ejemplo, Strobel, FIG. 11.4, p.392).

[Documentos de la técnica relacionada]

[Documentos de patente]

(Documento de Patente 1) Patente coreana N.º 10-1569522
(Documento de Patente 2) Patente coreana N.º 10-1728900

[Documentos no de patente]

(Documento de No Patente 1) Strobel, H.A.; Heineman, W.R., "Chemical Instrumentation: A Systematic approach, 3Rd dd. (Wiley & Sons: Nueva York 1989)
(Documento de No Patente 2) Snyder, L.R.; Kirkland, J.J. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2ª edición (John Wiley & Sons: Nueva York 1979)

[PROYECTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO EN APOYO A LA PRESENTE INVENCIÓN]

[N.º de Proyecto] HI17C2529
[Nombre del Ministerio] Ministerio de Salud y Bienestar
[Agencia especializada en gestión de la investigación] Instituto de Desarrollo de la Industria de la Salud de Corea
[Título de la investigación] Desarrollo de tecnología médica avanzada
[Título del proyecto de investigación] (Fase clínica 1) Desarrollo de un agente potente (CE50 <1 nM) HD-6277 para el tratamiento de la diabetes con un efecto hipoglucemiante revolucionario (HbA1c> 1 %) y sin efectos secundarios hipoglucémicos
[Tasa de contribución] 1/1
[Departamento de gestión] Hyundai Pharmaceutical Co., Ltd.
[Plazo de investigación] 12 de diciembre de 2017 al 30 de junio de 2020

[Divulgación]

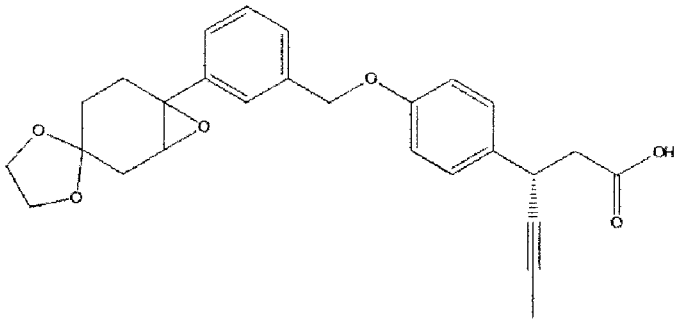
[Problema técnico]

La presente invención se ha realizado en un esfuerzo para proporcionar una sustancia relacionada de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico y un método para evaluar la calidad del ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico usando el mismo.

[Solución técnica]

La presente invención proporciona un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2, que es una sustancia relacionada del ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaspiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico o una sal del mismo.

[Fórmula Química 2]



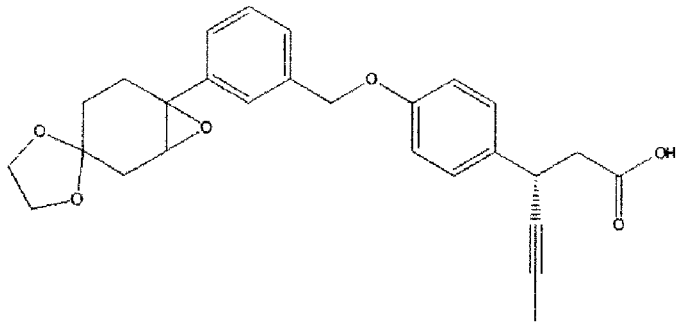
Como se usa en el presente documento, la expresión "patrón de referencia" se refiere a un compuesto que puede usarse tanto para el análisis cuantitativo como cualitativo de un principio activo farmacéutico. Por ejemplo, en HPLC, el tiempo de retención de un compuesto permite establecer el tiempo de retención relativo, permitiendo el análisis cualitativo. La concentración del compuesto en solución antes de inyectarse en la columna de HPLC permite la comparación del área bajo el pico del cromatograma de HPLC, permitiendo el análisis cuantitativo.

Aunque algunos con conocimientos en la técnica generalmente describen el patrón de referencia a este respecto, el experto en la materia puede entender que la respuesta del detector puede ser una altura de máximo o un área de máximo integrada de un cromatograma obtenido del eluyente de HPLC por ultravioleta (UV) o detección de índice de refracción o, por ejemplo, del eluyente de GC por detección de ionización de llama o detección de conductividad térmica, o del eluyente de manchas en placas de TLC fluorescentes por otras respuestas del detector, por ejemplo, absorción UV. La posición del patrón de referencia puede usarse para calcular el tiempo de retención relativo de (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico y otras impurezas.

Cuando el ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico se expone a condiciones de estrés usando luz o ácido, temperatura, humedad y similares, se obtiene una sustancia relacionada del ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaspiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico y la sustancia relacionada puede usarse como un patrón de referencia.

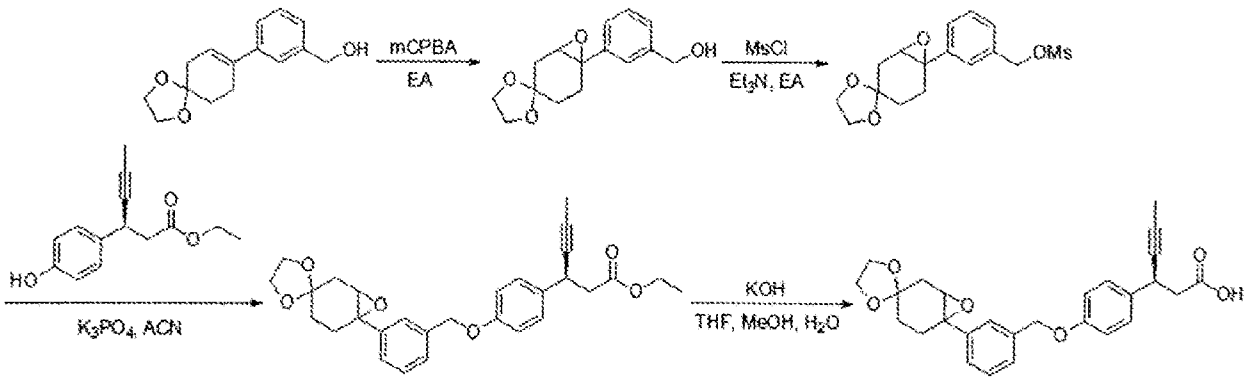
Aplicando estrés en el proceso de síntesis de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico a través del siguiente Ejemplo 1, los presentes inventores obtuvieron una sustancia relacionada del mismo y, como resultado de HPLC y espectrometría de masas, los presentes inventores confirmaron que la sustancia relacionada es un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2.

[Fórmula Química 2]



El compuesto de Fórmula Química 2 puede prepararse mediante síntesis química para su uso como un patrón de referencia. Aunque no limitado a ello, puede obtenerse el compuesto de Fórmula Química 2, por ejemplo, a través del proceso del siguiente Esquema de Reacción 1.

[Esquema de reacción 1]



Un método de síntesis específico incluye las siguientes etapas.

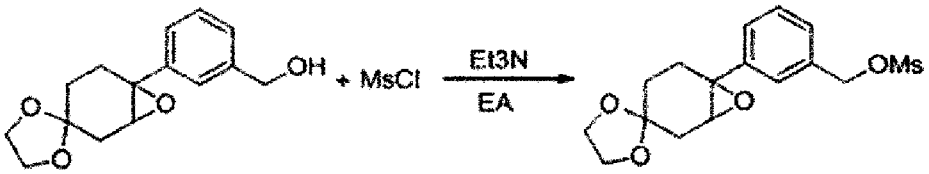
<Etapa 1> Síntesis de (3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)fenil)metanol



DS-PMA

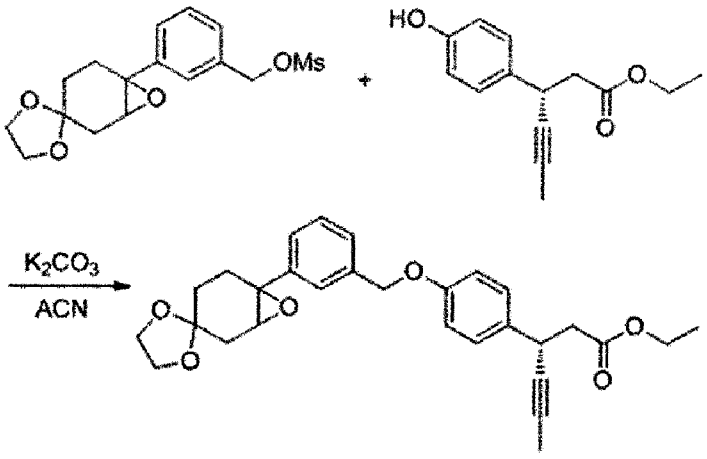
(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)fenil)metanol se sintetiza epoxidando (3-(1,4-dioxaspiro[4.5]dec-7-en-8-il)fenil)metanol.

<Etapa 2> Síntesis 3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil metanosulfonato



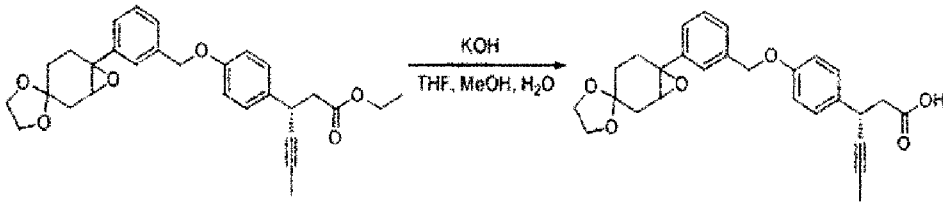
3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolano]-6-il)bencil metanosulfonato se sintetiza mesilando (3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)fenil)metanol.

<Etapa 3> Síntesis de 3-(4-((3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil)oxi) fenil)hex-4-inoato de (3S)-etilo



3-(4-((3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil)oxi)fenil)hex-4-inoato de (3S)-etilo se obtiene haciendo reaccionar metanosulfonato de 3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencilo con 3-(4-hidroxifenil)hex-4-inoato de (S)-etilo.

<Etapa 4> Síntesis de ácido (3S)-3-(4-((3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil)oxi)fenil)hex-4-inoico

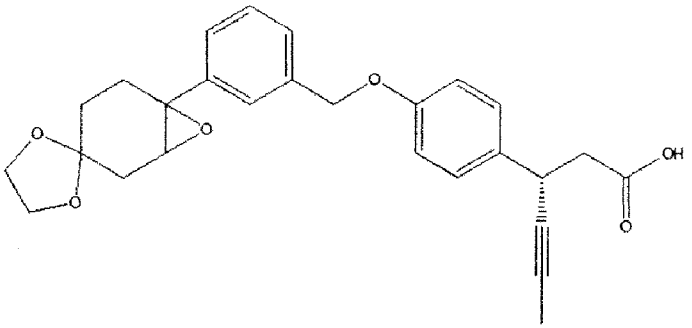


El ácido (3S)-3-(4-((3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil)oxi)fenil)hex-4-inoico se obtiene hidrolizando 3-(4-((3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolano]-6-il)bencil)oxi)fenil)hex-4-inoato de (3S)-etilo.

El compuesto de Fórmula Química 2 puede usarse en forma de sal. El ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico puede incluirse en forma de una sal farmacéuticamente aceptable en un producto farmacéutico. Por lo tanto, el compuesto de Fórmula Química 2, que es una sustancia relacionada del ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaspiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico también puede usarse en forma de una sal equivalente a una sal farmacéuticamente aceptable de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico (véase el Documento de Patente 1, Patente coreana N.º 10-1569522). Por ejemplo, el compuesto de Fórmula Química 2 puede usarse en forma de una sal de metal o de aminoácido farmacéuticamente aceptable cuando se usa como el patrón de referencia. Por ejemplo, la sal metálica incluye sal de sodio, potasio o calcio y la sal de aminoácido incluye, por ejemplo, una sal de aminoácido natural tales como glicina, alanina, fenilalanina, valina, lisina y sal de ácido glutámico.

En una realización ilustrativa, la presente invención proporciona una composición para evaluar un producto farmacéutico que incluye ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico, incluyendo un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo.

[Fórmula Química 2]



Como se ha descrito anteriormente, el compuesto de Fórmula Química 2 o una sal del mismo puede usarse como un patrón de referencia para evaluar la calidad de un principio farmacéutico activo o sustancia farmacéutica o un producto farmacéutico, que incluye ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4.5]dec-7-en-8-il)benciloxi) fenil)hex-4-inoico. En otras palabras, el compuesto de Fórmula Química 2 o una sal del mismo puede usarse como un patrón de referencia para evaluar la pureza, estabilidad de almacenamiento o similares de un producto farmacéutico en el proceso de preparación del producto farmacéutico mediante el análisis del contenido de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaspiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico o una sustancia relacionada del mismo en el producto farmacéutico.

La presente invención también proporciona un método para evaluar la calidad de un producto farmacéutico que incluye ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico, incluyendo el método la evaluación del contenido de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico en el producto farmacéutico usando un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo como un patrón de referencia.

Un método para analizar el contenido de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico en un producto farmacéutico o un principio farmacéutico activo o sustancia farmacológica usando el compuesto de Fórmula Química 2 o una de sus sales no está particularmente limitado y puede usarse un método conocido para analizar una sustancia en una composición.

Por ejemplo, puede usarse HPLC para el método de análisis. Además, el método de análisis puede incluir además una etapa de análisis cualitativo de la sustancia mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas (CL/EM), cromatografía líquida/espectrometría de masas en tándem (CL/EM/EM), resonancia magnética nuclear (RMN) o uno o más de los mismos.

Por ejemplo, cuando una muestra se analiza usando HPLC, una señal eléctrica emitida por un detector se usa para dibujar un máximo con el eje X como el tiempo y el eje Y como la magnitud de la señal. Los resultados relativos con respecto a la concentración pueden obtenerse con la altura del máximo, área y similares de la sustancia separada. El tiempo del eje X (RT: tiempo de retención) es un factor cualitativo en comparación con el patrón de referencia que se conoce convencionalmente y el área del máximo (área del máximo, altura del máximo) con el eje Y como la altura y el eje X del pico como la línea base es un factor cualitativo. La pureza (% de área) se calcula por el valor del área de cada máximo de la suma total de las áreas de los máximos detectados.

En el método para evaluar la calidad de un producto farmacéutico, la diana de la evaluación del contenido no se limita necesariamente al principio activo. Por ejemplo, el contenido de otras sustancias relacionadas incluidas además del principio activo también puede analizarse usando el compuesto de Fórmula Química 2 o una sal del mismo como un patrón de referencia.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para evaluar la calidad de un producto farmacéutico que incluye ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico, incluyendo el método la evaluación del contenido de una sustancia relacionada en el producto farmacéutico usando un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo como un patrón de referencia.

En una realización ilustrativa, cuando el contenido de la sustancia relacionada es menos del 0,5 % durante el almacenamiento del producto farmacéutico en condiciones de almacenamiento a largo plazo (5 °C±3 °C durante 36 meses), se determina que cumple los criterios de calidad.

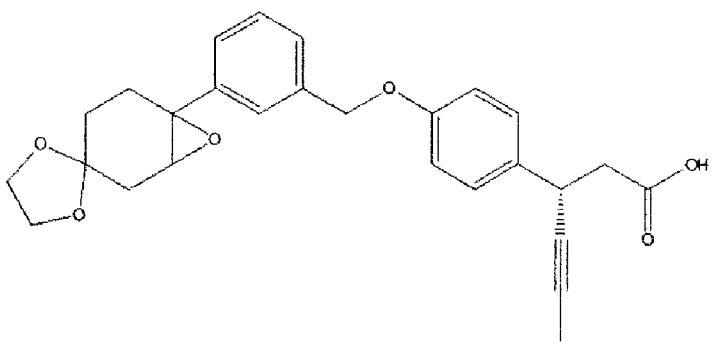
En otra realización ilustrativa, cuando el contenido de la sustancia relacionada es menos del 0,5 % durante el almacenamiento del producto farmacéutico en condiciones de almacenamiento a largo plazo (25 °C±2 °C±5 % de HR) durante 36 meses, se determina que ha cumplido con los criterios de calidad.

En todavía otra realización ilustrativa, cuando el contenido de la sustancia relacionada es menos del 0,5 % durante el almacenamiento del producto farmacéutico en condiciones de almacenamiento acelerado (40 °C±2 °C±5 % de HR) durante 24 meses, se determina que ha cumplido con los criterios de calidad.

En una realización ilustrativa, la presente invención proporciona un método para evaluar una muestra que incluye ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico, incluyendo el método:

a) obtener datos sometiendo una muestra a cromatografía; y
b) comparar los datos con los datos cromatográficos de un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo.

[Fórmula Química 2]



Por ejemplo, el método puede incluir:

(a) obtener un cromatograma sometiendo una solución de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-

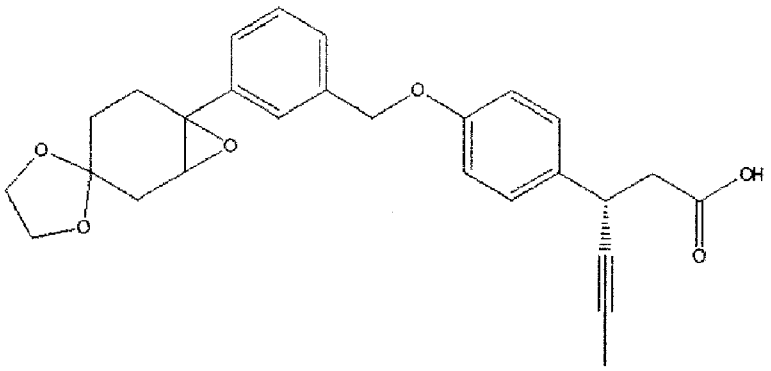
il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico que incluye el compuesto de Fórmula Química 2 o una sal del mismo a cromatografía líquida de alta resolución; y
(b) comparar un máximo obtenido del cromatograma con un máximo producido a partir del compuesto de Fórmula Química 2 o una sal del mismo.

De manera alternativa, el método puede incluir:

(a) obtener un cromatograma sometiendo una solución de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico a cromatografía en capa fina; y
(b) comparar una mancha obtenida del cromatograma con una mancha producida a partir del compuesto de Fórmula Química 2 o una sal del mismo.

Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para medir el tiempo de retención en la columna de cromatografía para ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico, incluyendo el método:
realizar una cromatografía usando un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo como un patrón de referencia.

[Fórmula Química 2]



[Efectos ventajosos]

De acuerdo con la presente invención, es posible evaluar la calidad, estabilidad y similares de una composición farmacéutica que incluye ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico usando un compuesto de Fórmula Química 2 o una sal del mismo como un patrón de referencia.

[Descripción de los dibujos]

La FIGURA 1 ilustra los datos IR de un compuesto de Fórmula Química 2.
La FIGURA 2 ilustra los datos DSC-TGA de un compuesto de Fórmula Química 2.
La FIGURA 3 ilustra los datos XRD del compuesto de Fórmula Química 2.
La FIGURA 4 ilustra una comparación de los resultados del análisis HPLC de un control y una muestra de estrés. En el dibujo, el azul indica el control y el verde indica la muestra de estrés.

[Modos de la invención]

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en mayor detalle a través de ejemplos, pero esto es con el fin de describir la presente invención, y el alcance de la presente invención no está limitado de ninguna manera por los ejemplos.

[Ejemplos]

Ejemplo 1: Separación de la sustancia relacionada

Aproximadamente 35 mg de una sustancia que contiene ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico almacenada en condiciones de refrigeración (5 °C±3 °C) durante aproximadamente 2 años se pesó con precisión y se colocó en un matraz de 50 ml de volumen, se añadió un diluyente al matraz a aproximadamente 2/3 del volumen y la mezcla resultante se mezcló bien. En lo sucesivo, se analizó una sustancia relacionada usando HPLC (Agilent Technologies 1200 Series).

<Condiciones de HPLC> Parámetros de funcionamiento

Columna: Kinetex EVO C18, 5 um, 4,6 × 250 mm
Temperatura de la columna: 25 °C
Caudal: 1,0 ml/min
Volumen de inyección: 5 µl
Concentración de muestra: 0,7 mg/ml
Longitud de onda: 220 nm
Fase móvil A: K_2HPO_4 0,01 M (pH 7)
Fase móvil B: AN
Diluyente: H_2O/AN (80/20)

Gradiente:

Tiempo (min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	80	20
7	80	20
50	30	70
55	30	70
55,10	80	20
62	80	20

Los resultados del análisis se muestran a continuación.

Número de máximo	Tiempo de retención	Área	% de área	Nombre
1	6,953	40106	0,0035	
2	13,560	50730	0,0044	
3	15,907	121406	0,0106	
4	16,740	81372	0,0071	
5	17,647	72507	0,0063	
6	18,127	171612	0,0150	
7	18,407	72715	0,0063	
8	19,387	450501	0,0393	
9	19,613	347157	0,0303	
10	19,840	85581	0,0075	
11	20,373	121471	0,0106	
12	20,740	74147	0,0065	
13	21,033	80418	0,0070	
14	21,220	195488	0,0171	
15	21,827	286792	0,0250	
16	22,493	160952	0,0141	
17	22,573	289110	0,0252	
18	22,967	143309	0,0125	
19	23,047	310852	0,0271	
20	23,580	2939436	0,2566	←

(continuación)

Número de máximo	Tiempo de retención	Área	% de área	Nombre
21	24,107	111999	0,0098	
22	25,167	119138	0,0104	
23	25,347	1133145719	98,9289	**Fórmula Química 1**
24	26,767	872290	0,0762	
25	27,980	47225	0,0041	
26	31,740	166640	0,0145	
27	35,560	4718016	0,4119	
28	39,353	137539	0,0120	
Totales		1145414228	100,0000	

Una sustancia que contiene la sustancia relacionada (RRT: 0,93, % de área 0,26 %) analizado por HPLC se analizó cualitativamente mediante barrido de EM y barrido iónico de producción usando un sistema Q-TOF-CL/EM. El sistema CL-EM/EM analiza cualitativamente la sustancia utilizando un sistema HPLC Agilent 1290 Infinity y un espectrómetro de masas Agilent 6550 Q-TOF. Las condiciones de análisis son las siguientes.

<Condiciones de HPLC>

Columna: Columna YMC-Pack Pro C18 (4,6 × 150 mm, 5 µm) equipada con precolumna Phenomenex SecurityGuard C18 (4 × 20 mm)
Fase móvil A: ácido fórmico al 0,1 % en H2O/MeOH=60/40
Fase móvil B: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo/MeOH=60/40
Caudal: 1 ml/min (durante 34 min)
Volumen de inyección: 10 µl
Diluyente: H_2O/ACN = 10/90

Tiempo (min)	Fase móvil A %	Fase móvil B %
0	80 %	20 %
0-23	80-10 %	20-90 %
23-28	10 %	90 %
28-29	10-80 %	90-20 %
29-34	80 %	20 %

Longitud de onda: 220 (o 260 nm)

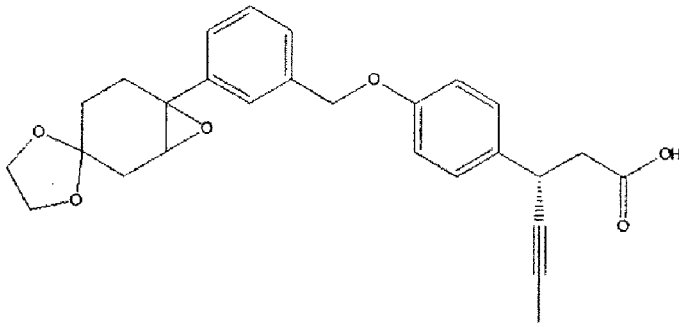
<Condiciones de espectrometría de masas>

Voltaje capilar: 3500 V
Ionización: Ionización por electropulverización, Positivo (ESI+)
Gas de secado: 14
Gas nebulizador: 50
Gas envolvente: 12
Temperatura del gas envolvente: 400 °C
Temperatura del gas de secado: 250 °C
Barrido completo EM, Modo EM/EM: (m/z 100 a 1000)

Se ajustó un analito separado en la etapa de detección para que fluya hacia el espectrómetro de masas y, en este caso, el ion detectado de la sustancia relacionada se analizó cualitativamente seleccionando el ion característico [M+Na] del espectro de masas.

Como resultado del análisis, se derivaron tres compuestos pronosticados y cada compuesto pronosticado se sintetizó y se sometió a análisis EM. Como resultado, se confirmó que la estructura química de una sustancia relacionada representada por RRT 0,93 tiene la estructura de la siguiente Fórmula Química 2.

[Fórmula Química 2]

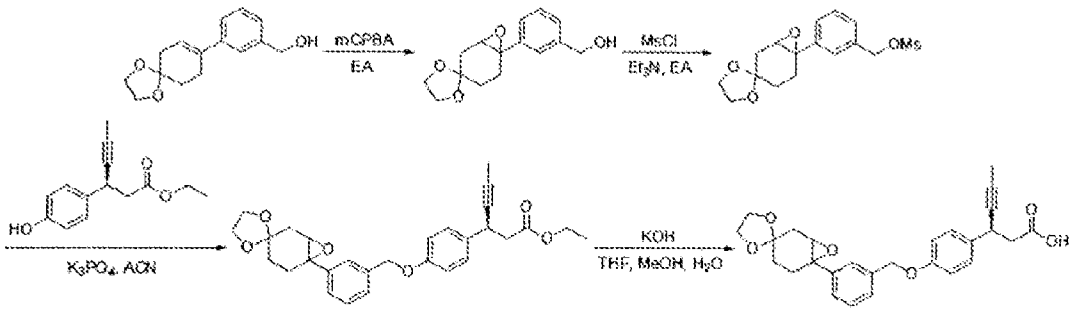


ácido (3S)-3-(4-((3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil)oxi)fenil)hex-4-inoico

Ejemplo 2. Síntesis de la Fórmula Química 2

El compuesto de Fórmula Química 2 se sintetizó como sigue de acuerdo con el siguiente Esquema de Reacción 1.

[Esquema de reacción 1]



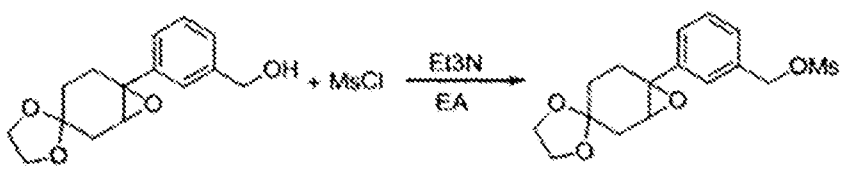
<Etapa 1> Síntesis de (3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)fenil)metanol



DS-PMA

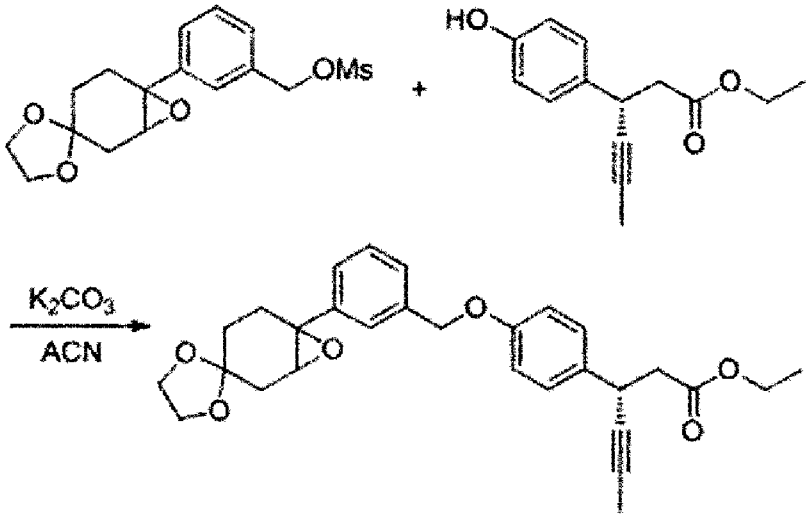
Se añadió ácido metacloroperoxibenzoico (MCPBA) (365,40 mmol) a un matraz y se disolvió en acetato de etilo (450 ml). La temperatura interna se enfrió a 0 °C mientras se agitaba. (3-(1,4-Dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)fenil)metanol (DS-PMA)(30 g, 121,80 mmol) se disolvió en acetato de etilo (150 ml) y la solución resultante se añadió a la misma a 0 °C. Después de la adición, la mezcla se agitó a temperatura ambiente y después se comprobó con TLC para confirmar que la reacción se había completado. El producto de reacción se lavó con una solución acuosa de hidróxido de sodio 1 N (300 ml × 3) y agua purificada (300 ml × 2). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y después se filtró y se concentró a presión reducida. La capa orgánica se separó por cromatografía en columna de sílice (acetato de etilo: n-hexano = 1:2 → acetato de etilo: n-hexano = 1:1) y se concentró a presión reducida para obtener un compuesto sólido.

<Etapa 2> Síntesis 3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil metanosulfonato



Después de disolver (3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptano-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)fenil)metanol (4,25 g, 16,20 mmol) en acetato de etilo (42,5 ml), se le añadió trietilamina (3,38 ml, 24,30 mmol) a temperatura ambiente. Se bajó la temperatura mientras se agitaba durante 30 minutos y se le añadió lentamente gota a gota cloruro de mesilo (1,63 ml, 21,06 mmol) a 0 °C. La mezcla resultante se agitó a 5 °C. Se confirmó por TLC que la reacción se había completado. Se le añadió agua purificada (42,5 ml) a 5 °C y la mezcla resultante se agitó. La capa orgánica se extrajo y después se lavó con agua purificada (42,5 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro (50 g) y se filtró para realizar la siguiente reacción sin concentración.

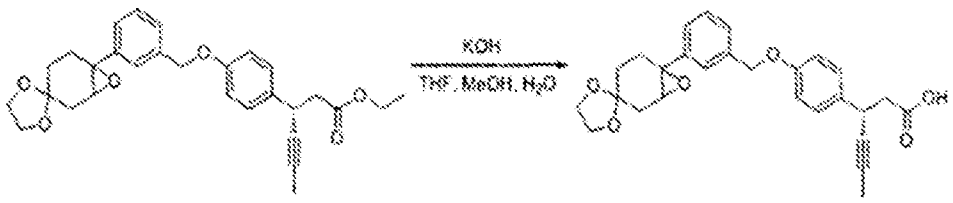
<Etapa 3> Síntesis de 3-(4-((3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil)oxi) fenil)hex-4-inoato de (3S)-etilo



Se calculó una sustancia mesilada con un rendimiento del 100 %, y la reacción S_n2 se realizó usando 5,51 g de la sustancia.

3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptano-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil metanosulfonato (5,51 g, 16,20 mmol), 3-(4-hidroxifenil)hex-4-inoato de (S)-etilo (3,57 g, 15,39 mmol) se puso en un matraz y se disolvió en acetonitrilo (64 ml). Después de añadirle fosfato tribásico de potasio (212,27 g, 32,405 mmol) a temperatura ambiente, la mezcla se agitó durante 1 hora y 30 minutos mientras se calentaba de 74 a 76 °C. Después de que se confirmó por TLC que la reacción se había completado, la temperatura se redujo a temperatura ambiente. Se le añadieron agua purificada (30 ml) y acetato de etilo (30 ml), la mezcla resultante se agitó y luego se separaron la capa orgánica y la capa acuosa. La capa orgánica se lavó dos veces con una solución acuosa al 5 % de cloruro sódico. La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. La capa orgánica filtrada se concentró a presión reducida para obtener un compuesto sólido.

<Etapa 4> Síntesis de ácido (3S)-3-(4-((3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptan-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil)oxi)fenil)hex-4-inoico



Se calculó que el rendimiento era del 100 % en el S_n2 etapa de reacción y se realizó una reacción de hidrólisis usando 7,11 g del compuesto sólido.

Se añadieron tetrahidrofurano (36 ml) y metanol (36 ml) a (3S)-etilo 3-(4-((3-(7-oxaspiro[biciclo[4.1.0]heptano-3,2'-[1,3]dioxolan]-6-il)bencil)oxi)fenil)hex-4-inoato (7,11 g, 14,92 mmol) y la mezcla resultante se agitó. Se disolvió hidróxido de potasio (4,92 g, 74,59 mmol) en agua purificada (36 ml), se añadió la solución resultante y se agitó la mezcla resultante a 30 °C durante 30 minutos. Después de que se confirmó por TLC que la reacción se había completado, el producto resultante se concentró a presión muy reducida. Se le añadió agua purificada, la mezcla resultante se agitó y después la capa acuosa se lavó dos veces con acetato de etilo. Después de que la temperatura

interna se enfrió de 0 a 5 °C, la capa orgánica se extrajo acidificando con una solución acuosa de ácido clorhídrico 2 N. La capa orgánica se lavó dos veces con una solución acuosa de cloruro de sodio al 5 %, se secó con sulfato de magnesio anhidro y después se concentró a presión reducida para obtener un compuesto.

La sustancia sintetizada fue confirmada por HPLC y espectrometría de masas y se confirmó que la sustancia tenía la estructura de Fórmula Química 2. Además, se analizaron los espectros de RMN e IR de esta sustancia. Los resultados del análisis de 1HRMN, 13CRMN e IR (FIGURA 1) se muestran a continuación.

RMN 1H (300 MHz, DMSO-d6): 12,27 (a, 1H), 7,43 (1H), 7,37 (1H), 7,32 - 7,27 (m, 3H), 6,96 (d, 2H), 5,09 (s, 1H), 3,95 - 3,81 (m, 5H), 3,12 (d, 1H), 2,61 - 2,51 (m, 3H), 2,16 (t, 2H), 2,01 (d, 1H), 1,79 (s, 3H), 1,68 - 1,56 (m, 2H)
13C RMN (DMSO d6) 171,85, 157,18, 141,11, 137,27, 133,48, 128,45, 128,29, 126,73, 124,68, 124,39, 114,64, 105,44, 80,58, 78,16, 69,14, 63,84, 63,52, 59,88, 59,27, 42,81, 34,72, 32,70, 27,91, 25,45, 3,14 ppm

Espectro de absorción (FT-IR, KBr): 2912 cm^{-1}, 1706,14 cm^{-1}, 1508,03 cm^{-1}, 1111,62 cm^{-1}

Adicionalmente, se analizaron XRD y DSC/TGA y los resultados se muestran en las FIGURAS 2 y 3, respectivamente. Las condiciones de análisis XRD y DSC/TGA son las siguientes. Se confirmó que la sustancia sintetizada era amorfa.

<Condiciones de XRD>

Modelo: D8 Advance (Bruker)
Potencia: 40 mA, 40 kV,
Intervalo de tiempo: 3 min a 45 min (6 grados/min*3)

<Condiciones DSC/TGA>

Modelo: TGA Q5000 IR/SDT Q600 (TA)
Intervalo de temperatura: 40 °C a 600 °C
Velocidad: 20 °C

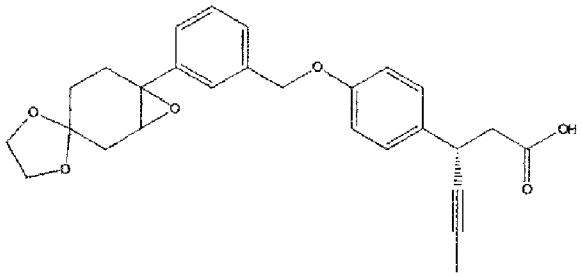
Ejemplo 3: Confirmación del compuesto de Fórmula Química 2 como sustancia relacionada

Se preparó una muestra de estrés sometida a estrés con un oxidante para confirmar la producción de la sustancia relacionada. Aproximadamente 35 mg de una sustancia que contiene ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico almacenada en condiciones de refrigeración (5 °C±3 °C) durante aproximadamente 2 años se pesó con precisión y se colocó en un matraz de 50 ml de volumen. Se añadió un diluyente al matraz a aproximadamente 2/3 del volumen y la mezcla resultante se mezcló bien. Después de que se añadiera a la misma 2 ml de una solución de peróxido de hidrógeno al 3 %, la mezcla resultante se mezcló bien y se marcó con un diluyente. La muestra de estrés se dejó reposar a temperatura ambiente y 24 horas después, se analizó la sustancia relacionada usando HPLC (Agilent Technologies 1200 Series). La sustancia relacionada se analizó en las mismas condiciones que en el Ejemplo 1. Como resultado, se confirmó que la sustancia relacionada se produjo a partir de la muestra de estrés (RRT 0,93, Área 3,83 %). En la FIGURA 4 se muestra una comparación de los datos de HPLC de ambas muestras usando la muestra del Ejemplo 1 como control (azul: control, verde: muestra de estrés). Se confirmó que la producción de la sustancia relacionada de Fórmula Química 2 en la muestra de estrés aumentó en comparación con el control.

REIVINDICACIONES

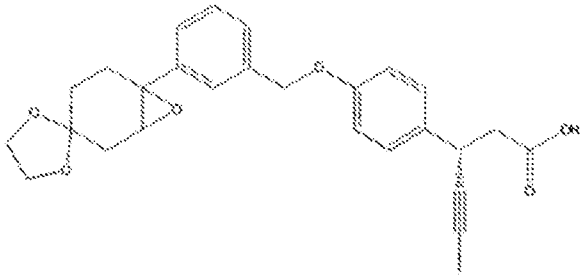
1. Una composición para evaluar un producto farmacéutico que comprende ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico, que comprende un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo.

[Fórmula Química 2]



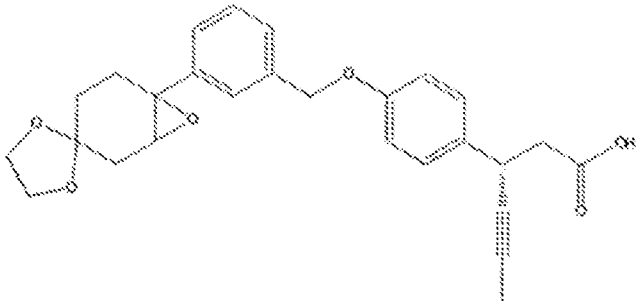
2. Un método para evaluar la calidad de un producto farmacéutico que comprende ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico, comprendiendo el método la evaluación de un contenido de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico en el producto farmacéutico usando un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo como un patrón de referencia.

[Fórmula Química 2]



3. Un método para evaluar la calidad de un producto farmacéutico que comprende ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico, comprendiendo el método la evaluación de un contenido de una sustancia relacionada en el producto farmacéutico usando un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo como un patrón de referencia.

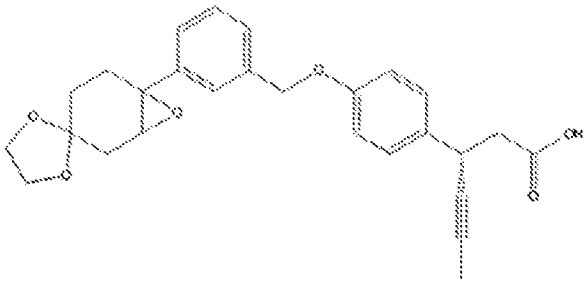
[Fórmula Química 2]



4. Un método para analizar una muestra que comprende ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico, comprendiendo el método:

a) obtener datos sometiendo una muestra a cromatografía; y
b) comparar los datos con los datos cromatográficos de un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo.

[Fórmula Química 2]



5. El método de la reivindicación 4, en donde el método comprende:

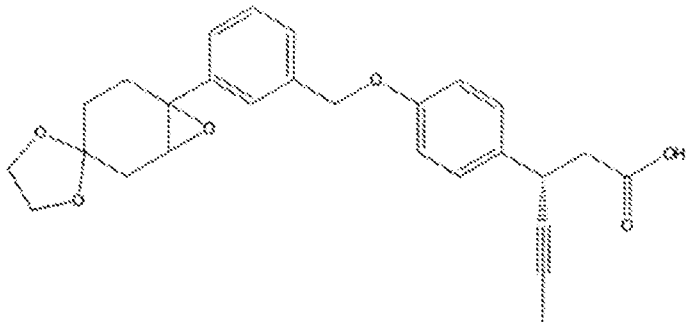
(a) obtener un cromatograma sometiendo una solución de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico que comprende el compuesto de Fórmula Química 2 o una sal del mismo a cromatografía líquida de alta resolución; y
(b) comparar un máximo obtenido del cromatograma con un máximo producido a partir del compuesto de Fórmula Química 2 o una sal del mismo.

6. El método de la reivindicación 4, en donde el método comprende:

(a) obtener un cromatograma sometiendo una solución de ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico a cromatografía en capa fina; y
(b) comparar una mancha obtenida del cromatograma con una mancha producida a partir del compuesto de Fórmula Química 2 o una sal del mismo.

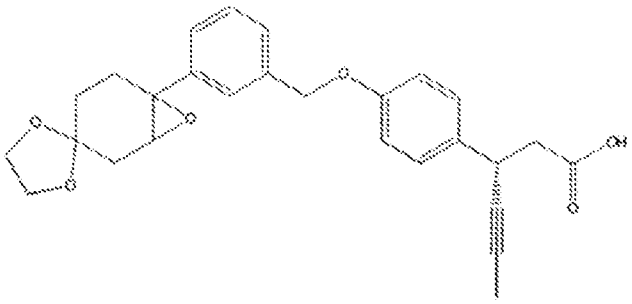
7. Un método para medir un tiempo de retención en una columna de cromatografía para ácido (3S)-3-(4-(3-(1,4-dioxaespiro[4,5]dec-7-en-8-il)benciloxi)fenil)hex-4-inoico, comprendiendo el método:
realizar una cromatografía usando un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo como un patrón de referencia.

[Fórmula Química 2]

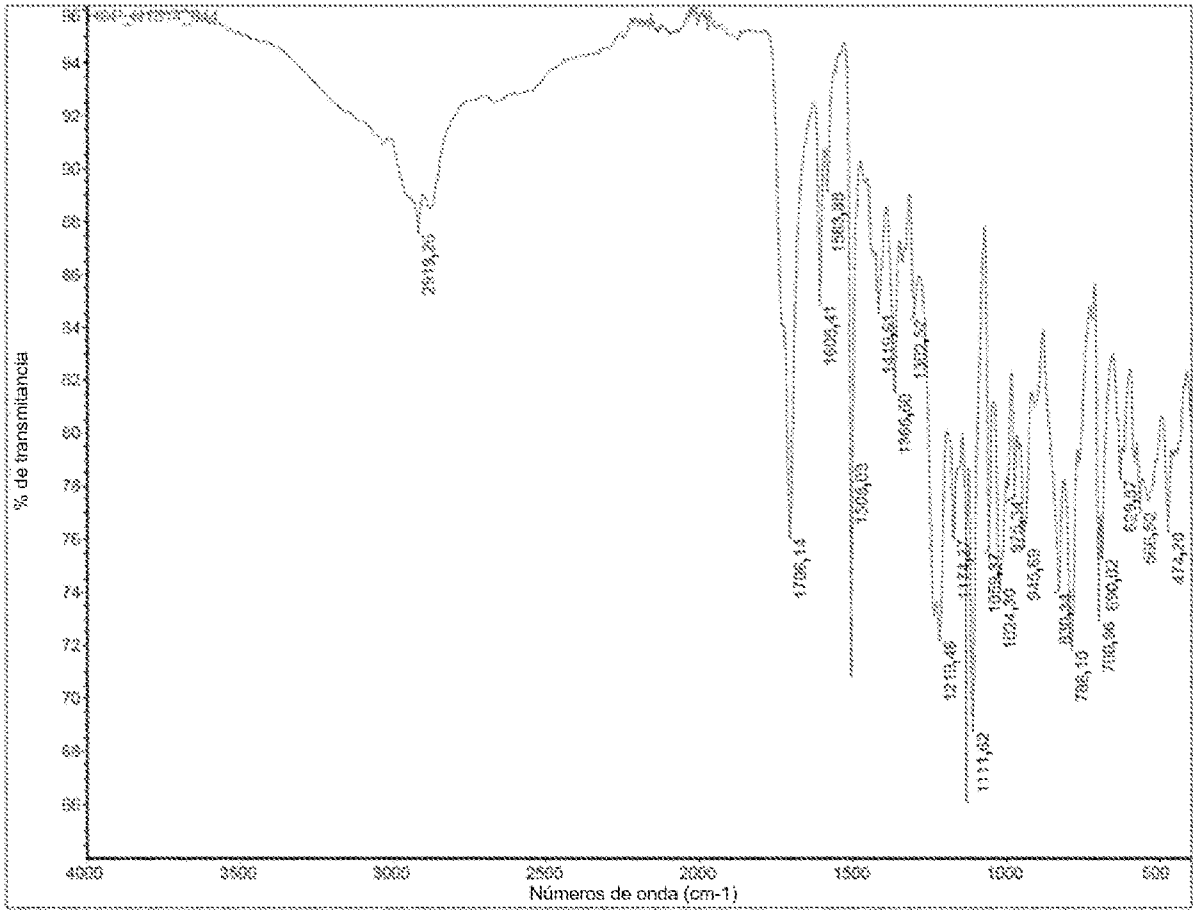


8. Un compuesto de la siguiente Fórmula Química 2 o una sal del mismo:

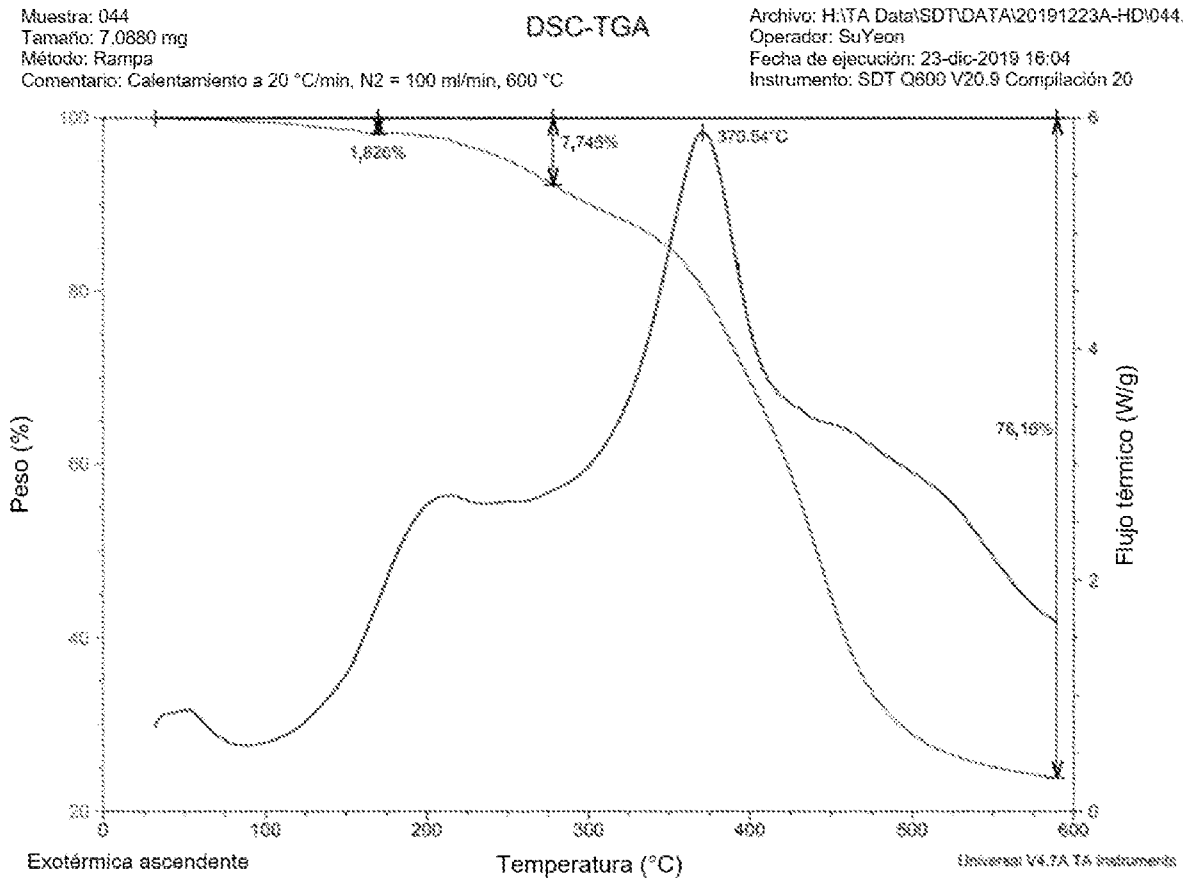
[Fórmula Química 2]



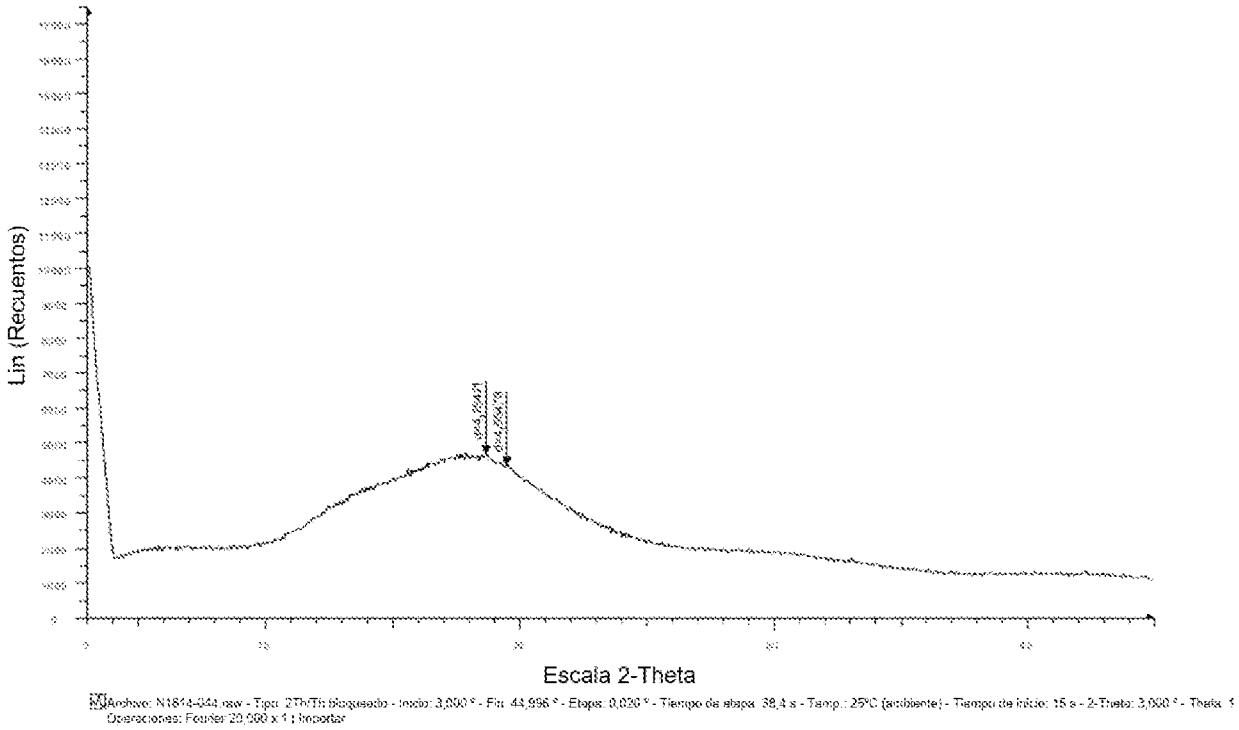
【FIG. 1】


% de transmitancia
Números de onda (cm-1)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500

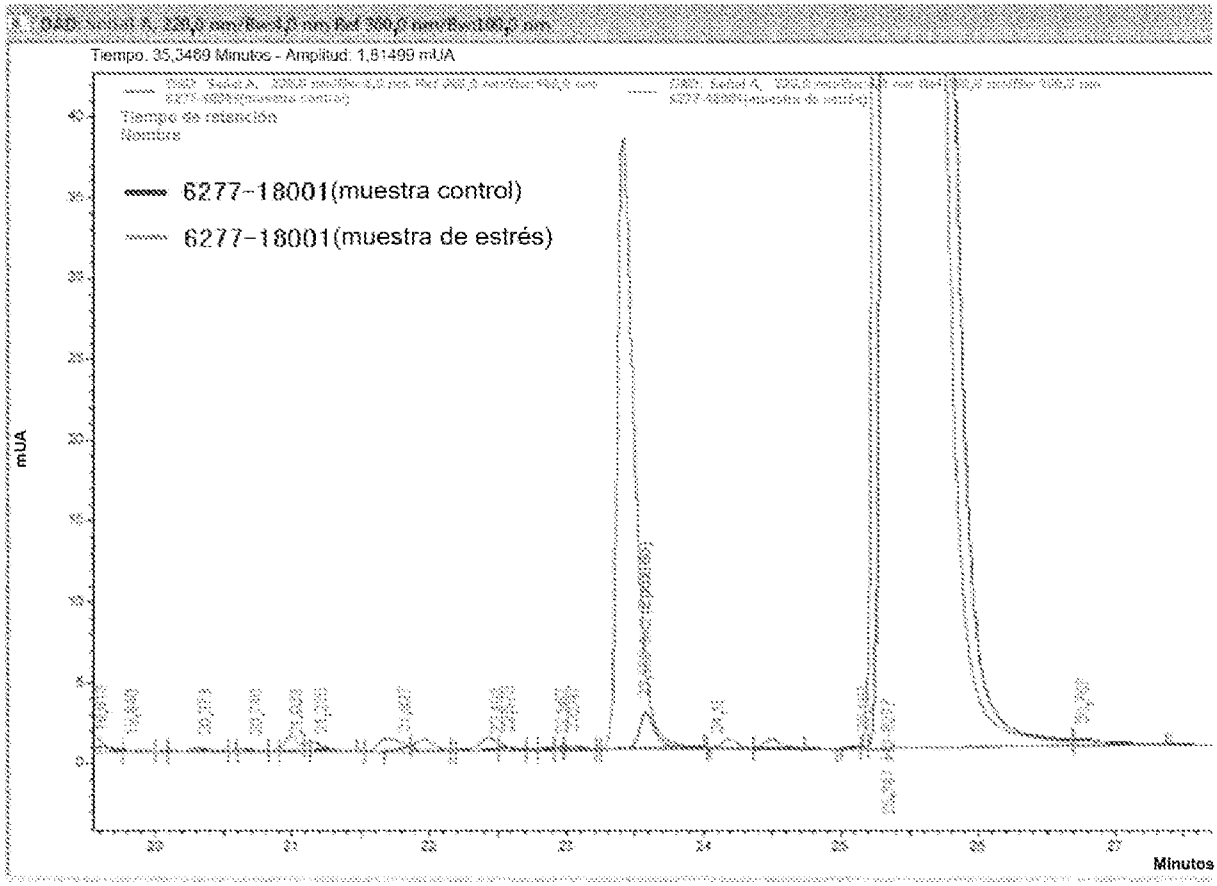
【FIG. 2】


Muestra: 044
Tamaño: 7.0880 mg
Método: Rampa
Comentario: Calentamiento a 20 °C/min, N2 = 100 ml/min, 600 °C
DSC-TGA
Archivo: H:\TA Data\SDT\DATA\20191223A-HD\044.001
Operador: SuYeon
Fecha de ejecución: 23-dic-2019 16:04
Instrumento: SDT Q600 V20.9 Compilación 20
1,626%
7,748%
370.54°C
76,16%
Peso (%)
Flujo térmico (W/g)
Exotérmica ascendente
Temperatura (°C)
Universal V4.7A TA Instruments

【FIG. 3】



【FIG. 4】


Tiempo. 35,3469 Minutos - Amplitud: 1,81499 mUA
Tiempo de retención
Nombre
6277-18001(muestra control)
6277-18001(muestra de estrés)
mUA
Minutos