

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS DE INHIBIDORES DE LA CINASA
RELACIONADA CON TROPOMIOSINA (TRK)

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, un inhibidor de cinasa relacionada con tropomiosina ("inhibidor de Trk"), y una forma monohidrato de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina – 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. La forma de monohidrato tiene propiedades deseables que facilitan la preparación de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en formulaciones farmacéuticas.

Las formulaciones farmacéuticas de solución microcristalina de inhibidor de Trk comprenden 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en su forma de monohidrato, que muestra características mejoradas sobre la forma de anhidrato.

La presente invención también se refiere a formulaciones de liberación prolongada del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, que comprenden microesferas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina.

Esta invención se refiere además al uso de estas formulaciones farmacéuticas para tratar enfermedades, incluyendo enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, defectos del metabolismo óseo, y cáncer, así como en el tratamiento de la osteoartritis (OA), dolor, dolor postoperatorio, y dolor asociado con la osteoartritis.

El inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina y los métodos para producir el inhibidor de Trk se divulgan en la Solicitud Internacional de Patente Número PCT/US14/69469 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 14/564.773, cada una titulada *Tropomyosin-Related Kinase (TRK) Inhibitors*, que se incorporan en el presente documento por referencia.

TÉCNICA RELACIONADA

No aplicable

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

Un primer aspecto de la invención se refiere a una forma cristalina del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, en donde el patrón de difracción de polvo de rayos X

contiene los siguientes picos 2θ medidos usando radiación de CuK_α: 7,14, 8,89, 10,22, 12,42, 12,73 y 14,31.

Un segundo aspecto de la invención se refieren a formulaciones farmacéuticas que comprenden la forma cristalina del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina, en donde el patrón de difracción de polvo de rayos X contiene los siguientes picos 2θ medidos usando radiación de CuK_α: 7,14, 8,89, 10,22, 12,42, 12,73 y 14,31, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a la forma monohidrato del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina.

Un cuarto aspecto de la invención se refieren a formulaciones farmacéuticas que comprenden la forma monohidrato del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un quinto aspecto de la invención se refiere formulaciones farmacéuticas de liberación prolongada que comprenden microesferas cargadas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina.

En un sexto aspecto, la invención se refiere a métodos de fabricación de una forma cristalina de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina que comprenden:

- a. Mezclar 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina con un disolvente para formar una suspensión;
- b. Agitar la suspensión;
- c. Recoger los sólidos en la suspensión mediante filtración; y
- d. Secar los sólidos.

En un séptimo aspecto, la invención se refiere a métodos de fabricación de una forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina que comprenden:

- a. Mezclar 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina con un disolvente para formar una suspensión;
- b. Agitar la suspensión;
- c. Recoger los sólidos en la suspensión mediante filtración; y
- d. Secar los sólidos.

En un octavo aspecto, la invención se refiere a métodos de fabricación de microcápsulas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina mediante extracción de disolventes, que comprende:

- a. Disolver la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-

4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en un disolvente orgánico para formar una solución de fármaco;

b. Añadir un polímero a la solución de fármaco para formar una solución de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina;

c. Mezclar la solución de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en una solución acuosa para formar una emulsión;

d. Añadir agua desionizada a la emulsión;

e. Formar microesferas a partir de la emulsión mediante extracción de disolventes; y

f. Tamizar las microesferas resultantes usando una solución tensioactiva.

En un noveno aspecto, la invención se refiere a métodos de fabricación de microcápsulas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina mediante extracción de disolventes, que comprende:

a. Dispersar la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en un disolvente orgánico para formar una suspensión de fármaco;

b. Añadir un polímero a la suspensión de fármaco para formar una dispersión de polímero /3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina;

c. Mezclar la dispersión de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina con una solución acuosa para formar una emulsión;

d. Añadir agua desionizada a la emulsión;

e. Formar microesferas a partir de la emulsión mediante extracción de disolventes; y

f. Tamizar las microesferas resultantes usando una solución tensioactiva.

En un undécimo aspecto, la invención se refiere a métodos de fabricación de microcápsulas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina mediante secado por pulverización, que comprende:

a. Disolver la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en un disolvente orgánico para formar una solución de fármaco;

b. Añadir un polímero a la solución de fármaco para formar una solución de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina; y

c. Bombear la solución de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-

2-amina a través de un rociador a un secador para formar una partícula esférica.

En un undécimo aspecto, la invención se refiere a métodos de fabricación de microcápsulas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina mediante secado por pulverización, que comprende:

- a. Dispersar la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en un disolvente orgánico para formar una suspensión de fármaco;
- b. Añadir un polímero a la suspensión de fármaco para formar una dispersión de polímero /3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina; y
- c. Bombear la dispersión de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina a través de un rociador en un secador para formar una partícula microesférica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS DIVERSAS VISTAS DE LAS FIGURAS

Figura 1: Difracción de rayos X para muestra en polvo (XRPD) de la forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, 4–40 °2θ. El XRPD de la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina muestra picos únicos en picos 2θ 7,14, 8,89, 10,22, 12,42, 12,73 y 14,31 medidos usando CuK_α.

Figura 2: Calorimetría de exploración diferencial (DSC) y termograma de análisis termogravimétrico (TGA) de la forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, Calentado a 10 °C/min. El termograma DSC muestra tres eventos térmicos en 76,72, 160,13, y 195,78 °C, el termograma TGA muestra una pérdida de peso de 3,7 % de 25 – 100 °C.

Figura 3: Estructura cristalina de la forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. Se representa la estructura cristalina de la forma monohidrato del inhibidor de Trk.

Figura 4: Superposición del patrón de XRPD experimental con el patrón XRPD calculado a partir de la estructura de un solo cristal. Esta figura representa una superposición del patrón de polvo experimental con el calculado a partir de la estructura cristalina sencilla. El fuerte grado de coincidencia sugiere que la estructura cristalina sencilla es indicativa del material sin procesar.

Figura 5: Efecto de carga de API en el perfil IVR – microesferas de 12 % de API/9:1 de R202H:752H, 16 % de API/9:1 de R202H:752H y 20 % de API/9:1 de R202H:752H . Esta figura compara el efecto de la carga de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina sobre el perfil de liberación *in*

vitro de microesferas de composiciones diversas.

Figura 6: Termogramas DSC de Microesferas de 16 % de API/9:1 de R202H:752H y 20 % de API/9:1 de R202H:752H . El termograma DSC demuestra que el 20 % de microesferas muestran una endotermia de fusión entre 130- y 150 °C, lo que confirma la presencia de cristales de fármaco en la superficie.

Figura 7: Vista de microscopía electrónica de barrido (SEM) de Microesferas de 16 % de API/9:1 de R202H:752H (1500X). El 16 % de microesferas cargadas con fármaco no mostró cristales de fármaco, indicando que el fármaco era amorfo.

Figura 8: Vista de microscopía electrónica de barrido (SEM) de Microesferas de 20 % de API/9:1 de R202H:752H (1500X). El 20 % de microesferas cargadas con fármaco mostraron cristales de fármaco en la superficie.

Figura 9: Efecto de carga de API en el perfil IVR – Microesferas de 15 % de API/R202H, 17 de % de API/R202H y 19 de % de API/R202H . Esta figura compara el efecto de la carga de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina sobre el perfil de liberación *in vitro* de microesferas de composiciones diversas.

Figura 10: Efecto de carga de API en el perfil IVR – microesferas de 16 % de API/9,5:0,5 de R202H:752H, 18 % de API/9,5:0,5 de R202H:752H y 20 % de API/9,5:0,5 de R202H:752H . Esta figura compara el efecto de la carga de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina sobre el perfil de liberación *in vitro* de microesferas de composiciones diversas.

Figura 11: Efecto de mezcla de polímero en perfil IVR – microesferas de 16 % de API/R202H, 16 % de API/9,0:0,5 de R202H:RG752H y 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H . Esta figura compara el efecto de la mezcla de polímero sobre el perfil de liberación *in vitro* de microesferas de composiciones diversas.

Figura 12: Efecto de mezcla de polímero en perfil IVR – microesferas de 16 % de API/R202H, 16 % de API/9,5:0,5 de R202H:RG502H y 16 % de API/9:1 de R202H:RG502H . Esta figura compara el efecto de la mezcla de polímero sobre el perfil de liberación *in vitro* de microesferas de composiciones diversas.

Figura 13: Formulaciónes que muestran perfil de IVR de orden cero durante 180 días – microesferas de 15 % de API/9:1 de R203H:RG752H y 16 % de API/9.5:0.5 de R202H:RG502H. Las microesferas preparadas usando 15 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en polímeros R203H:752H a una proporción de 9:1 y 16 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en polímeros R202H:RG502H a una proporción de 9.5:0.5 mostraron un perfil de liberación de orden pseudo cero durante 6 meses.

Figura 14: Efecto de sistemas de Co-Disolvente en la Preparación sobre perfil de IVR – microesferas de 16 % de API/9:1 de R203H:RG752H – 9:1 de DCM:MeOH, 9:0.5:0.5 de DCM:MeOH:BA, 9,5:0,5 de DCM:BA, 9:1 de DCM:BA. Esta figura compara el efecto del

sistema de co-disolvente usado en la preparación de las microesferas sobre el perfil de liberación *in vitro* de microesferas con 16 % de carga de fármaco y una mezcla de polímero de 9:1 de R203H:RG752H.

Figura 15: Efecto del sistema de codisolvente de DCM:BA para aumentar la carga de API en el perfil de IVR – microesferas de 16% de API/9:1 de R202H:RG752H, 25 % de API/9:1 de R202H:RG752H, 30 % de API/R202H, 40 % de API/R202H, 25 % de API/R203H, 30 % de API/R203H, 40 % de API/R203H, 50 % de API/R203H. Esta figura compara el efecto del sistema de co-disolvente usado en la preparación de microesferas para aumentar la carga de fármaco en el perfil de liberación *in vitro* de microesferas variando la mezcla de polímero.

Figura 16: Vista por microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas preparadas con un proceso de microencapsulación de suspensión micronizada (1500X). Las microesferas producidas mediante encapsulación de una suspensión de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina fueron esféricas con una textura de superficie rugosa debido a la presencia de cristales de fármaco embebidos en la superficie.

Figura 17: Efecto de Proceso de Microencapsulación de suspensión micronizada en el perfil de IVR – 25 % de API/9:1 de R202H:RG752H 39 ml de PVA al 5 % + 2,6 ml de EA, 25 % de API/9:1 de R202H:RG752H 39 ml de PVA al 5 % + 3,25 ml de EA, 25 % de API/R203H 39 de PVA al 5 % + 2,0 ml de EA, 30 % de API microfluidificado/9:1 de R202H:RG752H 39 ml de PVA al 5 % + 2,0 ml de EA, 40 % de API microfluidificado/9:1 de R202H:RG752H 39 ml de PVA al 5 % + 2,0 ml de EA, 30 % de API microfluidificado/9:1 de R202H:RG752H 39 ml de PVA al 5 % + 2,0 ml de EA, 30 % de API microfluidificado/9:1 de R202H:RG752H 39 ml de PVA al 5 % + 2,3 ml de EA, 30% de API microfluidificado/R202S 39 ml de PVA al 5 % + 2,0 ml de EA, 30% de API microfluidificado/R203S 39 ml de PVA al 5 % + 2,0 ml de microesferas. Esta figura compara el proceso de microencapsulación de suspensión micronizada usado en la preparación de microesferas en el perfil de liberación *in vitro* de microesferas con diversas cargas de fármaco.

Figura 18: Vista de microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas de 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H, Extracción de Disolventes (1000X). Las microesferas de extracción de disolventes fueron esféricas con una textura de superficie suave.

Figura 19: Vista de microscopía electrónica de barrido (SEM) de microesferas de 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H, Secado por Pulverización (1000X). Las microesferas de secado por pulverización fueron esféricas con un poco de textura de superficie.

Figura 20: Efecto de Proceso de Microencapsulación en perfil de IVR – microesferas de 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H mediante Extracción de Disolventes (OW), microesferas de 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H mediante Secado por Pulverización (20 % y 22,5 % de Polímero) y microesferas de 16 % de API/9:1 de

R203H:RG752H mediante Secado por Pulverización (22,5 % de Polímero). Esta figura compara el perfil de liberación *in vitro* de microesferas de 16 % de 9:1 de R202H:RG752H cargadas con fármaco preparadas mediante extracción de disolventes y secado por pulverización.

- 5 Figura 20: Efecto de Proceso de Microencapsulación en perfil de IVR – microesferas 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H mediante Extracción de Disolventes (OW), microesferas de 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H mediante Secado por Pulverización (20 % y 22,5 % de Polímero) y microesferas de 16 % de API/9:1 de R203H:RG752H mediante Secado por Pulverización (22,5 % de Polímero). Esta figura muestra el efecto del proceso de microencapsulación en el perfil de liberación *in vitro* de microesferas de diversas formulaciones.

Figura 21: Vista de microscopía electrónica de barrido (SEM) de Microesferas de 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/Sin aditivo, Secadas por pulverización (1000X). Se presentan microesferas secadas por pulverización de 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/Sin aditivo.

Figura 22: Vista de microscopía electrónica de barrido (SEM) de Microesferas de 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/31,25 mg de PEG, Secadas por pulverización (1000X). Se presentan microesferas secadas por pulverización de 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/31,25 mg de PEG.

Figura 23: Vista de microscopía electrónica de barrido (SEM) de Microesferas de 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/31,25 mg de Poloxámero 407, Secadas por pulverización (1000X). Se presentan microesferas secadas por pulverización de 16 % de PI/1:1 de R202H:R203H/31,25 mg de Poloxámero 407.

Figura 24: Efecto de % de 10 kDa de PEG o 1 % de Poloxámero 407 en Perfil de IVR – 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/Sin aditivo, 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/31,25 mg de PEG, 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/31,25 mg de Poloxámero 407. Esta figura compara el perfil de liberación *in vitro* de microesferas de 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/Sin aditivo, microesferas de 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/31,25 mg de PEG, y 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/31,25 mg de Poloxámero 407 preparado mediante secado por pulverización.

Figura 25: *Perfil IVR in vivo* (de rata) – Microesferas de 16 % de API/9:1 de 202H:RG502H y 15 % de API/9:1 de R203H:RG752H. Esta figura muestra una liberación *in vivo* de liberación en orden próximo a cero a lo largo de aproximadamente 3-4 meses y 5-6 meses para microesferas de API 16 %/202:H:RG502H 9:1 y API 15 %/R203H:RG752H 9:1.

Figura 26: $[^{14}\text{C}]$ 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina restante a lo largo del tiempo (articulación de la rodilla de ratas) – microesferas de 16% de API/9:1 de 202H:RG502H y 15% de API/9:1 de 203H:RG752H. Después de la administración intraarticular en las articulaciones de la rodilla de ratas, se mostró una liberación de fármaco durante 5-6 meses para microesferas de API 16 %/202:H:RG502H 9:1 y API 15 %/R203H:RG752H 9:1; API 16

%/202:H:RG502H 9:1 mostraron un 12% restante en la articulación después de 5 meses y API 15%/R203H:RG752H 9:1 mostró un 30% del fármaco restante después de 6 meses.

Figura 27: Perfiles de concentración-tiempo de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina (sangre de rata) – microesferas de 16% de API/9:1 de 202:H:RG502H y 15% de API/9:1 de R203H:RG752H. Esta figura muestra el perfil de concentración-tiempo del fármaco en la sangre después de la administración intraarticular de microesferas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina.

Figura 28: Perfil IVR - microesferas de 16% de API/9:1 de 202:H:RG752H, 15% de API/9:1 de R203H:RG752H y 40% de API/203H

Figura 29: Perfiles de concentración-tiempo de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina – microesferas de 16% de API/9:1 de 202:H:RG752H, 15% de API/9:1 de R203H:RG752H y 40% de API/203H

Figura 30: XRPD Medido o Simulado de las Formas 1 a 4 (Anhidro e **hidrato**). Se presentan los XRPD de las formas anhidra e hidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina.

Figura 31: XRPD de la Forma 5 (Etanol). Se presenta el XRPD de la Forma 5 (Etanol) de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina.

Figura 32: XRPD de la Forma 9 (**Acetona**). Se presenta el XRPD de la Forma 9 (Acetona) de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina.

Figura 33: Comparación de XRPD de la Forma 10 (Acetona) y la Forma **9 (Acetona)**. Esta figura proporciona una comparación de las dos formas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina obtenidas en acetona.

Figura 34: XRPD de la Forma 11 (**Acetonitrilo**). Se presenta el XRPD de la Forma 11 (Acetonitrilo) de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina.

Figura 35: Fases cristalinas sólidas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. Esta figura proporciona una comparación de las diez formas cristalinas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina obtenidas en experimentos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, un inhibidor de cinasa relacionada con tropomiosina ("inhibidor de Trk"), y una forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-

imidazo[4,5-b]piridin-2-amina.

Las formulaciones farmacéuticas de solución microcristalina de inhibidor de Trk comprenden 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en su forma de monohidrato, que muestra características mejoradas sobre la forma de anhidrato.

La presente invención también se refiere a formulaciones de liberación prolongada del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, que comprenden microesferas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina.

La presente invención se refiere además al uso de estas formulaciones farmacéuticas para tratar enfermedades, incluyendo enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, defectos del metabolismo óseo, y cáncer, así como en el tratamiento de la osteoartritis (OA), dolor, dolor postoperatorio, y dolor asociado con la osteoartritis.

Las formulaciones farmacéuticas del inhibidor de Trk de la presente invención inhiben a la cinasa A relacionada con tropomiosina (TrkA), a la cinasa B relacionada con tropomiosina (TrkB), a la cinasa C relacionada con tropomiosina (TrkC), y a c-FMS (el receptor celular para el factor 1 estimulador de colonias (CSF-1)). Las cinasas relacionadas con tropomiosina (Trk) son receptores de alta afinidad activados por factores de crecimiento solubles denominados neutrofinas (NT). TrkA, también conocido como receptor de tipo 1 de tirosina cinasa neurotrófico, se activa por el factor de crecimiento nervioso (NGF). TrkB se activa por el factor de crecimiento procedente del cerebro y por NT-4/5. TrkC se activa por NT3. La activación de Trk da lugar a la activación de cinasas aguas abajo que están implicadas en la señalización celular, incluyendo la proliferación celular, la supervivencia, la angiogénesis y la metástasis. Trk se ha relacionado con una serie de enfermedades, incluyendo la osteoartritis.

Las formulaciones farmacéuticas del inhibidor de Trk de la presente invención también pueden inhibir a c-FMS (el receptor celular para el factor 1 estimulante de colonias (CSF-1)). C-FMS desempeña un papel en la regulación de la función de macrófagos, y se cree que desempeña un papel en enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, defectos del metabolismo óseo y el cáncer (Burns y Wilks, 2011, *Informa Healthcare*).

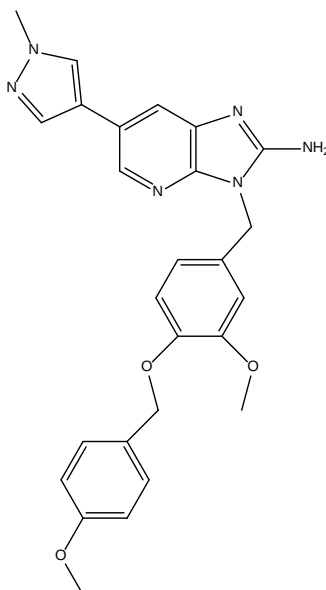
La osteoartritis es una enfermedad articular prevalente y debilitante caracterizada por un dolor crónico y la destrucción del cartílago articular. Ensayos clínicos recientes han confirmado un papel para bloquear a NGF en el dolor articular de la osteoartritis, lo que demuestra un alivio del dolor significativo y altas tasas de respuesta en pacientes tratados mediante infusión intravenosa con anticuerpos bloqueantes anti-NFG (Lane, 2010, *N Engl J Med*). Sin embargo, esta modalidad puede dar lugar a un riesgo aumentado de sucesos adversos debido a la inhibición sistémica de la señalización de NGF (FDA Arthritis Advisory Committee Meeting to Discuss Safety

Issues Related to the Anti-Nerve Growth Factor Agents;
<http://www.fda.gov/AdvisoryCommittees/Calendar/ucm286556.htm>). Por consiguiente,

se ha adoptado una nueva estrategia para dirigirse al dolor de osteoartritis mediado por NGF mediante el desarrollo de inhibidores de Trk, específicamente inhibidores de TrkA, el receptor de alta afinidad para NGF (Nicol, 2007, *Molecular Interv*). Los inhibidores de Trk de la presente invención se administran localmente y por lo tanto evitan la distribución sistémica observada con la administración intravenosa de anti-NGF. Esta estrategia de tratamiento proporciona una conveniencia potenciada de la dosificación, así como una mayor seguridad permitiendo mantener la señalización fisiológicamente necesaria de NGF (es decir, mantenimiento de los nervios sensoriales/simpáticos, angiogénesis) en sitios no locales.

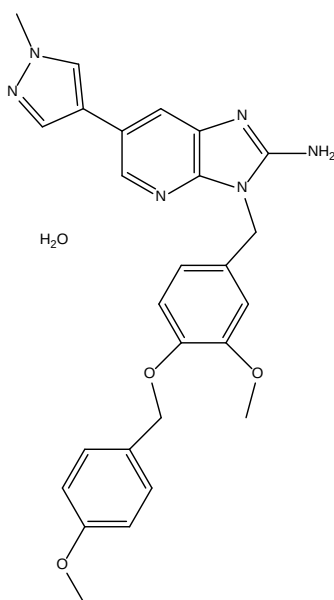
La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas del inhibidor de Trk y a métodos para tratar enfermedades con formulaciones farmacéuticas del inhibidor de Trk. Más particularmente, la invención pertenece a métodos para tratar el dolor, osteoartritis, dolor asociado con la osteoartritis, dolor postoperatorio, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunes, defectos del metabolismo óseo y el cáncer con formulaciones farmacéuticas de los inhibidores de Trk. Las composiciones farmacéuticas de inhibidores de Trk pueden administrarse en múltiples formas de dosificación, incluyendo una inyección para administración local tanto como una suspensión microcristalina y en formulaciones de liberación prolongada. El inhibidor de Trk es el ingrediente farmacéutico activo en composiciones farmacéuticas que comprenden al inhibidor de Trk. El inhibidor de Trk también puede administrarse conjuntamente y/o formularse conjuntamente con otros ingredientes activos para el tratamiento de enfermedades, incluyendo el tratamiento del dolor, osteoartritis y dolor asociado con la osteoartritis.

Las formulaciones farmacéuticas del inhibidor de Trk de la presente invención comprenden 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, representada por la Fórmula (I) a continuación, como ingrediente farmacéutico activo. La 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina también se conoce como GZ389988.



Fórmula (I): 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina (GZ389988)

- 5 El problema que debe resolverse con esta invención es la dificultad en la formulación de composiciones que comprenden 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. La solución a este problema es el descubrimiento de que la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina tiene propiedades físicas y químicas mejoradas, incluyendo mejor estabilidad física y una disolución acuosa más lenta, en comparación con la forma de anhidrato. La forma de anhidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina se ha demostrado relativamente inestable en solución, produciendo incidencias con su formulación en una composición farmacéutica.
- 10 La forma de anhidrato muestra cambios en la forma sólida variables en determinadas condiciones, incluyendo la conversión en el hidrato. La forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina permitió una estabilidad adicional y es esencial para evitar una conversión polimórfica tras un largo periodo de almacenamiento y durante el procesado, y conduce a una estabilidad física mejorada. Además, se observó una disolución más lenta en solución acuosa con la forma de monohidrato. La forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, también conocida como GZ389988A, se representa mediante la siguiente Fórmula (II).
- 20



Fórmula (II): Forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina (GZ389988A)

El peso molecular de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina es 470,54 g/mol, y la fórmula elemental es $C_{26}H_{26}N_6O_3$. La forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina es un polvo de color blanquecino y bajo un microscopio de luz polarizada se descubre que son agujas finas o partículas de tipo fibra.

La forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina se sintetiza de acuerdo con el Ejemplo 1.

Una realización particular de esta invención es una forma cristalina de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, en donde el patrón de difracción de polvo de rayos X (XRPD) contiene los siguientes picos 2θ medidos usando radiación de $CuK\alpha$: 7,14, 8,89, 10,22, 12,42, 12,73 y 14,31. En el Ejemplo 1 se proporcionan detalles sobre el método de obtener los cálculos de XRPD. Otra realización de la invención es una formulación farmacéutica que comprende la forma cristalina del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otra realización de la presente invención se refiere a las otras formas cristalinas del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en otros disolventes, incluyendo etanol, acetona, acetonitrilo, y disolventes mixtos. En el Ejemplo 4 se proporcionan detalles sobre las otras formas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina y el método de obtención de los cálculos de XRPD.

La invención también se refiere a una composición que comprende la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, representada por Fórmula (I), y formulaciones

farmacéuticas que comprenden la forma de monohidrato del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones farmacéuticas del inhibidor de Trk pueden comprender uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los modos de administración de las formulaciones farmacéuticas del inhibidor de Trk incluyen oral, sublingual, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraarticular, transdérmica, rectal, inhalatoria, intratecal/intraventricular, y tópica. Por consiguiente, las formulaciones farmacéuticas del inhibidor de Trk pueden formularse, por ejemplo, en forma de una cápsula, comprimido, polvo, solución, suspensión, emulsión, polvo liofilizado, o una formulación de liberación sostenida que comprende microcápsulas inyectables. Los excipientes usados en las formulaciones farmacéuticas del inhibidor de Trk dependerán de la ruta de administración para la que está prevista la formulación farmacéutica del inhibidor de Trk.

Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, materiales inorgánicos u orgánicos, tales como diluyentes, disolventes, gelatina, albúmina, lactosa, almidón, estabilizantes, agentes fundentes, agentes emulsionantes, agentes suspensores, sales y tampones. Los excipientes farmacéuticamente aceptables para formulaciones intraarticulares, tales como soluciones o suspensiones incluyen, pero sin limitación, geles o líquidos inertes disponibles comercialmente.

Dada la baja solubilidad del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina y la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina, se necesita un agente de suspensión para preparar una formulación de suspensión microcristalina para inyección intraarticular que comprende al inhibidor de Trk como ingrediente farmacéutico activo. Los agentes de suspensión farmacéuticamente aceptables usados comúnmente incluyen: goma arábica, agar, ácido algínico, bentonita, estearato de calcio, carbomer, carboximetilcelulosa (de calcio y de sodio), carragenano, celulosa (microcristalina, microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio, en polvo), dióxido de silicio coloidal, dextrina, gelatina, goma guar, hectorita, sílice coloidal hidrófobo, hidroxietilcelulosa, hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hipromelosa, caolín, silicato de aluminio y magnesio, soluciones de manitol, triglicéridos de cadena media, metilcelulosa, borato fenilmercúrico, fosfolípidos, policarbofil, polietilenglicol, ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán, povidina (polivinilpirrolidona), alginato de propilenglicol, saponita, aceite de sésamo, alginato de sodio, ésteres de sorbitán, sacarosa, tragacanto, vitamina E, succinato de polietilenglicol, y goma xantana (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6ª edición).

También se usan agentes tamponadores en la formulación de una solución para administración intraarticular donde el ingrediente activo es la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-

b]piridin-2-amina, el inhibidor de Trk. Los agentes tamponadores farmacéuticamente aceptables incluyen: ácido adípico, solución de amoníaco, ácido bórico, carbonato de calcio, hidróxido de calcio, lactato de calcio, fosfato de calcio, tribásico, cítrico y monohidrato, fosfato de sodio dibásico, dietanolamina, glicina, ácido maleico, ácido málico, metionina, fosfato de sodio monobásico, monoetanolamina, glutamato monosódico, ácido fosfórico, citrato de potasio, acetato de sodio, bicarbonato de sodio, borato de sodio, carbonato de sodio, dihidrato de citrato de sodio, hidróxido de sodio, lactato sódico, y trietanolamina (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6ª edición).

Ya que las formulaciones farmacéuticas del inhibidor de Trk de la presente invención son formulaciones para administración intraarticular, también pueden contener diluyentes. Los diluyentes adecuados para aplicaciones como en la presente invención incluyen: manitol, aceite de girasol, alginato de amonio, carbonato de calcio, lactato de calcio, fosfato de calcio dibásico anhidro, dihidrato dibásico, tribásico, silicato de calcio, sulfato de calcio, celulosa (en polvo, microcristalina silicificada), acetato de celulosa, azúcar comprimible, azúcar glass, almidón de maíz y almidón pregelatinizado, dextratos, dextrina, dextrosa, eritritol, etilcelulosa, fructosa, ácido fumárico, palmitoestearato de glicerilo, lactosa para inhalación, isomalta, caolín, lactitol, lactosa (anhidra, monohidrato y almidón de maíz, monohidrato y celulosa microcristalina, secado por pulverización), carbonato de magnesio, óxido de magnesio, maltodextrina, maltosa, manitol, triglicéridos de cadena media, celulosa microcristalina, polidextrosa, polimetacrilatos, simeticona, alginato de sodio, cloruro sódico, sorbitol, almidón (pregelatinizado, maíz esterilizable), sacarosa, esferas de azúcar, b-ciclodextrina de sulfobutiléter, talco, tragacanto, trehalosa, xilitol (Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6ª Edición).

Las formulaciones farmacéuticas de suspensión microcristalina del inhibidor de Trk con la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina como ingrediente activo se describen en el Ejemplo 2.

Esta invención también se refiere a métodos de fabricación de la forma cristalina de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina y de fabricación de la forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina que comprenden:

- a. Mezclar 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina con un disolvente para formar una suspensión;
- b. Agitar la suspensión;
- c. Recoger los sólidos en la suspensión mediante filtración; y
- d. Secar los sólidos.

En este método, el disolvente usado para formar la suspensión puede ser una mezcla de acetona y agua. Además, la suspensión puede agitarse durante una noche, y los sólidos se recogen mediante secado al aire.

Las formulaciones de liberación prolongada del inhibidor de Trk pueden comprender 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina o la forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina como, en el caso de formulaciones producidas a partir de soluciones de fármaco, el inhibidor de Trk se disuelve en el disolvente antes de la microencapsulación y formulación, y en el caso de formulaciones producidas a partir de suspensiones de fármaco, el inhibidor de Trk se suspende en el disolvente antes de la microencapsulación y la formulación. Después, una solución o suspensión que el principio activo se combina diversos polímeros, como se expone en el Ejemplo 3, para microencapsular la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. La microencapsulación de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina ayuda a proporcionar una formulación con un efecto prolongado, hasta y de más de 3 meses de duración, y a proporcionar un efecto terapéutico prolongado en el paciente.

En una realización particular de la invención, la formulación farmacéutica que comprende la forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina comprende un diluyente farmacéuticamente aceptable, un agente de suspensión farmacéuticamente aceptable y un agente tamponante farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, el diluyente es sorbitol, el agente de suspensión es povidona, y el agente tamponante es ácido fosfórico.

La presente invención también se refiere a formulaciones farmacéuticas de liberación prolongada que comprenden microesferas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. En estas formulaciones de liberación prolongada, el inhibidor de Trk puede ser 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina o la forma monohidrato del compuesto. Las microesferas cargadas con fármaco pueden comprender adicionalmente un polímero.

En una realización específica de una microesfera cargada con inhibidor de Trk que comprende un polímero, el polímero se selecciona entre (D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-glicólido) y una combinación tanto de poli(D,L-lactida) y poli(D,L-lactida-co-glicólido). En determinadas realizaciones de la invención, la poli(D,L-lactida) usada en la formulación de liberación extendida tiene una viscosidad inherente de 0,16-0,35 dl/g. En otra realización, la poli(D,L-lactida) tiene una viscosidad inherente de 0,16-0,24 dl/g. En otra realización más, la poli(D,L-lactida) tiene una viscosidad inherente de 0,25-0,35 dl/g. En determinadas realizaciones de la invención, la poli(D,L-lactida-co-glicólido) tiene una viscosidad inherente de 0,14-0,24 dl/g. En una realización, la poli(D,L-lactida-co-glicólido) tiene una viscosidad inherente de 0,14-0,22 dl/g. En otra realización, la poli(D,L-lactida-co-glicólido) tiene una viscosidad inherente de 0,16-0,24 dl/g.

En una formulación de liberación prolongada que comprende tanto poli(D,L-

lactida) como poli(D,L-lactida-co-glicólido), la poli(D,L-lactida) tiene una viscosidad inherente de 0,16-0,35 dl/g y la poli(D,L-lactida-co-glicólido) tiene una viscosidad inherente de 0,14-0,24 dl/g. En una realización, la poli(D,L-lactida) tiene una viscosidad inherente de 0,16-0,24 dl/g y la poli(D,L-lactida-co-glicólido) tiene una viscosidad inherente de 0,14-0,22 dl/g. En otra realización, la poli(D,L-lactida) tiene una viscosidad inherente de 0,16-0,24 dl/g y la poli(D,L-lactida-co-glicólido) tiene una viscosidad inherente de 0,16-0,24 dl/g. En otra realización más, la poli(D,L-lactida) tiene una viscosidad inherente de 0,25-0,35 dl/g y la poli(D,L-lactida-co-glicólido) tiene una viscosidad inherente de 0,14-0,22 dl/g. Y en otra realización más, la poli(D,L-lactida) tiene una viscosidad inherente de 0,25-0,35 dl/g y la poli(D,L-lactida-co-glicólido) tiene una viscosidad inherente de 0,16-0,24 dl/g.

En otra realización, las formulaciones farmacéuticas de liberación prolongada que comprenden microesferas cargadas con inhibidor de Trk comprenden una proporción 9:1 de poli(D,L-lactida) y poli(D,L-lactida-co-glicólido). En estas formulaciones de liberación prolongada, la poli(D,L-lactida) tiene una viscosidad inherente de 0,16-0,35 dl/g y la poli(D,L-lactida-co-glicólido) tiene una viscosidad inherente de 0,14-0,24 dl/g.

En otra realización, las formulaciones farmacéuticas de liberación prolongada que comprenden microesferas cargadas con inhibidor de Trk comprenden una proporción 9,5:0,5 de poli(D,L-lactida) y poli(D,L-lactida-co-glicólido). En estas formulaciones, la poli(D,L-lactida) tiene una viscosidad inherente de 0,16-0,35 dl/g y la poli(D,L-lactida-co-glicólido) tiene una viscosidad inherente de 0,14-0,24 dl/g.

En la formulación farmacéutica de liberación prolongada que comprende microesferas cargadas de inhibidor de Trk, las microesferas se cargan con de un 1% p/p a un 99% p/p 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina. En una realización más específica, las microesferas se cargan con de un 12 % p/p a un 50 % p/p 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina. En otra realización más, las microesferas se cargan con de un 12 % p/p a un 50 % p/p 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina. En realizaciones más específicas, las microesferas se cargan con un 12 % p/p, 15 % p/p, 16 % p/p, 17 % p/p, 18 % p/p, 19 % p/p, 20 % p/p, 25 % p/p, 30 % p/p, 40 % p/p o incluso un 50 % p/p de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina.

La presente invención también se refiere a métodos para fabricar microcápsulas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina mediante extracción de disolvente mediante secado por pulverización.

Un método de extracción de disolvente de la presente invención se refiere a formar microesferas cargadas con inhibidor de Trk a partir de una solución de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-

amina. Este método comprende:

- a. Disolver la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en un disolvente orgánico para formar una solución de fármaco;
- 5 b. Añadir un polímero a la solución de fármaco para formar una solución de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina;
- c. Mezclar la solución de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)-oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en
10 una solución acuosa para formar una emulsión;
- d. Añadir agua desionizada a la emulsión;
- e. Formar microesferas a partir de la emulsión mediante extracción de disolventes; y
- f. Tamizar las microesferas resultantes usando una solución tensioactiva.

15 En este método, el disolvente orgánico puede comprender (i) diclorometano y metanol, (ii) diclorometano, (iii) alcohol bencílico y metanol, (iv) diclorometano y alcohol bencílico, (v) cloroformo, (v) cloroformo y metanol, o (vii) cloroformo y alcohol bencílico. . El polímero en este método puede ser poli(D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-glicólido), o una combinación de poli(D,L-lactida) y poli(D,L-lactida-co-glicólido). La solución acuosa
20 en este método puede ser alcohol polivinílico en agua. La solución tensioactiva en este método puede ser Poloxámero 407 en agua, polisorbato 80 en agua, o polisorbato 20 en agua.

Otro método de extracción de disolvente de la presente invención se refiere a formar microesferas cargadas con inhibidor de Trk a partir de una suspensión de 3-(3-
25 metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina. Este método comprende:

- a. Dispersar la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en un disolvente orgánico para formar una suspensión de fármaco;
- 30 b. Añadir un polímero a la suspensión de fármaco para formar una dispersión de polímero /3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina;
- c. Mezclar la dispersión de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)-oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina con
35 una solución acuosa para formar una emulsión;
- d. Añadir agua desionizada a la emulsión;
- e. Formar microesferas a partir de la emulsión mediante extracción de disolventes; y
- f. Tamizar las microesferas resultantes usando una solución tensioactiva.

40 En este método, el disolvente orgánico puede comprender (i) acetato de etilo, (ii) diclorometano, (iii) cloroformo, (iv) acetato de etilo y diclorometano, (v) acetato de etilo y

cloroformo, (vi) diclorometano y cloroformo o (vii) acetato de etilo, diclorometano y cloroformo. El polímero en este método puede ser poli(D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-glicólido), o una combinación de poli(D,L-lactida) y poli(D,L-lactida-co-glicólido). La solución acuosa en este método puede ser alcohol polivinílico en agua. La solución tensioactiva en este método puede ser Poloxámero 407 en agua, polisorbato 80 en agua, o polisorbato 20 en agua.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para formar microesferas cargadas de inhibidor de Trk a partir de una solución de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina

mediante secado por pulverización. Este método comprende:

- a. Disolver la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en un disolvente orgánico para formar una solución de fármaco;
- b. Añadir un polímero a la solución de fármaco para formar una solución de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina; y
- c. Bombear la solución de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina a través de un rociador a un secador para formar una partícula esférica.

En este método, el disolvente orgánico puede comprender (i) diclorometano y metanol, (ii) diclorometano, (iii) alcohol bencílico y metanol, (iv) diclorometano y alcohol bencílico, (v) cloroformo, (v) cloroformo y metanol, o (vii) cloroformo y alcohol bencílico. El polímero en este método puede ser poli(D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-glicólido), o una combinación de poli(D,L-lactida) y poli(D,L-lactida-co-glicólido). Los parámetros adicionales de este método se refieren a la velocidad de pulverización y flujo de atomización de nitrógeno del pulverizador. La tasa de pulverización puede ser de 0,7 ml/min; el flujo de atomización de nitrógeno puede ser de 4 l/min. Las temperaturas en diversos puntos en el secador también son elementos que pueden controlarse para tener impacto en el tamaño resultante de la microesfera. En este método, el secador puede tener una temperatura de entrada de 50 °C, una temperatura de la cámara de 40-45 °C, y una temperatura de salida de 20-30 °C. En una realización más específica, la temperatura de la cámara es de 40-43 °C; más específicamente, la temperatura de la cámara es de 41-43 °C. En otra realización, la temperatura de salida es de 22-28 °C.

En otro aspecto más, la invención se refiere a un método para formar microesferas cargadas de inhibidor de Trk a partir de una suspensión de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina mediante secado por pulverización. Este método comprende:

- a. Dispersar la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en un disolvente orgánico para formar una suspensión de fármaco;
- b. Añadir un polímero a la suspensión de fármaco para formar una

dispersión de polímero /3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina; y

- c. Bombear la dispersión de polímero/3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina a través de un rociador en un secador para formar una partícula microesférica.

En este método, el disolvente orgánico puede comprender (i) acetato de etilo, (ii) diclorometano, (iii) cloroformo, (iv) acetato de etilo y diclorometano, (v) acetato de etilo y cloroformo, (vi) diclorometano y cloroformo o (vii) acetato de etilo, diclorometano y cloroformo. El polímero en este método puede ser poli(D,L-lactida), poli(D,L-lactida-co-glicólido), o una combinación de poli(D,L-lactida) y poli(D,L-lactida-co-glicólido). Los parámetros adicionales de este método se refieren a la velocidad de pulverización y flujo de atomización de nitrógeno del pulverizador. La tasa de pulverización puede ser de 0,7 ml/min; el flujo de atomización de nitrógeno puede ser de 4 l/min. Las temperaturas en diversos puntos en el secador también son elementos que pueden controlarse para tener impacto en el tamaño resultante de la microesfera. En este método, el secador puede tener una temperatura de entrada de 50 °C, una temperatura de la cámara de 40-45 °C, y una temperatura de salida de 20-30 °C. En una realización más específica, la temperatura de la cámara es de 40-43 °C; más específicamente, la temperatura de la cámara es de 41-43 °C. En otra realización, la temperatura de salida es de 22-28 °C.

Los siguientes ejemplos no limitantes ilustran diversas realizaciones de la invención, incluyendo métodos para preparar la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina, formulaciones farmacéuticas con la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina, formulaciones farmacéuticas de liberación prolongada de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina y métodos para producir estas formulaciones de liberación prolongada.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: La forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina

Ejemplo 1- 1: Síntesis de la forma monohidrato de 3-(3-Metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina

A una solución en agitación de 3-metoxi-4-(4-metoxibenciloxi)fenil)metanamina (2,00 g, 7,32 mmol) y 5-bromo-2-cloro-3-nitropiridina (1,66 g, 6,97 mmol) en acetonitrilo (50 ml) se añadió *N,N*-diisopropiletilamina (1,13 g, 8,71 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo y se dejó en agitación. Después de 64 h, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con agua. La mezcla se extrajo dos veces con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron para proporcionar 3,34 g (> 100 %) de 5-

bromo-*N*-(3-metoxi-4-(4-metoxibenciloxi)bencil)-3-nitropiridin-2-amina en forma de un sólido de color amarillo-pardo.

A una solución en agitación de 5-bromo-*N*-(3-metoxi-4-(4-metoxibenciloxi)bencil)-3-nitropiridin-2-amina en tetrahidrofurano (40 ml), etanol (40 ml),
 5 y agua (40 ml) se añadió hidrosulfito sódico (6,09 g, 34,99 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo y se dejó en agitación. Después de 4 h, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con agua. La mezcla de color amarillo se extrajo tres veces con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron (sulfato de magnesio), se filtraron, y se concentraron para
 10 proporcionar 3,10 g de un sólido de color amarillo-pardo. La purificación cromatográfica (columna Combi-Flash 40 g SiO₂ gold, 1-2,5 % de metanol/diclorometano) proporcionó 1,28 g (51 %) de 5-bromo-*N*-(3-metoxi-4-(4-metoxibenciloxi)bencil)piridine-2,3-diamina en forma de un sólido de color amarillo.

A una solución en agitación de 5-bromo-*N*-(3-metoxi-4-(4-metoxibenciloxi)bencil)piridin-2,3-diamina (0,850 g, 1,91 mmol) en diclorometano (30 ml)
 15 y metanol (30 ml) se añadió bromuro de cianógeno (5,0 M en acetontitrilo, 573 µl, 2,87 mmol). La solución resultante se dejó en agitación a temperatura ambiente. Después de 24 h, se añadió una segunda alícuota de solución de bromuro de cianógeno (600 µl) y se continuó agitando. Después de 48 h, se añadió una tercera alícuota de solución de
 20 bromuro de cianógeno (600 µl) y se continuó agitando. Después de un total de 72 h, la mezcla de reacción se concentró, y el residuo se disolvió en diclorometano. La solución se lavó con una solución 1 N de hidróxido sódico, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentró para proporcionar 1,17 g de un sólido de color pardo. La purificación cromatográfica (columna Combi-Flash 40 g SiO₂ gold, 1-10 % p
 25 amoniac 2 M en metanol/diclorometano) proporcionó 0,28 g (32 %) de 6-bromo-3-(3-metoxi-4-(4-metoxibenciloxi)bencil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en forma de un sólido de color pardo.

A una solución en agitación de 6-bromo-3-(3-metoxi-4-(4-metoxibenciloxi)bencil)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina (0,25 g, 0,53 mmol) en 1,4-dioxano (10 ml) y agua (4
 30 ml) se añadió 1-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-1*H*-pirazol (0,14 g, 0,66 mmol), fosfato potásico tribásico (0,39 g, 1,84 mmol), triciclohexilfosfina (0,015 g, 0,052 mmol), acetato de paladio (II) (0,005 g, 0,026 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 125 °C en un reactor de microondas. Después de 15 min, la mezcla de
 35 reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con agua. La mezcla se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron, y se concentraron para proporcionar 0,36 g de un sólido de color pardo verdoso. La purificación cromatográfica (columna Combi-Flash 12 g SiO₂ gold, 1-10 % de amoniac 2 M en metanol/diclorometano) proporcionó 0,10 g (41 %) del producto en forma de un sólido
 40 de color verde claro.

Se añadió 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina a una mezcla de acetona (2 ml) y agua (0,1 ml). La suspensión se agitó mediante una barra de agitación magnética a temperatura ambiente durante una noche. Los sólidos se recogieron por filtración y se secaron al aire. La estructura se confirmó mediante RMN de protón. El termograma de calorimetría de exploración diferencial (DSC) muestra tres eventos termales a 76,72, 160,13, y 195,78 °C, el termograma de análisis termogravimétrico (TGA) muestra 3,7 % de pérdida de peso de 25 a 100 °C, y el análisis de difracción de polvo de rayos X (XRPD) muestra picos únicos a picos 2θ de 3,6, 7,1, 8,9, 10,4, 10,7, 12,4, 12,7 y 14,3 medidos usando $\text{CuK}\alpha$ (precisión $\pm 0,2^\circ$).

Ejemplo 1- 2: Identificación de la estructura cristalina de la forma monohidrato de 3-(3-Metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

También se resolvió la estructura cristalina de la forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. Se recrystalizaron cristales de la forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en acetona/agua. Se produjo un cristal de tamaño 0,20 x 0,08 x 0,03 mm a las fases de difracción adecuadas cuando se puso en la parte superior de un aparato MiTeGen MicroMount. Se recogieron datos de difracción de rayos X en un difractómetro de tres círculos Bruker/AXS, equipado con un detector de área SMART APEX, un dispositivo de baja temperatura (modelo LT 2) y un generador de microfoco de cobre-K, operado a 45 kV/650 μA y una óptica multicapa Montel de haz de con un diámetro de punto de foco de imagen de $\sim 250 \mu\text{m}$ (Wiesmann et al., 2007). Los datos se recogieron usando el programa package SMART V 5.628 (Bruker AXS, 2001), y se procesaron con el programa SAINT + Release 6.45 (Bruker AXS, 2003). Estos análisis produjeron 2459 reflexiones ($\vartheta_{\min} = 1,78$, $\vartheta_{\max} = 50,21$; $0 < h < 24$, $-4 < k < 0$, $-19 < l < 19$) de las cuales todas las 2459 reflexiones fueron únicas ($R_{\text{int}} = \text{n.a.}$, $R_\sigma = 0,1583$). El refinamiento de los parámetros de celda se realizó usando 1405 reflexiones. Se aplicó una corrección de absorción empírica y el problema de fase se resolvió con el módulo "structure-solution" de la suite APEX2.

La estructura se refinó mediante métodos de mínimos cuadrados (minimización de $(F_o^2 - F_c^2)^2$) usando el módulo XL de la suite APEX2 (Bruker AXS, 2011). Se calcularon las posiciones de todos los átomos de hidrógeno, $S_{\text{bondad de ajuste}} = 1,085$, $R_{\text{todos los datos}} = 0,1329$ ($R_{\text{datos obs.}} = 0,0920$ para 1614 reflexiones con $|F_{\text{obs}}| > 4\sigma$, $wR2_{\text{todos los datos}} = 0,2710$, $wR2_{\text{datos obs.}} = 0,2377$). Los picos sin asignar más grandes en el mapa de diferencias corresponden a -0,348 frente a +0,386 electrones por $\text{\AA}^3$. La desviación estándar estimada promedio (d.t.e) de un enlace C-C es 0,009 $\text{\AA}$, la de un enlace O-C es 0,009 $\text{\AA}$ y la de un enlace N-C es 0,009 $\text{\AA}$. La d.t.e. promedio de ángulos de enlace C-C-C es 0,7 y la de ángulos de torsión C-C-C-C 1,004°.

La estructura cristalina de la forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-

metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina se presenta en la Figura 3. Figura 4 representa una superposición del patrón de polvo experimental con el calculado a partir de la estructura cristalina sencilla. El fuerte grado de coincidencia sugiere que la estructura cristalina sencilla es indicativa del material sin procesar.

Ejemplo 2: Formulaciones de suspensión microcristalina de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

Se desarrollaron formulaciones farmacéuticas de suspensión microcristalina del inhibidor de Trk , donde la forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina es el ingrediente activo. Estas formulaciones se desarrollaron en forma de una suspensión de las partículas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina insolubles para prolongar la liberación del inhibidor de Trk en el organismo a lo largo del tiempo. Este enfoque depende de la pobre solubilidad del principio activo y la dosis para controlar la duración de la liberación; este también muestra una liberación sostenida de aproximadamente 1 mes de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina *in vivo*.

Ejemplo 2- 1: Suspensión microcristalina de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina 20 mg/ml para inyección

Se preparó una formulación farmacéutica que comprende 20 mg de la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina por ml de solución. La composición de la suspensión microcristalina de 20 mg/ml se proporciona en Tabla 1 a continuación.

Tabla 1: Formulación de suspensión microcristalina 20 mg/ml

Componente	Composición por unidad	Función
Forma monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina	72 mg	Principio activo
Sorbitol	162 mg	Diluyente
Povidona K17 sin pirógenos	72 mg	Agente de suspensión
Tampón fosfato (10 mM, pH 7,4)	3,6 ml†	Agente tamponador

† Se aplica una sobrecarga del 10 %

Ejemplo 2- 2: Método para fabricar la formulación en suspensión microcristalina de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina 20 mg/ml

La solución de 20 mg/ml de la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina se preparó de acuerdo con las siguientes etapas:

1.
- Se prepara un tampón fosfato 10 mM, pH 7,4 combinando cantidades adecuadas de agua para inyección (API) y dihidrogenofosfato de sodio, agitando hasta su completa disolución, y después ajustando el pH a 7,4 (± 0,2) con solución de hidróxido de sodio 1 N.
- 5
2.
- Se prepara un vehículo combinando las cantidades adecuadas de sorbitol y povidona K17 pirógena, añadiendo el tampón fosfato 10 mM, pH 7,4 y agitando hasta su completa disolución.
3.
- El vehículo resultante se filtra entonces a través de un filtro hidrófilo de 0,22 µm de PVDF [fluoruro de polivinilideno].
- 10
4.
- Se obtiene una suspensión concentrada mezclando la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina con el vehículo para obtener una suspensión concentrada de 30 mg/ml.
5.
- La suspensión concentrada, mantenida en agitación, se filtró en un tamiz de acero inoxidable de 75 µm.
- 15
6.
- La suspensión prefiltrada permanece en agitación y se filtra en un tamiz de 40 µm para obtener la suspensión concentrada.
7.
- La suspensión concentrada se ajustó con el vehículo filtrado para obtener una suspensión de 20 mg/ml.
- 20
8.
- La suspensión final se carga en viales de vidrio incoloros estériles y despirogenados de tipo 1 hasta un volumen de llenado de 3,6 ml. Los viales se cierran con tapones de bromo butilo recubiertos con ETFE estéril y despirogenado. Se sellan los tapones con tapas estériles de aluminio y tapones de plástico blancos estériles sobre los viales.
- 25
9.
- Los viales cargados se esterilizan en el equipo de autoclavado.

Ejemplo 2- 3: Dosis clínicas de la formulación en suspensión microcristalina de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina 20 mg/ml

La suspensión microcristalina de 20 mg/ml de la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina se modifica adicionalmente para lograr la dosis y el volumen que se va a administrar al paciente en las configuraciones de producto farmacológico finalizadas. Las dosis diana se reconstituyen según sea necesario a partir de la suspensión microcristalina de 20 mg/ml. Se proporciona un resumen de los diversos formatos de dosificación y volumen en Tabla 2.

Tabla 2: Presentaciones clínicas de la suspensión microcristalina de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina 20 mg/ml

Dosis diana (mg)	Volumen total del vial reconstituido (ml)	Concentración final en el vial (mg/ml)	Volumen administrado al paciente (ml)
------------------	---	--	---------------------------------------

3	3,47	0,98	3,2
10	3,95	3,29	3,2
30	6,60	10	3,2
60	n/a [†]	20	3,2
100	n/a [†]	20	5,4 [‡]

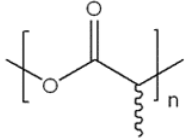
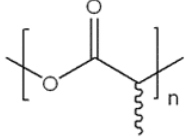
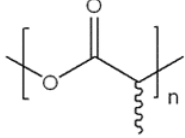
[†] No es necesaria reconstitución para lograr la concentración final deseada.

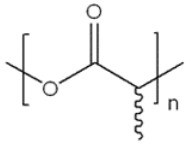
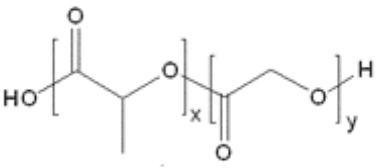
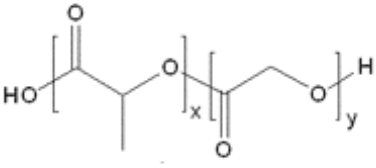
[‡] Viales de 2 x 2,7 ml

Ejemplo 3: Formulaciones de liberación prolongada de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

En algunos casos, se desea prolongar la duración de la liberación del fármaco, por ejemplo, a un tiempo de exposición mayor de 3 meses. Por consiguiente, se producen formulaciones de liberación prolongada del inhibidor de Trk 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina como principio activo y se formulan usando la forma bien de anhidrato o bien de monohidrato del compuesto. La estrategia de formulación de liberación prolongada usa polímeros de poli(D,L-lactida) (PLA), poli(D,L-lactida-co-glicólido) (PLGA) o una combinación de polímeros de PLA-PLGA para encapsular 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina (el principio activo farmacéutico [API] o sustancia farmacológica [DS]) para producir una solución de producto farmacológico [DP] de microcápsulas inyectables. Estas formulaciones pueden proporcionar una exposición sostenida o mayor de 3 meses del fármaco al organismo. Se proporciona un resumen de los diferentes polímeros usados en la preparación de las formulaciones de liberación prolongada de este ejemplo en Tabla 3

Tabla 3: Polímeros usados en las formulaciones de liberación prolongada de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

Código de referencia del polímero Evonik	Nombre del polímero	Estructura general	Viscosidad inherente* (g/mol)	Grupo terminal
R202H	Poli(D,L-lactida) [PLA]		0,16-0,24	Ácido
R202S	Poli(D,L-lactida) [PLA]		0,16-0,24	Éster
R203H	Poli(D,L-lactida) [PLA]		0,25-0,35	Ácido

R203S	Poli(D,L-lactida) [PLA]		0,25-0,35	Éster
RG502H	Poli(D,L-lacrida- co-glicólido) 50:50 [PLGA]		0,16-0,24	Ácido
RG752H	Poli(D,L-lacrida- co-glicólido) 75:25 [PLGA]		0,14-0,22	Ácido

* La viscosidad inherente se mide al 0,1% p/v en CHCl₃ a 25 °C, con un viscómetro por capilaridad de vidrio de tamaño 0c de Ubbelohde.

Fuente: <http://www.resomer.com/product/biodegradable-polymers/en/pharma-polymers/products/pages/bioresorbable-polymer.aspx>

5

Las formulaciones farmacéuticas de liberación prolongada de los inhibidores de Trk con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina como ingrediente activo usan polímeros bioerosionables, poli(D,L-lactida) y/o poli(D,L-lactida-co-glicólido), para alterar el control de la liberación del principio activo desde la disolución de la partícula de fármaco hasta la hidrólisis del polímero. Usando la combinación adecuada de polímeros y de carga de principio activo, puede controlarse la velocidad de liberación del fármaco para dar como resultado 3 o más meses de exposición. Se combinan combinaciones particulares de polímeros de PLGA/PLA y de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina de un modo que prolonga la duración de la liberación del fármaco a más de 3 meses; estas formulaciones se discuten adicionalmente en este ejemplo.

Ejemplo 3- 1: Efecto de carga de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxivencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina sobre perfil de liberación *in vitro*

Se prepararon composiciones farmacéuticas que comprenden microesferas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina mediante extracción de disolvente. Las cantidades de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina y las masas de polímero de PLA/PGLA usadas para preparar cada lote se presentan en Tabla 4. Se examinó la cinética de liberación *in vitro* (IVR) de estas diversas formulaciones.

Tabla 4: Composiciones de microesferas[‡] – API 12%/R202H:752H 9:1, API 16 %/9:1 de R202H:752H y 20 % de API/9:1 de R202H:752H

Lote n.º	Carga de GZ389988†	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero (mg)*
1	12 %	36	9:1 R202H:752H	234:26
2	16 %	50	9:1 R202H:752H	234:26
3	20 %	65	9:1 R202H:752H	234:26

‡ Preparado mediante extracción de disolvente

5 † GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

* Cantidad total de polímero = 260 mg

Se disolvió 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en 2 ml de diclorometano (DCM):metanol (MeOH) 9:1 con
10 agitación suave (~30 minutos). Los polímeros se añadieron y disolvieron durante 30 minutos. Por separado, se pusieron 39 ml de solución de polivinilamina (PVA) esterilizada por filtración (5 % p/v en agua) en un decantador de 250 ml equipado con una barra de agitación magnética de Teflon de 7,9 x 38,1 mm. El decantador se colocó en un baño de hielo en un conjunto de placa de agitación básico IKA RCT a 500 rpm. La
15 solución de polímero/fármaco se filtró en la solución de PVA usando una jeringuilla de filtro de PTFE Pall Acrodisc de 0,2 µm acoplada a una jeringa Hamilton de vidrio de 5 cc. Tras la adición, la solución de polímero/fármaco formó una emulsión. Después de 1 minuto, se añadieron 160 ml de agua desionizada fría. Después de 5 minutos, se disminuyó la velocidad de agitación a 300 rpm. Se formaron las microesferas mediante
20 extracción de disolvente durante 3 horas. Las microesferas se tamizaron a través de tamices apilados de 75 µm y 38 µm usando Kolliphor P 407 al 0,1 % en agua desionizada; se recogió la fracción de 38-75 µm y se retiró el exceso de solución de aclarado. Las microesferas se congelaron a -80 °C y se liofilizaron.

La cinética de IVR de la liberación de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-
25 6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina de las formulaciones de microesferas se determinó preparando una suspensión acuosa al 2 % (p/v) de microesferas en ácido hialurónico al 0,2 % + Kolliphor P 407 al 0,2 %, prevista para imitar el ambiente intraarticular de la rodilla. En triplicado, se pipetearon volúmenes de las suspensiones que contenían una carga teórica de 500 µg de 3-(3-metoxi-4-((4-
30 metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en tubos de vidrio de centrifugación separados de 50 ml que contenían dodecilsulfato de sodio al 0,5 % en medio de liberación de PBS, pH 7,4. Los tubos se colocaron sobre su lado en un incubador con agitación recíproca a 37 °C. En cada instante, se dejó que se asentasen las microesferas y se recogió una muestra de 1 ml del medio de liberación y
35 se repuso. Para determinar la masa total real de 3-(3-metoxi-4-((4-

metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en las muestras de IVR, se tomaron muestras de iguales volúmenes de suspensiones usadas para el estudio de liberación (por triplicado) y se añadieron 10 ml de dimetil sulfóxido. Se sonicaron las muestras, se calentaron suavemente y se colocaron en un agitador a temperatura ambiente para su disolución. Estas muestras se analizaron para un contenido de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina total usando HPLC-UV. Se representó un perfil IVR como un porcentaje de carga de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina real frente al tiempo.

Se determinó la eficacia de encapsulación de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina dividiendo la carga de fármaco real entre la carga teórica. Para determinar la carga real, se disolvieron masas precisamente pesadas de microesferas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en dimetilsulfóxido y la concentración de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina se midió mediante HPLC-UV.

Los perfiles IVR mostraron que los niveles de carga de fármaco por encima de 16 % (p/p) mostraban una liberación a ráfagas (Figura 5). La causa de esta ráfaga se identificó mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Los análisis DSC indicaron que las cargas de fármaco por encima de 16 % (p/p) mostraban una cristalización de fármaco en las microesferas como se puso de evidencia por una endotermia de fusión a 130 - 150 °C (Figura 6). También se reveló la cristalización de fármaco mediante SEM, donde los niveles de carga de fármaco por encima de 16 % mostraban cristales de fármaco sobre superficies de microesfera (Figura 7).

La Figura 6 demuestra que el 20 % de microesferas muestran una endotermia de fusión entre 130 y -150 °C confirmando la presencia de cristales de fármaco en la superficie. La Figura 7 y la Figura 8 muestra SEM de microesferas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina a 1500X. Figura 7, microesferas de 16 % cargadas con fármaco, no muestra ningún cristal de fármaco (el fármaco es amorfo); Figura 8, microesferas de 20 % cargadas con fármaco, muestra cristales de fármaco en la superficie.

El efecto de cristalización de fármaco en IVR también se demostró usando composiciones de microesfera relacionadas. Figura 9 muestra el IVR de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina de microesferas preparadas con polímero R202H. Figura 10 muestra el IVR de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina de microesferas preparadas con una proporción 9.5:0.5 de polímeros R202H y RG752H. En estos ejemplos, los niveles de carga de fármaco por encima de 16 % (p/p) mostraron una liberación en ráfagas; la extensión de ráfaga de fármaco estaba relacionada directamente con el nivel de carga de fármaco.

Ejemplo 3- 2: Efecto de mezclas de poli-láctido y Poli-láctido-co-glucolida en el perfil de liberación *in vitro* de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

Ejemplo 3- 2- 1: microesferas de 16 % de API/R202H, 16 % de API/9,0:0,5 de R202H:RG752H y 16 % de API/9:1 de R202H:752H

Se prepararon composiciones farmacéuticas que comprenden 16 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en R202H, 9.0:0.5 de R202H:RG752H y 9:1 de R202H:752H y 16 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en R202H, 9.0:0.5 de R202H:RG502H y 9:1 R202H:RG502H se prepararon para asegurar el efecto de mezclas de polímero diferentes en la cinética de liberación *in vitro* de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. La Tabla 5 presenta las masas de fármaco y polímero usadas para preparar cada lote. El método usado para preparar estas formulaciones se describe en el Ejemplo 3- 1.

Tabla 5: Formulaciones de microesfera de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina con mezclas de polímero de Poli-lactida y Polilactida-co-glucolida (16 % de API/R202H, 16 % de API/9.0:0.5 de R202H:RG752H y 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H)

Lote n.º	Carga de GZ389988†	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero (mg)*
4	16 %	50 mg	R202H	260
5	16 %	50 mg	9.5:0.5 de R202H:RG752H	247:13
6	16 %	50 mg	9:1 R202H:RG752H	234:26

‡ Preparado mediante extracción de disolvente

† GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

* Cantidad total de polímero = 260 mg

La eficacia de la encapsulación y los análisis de IVR se realizaron como se describe en el Ejemplo 3- 1. La eficacia de encapsulación para las formulaciones 4, 5, y 6 fueron del 96,1 ± 2,6 %, 87,8 ± 6,3 %, y 77,7 ± 8,6 %, respectivamente.

Las microesferas preparadas usando 16 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en polímero R202H mostraron una tasa de liberación bifásica, con una tasa de liberación

inicial lenta de 0 – 70 días, seguido de una tasa de liberación secundaria más rápida de 70 – 110 días (Figura 11). La mezcla de un polímero más hidrófilo, RG752H (75:25 de PLGA), en las formulaciones de microesfera de PLA aumentó la tasa de liberación inicial. Este polímero de PLGA permitió una captación de agua más rápida en las microesferas, conduciendo al aumento de velocidad. A la proporción de 9:1 de R202H:RG752H, la liberación inicial coincidió con la tasa de liberación secundaria, produciendo un perfil de liberación un perfil de liberación de orden pseudo cero durante 3 meses (Figura 11).

Ejemplo 3- 2- 2: microesferas de 16 % de API/R202H, 16 % de API/9,5:0,5 de R202H:RG502H y 16 % de API/9:1 de R202H:RG502H

Se prepararon composiciones farmacéuticas que comprenden 16 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en R202H, 9.0:0.5 de R202H:RG502H y 9:1 R202H:RG502H se prepararon para asegurar el efecto de mezclas de polímero diferentes en la cinética de liberación *in vitro* de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. La Tabla 6 presenta las masas de fármaco y polímero usadas para preparar cada lote. El método usado para preparar estas formulaciones se describe en el Ejemplo 3- 1.

Tabla 6: Composiciones de microesferas[‡] – 16 % de API/R202H, 16 % de API/9,5:0,5 de R202H:RG502H y 16 % de API/9:1 de R202H:RG502H

Lote n.º	Carga de GZ389988†	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero (mg)*
7	16 %	50 mg	R202H	260
8	16 %	50 mg	9.5:0.5 de R202H:RG502H	247:13
9	16 %	50 mg	9:1 R202H:RG502H	234:26

‡ Preparado mediante extracción de disolvente

† GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

* Cantidad total de polímero = 260 mg

La eficacia de la encapsulación y los análisis de IVR se realizaron como se describe en el Ejemplo 3- 1. La eficacia de encapsulación para las formulaciones 7, 8, y 9 fueron del 96,1 ± 2,6 %, 91,7 ± 3,3 %, y 94,2 ± 2,5 %, respectivamente.

Las microesferas preparadas usando 16 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en polímero R202H mostraron una tasa de liberación bifásica, con una tasa de liberación inicial lenta de 0 – 70 días, seguido de una tasa de liberación secundaria más rápida de 70 – 110 días (Figura 12). El mezclado de un polímero de 50:50 de PLGA más hidrófilo (RG752H) en las formulaciones de microesfera de PLA aumentó la tasa de liberación inicial. RG752H permitió una captación de agua más rápida en las microesferas, conduciendo a este aumento en la tasa. A la proporción de 9,5:0,5 de R202H:RG502H,

la liberación inicial coincidió con la tasa de liberación secundaria, produciendo un perfil de liberación un perfil de liberación de orden pseudo cero durante 6 meses (Figura 12).

Ejemplo 3- 3: Preparación y caracterización de Formulaciones de Microesfera que muestran cinéticas de liberación *in vitro* de orden cero durante 180 Días

Se prepararon composiciones farmacéuticas que comprenden 15 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en 9:1 de R203H:RG752H y 16 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en 9,0:0,5 de R202H:RG502H y se analizaron para cinéticas de liberación *in vitro*. Tabla 7 presenta las masas de fármaco y polímero usadas para preparar cada lote.

Tabla 7: Composiciones de Microesferas[‡] – 15 % de API/9:1 de R203H:RG502H y 16 % de API/9.5:0.5 de R202H:RG502H)

Lote n.º	Carga de GZ389988 [†]	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero (mg)*
10	15 %	46 mg	9:1 R203H:RG752H	234:26
11	16 %	50 mg	9.5:0.5 de R202H:RG502H	247:13

[‡] Preparado mediante extracción de disolvente

[†] GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

* Cantidad total de polímero = 260 mg

La eficacia de la encapsulación y los análisis de IVR se realizaron como se describe en el Ejemplo 3- 1. La eficacia de encapsulación para las formulaciones 10 y 11 fueron 89,7 ± 2,1 % y 91,7 ± 3,3 %, respectivamente.

Las microesferas preparadas usando 15 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en polímeros R203H:752H a una proporción de 9:1 y 16 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en polímeros R202H:RG502H a una proporción de 9.5:0.5 mostraron un perfil de liberación de orden pseudo cero durante 6 meses (Figura 13).

Ejemplo 3- 4: Efecto de sistemas de co-disolvente en preparación en perfil de liberación *in vitro* de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

Ejemplo 3- 4- 1: 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H como se prepara en 9:1 de DCM:MeOH, 9:0.5:0.5 de DCM:MeOH:BA, 9:5 de DCM:BA y 9:1 de DCM:BA

Las composiciones farmacéuticas que comprenden microesferas cargadas con 16 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en 9:1 de R202H:RG752H se prepararon usando diversas soluciones de co-disolvente con proporciones diferentes de disolventes de diclorometano (DCM), metanol (MeOH) y alcohol bencílico (BA). Las proporciones usadas fueron 9:1 de DCM:MeOH, 9:0.5:0.5 de DCM:MeOH:BA, 9,5:0,5 de DCM:BA, y

9:1 de DCM:BA. Hágase referencia a la Tabla 8 para fármaco, polímeros y co-disolventes usados para preparar cada lote. El método usado para preparar estas formulaciones se describe en el Ejemplo 3- 1.

5 **Tabla 8: Composiciones de microesferas[‡] preparadas con diversos sistemas de co-disolvente – 16% de API/9:1 de R203H:RG752H**

Lote n.º	Carga de GZ389988 †	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero. (mg)*	Sistema de co-disolvente
12	16 %	50 mg	9:1 R202H:RG75 2H	234:26	9:1 DCM:MeOH
13	16 %	50 mg	9:1 R202H:RG75 2H	234:26	9:0.5:0.5 DCM:MeOH:B A
14	16 %	50 mg	9:1 R202H:RG75 2H	234:26	9.5:0.5 DCM:BA
15	16 %	50 mg	9:1 R202H:RG75 2H	234:26	9:1 DCM:BA

‡ Preparado mediante extracción de disolvente (diversos sistemas de co-disolvente)

† GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

10 * Cantidad total de polímero = 260 mg

La eficacia de la encapsulación y los análisis de IVR se realizaron como se describe en el Ejemplo 3- 1. La eficacia de encapsulación para los lotes 12, 13, 14, y 15 fueron del 77,7 ± 8,6 %, 94,9 ± 2,0 %, 90,5 ± 2,6 %, y 94,4 ± 1,5 %, respectivamente. Se seleccionó alcohol bencílico para su incorporación en los sistemas de co-disolvente debido a su capacidad mejorada para solubilizar 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina.

Figura 14 y la Figura 15 muestra que puede usarse alcohol bencílico como parte de un sistema de co-disolvente con diclorometano o diclorometano y metanol para producir microesferas si afectar a las tasas de liberación. Esto puede ser útil en la reducción de la recristalización potencial de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina durante la producción de microesferas.

Ejemplo 3- 4- 2: Uso de DCM:BA para aumentar la carga de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

Se prepararon composiciones farmacéuticas que comprenden 16 % y 25 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en 9:1 de R202H:RG75H, 30 % y 40 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en R202H, y 25 %, 30 %, 40 % y 50 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en R203H usando diversos volúmenes de diclorometano (DCM) y alcohol bencílico (BA). Hágase referencia a la

Tabla 9 para masas de fármaco y polímero y volúmenes de disolvente usados para preparar cada lote. El método usado para preparar estas formulaciones se describe en el Ejemplo 3- 1.

5 **Tabla 9: Composiciones de Microesferas[‡] Preparadas con Sistema de co-disolvente de DCM:BA – 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H, 25 % de API/9:1 de R202H:RG752H, 30 % de API/R202H, 40 % de API/R202H, 25 % de API/R203H, 30 % de API/R203H, 40 % de API/R203H, 50 % de API/R203H**

Lote n.º	Carga de GZ389988†	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero (mg)*	Sistema de co-disolvente [volumen de disolvente + volumen de disolvente (ml)]
16	16 %	50 mg	9:1 R202H:RG752H	234:26	0,2 ml de BA + 1,8 ml de DCM
17	25 %	84 mg	9:1 R202H:RG752H	234:26	0,2 ml de BA + 1,8 ml de DCM
18	30 %	112 mg	R202H	260	0,26 ml de BA + 1,2 ml de DCM
19	40 %	174 mg	R202H	260	0,4 ml de BA + 1,2 ml de DCM
20	40 %	174 mg	R202H	260	0,5 ml de BA + 1,2 ml de DCM
21	25 %	84 mg	R203H	260	0,2 ml de BA + 1,8 ml de DCM
22	30 %	112 mg	R203H	260	0,2 ml de BA + 1,8 ml de DCM
23	40 %	174 mg	R203H	260	0,4 ml de BA + 1,2 ml de DCM
24	40 %	174 mg	R203H	260	0,5 ml de BA + 1,2 ml de DCM
25	50 %	260 mg	R203H	260	0,5 ml de BA + 1,2 ml de DCM
26	50 %	26 mg	R203H	260	0,61 ml de BA + 1,2 ml de DCM

‡ Preparado mediante extracción de disolvente

10 † GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

* Cantidad total de polímero = 260 mg

La eficacia de la encapsulación y los análisis de IVR se realizaron como se describe en el

15 Ejemplo 3- 1. La eficacia de encapsulación para las formulaciones producidas con diversos volúmenes de diclorometano (DCM) y alcohol bencílico (BA) fueron:

Lote	Eficacia de encapsulación
16	94,4 ± 1,5 %
17	96,0 ± 1,8 %
18	99,2 ± 3,6 %
19	94,0 ± 1,0 %

20	100,5 ± 1,0 %
21	91,2 ± 0,5 %
22	90,2 ± 2,8 %
23	95,5 ± 6,8 %
24	95,4 ± 3,1 %
25	95,0 ± 0,8 %
26	94,7 ± 1,7 %

Se seleccionó alcohol bencílico para su incorporación en los sistemas de co-disolvente debido a su capacidad mejorada para solubilizar 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. La figura 10 muestra que puede usarse el alcohol bencílico como parte de un sistema de codisolvente con diclorometano para producir microesferas con cargas tan altas como el 50 % (p/p). Algunos de los perfiles de liberación muestran una liberación en ráfagas mínima y cinéticas que deben lograr 3-6 meses de duración. El volumen de alcohol bencílico usado en el proceso efectúa la liberación en ráfagas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. Al reducir la cantidad de alcohol bencílico en el sistema de disolvente, mientras que se mantiene la solubilidad del API, la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, en la solución de polímero, reduce el efecto de ráfaga. El aumento de la carga de API proporciona un beneficio al disminuir la cantidad de polímero administrada al paciente. Se espera que esto mejore la biocompatibilidad del implante y reduzca el potencial de acumulación de polímero después de administraciones repetidas. Además, el aumento de carga de API debería traducirse en unos menores costes de fabricación por unidad.

Ejemplo 3- 5: Efecto del proceso de microencapsulación de suspensión micronizada en el perfil de liberación in vitro de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

Se prepararon composiciones farmacéuticas que comprenden 25 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina (forma de monohidrato) en 9:1 de R202H:RG752H, 30 % y 40 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en 9:1 de R203H:RG752H, 25 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en R202H, 30 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en R202S, y 30% de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en R203S con la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. Hágase referencia a la Tabla 10 para masas de fármaco y polímero usadas para preparar cada lote. Los lotes 27, 28 y 29 se prepararon usando 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-

2-amina a partir de lotes de fabricación, mientras que los lotes 30, 31, 32, 33, 34 y 35 se prepararon usando 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina que se micronizó usando un proceso de microfluidificación para asegurar que el tamaño de partícula era menor de 10 µm de diámetro. Este ejemplo compara la diferencia en las microesferas obtenidas cuando el polímero se dispersa en una solución de alcohol polivinílico (PVA) con o sin acetato de etilo (EA), así como la carga de API, la composición de polímero y las diversas concentraciones de solución de polímero (variando el volumen de EA).

10

Tabla 10: Composiciones de microesferas[†] preparadas con un proceso de microencapsulación de suspensión micronizada – 16% de API/9:1 de R202H:RG752H, 25 % de API/9:1 de R202H:RG752H, 30 % de API/R202H, 40 % de API/R202H, 25 % de API/R203H, 30 % de API/R203H, 40 % de API/R203H, 50 % de API/R203H

15

Lote n.º	Carga de GZ389988†	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero (mg)*	Volumen y composición de la solución de dispersión (ml)	Volumen de acetato de etilo (ml)
27	25 %	84 mg	9:1 R202H:RG752H	234:26	39 ml de PVA al 5 %	2,6
28	25 %	84 mg	9:1 R202H:RG752H	234:26	39 ml de PVA al 5 %	3,25
29	25 %	84 mg	R203H	260	39 ml de PVA al 5 %	2,0
30	30 %	112 mg	9:1 R203H:RG752H	234:26	39 ml de PVA al 5 % + acetato de etilo al 2,5 %	2,0
31	40 %	174 mg	9:1 R203H:RG752H	234:26	39 ml de PVA al 5 % + acetato de etilo al 2,5 %	2,0
32	30 %	112 mg	9:1 R203H:RG752H	234:26	39 ml de PVA al 5 % + acetato de etilo al 2,5 %	2,0
33	30 %	112 mg	9:1 R203H:RG752H	234:26	39 ml de PVA al 5 % + acetato de etilo al 2,5 %	2,3
34	30 %	112 mg	R202S	260	39 ml de PVA al 5 % + acetato de etilo al 2,5 %	2,0

Lote n.º	Carga de GZ389988†	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero (mg)*	Volumen y composición de la solución de dispersión (ml)	Volumen de acetato de etilo (ml)
35	30 %	112 mg	R203S	260	39 ml de PVA al 5 % + acetato de etilo al 2,5 %	2,0

‡ Preparado mediante extracción de disolvente

† GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

* Cantidad total de polímero = 260 mg

5 Los análisis de SEM mostraron que las microesferas producidas mediante encapsulación de una suspensión de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina fueron esféricas con una textura de superficie rugosa debido a la presencia de cristales de fármaco embebidos en la superficie (Figura 16). La eficacia de la encapsulación y los análisis de IVR se realizaron como se describe en el Ejemplo 3- 1. La eficacia de encapsulación para los números de lote 30, 31, 32, 33, 34, y 35 fueron del 103,3 ± 3,8 %, 101,6 ± 5,3 %, 94,7 ± 4,0 %, 97,1 ± 0,2 %, 35,6 ± 0,8 % y 62,5 ± 3,0 %, respectivamente. La eficacia de encapsulación no se efectuó en los lotes 27, 28 o 29.

15 Los perfiles de IVR mostraron una liberación por ráfagas en el intervalo del 25 % al 47 %, seguido de una ausencia de liberación tras 4 días (Figura 17). Los lotes se evaluaron durante hasta 21 días.

Ejemplo 3- 6: Efecto del proceso de microencapsulación en el perfil de liberación in vitro de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

20 Se prepararon composiciones farmacéuticas que comprendían un 16 % y un 25 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en 9:1 de R202H:RG752H y un 25 % y un 30 % de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en R203H usando una proporción 9:1 de diclorometano (DCM):alcohol bencílico (BA). Hágase referencia a la Tabla 11 para masas de fármaco y polímero usadas para preparar cada lote. El método usado para preparar el lote 23 se describe en

30 Ejemplo 3- 1, lote 2. El lote 24 se preparó disolviendo 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en 5,016 g de 9:1 de DCM/MeOH con sonicación suave. Entonces se añadieron los dos polímeros y se disolvieron.

Tabla 11: Composiciones de Microesferas preparadas mediante extracción de disolventes – 16 % de API/9:1 de R202H:RG752H y Sin API/9:1 de R202H:RG752H

Lote n.º	Carga de GZ389988 †	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero (mg)*	Proceso de Microencapsulación
36	16 %	50 mg	9:1 R202H:RG75 2H	234:26	Extracción de disolventes
37	16 %	238,8 mg	9:1 R202H:RG75 2H	1140:114	Secado por pulverización
38	16 %	238,8 mg	9:1 R202H:RG75 2H	1140:114	Secado por pulverización
39	16 %	238,8 mg	9:1 R203H:RG75 2H	1140:114	Secado por pulverización

† GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

* Cantidad de polímero total = 260 mg para lote 23 y 1254 mg para lote 24

Se realizó secado por pulverización usando un ProCepT, unidad 4M8 equipado con una boquilla de dos fluidos con una abertura de 0,4 mm. A continuación se enumeran las condiciones y parámetros de secado por pulverización:

Lote n.º	37	38	39
carga de GZ389988 (% p/p)	16	16	16
Disolvente (Cloruro de metileno:Metanol (v/v))	90:10	90:10	90:10
Concentración de solución de PLGA (% p/v):	20	22,5	22,5
Velocidad de pulverización (ml/min):	0,7	0,7	0,7
Flujo de nitrógeno de atomización (l/min):	4	4	4
Cantidad de pulverización (g):	6,4	5,8	5,8
Temperatura de entrada (°C):	50	50	50
Temperatura de la cámara (°C):	41-43	40,7	40,0
Temperatura de salida (°C):	27,4	22,0	22,1
Flujo de nitrógeno (m³/min):	0,35	0,35	0,35
Presión del Tubo de Transferencia (mBar):	31-32	31 - 32	32
Rendimiento (% p/p)	72,8	76,7	51,6

Los análisis de SEM mostraron que las microesferas de extracción de disolventes fueron esféricas con una textura de superficie suave y las microesferas de secado por pulverización fueron esféricas con un poco de textura de superficie (Figura 18 y Figura 19). La eficacia de la encapsulación y los análisis de IVR se realizaron como se describe en el Ejemplo 3- 1. Las eficacias de encapsulación para el lote de extracción de disolventes 36 y los lotes de secado por pulverización 37 y 38 fueron 107,4 ± 11,6 %, 91,4 ± 4,3 %, y 92,6 ± 3,6 %, respectivamente.

Los dos procesos de microencapsulación produjeron microesferas con perfiles de liberación próximos a orden cero. Figura 18 y la Figura 19 muestra SEM de microesferas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina a 1000X. Los perfiles de IVR muestran tasas de liberación diferentes (Figura 20); la formulación de secado por pulverización consigue la duración de liberación deseada de 3-6 meses.

Ejemplo 3- 7: Efecto de 1 % de 10 kDa de PEG o 1 % de Poloxámero 407 sobre Perfil de liberación *in vitro* de Microesferas de Secado por Pulverización de 16 % (p/p) de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

Este experimento se realizó para determinar si la adición de un aditivo hidrófilo puede usarse para acelerar la tasa de liberación *in vitro* de GZ389988 de microesferas de PLA/PGA. En este experimento, se compararon microesferas (sin aditivos) con microesferas preparadas con 1 % de 10 kDa de PEG o 1 % de Poloxámero 407. Tabla 12 detalla las masas de fármaco y polímero usadas para preparar cada lote.

Tabla 12: Composiciones de Microesferas[‡] Preparadas con 1 % de 10 kDa de PEG o 1 % de Poloxámero 407 – 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/Sin aditivo, 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/31,25 mg de PEG, 16 % de API/1:1 de R202H:R203H/31,25 mg de Poloxámero 407

Lote n.º	Carga de GZ389988 †	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero (mg:mg)	Cantidad de aditivo (mg)
40	16 %	500 mg	1:1 R202H:R203H	1310:1310	N/A
41	16 %	500 mg	1:1 R202H:R203H	1297:1297	31,25 10 kDa de PEG
42	16 %	500 mg	1:1 R202H:R203H	1297:1297	31,25 Poloxámero 407

[‡] Preparado por secado por pulverización
[†] GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

Se realizó secado por pulverización usando un ProCepT, unidad 4M8 equipado con una boquilla de dos fluidos con una abertura de 0,4 mm. A continuación se enumeran las condiciones y parámetros de secado por pulverización:

Lote n.º	40	41	42
carga de GZ389988 (% p/p)	16	16	16
Concentración de solución de PLGA (% p/v):	22,5	22,5	22,5
Velocidad de pulverización (ml/min):	0,7	0,7	0,7
Flujo de aire (l/min):	0,35	0,35	0,35
Flujo de nitrógeno de atomización (l/min):	4	4	4
Temperatura del enfriador (°C):	-4	-4	-4
Temperatura de entrada (°C):	50	50	50

Temperatura de la cámara (°C):	40	40	40
Temperatura de salida (°C):	29	29	29
Presión antes del Cyclone (mBar):	27-30	27-30	27-30

Los análisis de SEM mostraron que microesferas preparadas con o sin aditivos hidrófilos mostraban una distribución de tamaño y textura de superficie similar; todas las microesferas de secado por pulverización fueron esféricas con un poco de textura de superficie (Figura 21, Figura 22, y Figura 23). La eficacia de la encapsulación y los análisis de IVR se realizaron como se describe en el Ejemplo 3- 1. Las eficacias de encapsulación para los número de lote de secado por pulverización 40, 41 y 42 fueron $102,0 \pm 16,3\%$, $101,7 \pm 16,3 \%$ y $100,5 \pm 16,1 \%$, respectivamente.

Las microesferas preparadas sin aditivos mostraron, una liberación lenta de orden próximo a cero de GZ389988 con aproximadamente un 20 % del compuesto activo liberado durante 35 días (Figura 24). La adición de 1 % de 10 kDa de PEG o 1 % de Poloxámero 407 aumentó la tasa de liberación; aproximadamente un 42 % del compuesto activo se liberó durante 35 días. Este ejemplo demuestra que la incorporación de un excipiente hidrófilo aceleró la tasa de liberación *in vitro* de GZ389988 a partir de microesferas de PLA/PGA.

Ejemplo 4: Estudios *In vivo*

Ejemplo 4- 1: Rendimiento *in vivo* de Microesferas cargadas con [¹⁴C]- 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina Tras inyección Intra-Articular en una articulación de rodilla de rata

Se seleccionaron dos formulaciones para comparar las cinéticas de liberación *in vitro* con la persistencia de fármaco *in vivo* en la articulación de rodilla de rata. Las formulaciones se presentan en la Tabla 13.

Se realizó un ensayo de liberación *in vitro* usando el método descrito en el Ejemplo 3- 1. Se realizó un ensayo de persistencia de fármaco *in vivo* usando [¹⁴C]-3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina y 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina sin marcar; las dos formas de fármaco se co-solubilizaron durante los procesos de microencapsulación para asegurar la distribución uniforme de fármaco en las microesferas. La cantidad total de radioactividad administrada a cada articulación de rata fue ~ 1,2 MBq.

La evaluación de fármaco que quedaba en las articulaciones de rodilla de rata se realizó sacrificando 2-3 ratas en cada momento temporal, criotriturando la articulación de la rodilla y extrayendo la 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina del tejido triturado. La cuantificación se realizó mediante recuento de centelleo líquido. La cantidad de radioactividad recuperada en la articulación se calculó dividiendo los recuentos radioactivos en cada momento temporal entre los recuentos radioactivos en ratas sacrificadas a las 0,1 horas tras el tratamiento. Las concentraciones de fármaco radioactivo en sangre de rata

(expresadas como nEq/g) se representaron a lo largo del tiempo y en comparación con el valor de CI50 conocido para el compuesto.

Tabla 13: Composiciones de microesferas ensayadas *in vivo* – 16% de API/9:1 de 202:H:RG502H y 15% de API/9:1 de R203H:RG752H

Lote n.º	Carga de GZ389988† + [14C] GZ389988	Peso de GZ389988 (mg)	Relación de polímero	Cantidad de polímero (mg)*
43	16 %	50 mg	9:1 R202H:RG502H	234:26
44	15 %	47 mg	9:1 R203H:RG752H	234:26

† GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

* Cantidad total de polímero = 260 mg

Los perfiles de IVR para los lotes 40 y 41 muestran una liberación de orden próximo a cero durante aproximadamente 3-4 meses y 5-6 meses, respectivamente (Figura 25). Después de la administración intraarticular en las articulaciones de la rodilla de ratas, los lotes 43 y 44 mostraron liberación de fármaco durante 5 a 6 meses; el lote 43 mostró un 12 % restante en la articulación tras 5 meses y el lote 44 mostró un 30 % del fármaco restante después de 6 meses (Figura 26). La velocidad de liberación de fármaco *in vivo* fue ligeramente menor en comparación con la velocidad de IVR igualmente debido a la localización de las microesferas en el sinovio.

Figura 27 muestra el perfil de concentración-tiempo de fármaco en sangre. Después de la administración intra-articular de microesferas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina, la concentración de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en el compartimento sistémico fue ligeramente mayor al valor de CE₅₀ (basado en células) durante la primera semana, pero después se precipitó por debajo del valor de CE₅₀ durante la duración del experimento (5-6 meses). Este experimento demuestra que las microesferas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina proporcionan administración sostenida local del fármaco a la articulación de la rodilla con una baja exposición sistémica (es decir, subterapéutica) al fármaco.

Ejemplo 4- 2: Evaluación de la farmacocinética de GZ389988 después de una sola inyección intraarticular de tres formulaciones de microesferas cargadas con 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina de liberación sostenida

Se seleccionaron tres formulaciones para comparar la farmacocinética *in vitro* e *in vivo* en el compartimento sistémico después de la inyección intraarticular en las articulaciones de la rodilla de ratas. Las formulaciones se presentan en la Tabla 14.

El ensayo de liberación *in vitro* se efectuó usando el método descrito en la Ejemplo 3- 1. El rendimiento *in vivo* se midió inyectando a 3 ratas Wistar macho con una

formulación de microesferas dada administrando bien 0,1 o 1 mg de GZ389988 a la articulación de la rodilla. En cada instante, se recogieron muestras de sangre (~0,25 ml) mediante una cánula en la vena yugular y se colocaron en tubos enfriados que contenían K₂EDTA como anticoagulante, se mezclaron, y se mantuvieron sobre hielo hasta su centrifugación. Las muestras se centrifugaron dentro de un margen de 1 hora de su recolección a una temperatura de 4 °C, a 3.000 g durante 5 a 10 minutos. Se recogió el plasma después de la centrifugación de las muestras de sangre en tubos de polipropileno. Las muestras de plasma se congelaron sobre hielo seco y se almacenaron congeladas a entre -60 a -80 °C antes del análisis por CL-EM/EM. La concentración de GZ389988 en plasma de rata (expresado como ng/ml) se representó frente al tiempo (28 días en total).

Tabla 14: Composiciones y dosis de microesferas ensayadas para evaluar la farmacocinética de GZ389988

Formulación	Lote n.º	Carga de GZ389988†	Relación de polímero	Dosis administrada (mg)
A	45	16 %	9:1 R202H:RG752H	0,1
	46	16 %	9:1 R202H:RG752H	1
B	47	15 %	9:1 R203H:RG752H	0,1
	48	15 %	9:1 R203H:RG752H	1
C	49	40 %	R203H	0,1
	50	40 %	R203H	1

† GZ389988 = 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

Los perfiles de IVR para la formulación A y la formulación B muestran una liberación lenta con aproximadamente un 10 % del principio activo liberado durante 28 días. La formulación C muestra una liberación inicial ligeramente mayor durante los 5 primeros días, seguido de una velocidad de liberación disminuida durante los 23 días restantes; aproximadamente un 22 % del compuesto activo se liberó durante 28 días.

Después de la administración intraarticular en las articulaciones de la rodilla de ratas, Las formulaciones A y B mostraron perfiles de exposición al fármaco en plasma similares durante 28 días; ambas formulaciones mostraron valores de T_{max} de 1-1,5 horas con niveles de estado estacionario en plasma durante la duración del experimento (0,08 y 0,8 ng/ml para las dosis de 0,1 y 1,0 mg, respectivamente). En comparación con las formulaciones A y B, la formulación C mostró un valor de C_{max} mayor y un nivel de estado estacionario mayor durante la duración del experimento (1,2 a 12 ng/ml para las dosis de 0,1 y 1,0 mg, respectivamente) (Figura 29). Estos resultados estaban en consonancia con los resultados del experimento de IVR.

Ejemplo 4- 3: Estudio clínico para evaluar la seguridad, tolerabilidad, y farmacocinética de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina en pacientes con osteoartritis dolorosa de

rodilla

Se ensayó la seguridad y eficacia de la forma de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en seres humanos en un estudio clínico con doble enmascaramiento en dos partes controlado por placebo para evaluar la seguridad, tolerabilidad, y farmacocinética de

En la parte uno del estudio, se ensayaron inyecciones intraarticulares individuales en la rodilla de diversas dosis de suspensión microcristalina de monohidrato de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina, producida de acuerdo con

Ejemplo 2 anterior, frente a dosis de placebo de 3 ml y 5 ml.

Dosificación

- 3 mg/3 ml
- 10 mg/3 ml
- 30 mg/3 ml
- 60 mg/3 ml
- 100 mg/5 ml

Los hombres y mujeres adultos con un diagnóstico de osteoartritis primaria de rodilla son seleccionables para su participación en el estudio. Los pacientes son sintomáticos durante más de 6 meses y proporcionan un consentimiento informado por escrito para cualquier procedimiento relacionado con el estudio.

La eficacia se evalúa basándose en la seguridad y tolerabilidad (efectos adversos, examen físico, peso corporal, temperatura corporal, pruebas clínicas de laboratorio, presión sanguínea, frecuencia cardíaca, electrocardiograma de 12 polos, tolerancia local) a las 12 semanas después de la inyección. La farmacocinética (en plasma y, en caso posible, en el fluido sinovial) y la farmacodinámica se evalúan también.

Se efectúa el seguimiento de los pacientes durante 84 ± 7 días después de la administración de fármaco de estudio o placebo, con la opción de continuar en un estudio de observación de la seguridad a largo plazo sin estudio adicional de administración de fármaco para evaluar la seguridad y eficacia a largo plazo.

Ejemplo 5: Estudio de polimorfismo de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-piraz-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina

Se llevó a cabo un estudio de polimorfismo de GZ389988 para identificar formas cristalinas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-2-amina en disolventes puros y mezclas controladas de disolvente y agua. Las técnicas usadas como herramientas de caracterización de los polimorfismos incluyen difracción de polvo de rayos X (XRPD), difracción de polvo de rayos X de alta resolución (HR-XRPD) y difracción de rayos X de cristales individuales (XRSCD),

análisis termogravimétrico (TGA) acoplado a espectroscopía infrarroja (FT-IR) o espectrometría de masas (EM), absorción dinámica de vapor (DVS) de agua y disolventes, y microscopía óptica (OM). Estas técnicas se describen en más detalle a continuación.

5 DIFRACCIÓN DE POLVO DE RAYOS X DE ALTA RESOLUCIÓN (HR-XRPD)

Se registraron diagramas de alta resolución en condiciones ambientales en un difractómetro de polvo Panalytical X'Pert Pro MPD usando la geometría de para enfoque de Bragg-Brentano (configuración θ - 2θ vertical) acoplado a un detector X'Celerator. Se usó un tubo de rayos X de ánodo de cobre sellado, funcionando a niveles de 45 kV y de 10 40 mA. Un monocromador de haz incidente (tipo Johansson: un cristal de germanio (111) cortado de manera simétrica) produjo radiación Cu K α 1 pura ($\lambda = 1,54060 \text{ \AA}$).

Para cada conjunto de experimentos, se depositó una fina capa del producto sobre la superficie de un soporte de muestras, cubierto con una sola oblea de cristal de silicio. La oblea se había cortado de acuerdo con la orientación cristalográfica de Si 15 (510) que, mediante extinción sistemática, impidió cualquier reflexión de Bragg del silicio. El intervalo angular disponible se extendió desde 2 hasta 50° en 2θ , con un tamaño de paso de $0,017^\circ$ en 2θ . Se usó un tiempo de recuento variable de 100 a 2500 segundos por etapa.

DIFRACCIÓN DE POLVO DE RAYOS X (XRPD)

20 Otros análisis de XRPD se llevaron a cabo en un difractómetro de polvo Siemens-Brucker D8 Advance, usando también la geometría de para enfoque de Bragg-Brentano (configuración θ - θ vertical), y una cámara de temperatura Anton-Paar TTK450. Se depositó una fina capa del producto sobre una sola oblea cristalina de silicio, se cortó de acuerdo con la orientación cristalográfica de Si (510) que, mediante extinción 25 sistemática, impidió cualquier reflexión de Bragg de la oblea. Se usó un tubo de rayos X de ánodo de cobre que funciona a 40 kV y 35 mA. Típicamente se emitieron dos líneas: CuK α 1 ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$) y CuK α 2 ($\lambda = 1,5443 \text{ \AA}$). Un filtro β de níquel, situado entre el detector y el espécimen, no eliminó completamente la radiación de CuK β ($\lambda = 1,3922 \text{ \AA}$), que siguió contribuyendo a aproximadamente un 1 % del haz difractado hacia el 30 detector (datos del fabricante). El haz se envió a través de ranuras de Soller para mejorar su paralelismo. Las ranuras de divergencia variable mantuvieron la iluminación del área de la muestra constante. Un colimador limitó la difusión entre el tubo y la muestra. Un detector lineal LynxEye completó la configuración. Tenía una ventana de detección de 3.5° de amplitud en ángulo 2θ . Se registraron diagramas en las siguientes 35 condiciones: a temperatura ambiente, barridos de 2 a 40° en ángulo 2θ . Los tiempos de integración dependieron de las condiciones experimentales. Los estudios de evolución y la mayoría de los barridos se llevaron a cabo usando un tiempo de recuento de 0,1 por etapa en 2θ . Pueden haberse usado tiempos mayores de integración (de hasta 5s) para caracterizar formas estables.

40 DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE CRISTALES INDIVIDUALES (XRSCD, TAMBIÉN DENOMINADO SCXRD)

Los datos de XRSCD se registraron en un difractómetro de cristales individuales Bruker Smart Apex. Se usó una fuente de rayos X de molibdeno IμS, funcionando a 50 kV y 0,6 mA, emitiendo radiación Mo-Kα (λ = 0,710731 Å). Se colocó un dispositivo acoplado a carga (chip CCD: 4K, 62 mm) detector de área a 6,0 cm. Un criostato de nitrógeno Oxford Cryosystems (Cryostream Plus) permitió que los experimentos de XRSCD se llevasen a cabo a 100 K.

Los cristales se montaron a partir de una gota de aceite Paratone N™ sobre un bucle de bajo fondo mylar MiTeGen. Se recogió una esfera completa de Ewald de las reflexiones (barridos 3 omega de 680 marcos con un ancho de marco de 0,3°). Los tiempos de acumulación dependieron del cristal.

La matriz de orientación y la celda unitaria se establecieron usando el conjunto de programas Apex2 (v2014.11-0). El perfil de reflexión en 3D y la integración de todas las reflexiones se llevaron a cabo con el programa SAINT (v8.34A). Se usó el programa SADABS (v2014/5) para corregir respecto de los efectos de Lorentz y de polarización y para la absorción de la muestra. El grupo espaciador tentativo se determinó con el programa XPREP (v2014/2). Se usó el conjunto de programas SHELXTL (v2014/7) para resolver la estructura mediante el método de fase intrínseco y para refinar la solución mediante cálculos de mínimos cuadrados de matriz completa en F².

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN POLIMÓRFICA

Usando las técnicas anteriormente descritas, se identificaron formas cristalinas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina. Estas forma, los picos 2θ de XRPD medidos usando radiación de CuKα y las condiciones de formación se exponen en la Tabla 15 a continuación.

Tabla 15: Formas de 3-(3-metoxi-4-((4-metoxibencil)oxi)bencil)-6-(1-metil-1H-piraz-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-2-amina

Anhidra, Hidrato o Solvato	Número de polimorfo	Número de forma	Picos 2θ de XRPD Medidos usando radicación de CuKα	Condiciones de formación
Anhidra	1	Forma 2	3,8, 7,6, 11,0, 11,5, 13,3, 13,9 y 15,3	Forma obtenida mediante deshidratación del monohidrato 1
Anhidra	1	Forma 3	6,0, 6,9, 10,9, 12,4, 12,7, 13,7 y 15,3	Obtenido a alta temperatura (160 °C para el monohidrato 1, ~120 °C para solvatos)
Anhidra	3	Forma 6/7	5,6, 8,1, 12,1, 14,0, 16,2 y 20,7	Forma obtenida mediante desolvatación del monohidrato 2 y de etanol, 2 solvatos de acetonitrilo y acetona
Monohidrato	1	Forma 1	3,6, 7,1, 8,9, 10,4, 10,7, 12,4, 12,7 y 14,3	Véase el Ejemplo 1

Anhidra, Hidrato o Solvato	Número de polimorfo	Número de forma	Picos 2θ de XRPD Medidos usando radiación de CuK _α	Condiciones de formación
Monohidrato	2	Forma 8	5,5, 6,4, 8,2, 12,5, 12,8 y 16,5	Forma que deriva de etanol, 2 solvatos de acetonitrilo y acetona 2 (a partir de ciclos de “N ₂ /vapor de H ₂ O”)
Sesquihidrato		Forma 4	3,5, 7,1, 9,3, 10,3, 10,6, 12,4, 13,0 y 14,1	Forma obtenida mediante cristalización en acetona/agua
Solvato de etanol		Forma 5	5,3, 6,3, 7,5, 11,4, 12,6, 12,8 y 15,1	Forma obtenida mediante recrystalización del monohidrato 1 en etanol o de solvatación de etanol de la forma anhidra 3
Solvato de acetona	1	Forma 9	6,1, 8,9, 12,1, 15,3, 16,4, 18,2 y 21,2	Forma obtenida mediante recrystalización del monohidrato 1 en acetona pura y 99:1 de acetona/agua
Solvato de acetona	2	Forma 10	5,4, 6,2, 7,4, 11,4, 12,6 y 14,8	Forma obtenida mediante recrystalización del monohidrato 1 en acetona pura o a partir de solvatación de acetona de la forma anhidra 3
Solvato de acetonitrilo		Forma 11	5,3, 6,4, 7,7, 11,6, 12,8, 13,2 y 15,5	Forma obtenida mediante recrystalización del monohidrato 1 en acetonitrilo o a partir de solvatación de acetonitrilo de la forma anhidra 3

Los diagramas de HR-XRPD medidos de la Forma 1 monohidrato, Formas 2 y 3 anhidras, así como el diagrama de XRPD simulado de la Forma 4 sesquihidrato, se representan juntas en la Figura 30.

5 Una suspensión de 20 mg/ml del monohidrato de forma GZ389988A en un disolvente mixto de etanol/agua (99/1) se calentó a 80 °C durante 1 h. Después, la suspensión se filtró. A continuación, la solución se mantuvo a temperatura ambiente durante una noche. Después de una noche, se observaron cristales, después se identificaron como correspondientes a la forma de solvato de etanol (marcada como

10 Forma 5). La calidad física del cristal obtenido mediante evaporación lenta de una mezcla de etanol y agua (99/1) fue adecuada para su análisis mediante difracción de rayos X de un solo cristal. La medición se realizó a 100 K en un cristal de 5 x 50 x 200 μm³, con un tiempo de acumulación de 300 s por estructura. Los difractogramas confirmaron la cristalinidad de la partícula analizada. Figura 31 muestra el diagrama de

15 HR-XRPD de polvo de solvato de etanol (parte inferior) medido a temperatura ambiente, en comparación con el diagrama de XRPD simulado a partir de datos de XRSCD medidos a 100 K (parte superior).

Una suspensión de 20 mg/ml del monohidrato 1 de forma GZ389988A (Forma 1) se preparó en una mezcla de disolventes de acetona/agua (99/1) o en acetona pura, y se calentó hasta 80 °C durante 1 h para conseguir la disolución completa. A continuación, la suspensión se filtró. La solución se mantuvo a temperatura ambiente o a 5 °C. Después de una noche, los cristales fueron visibles a simple vista, más tarde se identificaron como correspondientes a una forma de solvato de acetona (marcada como Forma 9). La calidad física del cristal obtenido mediante evaporación lenta de una mezcla de acetona y agua (99/1) fue adecuada para su análisis mediante difracción de rayos X de un solo cristal. La medición se realizó a 100 K en un cristal de 100 x 200 x 2000 μm^3 , con un tiempo de acumulación de 30 s por estructura. Figura 32 muestra el diagrama XRPD para polvo de solvato de acetona, medido a temperatura ambiente (parte inferior) y simulado a partir de XRSCD a 100 K (parte superior).

En otro experimento, se preparó una suspensión de 20 mg/ml de monohidrato 1 de forma GZ389988A (Forma 1) en acetona pura, y se calentó a 80 °C durante 1 h. A continuación, la suspensión se filtró, y se enfrió directamente a 5 °C y se almacenó a esa temperatura. Después de una noche, los cristales fueron visibles a simple vista y similares a los obtenidos para el solvato de acetona 1, Forma 9. Después de molerlos en una suspensión en un mortero, se identificaron como correspondientes a otro solvato de acetona, Forma 10. La Figura 33 compara los XRPD para las dos formas de solvato de acetona, Forma 9 (parte inferior) y Forma 10 (parte superior).

Una suspensión de 20 mg/ml de monohidrato de forma GZ389988A en acetonitrilo (ACN) se calentó a 80 °C durante 4 h. Después, la suspensión se filtró. A continuación, la solución se mantuvo a 40 °C, después se dejó durante 2 horas para enfriar a temperatura ambiente. Después de una noche, se habían formado grupos de cristales en la parte inferior del vial. El diagrama de HR-XRPD de la forma del solvato de acetonitrilo (ACN) (Forma 11) se indica en la Figura 34.

IDENTIFICACIÓN DE LA FASE CRISTALINA SÓLIDA QUE SE FORMA EN DISOLVENTES MIXTOS DE ACETONA/AGUA Y ACETONITRILLO/AGUA

Se complementaron 50 mg del Monohidrato 1 de GZ389988A con 2 ml de una mezcla de un disolvente (acetona o acetonitrilo) y agua desmineralizada, a tres proporciones en peso diferentes: 50/50, 80/20 y 95/5. Con acetona, se probaron mezclas adicionales a proporciones de 99/1 y 98/2. Después de 2 horas a 80 °C, las muestras se filtraron en un filtro de jeringa PTFE con un tamaño de poro nominal de 0,45 μm , y se almacenaron de nuevo a 80 °C durante 15 minutos después de filtración.

Después, las muestras se dejaron enfriar durante una noche a 40 °C, y después a temperatura ambiente durante otras 24 horas.

Después, las muestras se analizaron mediante XRPD en una cámara saturada con el disolvente correspondiente. Según necesidad, se rompieron los cristales grandes en el vial con una espátula en un polvo fino. Después, una muestra de polvo "húmedo" se depositó tan plana como fue posible en el porta muestras. Los resultados de estos análisis se muestran a continuación en la Tabla 16.

Tabla 16: Fase cristalina sólida de GZ389988A en Mezclas de acetona/agua y acetonitrilo/agua

Disolvente	Proporción en peso de Disolvente/Agua	Fase(s) cristalina(s)
Acetona	99/1	Forma 9 de solvato de acetona
	98/2	Monohidrato 1
	97/3	Monohidrato 1
	95/5	Monohidrato 1
	80/20	Monohidrato 1
	50/50	Monohidrato 1
Acetonitrilo	95/5	Monohidrato 1
	80/20	Monohidrato 1
	50/50	Monohidrato 1

Se estudió la formación de solvatos e hidratos a partir de cristalización de Monohidrato 1 en etanol, acetona, acetonitrilo y mezclas de acetona/agua y acetonitrilo/agua y se presenta en este ejemplo. Se han identificado diez fases cristalinas:

- Fase anhidra 1 (Forma 2)
- Fase anhidra 2 (Forma 3)
- Fase anhidra 3 (Forma 6/7)
- Monohidrato 1 (Forma 1)
- Monohidrato 2 (Forma 8)
- Sesquihidrato (Forma 4)
- Solvato de etanol (Forma 5)
- Solvato de acetona 1 (Forma 9)
- Solvato de acetona 2 (Forma 10)
- Solvato de acetonitrilo (Forma 11)

Los difractogramas correspondientes se representan juntos en la Figura 35.

A partir del estudio de polimorfismo realizado en etanol, acetona y acetonitrilo, así como en mezclas de disolventes (acetona/agua y acetonitrilo/agua), pueden perfilarse muchas conclusiones. Todos los tres disolventes puros conducen a la formación de fases de solvato cristalino sólido. La recrystalización de GZ389988A en etanol y acetonitrilo condujo cada una a una forma de solvato. Se han obtenido dos formas de solvato a partir de recrystalización en acetona. Los cristales formados en disolventes mixtos de acetona/agua con proporciones en peso de 98:2, 97:3, 95:5, 80:20 y 50:50 están todos en la fase cristalina de monohidrato 1. Los cristales formados en disolventes mixtos de acetonitrilo/agua con proporciones en peso de 95:5, 80:20 y 50:50 son también todos cristales de monohidrato 1. Se ha observado que el solvato de acetona 1 se transforma en un sólido en su mayoría amorfo después de desolvatación. Si se aumenta la movilidad molecular mediante la presencia de vapores de acetona y

agua mezcladas, tanto los cristales de solvato 1 de acetona iniciales como el sólido amargo se reorganizan en el monohidrato 1. El solvato 1 de etanol, acetonitrilo y acetona expuesto a una temperatura de 120 °C en una atmósfera de nitrógeno se desolvata en la misma fase 2 cristalina amorfa. Se observa isomorfismo para las formas

5 de solvato 2 de etanol, acetonitrilo y acetona (que debe confirmarse por difracción de rayos X de un solo cristal). Todas ellas se desolvatan reversiblemente en la misma fase 3 anhidra. Los hidratos de fase 3 anhidra en una forma de monohidrato, “monohidrato 2”, diferente del monohidrato 1.