

UN DERIVADO DE OXAZINA BASE LIBRE EN FORMA CRISTALINA

Campo de la invención.

La presente invención se refiere a una forma sólida específica de *N*-(6-
5 ((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-(trifluorometil)-3,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-3-il)-5-fluoropiridin-2-il)-3-cloro-5-(trifluorometil)picolinamida, a decir, la Forma A. La presente invención describe además el proceso para preparar dicha forma sólida, composiciones farmacéuticas que comprenden dicha forma sólida, y métodos para usar dicha forma sólida y composiciones farmacéuticas en el
10 tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer o angiopatía amiloide cerebral.

Antecedentes.

La enfermedad de Alzheimer (AD, conforme a sus siglas en inglés) es uno de los trastornos neurológicos de mayor incidencia en todo el mundo y la afección
15 más común y debilitante relacionada con la edad, que causa amnesia progresiva, demencia y, en última instancia, insuficiencia cognitiva global y muerte. Actualmente, las únicas terapias farmacológicas disponibles son fármacos sintomáticos, tales como los inhibidores de la colinesterasa u otros fármacos utilizados para controlar los síntomas conductuales secundarios de la AD. Los
20 tratamientos de investigación dirigidos a la cascada patógena de la AD incluyen aquellos destinados a interferir con la producción, acumulación o las secuelas tóxicas de especies de amiloide- β ($A\beta$) (Kramp VP, Herrling P, 2011). Las estrategias que apuntan a disminuir el $A\beta$ mediante: (1) la mejora del aclaramiento amiloideo con una inmunoterapia activa o pasiva contra $A\beta$; (2) la disminución de
25 la producción a través de la inhibición de la enzima 1 de escisión de APP sitio beta (BACE-1, una enzima involucrada en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide [APP]) tienen un valor terapéutico potencial. Aún no se ha

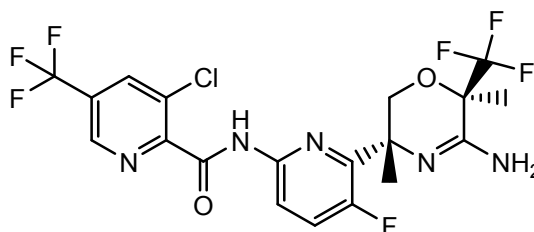
descripto en la bibliografía ningún tratamiento eficaz para modificar la enfermedad de la EA.

La angiopatía amiloide cerebral (CAA, por sus siglas en inglés) es una enfermedad común de los vasos pequeños cerebrales relacionada con la edad, caracterizada por el depósito progresivo de amiloide- β ($A\beta$), en particular, $A\beta_{40}$, en la pared de arterias, arteriolas y capilares de tamaño pequeño a mediano de la corteza cerebral y leptomeninges superpuestas (Charidimou A et al., 2011). CAA a menudo coexiste con la enfermedad de Alzheimer (AD). Las formas leves de CAA a menudo aparecen asintomáticas; sin embargo, la CAA también puede conducir a patologías vasculares graves, y es un factor de riesgo para hemorragias cerebrales, que varían desde microsangrados silenciosos hasta hemorragia intracerebral espontánea, una forma devastadora de accidente cerebrovascular.

APOE4 es un fuerte factor de riesgo genético tanto para AD como para CAA (Shinohara M et al., 2016). La ApoE humana se encuentra en el cromosoma 19 (gen *APOE*, Uniprot P02649). Se conocen tres isoformas principales (apoE2, -3 y -4) en los seres humanos. ApoE4 (con Arg en las posiciones 112 y 158) tiene una frecuencia de alelos de 5–35% en humanos (Verghese PB et al., 2011), y se estima que los homocigotos ApoE4 representan aproximadamente el 2 al 3% de la población general (Quintino–Santos SR et al., 2012).

Las estrategias que apuntan a disminuir el $A\beta$ mediante: (1) la mejora del aclaramiento amiloideo con una inmunoterapia activa o pasiva contra $A\beta$; (2) la disminución de la producción a través de la inhibición de la enzima 1 de escisión de APP sitio beta (BACE-1, una enzima involucrada en el procesamiento de la proteína precursora de amiloide [APP]) tienen un valor terapéutico potencial en el tratamiento o la prevención de la AD y CAA, particularmente, en pacientes que portan una o dos copias del alelo ApoE4.

N-(6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-(trifluorometil)-3,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-3-il)-5-fluoropiridin-2-il)-3-cloro-5-(trifluorometil)picolinamida, en adelante, referido como Compuesto 1,



(1)

5

es un inhibidor de BACE oralmente activo, descrito anteriormente en el documento WO 2012/095469 A1. Sin embargo, después de que un compuesto específico se identifica como un candidato prometedor para el uso en una composición farmacéutica, todavía es necesario ajustar sus propiedades con respecto a una serie de parámetros críticos, como la estabilidad en estado sólido y/o formulaciones líquidas, higroscopicidad, cristalinidad, consideraciones toxicológicas, punto de fusión o solubilidad en agua y medios acuosos.

Por lo tanto, existe la necesidad de formular formas sólidas del Compuesto 1, para el uso en el desarrollo de sustancias farmacológicas y productos farmacéuticos. Se ha encontrado que las formas sólidas del Compuesto 1 se pueden preparar como una o más formas polimorfas, incluida una forma de hidrato. Estas formas polimorfas exhiben propiedades físicas que pueden explotarse para mejorar aún más las propiedades farmacológicas, y que pueden utilizarse en el desarrollo de sustancias farmacológicas y productos farmacéuticos.

20

Síntesis de la invención.

En un aspecto, se proporciona aquí una Forma cristalina A del Compuesto de Fórmula 1.

En otro aspecto, se proporciona aquí una composición farmacéutica que comprende la Forma cristalina A del Compuesto de Fórmula 1 y por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, se proporciona en este documento la Forma cristalina A
5 del Compuesto de Fórmula 1 para el uso como un medicamento.

En un aspecto adicional, en la presente memoria se proporciona la Forma cristalina A del Compuesto de Fórmula 1 para el uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer o de la angiopatía amiloide cerebral.

Breve descripción de los dibujos.

10 La Figura 1 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo para la Forma A cristalina no micronizada del Compuesto de Fórmula 1 cuando se mide utilizando radiación CuK_α .

La Figura 2 muestra el termograma de DSC (calorimetría de barrido diferencial, conforme a sus siglas en inglés) para la Forma A cristalina no
15 micronizada.

La Figura 3 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo para la Forma A cristalina micronizada del Compuesto de Fórmula 1 cuando se mide utilizando radiación CuK_α .

La Figura 4 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo para la
20 Forma B cristalina del Compuesto de Fórmula 1 cuando se mide usando radiación CuK_α .

La Figura 5 muestra el termograma de DSC para la Forma B cristalina.

La Figura 6 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo para la Forma H_A de hidrato del Compuesto de Fórmula 1 cuando se mide usando
25 radiación CuK_α .

La Figura 7 muestra el termograma de DSC para la Forma H_A de hidrato del Compuesto de Fórmula 1.

La Figura 8 muestra el patrón de difracción de rayos X en polvo para la forma amorfa del Compuesto de Fórmula 1 cuando se mide utilizando radiación CuK_α .

La Figura 9 muestra el termograma de mDSC para la forma amorfa del
5 Compuesto de Fórmula 1.

La Figura 10 muestra el diseño de un estudio de dos partes, con rótulos a la vista, de dos períodos, de secuencia fija en sujetos sanos para evaluar la PK del Compuesto 1 cuando se administra solo y en combinación con el fuerte inhibidor de CYP3A4 itraconazol, o el fuerte inductor de CYP3A4 rifampicina .

10 **Descripción detallada de la invención.**

Formas polimorfas y propiedades.

La presente invención proporciona una forma polimórfica de *N*-(6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-(trifluorometil)-3,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-3-il)-5-fluoropiridin-2-il)-3-cloro-5-(trifluorometil)picolinamida, que es la Forma A.
15 *N*-(6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-(trifluorometil)-3,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-3-il)-5-fluoropiridin-2-il)-3-cloro-5-(trifluorometil)picolinamida, también denominada el “Compuesto de Fórmula 1” o “Compuesto 1”, fue originalmente descrito en el documento WO 2012/095469 A1, Ejemplo 34. El documento WO 2012/095469 A1 se incorpora en el presente documento por referencia en su
20 totalidad, en particular, la divulgación referida a la síntesis del Ejemplo 34.

Como se describe en el presente documento, la base libre del Compuesto 1 puede ser una forma cristalina que existe como una o más formas polimorfas, incluidas las formas de hidratos. Estas formas polimorfas (conocidas
alternativamente en la técnica como formas polimórficas o formas cristalinas)
25 difieren con respecto a sus patrones de difracción de rayos X en polvo, propiedades espectroscópicas, fisicoquímicas y farmacocinéticas, así como en su estabilidad termodinámica.

Es deseable tener acceso a diferentes formas polimórficas del Compuesto 1 por varias razones. Las distintas formas polimorfas pueden mostrar diferentes propiedades físicas, como el punto de fusión, la higroscopicidad, la solubilidad, las propiedades de flujo o la estabilidad termodinámica, y por lo tanto, distintas formas polimorfas permiten la elección de la forma más adecuada para un uso o aspecto determinado, por ejemplo, en distintas formas de administración tales como cápsulas, o en la fabricación de una forma de fármaco que tiene propiedades farmacocinéticas óptimas.

Ahora se ha encontrado sorprendentemente que, bajo ciertas condiciones, pueden proporcionarse nuevas formas sólidas de *N*-(6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-(trifluorometil)-3,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-3-il)-5-fluoropiridin-2-il)-3-cloro-5-(trifluorometil)picolinamida, que se describen en adelante como Forma A, Forma B, Forma H_A de hidrato y forma amorfa, y que tienen utilidades y propiedades convenientes. En particular, la Forma A del Compuesto de Fórmula 1 muestra excelentes propiedades de estabilidad cuando se somete a condiciones de estrés. Una forma polimorfa particular del Compuesto 1, a saber, la Forma A, es más estable que todas las demás formas sólidas del Compuesto 1 descritas en el presente documento. Este alto grado de estabilidad de la Forma A proporciona propiedades y beneficios ventajosos en términos de su conveniencia para el uso en una composición farmacéutica, por ejemplo, en términos de su vida útil y facilidad de fabricación.

La reducción del tamaño de partícula mediante molienda o micronización aumenta el área de superficie específica, lo que lleva a una mejor disolución y una mejorada homogeneidad del material a granel. Por lo tanto, también se proporciona aquí la Forma A cristalina micronizada del Compuesto de Fórmula 1.

La invención proporciona la Forma A cristalina de *N*-(6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-(trifluorometil)-3,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-3-il)-5-

fluoropiridin-2-il)-3-cloro-5-(trifluorometil)picolinamida (Compuesto 1) en forma libre. El término “forma libre” se refiere al compuesto *per se*, sin formación de sal.

En el presente documento también se describen la Forma B, la Forma de hidrato H_A y la forma amorfa en forma libre.

- 5 En una forma de realización, el Compuesto de Fórmula 1 es la Forma A cristalina. La Forma A cristalina se puede definir por referencia a una o más señales características que resultan de mediciones analíticas que incluyen, sin limitación: el patrón de difracción de rayos X en polvo de la Figura 1, el termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la Figura 2. La Forma
- 10 cristalina A (también denominada aquí como polimorfo Forma A) también se puede definir por referencia a una o más de las siguientes señales características:

 En una forma de realización, la Forma cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con por lo menos uno, dos o tres picos que tienen valores de ángulo de refracción 2 theta (θ) seleccionados de 14,8, 18,7 y 19,5°,

15 cuando se mide usando radiación CuK α , en donde dichos valores son más o menos 0,2° 2 θ .

 En una forma de realización, la Forma cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con por lo menos uno, dos o tres picos que tienen valores de ángulo de refracción 2 theta (θ) seleccionados de 10,7, 14,8 y 19,5°

20 cuando se mide usando radiación CuK α , en donde dichos valores son más o menos 0,2° 2 θ .

 En una forma de realización, la Forma cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con por lo menos uno, dos o tres picos que tienen valores de ángulo de refracción 2 theta (θ) seleccionados de 10,7, 14,8, 18,7, 19,5

25 y 21,4°, cuando se miden utilizando radiación CuK α , donde dichos valores son más o menos 0,2° 2 θ .

En una forma de realización, la Forma cristalina A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con por lo menos uno, dos, tres, cuatro o cinco picos con valores de ángulo de refracción 2θ (θ) seleccionados de 10,7, 14,8, 18,7, 19,5, 21,4, 21,7, 25,5, 29,9, 35,0, 37,8°, cuando se mide usando radiación CuK α , en donde dichos valores son más o menos 0,2° 2θ .

En una forma de realización, la Forma A cristalina del Compuesto de Fórmula 1 exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente igual al patrón de difracción de rayos X en polvo mostrado en la Figura 1 cuando se mide usando radiación CuK α .

En una forma de realización adicional, la Forma cristalina A del Compuesto de Fórmula 1 exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) sustancialmente igual al que se muestra en la Figura 2.

En una forma de realización adicional, la Forma cristalina A del Compuesto de Fórmula 1 exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) con un inicio de fusión de alrededor de 171°C.

En una forma de realización de la invención, se proporciona la Forma A cristalina de *N*-(6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-(trifluorometil)-3,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-3-il)-5-fluoropiridin-2-il)-3-cloro-5-(trifluorometil)picolinamida en forma sustancialmente pura.

Como se usa en este documento, el término “sustancialmente pura”, cuando se utiliza con referencia a formas cristalinas, que incluyen el hidrato de las formas cristalinas y la Forma amorfa de *N*-(6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-(trifluorometil)-3,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-3-il)-5-fluoropiridin-2-il)-3-cloro-5-(trifluorometil)picolinamida, significa que tiene una pureza mayor que 90% en peso, lo que incluye mayor que 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y 99% en peso, y además, lo que incluye igual a alrededor de 100% en peso de *N*-(6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-(trifluorometil)-3,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-3-il)-5-

fluoropiridin-2-il)-3-cloro-5-(trifluorometil)picolinamida, sobre la base del peso del Compuesto.

En otra forma de realización, el Compuesto de Fórmula 1 es la Forma A cristalina micronizada. La Forma A cristalina micronizada se puede definir por
5 referencia a una o más señales características que resultan de mediciones analíticas que incluyen, sin limitación: el patrón de difracción de rayos X en polvo de la Figura 3. La forma cristalina micronizada A también se puede definir por referencia a una o más de las siguientes señales características:

En una forma de realización, la Forma cristalina micronizada A tiene un
10 patrón de difracción de rayos X en polvo con por lo menos uno, dos o tres picos con valores de ángulo de refracción 2θ (θ) seleccionados de 12,1, 19,4, 24,0° cuando se mide utilizando radiación $\text{CuK}\alpha$, en donde dichos valores son más o menos 0,2° 2θ .

En una forma de realización, la Forma cristalina micronizada A tiene un
15 patrón de difracción de rayos X en polvo con por lo menos uno, dos o tres picos con valores de ángulo de refracción 2θ (θ) seleccionados de 12,1, 15,9, 18,5, 19,4, 24,0° cuando se miden utilizando radiación $\text{CuK}\alpha$, en donde dichos valores son más o menos 0,2° 2θ .

En una forma de realización, la Forma cristalina micronizada A tiene un
20 patrón de difracción de rayos X en polvo con por lo menos uno, dos, tres, cuatro o cinco picos con valores de ángulo de refracción 2θ (θ) seleccionados de 10,6, 12,1, 14,7, 15,9, 18,5, 19,4, 21,2, 24,0, 24,7, 29,7°, cuando se mide usando radiación $\text{CuK}\alpha$, en donde dichos valores son más o menos 0,2° 2θ .

En una forma de realización, la Forma A cristalina micronizada del
25 Compuesto de Fórmula 1 exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente igual al patrón de difracción de rayos X en polvo mostrado en la Figura 3 cuando se mide usando radiación $\text{CuK}\alpha$.

El término "sustancialmente igual", con referencia a las posiciones de pico de difracción de rayos X, significa que se tienen en cuenta la variabilidad de intensidad y posición de pico típica. Por ejemplo, un experto en la técnica apreciará que las posiciones de los picos (2θ) mostrarán cierta variabilidad interaparato, típicamente, tanto como $0,2^\circ$. Además, un experto en la técnica apreciará que las intensidades de pico relativas mostrarán variabilidad interaparato así como variabilidad debido al grado de cristalinidad, la orientación preferida, la superficie de muestra preparada y otros factores conocidos por los expertos en la técnica, y deben ser tomadas solo como medidas cualitativas. Una expresión que se refiere a una Forma A cristalina que tiene "un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente igual al patrón de difracción de rayos X en polvo que se muestra en la Figura X" puede intercambiarse con una expresión que se refiere a una Forma A cristalina que tiene "un patrón de difracción de rayos X en polvo caracterizado por el patrón representativo de difracción de rayos X en polvo que se muestra en la Figura X".

Un experto en la técnica también apreciará que se puede obtener un patrón de difracción de rayos X con un error de medición que depende de las condiciones de medición empleadas. En particular, generalmente se sabe que las intensidades en un patrón de difracción de rayos X pueden fluctuar de acuerdo con las condiciones de medición empleadas. Debe entenderse además que las intensidades relativas también pueden variar de acuerdo con las condiciones experimentales y, por consiguiente, no se debe tener en cuenta el orden exacto de intensidad. Además, un error de medición del ángulo de difracción para un patrón de difracción de rayos X convencional suele ser de alrededor del 5% o menos, y tal grado de error de medición debe tenerse en cuenta en relación con los ángulos de difracción mencionados anteriormente. En consecuencia, debe entenderse que la forma cristalina de la presente invención no se limita a la forma

cristalina que proporciona un patrón de difracción de rayos X completamente idéntico al patrón de difracción de rayos X representado en la Figura 1 adjunta descripta en este documento. Cualquier forma de cristal que proporcione patrones de difracción de rayos X sustancialmente idénticos a los descritos en la Figura 1
5 adjunta se encuentra dentro del alcance de la presente invención. La capacidad de determinar identidades sustanciales de los patrones de difracción de rayos X está dentro del alcance de un experto en la técnica.

La Forma cristalina B se puede definir por referencia a una o más señales características que resultan de mediciones analíticas, que incluyen, sin limitación:
10 el patrón de difracción de rayos X en polvo de la Figura 4, el termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la Figura 5. Forma Cristalina B (también referida aquí como Forma B polimorfa) también se puede definir por referencia a una o más de las siguientes señales características:

La forma B cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con
15 por lo menos uno, dos o tres picos que tienen valores de ángulo de refracción 2 theta (θ) seleccionados de 13,5, 20,5, 23,1° cuando se mide usando radiación $\text{CuK}\alpha$, donde dichos valores son más o menos 0,2° 2 θ .

La forma B cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con
por lo menos uno, dos o tres picos que tienen valores de ángulo de refracción 2
20 theta (θ) seleccionados de 10,7, 13,5, 16,6, 20,5, 23,1° cuando se mide usando radiación $\text{CuK}\alpha$, donde dichos valores son más o menos 0,2° 2 θ .

La forma B cristalina tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con
por lo menos uno, dos, tres, cuatro o cinco picos que tienen valores de ángulo de
refracción 2 theta (θ) seleccionados de 10,7, 13,5, 16,6, 16,8, 17,4, 19,7, 20,5,
25 21,3, 23,1, 27,2° cuando se mide usando radiación $\text{CuK}\alpha$, donde dichos valores son más o menos 0,2° 2 θ .

La forma B cristalina del Compuesto de Fórmula 1 exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente igual al patrón de difracción de rayos X en polvo que se muestra en la Figura 4 cuando se mide usando radiación $\text{CuK}\alpha$.

- 5 La forma B cristalina del Compuesto de Fórmula 1 exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) sustancialmente igual al que se muestra en la Figura 5.

La forma de hidrato cristalina H_A se puede definir por referencia a una o más señales características que resultan de mediciones analíticas que incluyen, sin limitación: el patrón de difracción de rayos X en polvo de la Figura 6, el termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la Figura 7. La forma de hidrato cristalina H_A (también denominada aquí como forma de hidrato H_A) también se puede definir por referencia a una o más de las siguientes señales características:

- 15 La Forma de hidrato H_A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con por lo menos uno, dos o tres picos que tienen valores de ángulo de refracción 2θ (θ) seleccionados de $14,0$, $14,3$, $18,3^\circ$ cuando se mide usando radiación $\text{CuK}\alpha$, donde dichos valores son más o menos $0,2^\circ 2\theta$.

La Forma de hidrato H_A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con por lo menos uno, dos o tres picos que tienen valores de ángulo de refracción 2θ (θ) seleccionados de $14,0$, $14,3$, $16,1$, $17,7$, $18,3^\circ$ cuando se mide usando radiación $\text{CuK}\alpha$, donde dichos valores son más o menos $0,2^\circ 2\theta$.

La Forma de hidrato H_A tiene un patrón de difracción de rayos X en polvo con por lo menos uno, dos, tres, cuatro o cinco picos que tienen valores de ángulo de refracción 2θ (θ) seleccionados de $14,0$, $14,3$, $16,1$, $17,7$, $18,3$, $19,6$, $21,4$, $21,6$, $24,1$, $25,8^\circ$ cuando se mide usando radiación $\text{CuK}\alpha$, donde dichos valores son más o menos $0,2^\circ 2\theta$.

La Forma de hidrato H_A del Compuesto de Fórmula 1 exhibe un patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente igual al patrón de difracción de rayos X en polvo que se muestra en la Figura 6 cuando se mide usando radiación $CuK\alpha$.

- 5 La Forma de hidrato H_A del Compuesto de Fórmula 1 exhibe un termograma de calorimetría de barrido diferencial (DSC) sustancialmente igual al que se muestra en la Figura 7.

Como se usa en este documento, el término "hidrato" se refiere a un complejo molecular del Compuesto 1 con una o más moléculas de agua. Esto
10 también abarca la forma de hemihidrato, que se define como un hidrato en el que la relación molecular de las moléculas de agua a compuesto anhidro es 1:2. Por ejemplo, la forma de hidrato H_A es un hemihidrato.

La forma amorfa se puede definir mediante mediciones analíticas que incluyen, sin limitación: referencia a un patrón de difracción de rayos X en polvo
15 sustancialmente igual al patrón de difracción de rayos X en polvo que se muestra en la Figura 8 y el termograma de calorimetría de barrido diferencial modulado (mDSC) de la Figura 9.

Se pueden agregar cristales de semillas a cualquier mezcla de cristalización para promover la cristalización. La siembra se puede emplear para
20 controlar el crecimiento de un polimorfo particular o para controlar la distribución del tamaño de partícula del producto cristalino. En consecuencia, el cálculo de la cantidad de semillas necesaria depende del tamaño de la semilla disponible y del tamaño deseado de una partícula promedio del producto como se describe, por ejemplo, en "Enfriamiento programado de cristalizadores en lote", J. W. Mullin y J.
25 Nyvlt, Chemical Engineering Science, 1971, 26, 369–377. En general, se necesitan semillas de tamaño pequeño para controlar eficazmente el crecimiento de cristales en el lote. La semilla de tamaño pequeño se puede generar por

tamizado, molienda o micronización de cristales grandes, o por microcristalización de soluciones. Se debe tener cuidado de que la molienda o micronización de cristales no produzca ningún cambio en la forma de cristalinidad de la forma cristalina deseada (es decir, cambio a amorfo u otro polimorfo).

5 *Método de tratamiento.*

La presente invención también proporciona un método para el tratamiento o la prevención de enfermedades, afecciones y/o trastornos modulados por la inhibición de BACE, por ejemplo, como se indica en el presente documento, en un sujeto que necesita dicho tratamiento o prevención, donde dicho método
10 comprende administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un Compuesto de Fórmula 1, especialmente, el polimorfo Forma A.

En una forma de realización del método, la inhibición de BACE es inhibición de BACE-1.

En otra forma de realización del método, la enfermedad o trastorno es la
15 enfermedad de Alzheimer o la angiopatía amiloide cerebral.

En una forma de realización, la presente invención proporciona el uso de la Forma cristalina A del Compuesto de Fórmula 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer o la angiopatía amiloide cerebral.

20 En otro aspecto, se proporciona en este documento la Forma A cristalina del Compuesto de Fórmula 1 para uso como un medicamento.

En un aspecto adicional, se proporciona en este documento la Forma A cristalina del Compuesto de Fórmula 1 para uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer o angiopatía amiloide cerebral.

25 *Composiciones farmacéuticas.*

El Compuesto de Fórmula 1, especialmente la Forma A polimorfa, es adecuado como agente activo en composiciones farmacéuticas que son

particularmente eficaces para el tratamiento o la prevención de enfermedades, afecciones y/o trastornos modulados por la inhibición de BACE, por ejemplo, enfermedad de Alzheimer o angiopatía amiloide cerebral. La composición farmacéutica en diversas formas de realización tiene una cantidad

5 farmacéuticamente eficaz del Compuesto cristalino de Fórmula 1, especialmente la Forma A polimorfa, junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

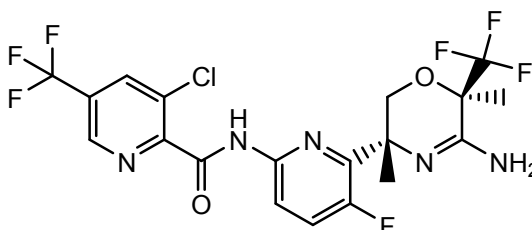
Como se usa en este documento, una "composición farmacéutica" comprende la Forma A y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable,

10 en una forma sólida de dosis unitaria adecuada para administración oral (típicamente una cápsula, más particularmente una cápsula de gelatina dura). Puede hallarse un listado de portadores farmacéuticamente aceptables en *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Ejemplos de formulaciones adecuadas para la Forma A se proporcionan en los Ejemplos 6 y 7.

15 Por lo tanto, en un aspecto, se proporciona en este documento una composición farmacéutica que comprende la Forma A polimorfa del Compuesto de Fórmula 1. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende la Forma A polimorfa del Compuesto de Fórmula 1 y por lo menos un portador farmacéuticamente aceptable.

20 Definiciones.

Como se usan en este documento, los términos "Compuesto 1", "Comp. 1", "Compuesto de Fórmula 1" se refieren a *N*-(6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-(trifluorometil)-3,6-dihidro-2*H*-1,4-oxazin-3-il)-5-fluoropiridin-2-il)-3-cloro-5-(trifluorometil)picolinamida y tienen la siguiente fórmula estructural:



En el Ejemplo 1, usando un formato de denominación química alternativo, "Compuesto 1" además es referido como [6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-trifluorometil-3,6-dihidro-2*H*-[1,4]oxazin-3-il)-5-fluoro-piridin-2-il]-amida del ácido 3-cloro-5-trifluorometil-piridina-2-carboxílico.

5 Como se usan en este documento, "Forma A cristalina", "Forma A polimorfa" y "Forma A" se usan de modo indistinto, y no tienen diferencia en significado.

 Como se usa en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios
10 de dispersión, recubrimientos, surfactantes, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, y
15 combinaciones de los anteriores, como conocerán los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

20 Tal como se usa en el presente documento, el término "enfermedad de Alzheimer" o "AD" abarca tanto la enfermedad de Alzheimer preclínica como la clínica, a menos que el contexto aclare que solo se pretende la enfermedad de Alzheimer preclínica o solo la enfermedad de Alzheimer clínica.

 Tal como se usa en el presente documento, el término "tratamiento de la
25 enfermedad de Alzheimer" se refiere a la administración del Compuesto de Fórmula 1, especialmente la Forma A polimorfa, a un paciente para mejorar por lo menos uno de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer.

Como se usa en este documento, el término "prevención de la enfermedad de Alzheimer" se refiere al tratamiento profiláctico de la enfermedad de Alzheimer; o al retraso de la aparición o progresión de la AD. Por ejemplo, la aparición o la progresión de la AD se retrasa por lo menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años.

- 5 En una forma de realización, "prevención de la enfermedad de Alzheimer" se refiere al tratamiento profiláctico de la AD preclínica; o al retraso de la aparición o progresión de la AD preclínica. En una forma de realización adicional, la aparición o la progresión de la AD preclínica se retrasa por lo menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años. En otra forma de realización, "prevención de la enfermedad de
- 10 Alzheimer" se refiere al tratamiento profiláctico de la AD clínica; o al retraso de la aparición o la progresión de la AD clínica. En una forma de realización adicional, la aparición o la progresión de la AD clínica se retrasa por lo menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años.

- Tal como se usa en el presente documento, el término "enfermedad de
- 15 Alzheimer clínica" o "AD clínica" abarca tanto el deterioro cognitivo leve (MCI, conforme a sus siglas en inglés) debido a AD, como la demencia debida a AD, a menos que el contexto aclare que solo se pretende MCI debido a AD o demencia debida a AD. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA, conforme a sus siglas en inglés) en su 'Proyecto de directrices sobre la investigación clínica de
- 20 medicamentos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y otras demencias' (EMA/Comité de Productos Medicinales para Uso Humano (CHMP)/539931/2014) resume los criterios del Instituto Nacional sobre Envejecimiento, para el diagnóstico de MCI debido a AD y demencia de AD, como se establece a continuación.

- 25 El diagnóstico de MCI debido a AD requiere evidencia de declinación intraindividuo, manifestada por:

a) Un cambio en la cognición de los niveles alcanzados previamente, como se señala en el autoinforme o el informe de informante y/o por el criterio de un médico.

5 b) Cognición deteriorada en por lo menos un dominio (pero no necesariamente en la memoria episódica) en relación con los valores normativos de la misma edad y educación; el deterioro en más de un dominio cognitivo es permisible.

c) Independencia preservada en las habilidades funcionales, aunque los criterios también aceptan 'problemas leves' al realizar actividades instrumentales de la vida diaria (IADL, conforme a sus siglas en inglés), incluso, cuando esto es solo con asistencia (es decir, en lugar de insistir en la independencia, los criterios permiten una dependencia leve debido a la pérdida funcional).

d) Sin demencia, que nominalmente es una función de c (arriba).

15 e) Una presentación clínica compatible con el fenotipo de la AD en ausencia de otros trastornos potencialmente demenciales. Una mayor confianza de diagnóstico puede ser sugerida por:

1) Óptimo: un biomarcador A β positivo y un biomarcador de degeneración positivo.

2) Menos óptimo:

20 i. Un biomarcador A β positivo sin un biomarcador de degeneración.

ii. Un biomarcador de degeneración positivo sin pruebas de biomarcadores A β .

El diagnóstico de demencia de AD requiere:

25 a) La presencia de demencia, determinada por la declinación intraindividuo en la cognición y la función.

b) Aparición insidiosa y declinación cognitiva progresiva.

c) Deterioro en dos o más dominios cognitivos; si bien es más común una presentación amnésica, los criterios permiten un diagnóstico sobre la base de presentaciones no amnésicas (por ejemplo, deterioro de la función ejecutiva y capacidades visuoespaciales).

- 5 d) Ausencia de características prominentes asociadas con otros trastornos demenciales.

Se puede sugerir una mayor confianza de diagnóstico mediante el algoritmo de biomarcadores analizado en la sección anterior de MCI debido a AD.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "enfermedad de Alzheimer preclínica" o "AD preclínica" se refiere a la presencia de biomarcadores moleculares *in vivo* de AD en ausencia de síntomas clínicos. El Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer proporcionan un esquema, que se muestra en la Tabla A a continuación, que establece las diferentes etapas de la AD preclínica (Sperling et al., 2011).

15 Tabla A: categorías de etapas de la AD preclínica.

Etapas	Descripción	Aβ (PET o CSF)	Marcadores de lesión neuronal (tau, sIRM, FDG)	Evidencia de sutil cambio cognitivo
Etapa 1	Amiloidosis cerebral asintomática	Positivo	Negativo	Negativo
Etapa 2	amiloidosis asintomática + neurodegeneración "descendente"	Positivo	Positivo	Negativo
Etapa 3	Amiloidosis + lesión neuronal + sutil declinación cognitiva/conductual	Positivo	Positivo	Positivo

sIRM = imagen de resonancia magnética estructural

20 Como se usa en este documento, el término "angiopatía amiloide cerebral" o "CAA" se refiere a una enfermedad caracterizada por la acumulación de proteínas β -amiloides (A β) en las paredes de los vasos sanguíneos corticales y leptomenínges. La CAA es una causa común de rotura de las paredes de los vasos y disfunción vascular en adultos mayores, lo que la convierte en un importante contribuyente a hemorragias intracerebrales (ICH, conforme a sus

siglas en inglés) mortales o incapacitantes, así como a lesiones isquémicas y demencia (Gurol ME et al., 2016). Como se usa en el presente documento, el término "angiopatía amiloide cerebral" o "CAA" abarca tanto CAA–Tipo 1 como CAA–Tipo 2, a menos que el contexto aclare que solo se pretende CAA–Tipo 1 o CAA–Tipo 2.

Como se usa en este documento, el término "CAA–Tipo 1" se refiere a CAA capilar (capCAA) caracterizada por depósitos de proteína A β en las paredes de los capilares corticales (Thal et al., 2002).

Como se usa en este documento, el término "CAA–Tipo 2" se refiere a CAA caracterizada por depósitos de proteína A β en las paredes de los vasos leptomeníngeos y corticales, con la excepción de los capilares corticales (Thal et al., 2002).

Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento de CAA" se refiere a la administración del Compuesto de Fórmula 1, especialmente la Forma A polimorfa, a un paciente para ralentizar o detener el desarrollo de CAA o por lo menos uno de los síntomas clínicos de CAA, por ejemplo, ICH, lesión isquémica o demencia. El desarrollo de CAA puede evaluarse midiendo la acumulación de A β en las paredes de los vasos sanguíneos corticales (por ejemplo, la corteza occipital) y leptomeníngeos, utilizando un marcador de tomografía por emisión de positrones (PET, conforme a sus siglas en inglés), por ejemplo, ^{18}F –florbetapir (Gurol ME et al., 2016). Alternativamente, el desarrollo de CAA puede evaluarse mediante el monitoreo de microsangrados cerebrales (CMB, conforme a sus siglas en inglés) como un marcador hemorrágico de CAA (Greenberg SM et al., 2014). Las técnicas adecuadas para el monitoreo de CMB incluyen, por ejemplo, las imágenes ponderadas por susceptibilidad (SWI, conforme a sus siglas en inglés), de imágenes por resonancia magnética (IRM), y las imágenes de eco recuperadas en gradiente (GRE, conforme a sus siglas en

inglés) ponderadas por IRM T2*, y se describen en Cheng A. L. et al. 2013. Además, las hiperintensidades de la materia blanca (WMH, conforme a sus siglas en inglés) se producen en un volumen mucho mayor en pacientes diagnosticados con CAA que en individuos de edad avanzada sanos o en pacientes con AD o deterioro cognitivo leve (MCI) (Greenberg S. M. et al., 2014). Por lo tanto, el desarrollo de CAA se puede monitorear mediante la medición del volumen de WMH usando IRM (Chen Y. W. et al., 2006). Se espera que el "tratamiento de CAA" tenga el beneficio resultante de reducir la probabilidad de un evento isquémico cerebral en el paciente que recibe tratamiento para CAA. Por lo tanto, en una forma de realización de la invención, el término "tratamiento de CAA" es equivalente al término "tratamiento de hemorragia intracerebral". En otra forma de realización de la invención, el término "tratamiento de CAA" es equivalente al término "tratamiento de CAA y/o hemorragia intracerebral". En una forma de realización adicional de la invención, el término "tratamiento de CAA" es equivalente al término "tratamiento de CAA y hemorragia intracerebral asociada".

Como se usa en el presente documento, el término "prevención de CAA" se refiere al tratamiento profiláctico de CAA; el retraso de la aparición o progresión de CAA; o el retraso de la aparición o la progresión de por lo menos uno de los síntomas clínicos de CAA. Por ejemplo, la aparición o la progresión de la CAA se retrasa por lo menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 años. En una forma de realización de la invención, el término "prevención de CAA" es equivalente al término "prevención de hemorragia intracerebral". En otra forma de realización de la invención, el término "prevención de CAA" es equivalente al término "prevención de CAA y/o hemorragia intracerebral". En una forma de realización adicional de la invención, el término "prevención de CAA" es equivalente al término "prevención de CAA y hemorragia intracerebral asociada".

Como se usa en este documento, el término "una predisposición genética para el desarrollo de CAA" incluye, sin limitación, situaciones en las que la predisposición genética se debe a: síndrome de Down; una mutación en el gen para la proteína precursora de amiloide o presenilina-1; o la presencia de una o
 5 dos copias del alelo ApoE4.

Como se usa en este documento, el término "paciente" se refiere a un sujeto humano.

El término "una cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de Compuesto 1 que provocará la inhibición de BACE-1 en un paciente, como lo
 10 demuestra una reducción en los niveles de A β 1-40 en LCR (líquido cefalorraquídeo) o plasma, en relación con un valor de referencia inicial. Los niveles de A β 1-40 se pueden medir utilizando técnicas de inmunoensayo convencionales, por ejemplo, el ensayo ultrasensible de A β 40 de humano/roedor (4G8) de 96 pocillos MULTI-ARRAY de Meso Scale Discovery (MSD) (#
 15 K110FTE-3, Meso Scale Discovery, Gaithersburg, Estados Unidos).

Listado de abreviaturas.

Abreviatura	Descripción
ACN	acetonitrilo
APP	proteína precursora de amiloide
A β	péptido beta-amiloide
ac.	acuoso
A β 40	péptido beta-amiloide 40
BACE-1	enzima 1 de escisión de APP sitio beta
BACE	enzima de escisión de APP sitio beta
Boc ₂ O	di- <i>ter</i> -butil dicarbonato
b. p.	punto de ebullición
BuLi o nBuLi	n-butil litio
C	concentración
CI	intervalo de confianza
CDCl ₃	cloroformo deuterado
conc.	concentrado

Abreviatura	Descripción
LCR	líquido cefalorraquídeo
Cu ₂ O	óxido de cobre (I)
d	día
δ	desplazamiento químico en ppm
DCM	diclorometano
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DSC	calorimetría de barrido diferencial
EDC	clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
ESI	ionización por electropulverización
EtOAc	etil acetato
g	gramo
h, hr	hora(s)
HCl	ácido clorhídrico
Hex	hexano
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HPLC, LC	cromatografía líquida de alto rendimiento, cromatografía líquida
IPAc	isopropil acetato
K ₂ CO ₃	carbonato de potasio
kJ	kilojoule
kg	kilogramo
KOtBu	ter-butóxido de potasio
kV	kilovoltio
LC-MS/MS	espectrometría de masas en tandem
mA	miliamperios
mDSC	calorimetría de barrido diferencial modulada
MeOH	metanol
MHz	megahertz
min	minuto
ml/mL	mililitro
mm	milímetro
μl	microlitro
μm	micrómetro
μM	micromolar
μmol	micromoles

Abreviatura	Descripción
min	minuto(s)
mmol	milimoles
MS	espectrometría de masas
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sodio
NEt ₃	triethylamina
nm	nanómetro
nM	nanomolar
RMN	espectrometría de resonancia magnética nuclear
PI	intermediario farmacéutico
PK	farmacocinética
ppm	partes por millón
q. d. o QD	quaque die (todos los días)
Rf	factor de retención
RH	humedad relativa
rpm	revoluciones por minuto
Rt	tiempo de retención (min)
TA, t. a.	temperatura ambiente
s	segundo
SD	dosis única
T	tiempo
TBME	ter-butyl metil éter
TFA	ácido trifluoroacético
TGA	análisis termogravimétrico
THF	tetrahidrofurano
TLC	cromatografía de capa delgada
UPLC	cromatografía líquida de ultrarrendimiento
v/v	en volumen
p/p	en peso
WL	longitud de onda de radiación K α de cobre ($\lambda_{Cu} = 1,5406 \text{ \AA}$)
wt	relación en peso sobre la base de la cantidad de material de partida
XRPD	difracción de rayos x en polvo

Ejemplos.

Los siguientes Ejemplos ilustran diversos aspectos de la invención. Los Ejemplos 1 y 2 muestran cómo se puede preparar el Compuesto 1 y cómo se puede cristalizar para producir la Forma A. Los Ejemplos 3 y 4 describen el análisis de XRPD y DSC de la Forma A. El Ejemplo 5 describe el procedimiento de micronización de la Forma A y los datos correspondientes de XRPD. Los Ejemplos 6 y 7 describen formulaciones que comprenden la Forma A y su método de fabricación. Los Ejemplos 8, 9 y 10 describen el proceso de elaboración de la Forma B, y el análisis XRPD y DSC de la Forma B. Los Ejemplos 11, 12 y 13 describen el proceso de preparación de la Forma H_A de hidrato y el análisis de DSC y XRPD de la Forma de hidrato H_A. Los Ejemplos 14 y 15 describen el proceso para preparar la forma amorfa y el análisis de mDSC. El Ejemplo 16 muestra los datos de estabilidad de la Forma A. El Ejemplo 17 describe el estudio en humanos de la farmacocinética del Compuesto 1 base libre cuando se administra solo y en combinación con el fuerte inhibidor de CYP3A4, itraconazol, o el fuerte inductor de CYP3A4, rifampicina.

Ejemplo 1: Preparación del Compuesto 1.

La preparación del Compuesto 1 se describe en el documento WO 2012/095469 A1 (Ejemplo 34). El Compuesto 1 también se puede preparar como se describe a continuación.

Metodología de RMN.

Los espectros de protones se registran en un espectrómetro de ultracampo Bruker 400 MHz a menos que se indique lo contrario. Los desplazamientos químicos se informan en ppm en relación con metanol (δ 3,31), dimetilsulfóxido (δ 2,50) o cloroformo (δ 7,29). Una pequeña cantidad de la muestra seca (2–5 mg) se disuelve en un solvente deuterado apropiado (0,7 ml). El equilibrado es automático, y los espectros se obtienen de acuerdo con procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Método XRPD para la Forma A:

- El análisis de difracción de rayos X en polvo (XRPD) se realizó utilizando un difractómetro de rayos X Bruker D8 Advance en geometría de reflexión. Las mediciones se tomaron a aproximadamente 30 kV y 40 mA en las siguientes condiciones:

Tabla 1a.

Tasa de barrido (barrido continuo):	3 s/escalón
Tamaño de escalón:	0,017° (2–theta)
ranura Soller:	2,5°
Ranuras (de izquierda a derecha):	V12 (variable)

El patrón de difracción de rayos X se registró entre 2° y 40° (2–theta) con radiación CuK α para la identificación del patrón completo.

Método XRPD para la Forma B, Hidrato H_A, Forma amorfa:

- El análisis de difracción de rayos X en polvo (XRPD) se realizó utilizando un difractómetro de rayos X Bruker D8 Advance en geometría de reflexión. Las mediciones se tomaron a aproximadamente 40 kV y 40 mA en las siguientes condiciones:

Tabla 1b.

Tasa de barrido (barrido continuo):	39 s/escalón
Tamaño de escalón:	0,016° (2–theta)
Ranura Soller:	2,5°
Ranuras:	Primaria: tamaño de muestra iluminada fijo 10 mm, ranura secundaria: 5 mm

- El patrón de difracción de rayos X se registró entre 2° y 45° (2–theta) con radiación CuK α para la identificación del patrón completo. Todos los valores 2–theta (2 θ) están dentro de $\pm 0,2^\circ$.

Información de cromatografía general.

Método HPLC H1 (R_{tH1}):

	Dimensiones de columna de HPLC:	3,0 x 30 mm
	Tipo de columna de HPLC:	Zorbax SB–C18, 1,8 µm
	Eluyente de HPLC:	A) agua + 0,05 Vol.–% TFA; B) + 0,05 Vol.–% TFA
5	Gradiente HPLC:	30–100% B en 3,25 min, caudal = 0,7 ml/min
	Método LCMS H2 (Rt_{H2}):	
	Dimensiones de columna de HPLC:	3,0 x 30 mm
	Tipo de columna de HPLC:	Zorbax SB–C18, 1,8 µm
10	Eluyente de HPLC:	A) agua + 0,05 Vol.–% TFA, B) + 0,05 Vol.–% TFA
	Gradiente de HPLC:	10–100% B en 3,25 min, caudal = 0,7 ml/min
	Método UPLCMS H3 (Rt_{H3}):	
15	Dimensiones de columna de HPLC:	2,1 x 50 mm
	Tipo de columna de HPLC:	Acquity UPLC HSS T3, 1,8 µm
	Eluyente de HPLC:	A) agua + 0,05 Vol.–% ácido fórmico + 3,75 mM acetato de amonio, B) ACN + 0,04 Vol.–% ácido
20	Gradiente de HPLC:	2–98 % B en 1,4 min, 98% B 0,75 min, caudal = 1,2 ml/min
	Temperatura de columna de HPLC:	50 °C
	Método LCMS H4 (Rt_{H4}):	
25	Dimensiones de columna de HPLC:	3,0 x 30 mm
	Tipo de columna de HPLC:	Zorbax SB–C18, 1,8 µm

	Eluyente de HPLC:	A) agua + 0,05 Vol.-% TFA; B) + 0,05 Vol.-% TFA
CAN	Gradiente de HPLC:	70 – 100 % B en 3,25 min, caudal = 0,7 ml/min
5	Método LCMS H5 (Rt_{H5}):	
	Dimensiones de columna de HPLC:	3,0 x 30 mm
	Tipo de columna de HPLC:	Zorbax SB–C18, 1,8 µm
	Eluyente de HPLC:	A) agua + 0,05 Vol.-% TFA; B) + 0,05 Vol.-% TFA
10	Gradiente de HPLC:	80 – 100 % B en 3,25 min, caudal = 0,7 ml/min
	Método LCMS H6 (Rt_{H6}):	
	Dimensiones de columna de HPLC:	3,0 x 30 mm
	Tipo de columna de HPLC:	Zorbax SB–C18, 1,8 µm
15	Eluyente de HPLC:	A) agua + 0,05 Vol.-% TFA; B) + 0,05 Vol.-% TFA
ACN	Gradiente de HPLC:	40 – 100 % B en 3,25 min, caudal = 0,7 ml/min
	a) 2–Bromo–5–fluoro–4–triethylsilanil–piridina.	
20	Una solución de diisopropilamina (25,3 g, 250 mmol) en 370 ml de THF se enfrió con un baño de acetona en hielo seco a –75°C. Se agregó BuLi (100 ml, 250 mmol, 2,5 M en hexanos) por goteo, mientras se mantenía la temperatura por debajo de –50°C. Después de que la temperatura de la mezcla alcanzó –75°C nuevamente, una solución de 2–bromo–5–fluoropiridina (36,7 g, 208 mmol) en 45	
25	ml de THF se agregó por goteo. La mezcla se agitó durante 1 h a –75°C. Se agregó trietilclorosilano (39,2 g, 260 mmol) rápidamente. La temperatura se mantuvo por debajo de –50°C. Se eliminó el baño de enfriamiento, y la mezcla de	

reacción se dejó entibiar a -15°C , y se vertió en NH_4Cl ac. (10%). Se agregó TBME, y se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó con $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se filtró y se evaporó a fin de obtener un líquido de color marrón que se destiló a 0,5 mm Hg, a fin de lograr el compuesto del título en forma de un líquido ligeramente amarillo (b. p. $105\text{--}111^{\circ}\text{C}$). HPLC: $\text{Rt}_{\text{H}_4} = 2,284$ min; ESIMS: 290, 292 $[(\text{M}+\text{H})^+, 1\text{Br}]$; ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): 8,14 (s, 1H), 7,40 (d, 1H), 1,00–0,82 (m, 15H).

b) 1-(6-Bromo-3-fluoro-4-trietilsilanil-piridin-2-il)-etanona.

Una solución de diisopropilamina (25,4 g, 250 mmol) en 500 ml de THF se enfrió a -75°C . Se agregó BuLi (100 ml, 250 mmol, 2,5 M en hexanos) por goteo, mientras se mantenía la temperatura por debajo de -50°C . Después de que la temperatura de la reacción alcanzó -75°C nuevamente, una solución de 2-bromo-5-fluoro-4-trietilsilanil-piridina (56,04 g, 193 mmol) en 60 ml de THF se agregó por goteo. La mezcla se agitó en un baño de hielo seco durante 70 minutos. N,N-dimetilacetamida (21,87 g, 250 mmol) se agregó rápidamente, la temperatura de la reacción se elevó a -57°C . La mezcla de reacción se agitó en un baño de hielo seco durante 15 min y luego se dejó entibiar a -40°C . Se vertió sobre una mezcla de 2M HCl ac. (250 ml, 500 mmol), 250 ml de agua y 100 ml de salmuera. La mezcla se extrajo con TBME, se lavó con salmuera, se secó sobre $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, se filtró y se evaporó a fin de obtener un aceite de color amarillo, que se purificó sobre una columna de gel de sílice eluyendo con hexano/0–5% TBME a fin de lograr 58,5 g del compuesto del título en forma de un líquido amarillo. TLC (Hex/TBME 99/1): $\text{R}_f = 0,25$; HPLC: $\text{Rt}_{\text{H}_4} = 1,921$ min; ESIMS: 332, 334 $[(\text{M}+\text{H})^+, 1\text{Br}]$; ^1H -RMN (400 MHz, CDCl_3): 7,57 (d, 1H), 2,68 (s, 3H), 1,00–0,84 (m, 15H).

c) (S)-2-(6-Bromo-3-fluoro-4-trietilsilanil-piridin-2-il)-2-trimetilsilaniloxi-propionitrilo.

En primer lugar, se preparó la solución de catalizador mediante la disolución de agua (54 mg, 3,00 mmol) en 100 ml de DCM seco ($\leq 0,001\%$ agua). Este DCM húmedo (44 ml, 1,32 mmol de contenido de agua) se agregó a una solución bien agitada de butóxido de titanio (IV) (500 mg, 1,47 mmol) en 20 ml de DCM seco. La solución transparente resultante se sometió a reflujo durante 1 h. Esta solución luego se enfrió a t. a., y se agregó 2,4-di-*ter*-butil-6-[[*(E)*-(*S*)-1-hidroxi-*metil*-2-*metil*-propilimino]-*metil*]-fenol [CAS 155052-31-6] (469 mg, 1,47 mmol). La solución amarilla resultante se agitó a t. a. durante 1 h. Esta solución de catalizador (0,023 M, 46,6 ml, 1,07 mmol) se agregó a una solución de 1-(6-bromo-3-fluoro-4-trietilsilanil-piridin-2-il)-etanona (35,53 g, 107 mmol) y cianuro de trimetilsililo (12,73 g, 128 mmol) en 223 ml de DCM seco. La mezcla se agitó durante 2 días y se evaporó a fin de obtener 47 g del compuesto del título bruto en forma de un aceite de color anaranjado. HPLC: $R_{t_{H5}} = 2,773$ min; ESIMS: 431, 433 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 7,46 (d, 1H), 2,04 (s, 3H), 1,00 (t, 9H), 1,03–0,87 (m, 15H), 0,20 (s, 9H).

d) (R)-1-Amino-2-(6-bromo-3-fluoro-4-trietilsilanil-piridin-2-il)-propan-2-ol, clorhidrato.

Complejo de borano dimetil sulfuro (16,55 g, 218 mmol) se agregó a una solución de producto bruto (*S*)-2-(6-bromo-3-fluoro-4-trietilsilanil-piridin-2-il)-2-trimetilsilanilo-*propionitrilo* (47 g, 109 mmol) en 470 ml de THF. La mezcla se sometió a reflujo durante 2 h. El baño de calentamiento se eliminó, y la mezcla de reacción se apagó mediante la cuidadosa adición por goteo de MeOH. Después de cesar la emanación de gas, se agregó lentamente 6M HCl ac. (23,6 ml, 142 mmol). La solución resultante se evaporó, y el residuo se disolvió en MeOH y se evaporó (dos veces) a fin de lograr 44,5 g de una espuma amarilla, lo suficientemente pura para reacciones posteriores. HPLC: $R_{t_{H1}} = 2,617$ min; ESIMS: 363, 365 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 7,93 (s, br, 3H), 7,53

(d, 1H), 6,11 (s, br, 1H), 3,36–3,27 (m, 1H), 3,18–3,09 (m, 1H), 1,53 (s, 3H), 0,99–0,81 (m, 15H).

e) (R)-N-(2-(6-bromo-3-fluoro-4-(triethylsilyl)piridin-2-il)-2-hidroxipropil)-4-nitrobenzenosulfonamida.

5 A una solución de producto bruto (R)-1-amino-2-(6-bromo-3-fluoro-4-triethylsilyl-piridin-2-il)-propan-2-ol, clorhidrato (43,5 g, 109 mmol) en 335 ml de THF se agregó una solución de NaHCO₃ (21,02 g, 250 mmol) en 500 ml de agua. La mezcla se enfrió a 0–5°C, y una solución de cloruro de 4-nitrobenzenosulfonilo (26,5 g, 120 mmol) en 100 ml de THF se agregó por goteo. La emulsión resultante
10 se agitó durante la noche mientras se permitía que la temperatura alcanzara t. a. La mezcla se extrajo con TBME. La capa orgánica se secó con MgSO₄·H₂O, se filtró y se evaporó a fin de obtener una resina de color anaranjado, que se purificó en una columna de gel de sílice eluyendo con Hexanos/10–20% EtOAc a fin de lograr 37,56 g del compuesto del título, en forma de una resina amarilla. TLC
15 (Hex/EtOAc 3/1): R_f = 0,34; HPLC: R_{tH4} = 1,678 min; ESIMS: 548, 550 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): 8,40 (d, 2H), 8,06 (t, 1H), 7,97 (d, 2H), 7,45 (d, 1H), 5,42 (s, 1H), 3,23 (d, 2H), 1,44 (s, 3H) 0,97–0,81 (m, 15H); Chiral HPLC (Chiralpak AD-H 1213, UV 210 nm): 90% ee.

f) 6-Bromo-3-fluoro-2-[(S)-2-metil-1-(4-nitro-benzenosulfonil)-aziridin-2-il]-4-triethylsilyl-piridina.

Una solución de trifenilfosfina (21,55 g, 82 mmol) y (R)-N-(2-(6-bromo-3-fluoro-4-(triethylsilyl)piridin-2-il)-2-hidroxipropil)-4-nitrobenzenosulfonamida (37,56 g, 69 mmol) en 510 ml de THF se enfrió a 4°C. Una solución de dietil azodicarboxilato en tolueno (40% en peso, 38,8 g, 89 mmol) se agregó por goteo
25 mientras se mantenía la temperatura por debajo de 10°C. Se eliminó el baño de enfriamiento, y la mezcla de reacción se agitó a t. a. durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó con aproximadamente 1000 ml de tolueno, y se eliminó THF a

presión reducida. La solución resultante de tolueno del producto bruto se prepurificó en una columna de gel de sílice eluyendo con hexanos/5–17% EtOAc. Las fracciones más puras se combinaron, se evaporaron y se cristalizaron a partir de TBME/hexano a fin de lograr 29,2 g del compuesto del título en forma de cristales blancos. HPLC: $R_{tH4} = 2,546$ min; ESIMS: 530, 532 $[(M+H)^+, 1Br]$; ^1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 8,40 (d, 2H), 8,19 (d, 2H), 7,39 (d, 1H), 3,14 (s, 1H), 3,02 (s, 1H), 2,01 (s, 3H) 1,03 – 0,83 (m, 15H); $\alpha[D] -35,7^\circ$ (c = 0,97, DCM).

g) 6-Bromo-3-fluoro-2-[(S)-2-metil-1-(4-nitro-bencenosulfonil)-aziridin-2-il]-piridina.

Fluoruro de potasio (1,1 g, 18,85 mmol) se agregó a una solución de 6-bromo-3-fluoro-2-[(S)-2-metil-1-(4-nitro-bencenosulfonil)-aziridin-2-il]-4-trietilsilanil-piridina (5 g, 9,43 mmol) y AcOH (1,13 g, 9,43 mmol) en 25 ml de THF. Se agregó DMF (35 ml), y la suspensión se agitó durante 1 h a t. a.. La mezcla de reacción se vertió sobre una mezcla de $NaHCO_3$ ac. sat. y TBME. Se separaron las capas y se lavaron con salmuera y TBME. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre $MgSO_4 \cdot H_2O$, se filtraron y se evaporaron a fin de obtener un aceite amarillo, que se cristalizó a partir de TBME/hexano a fin de lograr 3,45 g del compuesto del título como cristales blancos. HPLC: $R_{tH6} = 2,612$ min; ESIMS: 416, 418 $[(M+H)^+, 1Br]$; ^1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 8,41 (d, 2H), 8,19 (d, 2H), 7,48 (dd, 1H), 7,35 (t, 1H), 3,14 (s, 1H), 3,03 (s, 1H), 2,04 (s, 3H); $\alpha[D] -35,7^\circ$ (c = 0,89, DCM).

h) Éster etílico de ácido (R)-2-[(R)-2-(6-Bromo-3-fluoro-piridin-2-il)-2-(4-nitro-bencenosulfonilamino)-propoxi]-3,3,3-trifluoro-2-metil-propiónico.

Una solución de éster etílico de ácido (R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propiónico (11,93 g, 64,1 mmol) en DMF (158 ml) se evacuó/inundó con nitrógeno, dos veces. Una solución de KOtBu (6,21 g, 55,5 mmol) en DMF (17 ml)

se agregó por goteo, mientras se mantenía una temperatura de reacción de ca 25°C usando enfriamiento con un baño de agua. Después de 15 min, se agregó 6-bromo-3-fluoro-2-[(S)-2-metil-1-(4-nitro-bencenosulfonil)-aziridin-2-il]-piridina sólida (17,78 g, 42,7 mmol), y la agitación se continuó durante 3 h. La
 5 mezcla de reacción se vertió sobre una mezcla de 1M HCl (56 ml), salmuera y TBME. Se separaron las capas, se lavaron con salmuera y TBME. Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄.H₂O, se filtraron y se evaporaron. El producto de reacción bruto se purificó por medio de la cromatografía en gel de sílice (hexanos/25-33% TBME) a fin de lograr 16,93 g del compuesto del título en
 10 forma de una resina amarilla, que estaba contaminada con un producto secundario isomérico (relación: 70:30 por ¹H-RMN).

HPLC: Rt_{H6} = 2,380 min; ESIMS: 602, 604 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 8,32 (d, 2H), 8,07 (d, 2H), 7,46 – 7,41 (m, 1H), 7,30 – 7,23 (m, 1H), 6,92 (s, 1H), 3,39 – 4,30 (m, 2H), 3,95 (d, 1H), 3,84 (d, 1H), 1,68 (s, 3H), 1,56 (s,
 15 3H), 1,40–1,34 (m, 3H) + producto secundario isomérico.

i) (R)-2-[(R)-2-(6-Bromo-3-fluoro-piridin-2-il)-2-(4-nitro-bencenosulfonilamino)-propoxi]-3,3,3-trifluoro-2-metil-propionamida.

Una solución de éster etílico de ácido (R)-2-[(R)-2-(6-bromo-3-fluoro-piridin-2-il)-2-(4-nitro-bencenosulfonilamino)-propoxi]-3,3,3-trifluoro-2-metil-propiónico (16,93 g, 28,1 mmol) en NH₃/MeOH (7M, 482 ml) se agitó a 50°C en un
 20 recipiente sellado durante 26 h. La mezcla de reacción se evaporó, y el residuo se cristalizó a partir de DCM a fin de lograr 9,11 g del compuesto del título como cristales incoloros.

HPLC: Rt_{H6} = 2,422 min; ESIMS: 573, 575 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 8,33 (d, 2H), 8,06 (d, 2H), 7,42 (dd, 1H), 7,30 – 7,26 (m, 1H), 7,17 (s, br, 1H), 6,41 (s, 1H), 5,57 (s, br, 1H), 4,15 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,65 (s, 3H).

j) ***N*-[*(R)*-1-(6-Bromo-3-fluoro-piridin-2-il)-2-((*R*)-1-ciano-2,2,2-trifluoro-1-metil-etoxi)-1-metil-etil]-4-nitro-bencenosulfonamida.**

Una suspensión de (*R*)-2-[(*R*)-2-(6-bromo-3-fluoro-piridin-2-il)-2-(4-nitro-bencenosulfonilamino)-propoxi]-3,3,3-trifluoro-2-metil-propionamida (8,43 g, 14.70 mmol) y trietilamina (5,12 ml, 36,8 mmol) en 85 ml de DCM se enfrió a 0-5°C. Se agregó anhídrido trifluoroacético (2,49 ml, 17,64 mmol) por goteo durante 30 min. Se agregaron cantidades adicionales de trietilamina (1,54 ml, 11,07 mmol) y anhídrido trifluoroacético (0,75 ml, 5,29 mmol) a fin de completar la reacción. La mezcla de reacción se apagó mediante la adición de 14 ml de amoníaco acuoso (25%) y 14 ml de agua. La emulsión se agitó durante 15 min, se agregaron más agua y DCM, y se separaron las capas. La capa orgánica se secó con MgSO₄ H₂O, se filtró y se evaporó. La purificación por cromatografía de columna en gel de sílice (hexanos/10-25% EtOAc) proporcionó 8,09 g del compuesto del título como una resina amarilla.

HPLC: R_{tH6} = 3,120 min; ESIMS: 555, 557 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-RMN (400 MHz, CDCl₃): 8,35 (d, 2H), 8,11 (d, 2H), 7,50 (dd, 1H), 7,32 (dd, 1H), 6,78 (s, 1H), 4,39 (d 1H), 4,22 (d, 1H), 1,68 (s, 6H).

k) ***(2R,5R)*-5-(6-Bromo-3-fluoro-piridin-2-il)-2,5-dimetil-2-trifluorometil-5,6-dihidro-2H-[1,4]oxazin-3-ilamina.**

Una solución de *N*-[*(R)*-1-(6-bromo-3-fluoro-piridin-2-il)-2-((*R*)-1-ciano-2,2,2-trifluoro-1-metil-etoxi)-1-metil-etil]-4-nitro-bencenosulfonamida (9,18 g, 16,53 mmol) y *N*-acetilcisteína (5,40 g, 33,10 mmol) en 92 ml de etanol se evacuó y se inundó con nitrógeno. Se agregó K₂CO₃ (4,57 g, 33,1 mmol), y la mezcla se agitó a 80°C durante 3 días. La mezcla de reacción se concentró al vacío hasta alrededor de 1/4 del volumen original y se dividió entre agua y TBME. La capa orgánica se lavó con solución al 10% ac. de K₂CO₃, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó a fin de obtener un aceite amarillo. La

cromatografía de columna en sílice (hexanos/14–50% (EtOAc:MeOH 95:5)) proporcionó 4,55 g del compuesto del título en forma de un sólido blanquecino.

HPLC: $R_{t_{H_2}} = 2,741$ min; ESIMS: 370, 372 [(M+H)⁺, 1Br]; ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): 7,71 – 7,62 (m, 2H), 5,97 (s, br, 2H), 4,02 (d 1H), 3,70 (d, 1H),
 5 1,51 (s, 3H), 1,47 (s, 3H).

l) (2*R*, 5*R*)-5-(6-Amino-3-fluoro-piridin-2-il)-2,5-dimetil-2-trifluorometil-5,6-dihidro-2*H*-[1,4]oxazin-3-il amina

Una autoclave de vidrio/acero inoxidable se purgó con nitrógeno, Cu₂O (0,464 g, 3,24 mmol), amoníaco (101 ml, 25%, ac., 648 mmol, 30 equivalentes), y
 10 se agregó (2*R*,5*R*)-5-(6-Bromo-3-fluoro-piridin-2-il)-2,5-dimetil-2-trifluorometil-5,6-dihidro-2*H*-[1,4]oxazin-3-ilamina (8 g, 21,6 mmol) en etilenglicol (130 ml). La autoclave se cerró, y la suspensión se calentó hasta 60°C; la solución se agitó durante alrededor de 48 horas (max. presión 700 kPa (0,7 bar), temperatura interna 59–60°C). La mezcla de reacción se diluyó con etil
 15 acetato y agua. La fase orgánica se lavó con agua, y cuatro veces, con amoníaco acuoso al 12%, y finalmente, con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó. El producto bruto (7 g, que contenía cierto etilenglicol, rendimiento cuantitativo) se usó en la siguiente etapa sin otra purificación.

HPLC: $R_{t_{H_3}} = 0,60$ min; ESIMS: 307 [(M+H)⁺].

20 **m) Éster ter-butílico de ácido [(2*R*, 5*R*)-5-(6-Amino-3-fluoro-piridin-2-il)-2,5-dimetil-2-trifluorometil-5,6-dihidro-2*H*-[1,4]oxazin-3-il]-carbámico.**

Una solución de (2*R*, 5*R*)-5-(6-amino-3-fluoro-piridin-2-il)-2,5-dimetil-2-trifluorometil-5,6-dihidro-2*H*-[1,4]oxazin-3-il amina (6,62 g, 21,6 mmol),
 25 Boc₂O (4,72 g, 21,6 mmol) y base de Hünig (5,66 ml, 32,4 mmol) en diclorometano (185 ml) se agitó a t. a. durante 18 horas. La mezcla de reacción se lavó con NaHCO₃ sat. ac. y salmuera. Las capas acuosas se extrajeron

nuevamente con diclorometano, y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron a fin de obtener un sólido de color verde claro (14 g). El producto bruto se cromatografió sobre gel de sílice (ciclohexano:etil acetato, 95:5 a 60:40) a fin de lograr 7,68 g del compuesto del
5 título.

TLC (ciclohexano:etil acetato, 3:1): $R_f = 0,21$; HPLC: $R_{t_{H_3}} = 1,14$ min; ESIMS: 408 $[(M+H)^+]$; ^1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 11,47 (br, s, 1H), 7,23 (dd, $J=10,42, 8,78$ Hz, 1H), 6,45 (dd, $J=8,78, 2,64$ Hz, 1H), 4,50 (br, s, 2H), 4,32 (d, $J=2,38$ Hz, 1H), 4,10 (d, $J=11,80$ Hz, 1H), 1,69 (s, 3H, CH_3), 1,65 (s, 3H, CH_3),
10 1,55 (s, 9H).

n) Éster ter-butílico de ácido ((2*R*, 5*R*)-5-{6-[(3-Cloro-5-trifluorometil-piridina-2-carbonil)-amino]-3-fluoro-piridin-2-il}-2,5-dimetil-2-trifluorometil-5,6-dihidro-2*H*-[1,4]oxazin-3-il)-carbámico.

Una mezcla de éster ter-butílico de ácido [(2*R*, 5*R*)-5-(6-amino-3-fluoro-piridin-2-il)-2,5-dimetil-2-trifluorometil-5,6-dihidro-2*H*-[1,4]oxazin-3-il)-
15 carbámico (3,3 g, 8,12 mmol), ácido 3-cloro-5-trifluorometilpicolínico (2,2 g, 9,74 mmol), HOAt (1,99 g, 14,62 mmol) y EDC clorhidrato (2,33 g, 12,18 mmol) se agitó en DMF (81 ml) a t. a. durante 48 horas. La mezcla de reacción se diluyó con etil acetato y se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se
20 filtró y se evaporó. El producto bruto (12 g) se cromatografió sobre gel de sílice (ciclohexano a ciclohexano:etil acetato, 1:1) a fin de lograr 5,2 g del compuesto del título.

TLC (sílice, ciclohexano:etil acetato 3:1): $R_f=0,47$; HPLC: $R_{t_{H_3}} = 1,40$ min; ESIMS: 615, 616 $[(M+H)^+, 1Cl]$; ^1H -RMN (400 MHz, $CDCl_3$): 11,68 (s, 1H), 10,41
25 (s, 1H), 8,81 (dd, $J=1,82, 0,69$ Hz, 1 H), 8,45 (dd, $J=8,91, 3,14$ Hz, 1 H), 8,19 (dd, $J=1,88, 0,63$ Hz, 1 H), 7,59 (dd, $J=9,79, 9,16$ Hz, 1 H), 4,38 (d, $J=2,13$ Hz, 1 H), 4,18 (d, $J=11,80$ Hz, 1 H), 1,75 (s, 3H), 1,62 (s, 3H), 1,60 (s, 9H).

o) **[6-((3*R*,6*R*)-5-amino-3,6-dimetil-6-trifluorometil-3,6-dihidro-2*H*-[1,4]oxazin-3-il)-5-fluoro-piridin-2-il)-amida de ácido 3-cloro-5-trifluorometil-piridina-2-carboxílico.**

Una mezcla de éster ter-butilico de ácido ((2*R*, 5*R*)-5-{6-[3-cloro-5-trifluorometil-piridina-2-carbonil)-amino]-3-fluoro-piridin-2-il)-2,5-dimetil-2-trifluorometil-5,6-dihidro-2*H*-[1,4]oxazin-3-il)-carbámico (4,99 g, 8,13 mmol) y TFA (6,26 ml, 81 mmol) en diclorometano (81 ml) se agitó a t. a. durante 18 horas. El solvente se evaporó, y el residuo se diluyó con un solvente orgánico adecuado, tal como etil acetato, y amoníaco acuoso. Se agregó hielo, y la fase orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se evaporó a fin de lograr 3,78 g del compuesto del título.

HPLC: $R_{tH_3} = 0,87$ min; ESIMS: 514, 516 $[(M+H)^+, 1Cl]$; ^1H -RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 11,11 (s, 1H), 9,06 (s, 1H), 8,69 (s, 1H), 8,13 (dd, $J = 8,8, 2,6$ Hz, 1H), 7,80 – 7,68 (m, 1H), 5,88 (br, s, 2H), 4,12 (d, $J = 11,5$ Hz, 1H), 3,72 (d, $J = 11,4$ Hz, 1H), 1,51 (s, 3H), 1,49 (s, 3H).

Ejemplo 2: Procedimiento de cristalización, Forma A.

Se disolvió 1 wt de Compuesto 1, obtenido por el procedimiento del Ejemplo 1, en 5,11 wt de IPAc a 70–80°C. Se filtró la solución (filtro <2 μ m), y luego, se agregaron 1,52 wt de n-heptano. La solución se enfrió a 55°C, y se sembró con 0,5% p/p de Forma A. La suspensión se mantuvo a 55 °C durante 30–60 min, y luego se enfrió a 35 °C durante 2 horas. La suspensión se envejeció durante 1 hora, y luego se agregaron 8,2 wt de n-heptano en un período de 3 horas. La suspensión se envejeció durante una hora y luego se enfrió a 0–5°C durante 2 horas y se envejeció durante por lo menos dos horas. Se filtró la suspensión al vacío, y la torta se lavó con 10/90 p/p de isopropil acetato/n-heptano. La torta se secó al vacío a 40–45°C hasta sequedad, a fin de producir Forma A.

Ejemplo 3: Análisis de XRPD de la Forma A.

La Forma A cristalina se analizó por XRPD, y los diez picos más característicos se muestran en la Tabla 2 (ver, además, Figura 1).

Tabla 2.

2-theta en grados	intensidad relativa en %
10,68	67,4
14,84	100,0
18,66	23,5
19,52	46,6
21,38	71,4
21,68	19,9
25,52	5,4
29,86	6,8
35,04	6,0
37,83	4,5

Ejemplo 4: Análisis de DSC de la Forma A.

La Forma A cristalina se analizó por calorimetría de barrido diferencial (DSC) usando un calorímetro de barrido de difracción Discovery Diffraction Scanning Calorimeter de TA Instruments, y se halló que tenía un inicio de fusión a alrededor de 171°C, ver Figura 2. La tasa de calentamiento se realizó a 10°C por minuto.

Ejemplo 5: Procedimiento de micronización y XRPD para la Forma A micronizada.

La Forma cristalina A se micronizó de acuerdo con el siguiente método:

Se utilizó un instrumento de molienda por chorro en espiral con un anillo de 50 mm de diámetro. El gas portador fue nitrógeno, y la energía fue dirigida a 1800 kJ/kg (parámetro acumulativo considerando el número y diámetro de boquillas de molienda e inyectores, la presión de la boquilla de molienda e inyector y la velocidad de alimentación según Midoux et al., Powder Technol. 104 (1999) 113 – 120).

La Forma A cristalina micronizada se analizó mediante XRPD, y los diez picos más característicos se muestran en la Tabla 3 (ver también la Figura 3).

Tabla 3.

2–theta en grados	intensidad relativa en %
10,56	49,8
12,09	33,1
14,72	52,8
15,93	83,5
18,53	90,3
19,37	39,0
21,18	76,1
23,97	100,0
24,65	72,0
29,65	76,1

El análisis de difracción de rayos X en polvo (XRPD) se realizó usando un difractómetro de rayos x Bruker D8 Advance en geometría de reflexión. Las mediciones se tomaron a alrededor de 30 kV y 40 mA en las condiciones que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.

Tasa de barrido (barrido continuo):	3	s/escalón
Tamaño de escalón: Ranura Soller:	0,017°	(2–theta)
Ranuras (de izquierda a derecha):	2,5°	
	V12 (variable)	

El patrón de difracción de rayos X se registró entre 2° y 40° (2–theta) con radiación CuK_α para la identificación del patrón completo.

Ejemplo 6: Composición farmacéutica que comprende la Forma A – Formulación ‘A’.

La Forma A se formuló como cápsulas de gelatina dura de 1, 10, 25 y 75 mg de concentración de dosis (por ejemplo, Capsugel, tamaño 3) que comprendían los ingredientes mostrados en la Tabla 5 (Formulación A). La fabricación por lotes se llevó a cabo como se describe a continuación y en la

5 Tabla 6.

Tabla 5: Composición de cápsula de gelatina dura de 1 mg, 10 mg, 25 mg y 75 mg de Forma A (Formulación A).

	Cantidad de Formulación A por cápsula (% p/p)			
	1 mg	10 mg	25 mg	75 mg
Carga de fármaco	0,6%	5,9%	14,7%	44,1%
Ingrediente de relleno de cápsula				
Forma A	0,6	5,9	14,7	44,1
Manitol	67,2	63,37	56,91	35,14
Almidón pregelatinizado	21,77	20,29	17,94	10,29
Hidroxipropil celulosa de baja sustitución	5,17	5,17	5,18	5,17
Hidroxipropil celulosa	3,39	3,39	3,39	3,39
Talco	0,47	0,47	0,47	0,47
Estearil fumarato de sodio	1,41	1,41	1,41	1,41
Peso mezcla de relleno de cápsula (mg)	170,0	170,0	170,0	170,0

Tabla 6: Fabricación de cápsulas de gelatina dura de 1 mg, 10 mg, 25 mg y 75 mg de la Forma A (Formulación A).

	Cantidad por lote (kg)			
	1 mg	10 mg	25 mg	75 mg ³
Tamaño de lote	7500 unidades	16.000 unidades	35.000 unidades	7100 unidades

	Cantidad por lote (kg)			
Carga de fármaco	0,6%	5,9%	14,7%	44,1%
Ingrediente de relleno de cápsula				
Forma A ¹	0,0075	0,1600	0,875	0,5325
Manitol	0,8568	1,7238	3,386	0,4242
Almidón pregelatinizado	0,2775	0,5520	1,068	0,1243
Hidroxipropil celulosa de baja sustitución	0,0660	0,1408	0,308	0,0625
Hidroxipropil celulosa	0,0432	0,0922	0,202	0,0409
Estearil fumarato de sodio	0,0180	0,0384	0,084	0,0170
Talco	0,0060	0,0128	0,028	0,0057
Agua purificada ²	q. s.	q. s.	q. s.	q. s.
Peso mezcla de relleno de cápsula	1,2750	2,7200	5,950	1,2071
Cubierta de cápsula vacía				
Cubierta de cápsula, tamaño 3 (peso teórico)	0,3600	0,7680	1,680	0,3408
Total peso de lote	1,6350	3,4880	7,630	1,5479

¹ Correspondiente a un contenido de sustancia farmacológica corregida (= cc) del 100%. Se realiza una compensación de la sustancia del fármaco si el contenido de la sustancia del fármaco corregido es $\leq 99,5\%$. La diferencia de peso se ajusta con manitol.

5 ² Eliminada durante el procesamiento.

³ Durante la granulación de la formulación con una concentración de 75 mg, se observó que el proceso de granulación era inadecuado. Esto probablemente se atribuye a la alta carga de fármaco del 44% p/p en esta

composición. Por lo tanto, para un proceso de granulación confiable, se debe mantener un límite superior para la carga de fármaco de, por ejemplo, 35%.

Se pueden preparar otros tamaños de lotes según los requisitos de suministro y/o la cadena de equipos disponible. El peso de los componentes individuales para otros tamaños de lote corresponde proporcionalmente a la
5 composición indicada.

Descripción del proceso de fabricación de la Formulación A de la Forma A: cápsulas de gelatina dura de 1 mg y 10 mg.

1. Mezclar la sustancia farmacológica de Forma A y una porción de manitol.
- 10 2. Tamizar la mezcla del paso 1.
3. Mezclar la mezcla del paso 2.
4. Tamizar la porción de manitol y agregar a la mezcla del paso 3.
5. Mezclar la mezcla del paso 4.
6. Tamizar la porción restante de manitol, almidón pregelatinizado,
15 hidroxipropil celulosa de baja sustitución e hidroxipropil celulosa. Agregar los ingredientes tamizados a la mezcla del paso 5.
7. Mezclar la mezcla del paso 6.
8. Tamizar la mezcla del paso 7.
9. Mezclar la mezcla del paso 8.
- 20 10. Disolver la hidroxipropilcelulosa en agua purificada bajo agitación para formar una solución aglutinante. Agregar la solución aglutinante a la mezcla del paso 9 y granular la masa con un granulador de alto cizallamiento (por ejemplo, Collette).
11. Realizar un cribado en húmedo de la masa del paso 10 si es necesario.
- 25 12. Secar los gránulos húmedos del paso 11 en un secador de lecho fluido (por ejemplo, Aeromatic).
13. Cribar los gránulos secos del paso 12.

14. Tamizar manitol, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución y talco y agregue a los gránulos tamizados del paso 13.

15. Mezclar la mezcla del paso 14.

16. Tamizar el estearil fumarato de sodio y agregar a la mezcla del paso 15.

17. Mezclar la mezcla del paso 16 para obtener la mezcla final.

18. Encapsular la mezcla final del paso 17 utilizando una máquina de llenado de cápsulas (por ejemplo, H&K).

Descripción del proceso de fabricación de la Formulación A de la Forma A:
10 cápsulas de gelatina dura de 25 mg y 75 mg.

1. Tamizar la sustancia farmacológica de la Forma A, manitol, almidón pregelatinizado, hidroxipropil celulosa de baja sustitución, hidroxipropil celulosa.

2. Mezclar los materiales tamizados del paso 1.

3. Tamizar la mezcla del paso 2.

15 4. Mezclar la mezcla del paso 3.

5. Disolver la hidroxipropilcelulosa en agua purificada bajo agitación para formar una solución aglutinante. Agregar la solución de aglutinante a la mezcla del paso 4 y granular la masa con un granulador de alto cizallamiento (por ejemplo, Collette).

20 6. Realizar un cribado en húmedo de la masa del paso 6 si es necesario.

7. Secar los gránulos húmedos del paso 6 en un secador de lecho fluido (por ejemplo, Aeromatic).

8. Cribar los gránulos secos del paso 7.

25 9. Tamizar manitol, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución y talco y agregar a los gránulos tamizados del paso 8.

10. Mezclar la mezcla del paso 9.

11. Tamizar el estearil fumarato de sodio y añadir al paso 10.

12. Mezclar la mezcla del paso 11 para obtener la mezcla final.

13. Encapsular la mezcla final del paso 12.

Los procesos descritos anteriormente pueden ajustarse razonablemente según la cadena de equipos y la escala de lotes disponibles. Se pueden preparar diferentes tamaños de lotes por adaptación del tamaño del equipo. El peso de los componentes individuales para otros tamaños de lotes corresponde proporcionalmente a la composición establecida dentro de la adaptación habitual que puede ser necesaria para permitir la ampliación y transferencia del proceso como se muestra, por ejemplo, en la guía de la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) sobre cambios posteriores a la aprobación y de escala.

Ejemplo 7: Composición farmacéutica adicional que comprende la Forma A – Formulación ‘B’.

La Forma A se formuló adicionalmente como una cápsula de gelatina dura (por ejemplo, Capsugel, tamaño 2 o 3) que comprendía los ingredientes mostrados en la Tabla 7 (Formulación B). La fabricación de la formulación B se llevó a cabo como se describe a continuación y en la Tabla 8.

Tabla 7: Composición unitaria de formulaciones de 10 mg, 15 mg, 25 mg y 50 mg de concentración de dosis, de cápsulas de gelatina dura de la Forma A (Formulación B).

	Cantidad de formulación B por cápsula (% p/p)			
	10 mg	15 mg	25 mg	50 mg
Carga de fármaco	8,3%	8,3%	20,8%	20,8%
Ingrediente de relleno de cápsula				
Forma A	8,33 ¹	8,33 ¹	20,83 ¹	20,83 ¹
Manitol ²	42,97 ³	42,97 ⁴	39,30 ⁵	39,30 ⁶

Celulosa microcristalina	38,83	38,83	30,00	30,00
Hidroxipropil celulosa de baja sustitución	5,00	5,00	5,00	5,00
Hipromelosa	2,87	2,87	2,87	2,87
Estearil fumarato de sodio	1,50	1,50	1,50	1,50
Talco	0,50	0,50	0,50	0,50
Agua purificada ⁷	—	—	—	—
Peso de relleno de cápsula (mg)	120,00	180,00	120,00	240,00
Cubierta de cápsula vacía (peso teórico en mg)	48,00 ⁸	61,00 ⁹	48,00 ⁸	61,00 ⁹
Total peso de cápsula (mg)	168,00	241,00	168,00	301,00

¹ La Formulación B utiliza una combinación comolida de 50% p/p de sustancia de fármaco y 50% p/p de manitol.

² Cantidad total de manitol en la formulación, incluido el manitol de la mezcla comolida (intermediario farmacéutico – PI) y el manitol agregado en la
5 mezcla para la granulación.

³ Incluye 10.000 mg (8,33% p/p) de la mezcla comolida y 41,560 mg (34,63% p/p) tomados en la mezcla para granulación.

⁴ Incluye 15.000 mg (8,33% p/p) de la mezcla comolida y 62,340 mg (34,63% p/p) tomados en la mezcla para granulación.

10 ⁵ Incluye 25.000 mg (20,83% p/p) de la mezcla comolida y 22,160 mg (18,47% p/p) tomados en la mezcla para granulación.

⁶ Incluye 50.000 mg (20,83% p/p) de la mezcla comolida y 44,320 mg (18,47% p/p) tomados en la mezcla para granulación.

⁷ Eliminada durante el procesamiento.

15 ⁸ Se llenan con la Formulación B con concentraciones de dosificación de 10 mg (8,33% p/p) y 25 mg (20,83% p/p), cápsulas de gelatina dura de tamaño 3.

⁹ Se llenan con la Formulación B con concentraciones de dosificación de 15 (8,33% p/p) y 50 mg (20,83% p/p), cápsulas de gelatina dura de tamaño 2.

En la Formulación B, la sustancia farmacológica de la Forma A y el manitol se someten a comolienda a fin de mejorar la robustez del proceso de molienda.

5 Se encontró que la molienda de una sustancia de fármaco pura era un desafío debido al flujo deficiente y a la tendencia de adherencia del material. Los ejemplos de molinos adecuados para el proceso de molienda conjunta incluyen, sin limitación, molinos Hosokawa Alpine, por ejemplo: modelos de sistema AS, AFG y JS; o molinos de Fluid Energy Processing & Equipment Company, por ejemplo:
10 modelos de sistema Roto–Jet. La mezcla comolida se considera un intermediario farmacéutico (PI, conforme a sus siglas en inglés) que se procesa aún más para fabricar el producto farmacológico. La mezcla comolida utilizada en la Formulación B contiene 50% p/p de la sustancia de fármaco de la Forma A y 50% p/p de manitol. Los ensayos de desarrollo a escala de laboratorio y la fabricación
15 piloto a pequeña escala de una mezcla comolida que contiene una sustancia de fármaco de la Forma A hasta 70% p/p y manitol hasta 30% p/p (es decir, 70:30 – sustancia de fármaco de Forma A: manitol) condujo a un proceso engorroso debido a las deficientes propiedades del material de la mezcla y la adherencia a la cámara de molienda. La comolienda de la sustancia de fármaco de la Forma A
20 con 15% p/p de manitol fracasó. La relación de 50:50% p/p (o 1: 1) de la sustancia de fármaco de la Forma A a manitol se usó posteriormente sobre la base de la lectura positiva de un ensayo de fabricación en esta relación.

Las Formulaciones A y B se producen mediante tecnología de granulación en húmedo. La granulación en húmedo se eligió para superar las desafiantes
25 propiedades físicas de las sustancias farmacológicas, a saber, baja densidad aparente, deficiente flujo y humectabilidad. El almidón pregelatinizado y la hidroxipropilcelulosa utilizados como relleno y aglutinante, respectivamente, en la

- Formulación A fueron reemplazados por celulosa microcristalina e hipromelosa. Los experimentos mostraron que el uso de celulosa microcristalina como relleno, en lugar de almidón pregelatinizado, condujo a un perfil de disolución más rápido y mejoró las propiedades de los gránulos. Experimentos adicionales demostraron
- 5 que el uso de hipromelosa como aglutinante, en lugar de hidroxipropilcelulosa, proporcionó mejoradas propiedades granulares y proceso de granulación.

Tabla 8: Fórmula de fabricación para la Formulación B de la Forma A: cápsulas de gelatina dura de 10 mg, 15 mg, 25 mg y 50 mg.

Ingrediente	Cantidad por lote (kg)			
Formulación B, concentración de dosis y tamaño de lote	10 mg, 40.000 cápsulas	15 mg, 255.650 cápsulas	25 mg, 40.000 cápsulas	50 mg, 219.000 cápsulas
Relleno de cápsula				
Forma A PI ¹	0,800	7,670	2,000	21,900
Celulosa microcristalina	1,864	17,870	1,440	15,768
Manitol	1,662	15,937	0,886	9,706
Hidroxipropil celulosa de baja sustitución	0,240	2,301	0,240	2,628
Hipromelosa	0,138	1,319	0,138	1,507
Estearil fumarato de sodio	0,072	0,690	0,072	0,788
Talco	0,024	0,230	0,024	0,263
Agua purificada ²	q. s.	q. s.	q. s.	q. s.
Peso de mezcla de relleno de cápsula	4,800	46,017	4,800	52,560
Cubierta de cápsula vacía	1,920	15,595	1,920	13,359
Cubierta de cápsula ³				

(peso teórico)				
Total peso de lote	6,720	61,612	6,720	65,919

¹ Si el contenido de fármaco PI es $\leq 99,5\%$ o $\geq 100,5\%$, el peso se ajustará y se compensará con manitol.

² Eliminada durante el procesamiento.

³ Con mezclas de 10 y 25 mg de concentración de dosis se rellenaron cápsulas de gelatina dura de tamaño 3, mientras que con mezclas de 15 mg y 50 mg de concentración de dosis se rellenaron cápsulas de gelatina dura de tamaño 2.

q. s = quantum satis (para agregar según sea necesario).

La Tabla 8 proporciona los ingredientes para tamaños de lotes particulares.
Se pueden utilizar otros tamaños de lotes según los requisitos clínicos y/o el equipo disponible y/o los materiales de partida disponibles. El peso de los componentes individuales para otros tamaños de lote corresponde proporcionalmente a la composición indicada.

Descripción del proceso de fabricación.

El proceso descrito a continuación puede ajustarse razonablemente, mientras se mantienen los mismos pasos básicos de producción, para compensar los diferentes tamaños de lote y/o las características del equipo, y/o sobre la base experimental del lote de producción anterior.

Fabricación de PI.

1. Mezclar la sustancia farmacológica de Forma A y el manitol.
2. Tamizar la mezcla del paso 1.
3. Comoler el material tamizado del paso 2.
4. Mezclar el material comolido del paso 3 para obtener el PI de la Forma A.

Formulación B de la Forma A: cápsulas de gelatina dura de 15 mg y 50 mg.

1. Tamizar PI Forma A, manitol, celulosa microcristalina e hidroxipropil celulosa de baja sustitución.
2. Mezclar los materiales tamizados del paso 1.
3. Tamizar la mezcla del paso 2.
- 5 4. Mezcla la mezcla del paso 3.
5. Disolver la hipromelosa en agua purificada bajo agitación para formar una solución aglutinante. Agregar la solución aglutinante a la mezcla del paso 4 y granular la masa con un granulador de alto cizallamiento (por ejemplo, Collette Model GRAL). Añadir agua purificada adicional si es necesario. Cantidad objetivo
- 10 de agua total: aproximadamente el 25%.
6. Realizar el cribado en húmedo según la observación/evaluación visual de los gránulos húmedos del paso 5 (opcional).
7. Secar los gránulos húmedos del paso 6 en un secador de lecho fluido (por ejemplo, Aeromatic).
- 15 8. Cribar los gránulos secos del paso 7.
9. Tamizar la hidroxipropilcelulosa de baja sustitución y el talco y agregar a los gránulos tamizados del paso 8.
10. Mezclar la mezcla del paso 9.
11. Tamizar el estearil fumarato de sodio y añadir al paso 10.
- 20 12. Mezclar la mezcla del paso 11 para obtener la mezcla final.
13. Encapsular la mezcla final del paso 12 en cápsulas de gelatina dura.

Ejemplo 8: Procedimiento de cristalización para la Forma B.

- Se suspendieron 3,5 g de la Forma A en 5 ml de THF en un vial de vidrio de 20 ml. La suspensión se agitó a 300 rpm a temperatura ambiente durante una
- 25 semana. La suspensión se filtró mediante un tubo de filtración centrífugo, y el sólido se secó a temperatura ambiente durante la noche para producir aproximadamente 1,39 g de la Forma B.

Ejemplo 9: Análisis de XRPD de la Forma B.

La forma cristalina B se analizó mediante XRPD, y los diez picos más característicos se muestran en la Tabla 9 (ver también la Figura 4).

Tabla 9.

2-theta en grados	intensidad relativa en %
10,65	68,3
13,48	100,0
16,56	29,9
16,77	47,1
17,39	18,6
19,71	17,0
20,45	22,8
21,34	55,9
23,08	18,0
27,16	20,7

Ejemplo 10: Análisis de DSC de la Forma B.

La Forma B se analizó mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC) utilizando un Calorímetro de Barrido por Difracción Discovery de TA Instruments, y muestra un inicio de conversión a alrededor de 119°C debido a la transformación en la Forma A, seguido de un inicio de fusión a alrededor de 170°C, consistente con la Forma A, ver Figura 5. La tasa de calentamiento se realizó a 10°C por minuto.

Ejemplo 11: Procedimiento de cristalización para hemihidrato de Forma H_A.

Se disolvieron 2,5 g de la Forma A en una mezcla de 15 ml de IPAc/0,375 ml de agua a 65°C con 300 rpm de agitación (barra de agitación). La solución transparente se enfrió a 45°C durante 20 min. Se añadieron gota a gota 7 ml de n-heptano a la solución mediante una bomba de inyección durante 10 minutos a 500 rpm (barra de agitación). La solución se enfrió a 15°C durante 2 h. Se agregaron 20 ml de n-heptano durante 50 minutos, y luego, se agregaron 37 ml

de n-heptano durante 93 minutos a 200 rpm (paleta). La suspensión se agitó durante la noche (por lo menos 10 h) a 15°C, se filtró y se lavó con n-heptano. El sólido se secó a temperatura ambiente. Se obtuvieron 1,78 g de hemihidrato de Forma H_A.

5 **Ejemplo 12: Análisis de XRPD de hemihidrato Forma H_A.**

La forma de hemihidrato cristalina H_A se analizó mediante XRPD, y los diez picos más característicos se muestran en la Tabla 10 (ver también la Figura 6).

Tabla 10.

2-theta en grados	intensidad relativa en %
13,96	65,0
14,28	100,0
16,07	39,0
17,66	47,6
18,33	83,9
19,57	38,2
21,40	30,3
21,56	34,0
24,06	28,8
25,83	25,8

Ejemplo 13: Análisis de DSC del hemihidrato Forma H_A.

10 La Forma H_A se analizó mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC) utilizando un calorímetro de barrido de difracción Discovery de TA Instruments, y se encontró que tenía un inicio de la temperatura de deshidratación a alrededor de 98°C, seguido de recristalización y un inicio de fusión a 170°C, consistente con Forma A. La tasa de calentamiento se realizó a 10°C por minuto (bandeja perforada), ver la Figura 7.

15

Ejemplo 14: Preparación de forma amorfa.

Se disolvieron 2,0 g de la Forma A en 100 ml de 1,4-dioxano y se congelaron en un baño de acetona en hielo seco. La muestra se liofilizó durante 1

día y luego se caracterizó por XRPD. No se observó pico de difracción. El sólido se secó en un horno de vacío a 70°C durante 2 horas y luego se almacenó a – 20°C. Ver la Figura 8.

Ejemplo 15: Análisis de DSC de la forma amorfa.

- 5 La forma amorfa se analizó mediante mDSC usando un calorímetro de barrido por difracción Discovery de TA Instruments a 2 K/min de –20 a 200°C, con amplitud de temperatura modulada 1 K y período de 60 s. Se puede detectar una transición vítrea a alrededor de 59°C, seguida de recristalización. El punto de fusión de la forma resultante es consistente con el de la Forma A; ver la Figura 9.

- 10 **Ejemplo 16: Estabilidad química de la Forma A cristalina cuando se expone a alta temperatura/humedad durante una semana.**

- La estabilidad de la Forma A cristalina se evaluó exponiendo el material cristalino a alta temperatura y/o humedad durante por lo menos tres semanas. Después del almacenamiento a alta temperatura y/o humedad, se tomaron
15 muestras del material cristalino en masa y se disolvieron en acetonitrilo: agua (80:20), y se analizó la pureza en un instrumento Waters Aquity UPLC usando las siguientes condiciones:

Tabla 11.

Columna de separac.	Waters Acquity UPLC BEH Phenyl		
Fase móvil	A: 0,05% TFA en 95% agua/5% acetonitrilo; B: 0,05% TFA en 95% acetonitrilo/5% agua		
Caudal	0,6 mL/min		
Temperatura columna°	35 °C		
Detección	286 nm		
Gradiente	Tiempo (min)	% A	% B
	0,0	95	5
	2,5	60	40
	3,5	54	46
	5,0	5	95
	5,01	95	5

6,0	95	5
-----	----	---

Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 12.

Condiciones de prueba Temp./HR; Tiempo exposic.	Pureza/%	Forma estado sólido
RT; 0	97,3	Cristalina
80°C; 3 semanas	97,3	Cristalina
50°C; 4 semanas	97,3	Cristalina
50°C/75%RH; 3 semanas	96,8	Cristalina

- 5 Los datos de estabilidad de la Forma A, resumidos en la Tabla 12, se compararon con la Forma B, la Forma de hidrato H_A y la forma amorfa, evaluadas en las mismas condiciones y, en cada caso, se produjo la conversión a la Forma A, indicado por el análisis de XRPD. Se encontró que la Forma A era el polimorfo más termodinámicamente estable.

10 **Ejemplo 17: Estudio en humanos de la farmacocinética del Compuesto 1 base libre cuando se administra solo y en combinación con el fuerte inhibidor de CYP3A4 itraconazol, o el fuerte inductor de CYP3A4, rifampicina.**

- 15 En un estudio de interacción fármaco–fármaco (DDI, conforme a sus siglas en inglés) en voluntarios sanos, se evaluó el efecto de un fuerte inhibidor de CYP3A4 (itraconazol) y un inductor fuerte de CYP3A4 (rifampicina) sobre la PK del Compuesto 1. El diseño del estudio DDI se describe en la Figura 10. Itraconazol, en una dosis de 200 mg q. d., aumentó la media de AUC del Compuesto 1 2–3 veces, y la media de C_{max} del Compuesto 1, en 25%, cuando

se administró junto con el Compuesto 1 en comparación con el Compuesto 1 administrado solo (Tabla 13). La rifampicina, en una dosis de 600 mg q. d., redujo la media de AUC del Compuesto 1 5 a 6 veces, y la media de Cmax del Compuesto 1, 2,5 veces, cuando se administró junto con el Compuesto 1 en comparación con el Compuesto 1 administrado solo (Tabla 14). En conclusión, el efecto de un fuerte inductor de CYP3A4 y un fuerte inhibidor de CYP3A4 sobre la exposición del Compuesto 1 en un estudio de Fase 1 ha demostrado que el CYP3A4 es de gran importancia para la eliminación del Compuesto 1, y que los efectos del cotratamiento con un fuerte inhibidor o inductor de CYP3A4 deben tenerse en cuenta al administrar el Compuesto 1.

Tabla 13: Resultados farmacocinéticos: análisis estadístico del efecto de itraconazol sobre los parámetros PK plasmáticos del Compuesto 1: Compuesto 1, 30 mg SD + itraconazol, 200 mg QD, frente al Compuesto 1, 30 mg SD.

Parámetro [Unidad]	Tratamiento	n*	Media geométrica ajustada	Relación media geométrica (Prueba/Referencia)	90% CI para relación
AUCinf (ng*h/mL)	Comp. 1 30 mg SD	17	3560	3,05	[2,91 , 3,20]
	Comp. 1 30 mg SD + Itraconazol 200 mg QD	17	10900		
AUCúltimo (ng*h/mL)	Comp. 1 30 mg SD	17	3150	2,20	[2,11 , 2,30]
	Comp. 1 30 mg SD + Itraconazol 200 mg QD	17	6930		
Cmax (ng/mL)	Comp. 1 30 mg SD	17	74,1	1,23	[1,18 , 1,29]
	Comp. 1 30 mg SD + Itraconazol 200 mg QD	17	91,3		

n * = número de sujetos con valores no faltantes.

Se ajustó un modelo ANOVA con efectos fijos para el tratamiento y el sujeto a cada parámetro PK transformado logarítmicamente. Los resultados se volvieron a transformar para obtener 'Media geo ajustada', 'Relación media geo' y '90% CI'.

Tabla 14: Resultados farmacocinéticos: análisis estadístico del efecto de la rifampicina sobre los parámetros PK plasmáticos del Compuesto 1: Compuesto 1, 100 mg SD + rifampicina, 600 mg QD, frente al Compuesto 1, 100 mg SD.

Parámetro [Unidad]	Tratamiento	n*	Media geométrica ajustada	Relación media geométrica (Prueba/Referencia)	90% CI para relación
AUCinf (ng*h/mL)	Comp. 1 100 mg SD	13	10200	0,172	[0,152, 0,194]
	Comp. 1 100 mg SD + Rifampicina 600 mg QD	13	1750		
AUCúltimo (ng*h/mL)	Comp. 1 100 mg SD	13	8560	0,196	[0,176 , 0,219]
	Comp. 1 100 mg SD + Rifampicina 600 mg QD	13	1680		
Cmax (ng/mL)	Comp. 1 100 mg SD	13	222	0,414	[0,365 , 0,470]
	Comp. 1 100 mg SD + Rifampicina 600 mg QD	13	92,2		

n * = número de sujetos con valores no faltantes.

- 5 Se ajustó un modelo ANOVA con efectos fijos para el tratamiento y el sujeto a cada parámetro PK transformado logarítmicamente. Los resultados se volvieron a transformar para obtener 'Media geo ajustada', 'Relación media geo' y '90% CI'.

Referencias.

- 10 Charidimou A *et al.* (2011) Sporadic cerebral amyloid angiopathy revisited: recent insights into pathophysiology and clinical spectrum. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry; 83(2):124–137.
- Chen YW *et al.* (2006) Progression of white matter lesions and hemorrhages in cerebral amyloid angiopathy. Neurology; 67(1):83–87.
- 15 Cheng AL *et al.* (2013) Susceptibility–Weighted Imaging is More Reliable Than T2*–Weighted Gradient–Recalled Echo MRI for Detecting Microbleeds. Stroke; 44(10):2782–2786.

Gennaro, AR (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences. 18th Ed. Mack Printing Company, pp. 1289– 1329.

Greenberg SM *et al.* (2014) Outcome Markers for Clinical Trials in Cerebral Amyloid Angiopathy. *Lancet Neurol.*; 13(4):419–428.

5 Gurol ME *et al.* (2016) Florbetapir–PET to diagnose cerebral amyloid angiopathy: A prospective study. *Neurology*; 87(19):2043–2049.

Kramp VP, Herrling P (2011) List of drugs in development for neurodegenerative diseases: Update June 2010. *Neurodegenerative Dis.*; 8:44–94.

10 Midoux N *et al.* (1999) Micronization of pharmaceutical substances in a spiral jet mill. *Powder Technol.*; 104:113–120.

Mullin JW, Nývlt J (1971) Programmed cooling of batch crystallizers. *Chem. Eng. Science*; 26(3): 369–377.

Quintino–Santos SR *et al.* (2012) Homozygosity for the APOE E4 allele is
15 solely associated with lower cognitive performance in Brazilian community dwelling older adults – The Bambuí Study. *Rev. Bras. Psiquiatr.*; 34(4):440–445.

Shinohara M *et al.* (2016) Impact of sex and *APOE4* on cerebral amyloid angiopathy in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.*; 132(2):225–234.

Sperling RA *et al.* (2011) Toward defining the preclinical stages of
20 Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging and the Alzheimer's Association workgroup. *Alzheimers Dement.*; 7(3):1–13.

Thal DR *et al.* (2002) Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*; 61: 282–293.

Verghese PB *et al.* (2011) Roles of Apolipoprotein E in Alzheimer's disease
25 and Other Neurological Disorders. *Lancet Neurol.*; 10(3): 241–252.

Todas las referencias, por ejemplo, una publicación científica o una publicación de solicitud de patente, aquí citadas, se incorporan aquí como

referencia en su totalidad y para todos los propósitos, en la misma medida que si cada referencia estuviera específica e individualmente indicada para ser incorporada por referencia en su totalidad para todos los propósitos. Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, será evidente para los expertos en la técnica, a la luz de las enseñanzas de esta invención, que ciertos cambios y modificaciones pueden hacerse al respecto sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas.