

POLIMORFOS DEL COMPUESTO ANTIFÚNGICO DE TRIAZOL PC945

Campo de la invención

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

Antecedentes

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

La aspergilosis pulmonar se puede segmentar en una afección no invasiva o invasiva. Se utiliza una subdivisión adicional para caracterizar la afección en pacientes que presentan síntomas que tienen un componente alérgico a la aspergilosis (conocido como ABPA; aspergilosis broncopulmonar alérgica) en comparación con los que no lo presentan. Los factores que precipitan la aspergilosis pulmonar pueden ser agudos, como la exposición a dosis altas de medicamentos inmunosupresores o la intubación en una unidad de cuidados intensivos. Alternativamente, pueden ser crónicos, como resultado de una infección previa, como la TB (**Denning** et ál., 2011a). Las infecciones pulmonares crónicas con aspergillus pueden dejar a los pacientes con daño pulmonar extenso y permanente, lo que requiere un tratamiento de por vida con medicamentos azólicos orales (**Limper** et ál., 2011).

Un creciente cuerpo de investigación sugiere que la infección por aspergillus puede desempeñar una función importante en el asma clínica (**Chishimba** et ál., 2012; **Pasqualotto** et ál., 2009). Además, un trabajo publicado recientemente ha correlacionado la infección por aspergillus con peores resultados clínicos en pacientes con EPOC (**Bafadhel** et ál., 2013). De igual forma, los estudios transversales han mostrado asociaciones entre la presencia de *Aspergillus spp.* y *Candida spp.* en el esputo de los pacientes y su función pulmonar empeorada (**Chotirmall** et ál., 2010; **Agbetile** et ál., 2012).

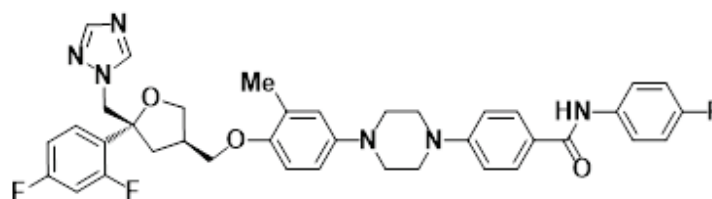
La aspergilosis invasiva (IA) da como resultado altas tasas de mortalidad entre los pacientes inmunocomprometidos, por ejemplo, aquellos que se someten a trasplantes alogénicos de células madre o trasplantes de órganos sólidos (como los trasplantes de pulmón). El primer caso de IA informado en un paciente inmunocomprometido ocurrió en 1953. Este evento coincidió con la

introducción de corticosteroides y quimioterapia citotóxica en los regímenes de tratamiento (**Rankin**, 1953). La aspergilosis invasiva es una preocupación importante en el tratamiento de la leucemia y otras neoplasias malignas hematológicas debido a su alta incidencia y mortalidad asociada. Las tasas de mortalidad suelen superar el 50 % (**Lin et ál.**, 2001) y las tasas a largo plazo pueden alcanzar el 90 % en los receptores de trasplantes alogénicos de células madre hematopoyéticas, a pesar de la disponibilidad de triazoles orales (**Salmeron et ál.**, 2012). En pacientes sometidos a trasplante de órganos sólidos, particularmente de pulmón, el uso de altas dosis de esteroides deja a los pacientes vulnerables a la infección (**Thompson y Patterson**, 2008). La enfermedad también ha aparecido en poblaciones de pacientes inmunocomprometidos menos graves. Estos incluyen aquellos que padecen EPOC o cirrosis subyacente, pacientes que reciben altas dosis de esteroides e individuos a los que se les colocan catéteres venosos centrales o que reciben ventilación mecánica (**Dimopoulos et ál.**, 2012).

Los medicamentos antifúngicos existentes se administran predominantemente por vía oral o sistémica. Estas vías de administración comúnmente explotadas son deficientes para el tratamiento de infecciones de las vías respiratorias pulmonares, ya que las concentraciones del fármaco, alcanzadas en el sitio de la infección, tienden a ser más bajas que en los órganos no afectados. Esto es especialmente cierto para el hígado, que es el principal sitio de toxicidad en hasta el 15 % de los pacientes tratados con voriconazol y que sufren niveles elevados de transaminasas (**Levin et ál.**, 2007; **Lat y Thompson**, 2011). La exposición del hígado también da como resultado interacciones farmacológicas significativas que surgen de la inhibición de las enzimas hepáticas P450 (**Jeong et ál.**, 2009; **Wexler et ál.**, 2004).

Además, el uso generalizado de triazoles, tanto en la clínica como en la agricultura, ha provocado una aparición creciente y problemática de micosis resistentes en algunos lugares (**Denning et ál.**, 2011b; **Bowyer y Denning**, 2014).

Los compuestos que tienen utilidad en el tratamiento de micosis se describen en los documentos WO2016/087878 A1 (**Sunose et ál.**, 2016) y WO2016/087880 A1 (**Colley et ál.**, 2016). El compuesto I se describe en las publicaciones de solicitud de patente antes mencionadas y es 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)-N-(4-fluorofenil)benzamida:



Compuesto I

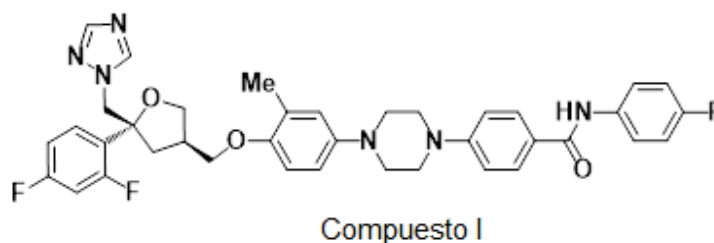
El compuesto I es un potente inhibidor de la estero 14 α -desmetilasa de *Aspergillus fumigatus* (CYP51A y CYP51B) y se ha caracterizado como un potente agente antifúngico de acción prolongada *in vitro* e *in vivo* (Colley et ál., 2017). Además, se ha revelado que el tratamiento tópico con el Compuesto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

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

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

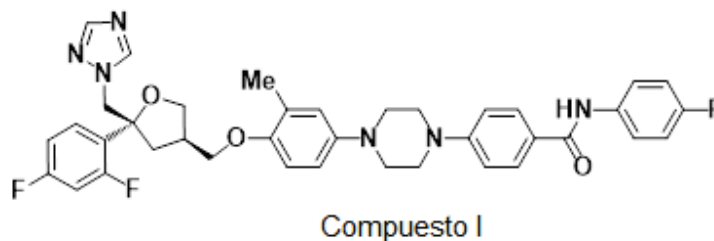
Compendio de la invención

La invención proporciona un compuesto de fórmula (I):



es decir, 4-(4-(4-(((3R,5R)-5-((1H-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)-N-(4-fluorofenil)benzamida en una forma cristalina en la que la forma cristalina es la Forma polimórfica 1.

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



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

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

El compuesto de fórmula (I) se denomina aquí Compuesto I.

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Patrón de XRPD de alta resolución de una muestra representativa de la forma polimórfica 1.

Figura 2: Patrón de XRPD de alta resolución de una muestra representativa de la forma polimórfica 2.

Figura 3: Alineación vertical de patrones de XRPD de alta resolución de formas polimórficas 1 y 2.

Figura 4: Superposición de patrones de XRPD de alta resolución de las formas polimórficas 1 y 2

Figura 5: Patrón de XRPD calculado para la forma polimórfica 1.

Figura 6: Patrón de XRPD calculado para la forma polimórfica 2.

Figura 7: Patrón de XRPD de una muestra de la técnica anterior de la Forma 3 en comparación con patrones de XRPD de muestras representativas de las Formas 1, 2 y 3.

Figura 8: Análisis térmico (DSC y TGA) del material de entrada bruto (forma polimórfica 3).

Figura 9: Trazado de DSC de la Forma polimórfica 1 obtenida a partir de acetona acuosa (H₂O al 5 %).

Figura 10: Patrón de XRPD de la Forma polimórfica 1 obtenida a partir de acetona acuosa (H₂O al 5 %) después de la micronización.

Figura 11: Trazado de XRPD de la Forma polimórfica 2 obtenida de THF/TBME.

Figura 12: Trazado de DSC de la Forma polimórfica 2 obtenida de THF/TBME.

Figura 13: Patrón de XRPD de alta resolución de la Forma polimórfica 2 obtenida de THF/TBME, después de la micronización.

Figura 14: Estructura cristalina de la Forma polimórfica 1 vista a lo largo del eje a.

Figura 15: Estructura cristalina de la Forma polimórfica 2 vista a lo largo del eje b.

Figura 16: Trazado de DSC de exploración rápida de la Forma polimórfica 1 (40 °C/min).

Figura 17: Trazado de DSC de exploración rápida de la Forma polimórfica 2 (40 °C/min).

Figura 18: Análisis térmico (DSC y TGA) de la Forma polimórfica 2 obtenida de MIBK.

Figura 19: Concentraciones medias del fármaco en plasma tras la administración por inhalación de la Forma polimórfica 1 a ratas macho a una dosis nominal de 2.2 mg/kg.

Figura 20: Concentraciones medias del fármaco en plasma tras la administración por inhalación de la Forma polimórfica 2 a ratas macho a un nivel de dosis nominal de 2.2 mg/kg.

Descripción detallada de la invención

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

Los reflejos en 2θ se consideran únicos (y, por lo tanto, característicos de la forma cristalina) siempre que no se observe ningún reflejo dentro de $2\theta \pm 0.2^\circ$ cuando se comparan dos (o más) patrones de difracción. Las formas polimórficas 1 y 2 exhiben una serie de reflejos únicos (**Tabla 1**).

Tabla 1: Reflejos de XRPD únicos de las formas polimórficas 1 y 2.

Reflejos en 2 θ

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

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

Por lo tanto, se proporciona la forma cristalina del Compuesto I en la Forma polimórfica 1 que tiene el patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente como se muestra en la **Fig. 1**.

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

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

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

Por lo tanto, se proporciona la forma cristalina del Compuesto I en la Forma polimórfica 2 que tiene el patrón de difracción de rayos X en polvo sustancialmente como se muestra en la **Fig. 2**.

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

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

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

Polimorfo de la Forma 3 (técnica anterior)

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

A los efectos de la presente descripción, el Compuesto I, como se describió anteriormente, resultante de las rutas sintéticas descritas en esta, es una manifestación ligeramente cristalina del Compuesto I, al que se hace referencia en la presente como Forma 3. Una característica común de estas rutas es que la Forma 3 polimórfica resulta de la producción rápida del Compuesto I, ya sea mediante la adición de agua a una solución del Compuesto I en un solvente orgánico miscible (tal como DMF o DMSO) o mediante la evaporación de una mezcla de solventes después de la purificación por cromatografía. Como se describe a continuación, el agua es un poderoso antidisolvente para el Compuesto I que conduce a su rápido depósito, en estos casos, en un estado casi amorfo. El mismo principio se aplica a las muestras devueltas de la cromatografía, donde la rápida evaporación del eluyente que contiene el Compuesto I da lugar a la Forma polimórfica 3, en lugar de una forma cristalina más ordenada como la Forma 1 o la Forma 2.

Sin estar limitado por la teoría, los datos experimentales indican que la precipitación del

Compuesto I por evaporación rápida de una solución en un solvente volátil (tal como DCM) conduce a un estado sólido desordenado. Lo mismo se aplica a la precipitación (casi instantánea) del Compuesto I por adición de antidisolvente; por ejemplo, al inactivar una solución del Compuesto I en un disolvente orgánico miscible con agua. Ninguno de estos procesos, descritos anteriormente, permite tiempo suficiente para que el compuesto de fórmula I alcance los estados cristalinos altamente ordenados, termodinámicamente estables, ejemplificados por las Formas polimórficas 1 y 2, descritas en este documento.

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

La **Figura 7** muestra el patrón de XRPD del Compuesto I como la Forma polimórfica 3 preparada como se describe anteriormente («Muestra de la técnica anterior»), en comparación con una muestra de la Forma 3 típica de los lotes utilizados en los presentes estudios («Referencia de la Forma 3») y en comparación con los patrones de XRPD obtenidos de los polimorfos de Forma 1 y Forma 2. Los trazados de XRPD del material de la Forma 3 revelan que es poco cristalino y, en consecuencia, no se consideró una entidad fácilmente desarrollable. Como resultado, no se han obtenido datos de biodisponibilidad comparativa para esta forma polimórfica (véanse los Ejemplos).

Propiedades de las formas polimórficas 1 y 2

Estabilidad termodinámica de las formas polimórficas 1 y 2 a temperaturas variables

Se ha determinado que los estados cristalinos, a los que se hace referencia aquí como Forma 1 y Forma 2, constituyen un par polimórfico enantiotrópico. Esta propiedad surge de una dependencia de la temperatura de sus estabildades termodinámicas relativas, por lo que uno de los polimorfos es la manifestación termodinámicamente más estable del material hasta una temperatura característica (determinada empíricamente), por encima del cual se invierte su orden de estabilidad.

En el presente caso, se maduraron suspensiones que comprendían cantidades iguales de los dos polimorfos, en uno de seis disolventes diferentes, a 50 °C, 70 °C y 135 °C (**Tabla 6**). En todos los experimentos realizados tanto a 50 °C como a 70 °C, las mezclas 1:1 se convirtieron en suspensiones que contenían únicamente el polimorfo de Forma 2. Por el contrario, todas las mezclas mantenidas a una temperatura de 135 °C se transformaron en la Forma 1. Estos datos respaldan el postulado de que la relación termodinámica entre las Formas 1 y 2 es enantiotrópica y que la temperatura a la que se invierte la estabilidad (el punto de transición enantiotrópica) está en el intervalo de temperatura de 70 a 135 °C.

Se investigó la predisposición de la Forma 1 o la Forma 2 a generarse, a partir de diferentes entornos de acondicionamiento, a temperaturas por debajo del punto de transición enantiotrópica mediante experimentos de siembra cruzada (véanse las **Tablas 8 a 13** del presente documento). En los sistemas de un solo disolvente orgánico, descritos en la **Tabla 8**, las mezclas que comprenden cantidades iguales de Forma 1 y Forma 2 se volcaron para dar suspensiones que comprenden únicamente el polimorfo de Forma 2. La excepción fue la mezcla binaria de IPA dopada con un 5 % de agua, que siguió siendo una mezcla polimórfica. (**Tabla 8**, entradas 10 a 12). Es posible interpretar este resultado como que surge de dos maneras diferentes. La primera es concluir que en IPA acuoso la solubilidad del Compuesto I, en cualquier forma, es demasiado baja para que tenga lugar la interconversión polimórfica y que, por lo tanto, los factores cinéticos han determinado el resultado. Un segundo postulado es que la presencia de agua ejerce una influencia sobre la mezcla polimórfica a favor de la Forma 1, a pesar de que sigue siendo el polimorfo metaestable en el intervalo de temperatura del experimento.

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

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

Se observó que la interconversión polimórfica tenía lugar más rápidamente al calentar (**Tablas 9, 10 y 12**), como se esperaba de la dependencia de la tasa de conversión con la

temperatura (según la ecuación de Arrhenius), y presumiblemente aumentó por un aumento en la solubilidad de los sólidos suspendidos. Se descubrió que el destino de los polimorfos cuando se equilibraban en MEK o THF enfriados dependía no solo de la presencia o ausencia de agua en el sistema, sino también de su composición polimórfica inicial (**Tabla 13**). Las mezclas de los dos polimorfos se convirtieron en suspensiones de la Forma 2 en medios nominalmente secos, como se esperaba, mientras que los polimorfos individuales permanecieron sin cambios. Por el contrario, la presencia de agua nuevamente favoreció el estado de la Forma 1 y hubo evidencia adicional de que la presencia inicial de este polimorfo en la mezcla inicial (actuando como semilla) promovió la interconversión.

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

El comportamiento de estos sistemas y lo que se entiende de estos es importante para diseñar formulaciones adecuadas mediante las cuales el Compuesto I pueda administrarse a los pacientes.

Los polimorfos de las formas 1 y 2 pueden micronizarse fácilmente. Esto significa que son adecuados para su uso en formulaciones para administración a las vías respiratorias (por ejemplo, los pulmones).

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

suspensión acuosa y se administra por inhalación. Por consiguiente, el polimorfo de Forma 2 es una presentación preferida del Compuesto I para uso como agente terapéutico inhalado en suspensiones acuosas nebulizadas.

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

Métodos sintéticos generales

Solvatos

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

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

Así, en un aspecto, se proporciona un proceso para preparar el Compuesto I como la Forma polimórfica 1 cristalina que comprende calentar el Compuesto I en forma solvatada, por ejemplo, el solvato formado con anisol, acetofenona, alcohol bencílico, clorobenceno o cumeno, para eliminar el solvente y producir así el Compuesto I como la Forma polimórfica 1 cristalina. Convenientemente, el Compuesto I en forma solvatada es un intermedio en la síntesis de la Forma polimórfica 1.

Polimorfo de Forma 1

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

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

Polimorfo de Forma 2

En una modalidad, se proporciona un proceso para la preparación del Compuesto I como

Forma polimórfica 2 que comprende el paso de cristalizar el Compuesto I como Forma polimórfica 2 a partir de una solución del Compuesto I en un disolvente orgánico nominalmente seco en el que el disolvente se selecciona del grupo que consiste en MIBK, THF, ProOAc, EtOH, DME, MeOH, MeCN, MeNO₂, n-heptano, Et₂O, IPA, MEK, acetona, TBME, i-BuOH o una mezcla de THF y TBME. De manera adecuada, el proceso comprende el paso de cristalizar el Compuesto I como Forma polimórfica 2 a partir de una solución del Compuesto I en una mezcla de disolvente orgánico nominalmente seco, en donde la mezcla de disolvente comprende dos o más disolventes seleccionados del grupo que consiste en MIBK, THF, ProOAc, EtOH, DME, MeOH, MeCN, MeNO₂, n-heptano, Et₂O, IPA, MEK, acetona, TBME e i-BuOH.

A los efectos de la presente invención, «nominalmente seco» significa que no se ha añadido agua al disolvente. Dependiendo de la hidrofiliidad del solvente seleccionado, puede haber trazas de agua, aunque las condiciones experimentales están diseñadas para excluirla.

Adecuadamente, el disolvente es MIBK. Alternativamente, el sistema de disolventes es una mezcla de THF y tolueno, en donde adecuadamente la mezcla comprende entre 2:1 y 1:2 de THF:tolueno (tal como 10:5 v/v; 9:5 v/v; 8:4 v/v; 8:16 v/v de THF:tolueno, respectivamente). Alternativamente, el sistema de disolventes es una mezcla de THF y TBME, en donde adecuadamente la mezcla comprende entre 4:1 y 1:2 de THF:TBME (tal como 8:2 v/v; 8:25 v/v; 8:4 v/v; 8.6 v/v, 8.8 v/v, 8.10 v/v u 8:12 v/v de THF:TBME, respectivamente).

Formulaciones farmacéuticas adicionales

En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Adecuadamente, el compuesto de la invención se administra por vía tópica en el pulmón o la nariz, en particular, por vía tópica en el pulmón. Por lo tanto, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos tópicamente aceptables. Adecuadamente, el compuesto de la invención se administra por inhalación.

Adecuadamente, el diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable es agua.

Las composiciones se pueden administrar convenientemente en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica farmacéutica, por ejemplo, como se describe en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17.^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA., (1985). Las composiciones también pueden administrarse convenientemente en múltiples formas farmacéuticas unitarias.

Las composiciones adecuadas para administración pulmonar o intranasal incluyen polvos, soluciones líquidas, suspensiones líquidas, suspensiones acuosas, gotas nasales que comprenden

soluciones o suspensiones o aerosoles presurizados o no presurizados.

La administración tópica en la nariz o los pulmones puede lograrse mediante el uso de una formulación no presurizada, como una suspensión acuosa. Dichas formulaciones pueden administrarse por nebulización, es decir, por medio de un nebulizador, por ejemplo, uno que puede ser manual y portátil o no portátil y destinado a uso doméstico u hospitalario. Un ejemplo de dicho dispositivo es un inhalador RESPIMAT.

Las formulaciones en aerosol (presurizadas o no presurizadas) y suspensión líquida contendrán normalmente el compuesto de la invención en forma de partículas, por ejemplo, con una D_{50} de 0.5 a 10 μm , adecuadamente, de alrededor de 1 a 5 μm , tal como de 1 a 2 μm . Convenientemente, el compuesto de la invención en forma de partículas tiene una D_{10} de 0.2 a 1 μm , tal como de 0.2 a 0.5 μm . Convenientemente, el compuesto de la invención en forma de partículas tiene una D_{90} de 2 a 6 μm , tal como de 3 a 4 μm . La forma de partículas del compuesto puede ser, por ejemplo, una forma micronizada. La micronización se puede realizar utilizando un molino de chorro como los fabricados por Hosokawa Alpine. La distribución del tamaño de partícula resultante puede medirse usando difracción láser (por ejemplo, con un instrumento Malvern Mastersizer 2000S). Las distribuciones de tamaño de partícula pueden representarse usando los valores D_{10} , D_{50} y D_{90} . El valor de mediana de D_{50} de las distribuciones de tamaño de partícula se define como el tamaño de partícula en micras que divide la distribución a la mitad. La medida derivada de la difracción láser se describe con mayor precisión como una distribución de volumen y, en consecuencia, el valor de D_{50} obtenido utilizando este procedimiento se denomina de manera más significativa como valor Dv_{50} (mediana para una distribución de volumen). Como se usa aquí, los valores de Dv se refieren a distribuciones de tamaño de partícula medidas usando difracción láser. De manera similar, los valores de D_{10} y D_{90} , utilizados en el contexto de la difracción láser, se entienden como valores de Dv_{10} y Dv_{90} y se refieren al tamaño de partícula en el que el 10 % de la distribución se encuentra por debajo del valor de D_{10} y el 90 % de la distribución se encuentra por debajo del valor de D_{90} , respectivamente.

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

El medio acuoso normalmente comprende agua y uno o más excipientes seleccionados de amortiguadores, agentes de ajuste de la tonicidad (como el cloruro de sodio), agentes de ajuste del pH, modificadores de la viscosidad, codisolventes (como el propilenglicol) y tensioactivos (como el Lipoid S100).

Convenientemente, el medio acuoso comprende al menos alrededor del 40 % de agua, como al menos alrededor del 60 % de agua, al menos alrededor del 80 % de agua, al menos alrededor del

95 % de agua, o al menos alrededor del 99 % de agua, como al menos alrededor del 99 % de agua.

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

Así, según una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el Compuesto I, empleado como Forma polimórfica 2 cristalina, en forma de partículas suspendidas en un medio acuoso.

La administración tópica en la nariz o los pulmones también puede lograrse mediante el uso de una formulación en aerosol presurizada. Las formulaciones en aerosol normalmente comprenden el ingrediente activo suspendido o disuelto en un propulsor de aerosol adecuado, como un clorofluorocarbono (CFC) o un hidrofluorocarbono (HFC). Los propulsores CFC adecuados incluyen tricloromonofluorometano (propulsor 11), diclorotetrafluorometano (propulsor 114) y diclorodifluorometano (propulsor 12). Los propelentes de HFC adecuados incluyen tetrafluoroetano (HFC-134a) y heptafluoropropano (HFC-227). El propulsor normalmente comprende del 40 % al 99.5 %, por ejemplo, del 40 % al 90 %, en peso de la composición de inhalación total. La formulación puede comprender excipientes que incluyen codisolventes (por ejemplo, etanol) y tensioactivos (por ejemplo, lecitina, trioleato de sorbitán y similares). Otros posibles excipientes incluyen polietilenglicol, polivinilpirrolidona, glicerina y similares. Las formulaciones en aerosol se envasan en botes y se administra una dosis adecuada por medio de una válvula dosificadora (por ejemplo, como la suministra Bepak, Valois o 3M o, alternativamente, Aptar, Coster o Vari).

La administración tópica en los pulmones también puede lograrse mediante el uso de una formulación en polvo seco. Una formulación en polvo seco contendrá el compuesto de la divulgación en forma de partículas, típicamente con un MMAD de 1 a 10 μm o un D_{50} de 0.5 a 10 μm , por ejemplo, alrededor de 1 a 5 μm . Los polvos del compuesto de la invención en forma de partículas se pueden preparar mediante un proceso de micronización o un proceso de reducción de tamaño similar. La micronización se puede realizar y medir como se describe anteriormente. La formulación normalmente contendrá un diluyente típicamente aceptable como lactosa, glucosa o manitol (preferiblemente lactosa), normalmente, de tamaño de partícula comparativamente grande, por ejemplo, un MMAD de 50 μm o más, por ejemplo, 100 μm o más o un valor de D_{50} de 40 a 150 μm . Como se usa aquí, el término «lactosa» se refiere a un componente que contiene lactosa, que incluye α -lactosa monohidrato, β -lactosa monohidrato, α -lactosa anhidra, β -lactosa anhidra y lactosa amorfa. Los componentes de la lactosa pueden procesarse mediante micronización, tamizado, molienda, compresión, aglomeración o secado por aspersión. También se incluyen formas de lactosa comercialmente disponibles en diversas formas, por ejemplo, Lactohale® (lactosa de grado

de inhalación; DFE Pharma), InhaLac®70 (lactosa tamizada para inhalador de polvo seco; Meggle), Pharmatose® (DFE Pharma) y Respitose® (lactosa tamizada lactosa de grado de inhalación; productos DFE Pharma). En una modalidad, el componente de lactosa se selecciona del grupo que consiste en α -lactosa monohidrato, α -lactosa anhidra y lactosa amorfa. Preferiblemente, la lactosa es α -lactosa monohidrato.

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

Una formulación en polvo seco generalmente se administra utilizando un dispositivo inhalador de polvo seco (DPI). Los ejemplos de sistemas de suministro de polvo seco incluyen SPINHALER, DISKHALER, TURBOHALER, DISKUS, SKYEHALER, ACCUHALER y CLICKHALER. Otros ejemplos de sistemas de suministro de polvo seco incluyen ECLIPSE, NEXT, ROTAHALER, HANDIHALER, AEROLISER, CYCLOHALER, BREEZHALER/NEOHALER, MONODOSE, FLOWCAPS, TWINCAPS, X-CAPS, TURBOSPIN, ELPENHALER, MIATHALER, TWISTHALER, NOVOLIZER, PRESSAIR, ELLIPTA, inhalador de polvo seco ORIEL, MICRODOSE, PULVINAL, EASYHALER, ULTRAHALER, TAIFUN, PULMOJET, OMNIHALER, GYROHALER, TAPER, CONIX, XCELOVAIR y PROHALER.

En formulaciones que no sean suspensiones acuosas, tales como cremas y pesarios, el Compuesto I se emplea adecuadamente como Forma polimórfica 1 cristalina.

Usos médicos

El compuesto I es útil en el tratamiento de micosis y para la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con la micosis.

En un aspecto de la invención, se proporciona el uso del Compuesto I en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de micosis y para la prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con la micosis.

En otro aspecto de la invención se proporciona un método de tratamiento de un sujeto con micosis que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del Compuesto I.

En otro aspecto de la invención se proporciona un método de prevención o tratamiento de una enfermedad asociada con una micosis que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del Compuesto I.

En otro aspecto de la invención se proporciona un método de tratamiento de un sujeto con una micosis pulmonar o nasal (particularmente, pulmonar) que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del Compuesto I mediante inhalación.

En otro aspecto de la invención, se proporciona un método de prevención o tratamiento de una enfermedad asociada con una micosis pulmonar o nasal (particularmente, pulmonar) a un sujeto que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz del Compuesto I mediante inhalación.

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

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

Adecuadamente, se proporciona el Compuesto I en forma del polimorfo de Forma 2 para uso en el tratamiento de micosis y enfermedades asociadas con una micosis.

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

El Compuesto I puede usarse en un entorno profiláctico al administrar el Compuesto I antes del inicio de la micosis. Por ejemplo, el Compuesto I puede administrarse profilácticamente a sujetos con riesgo de desarrollar una micosis, como bebés prematuros, niños con defectos congénitos del pulmón o del corazón, sujetos inmunocomprometidos (por ejemplo, aquellos que padecen infección por VIH), asmáticos, sujetos con fibrosis quística, sujetos de edad avanzada y sujetos que padecen un estado de salud crónico que afecta al corazón o al pulmón (por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva o enfermedad pulmonar obstructiva crónica).

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

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

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

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

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

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

Los segundos ingredientes activos o adicionales incluyen ingredientes activos adecuados para el tratamiento o la prevención de una micosis tal como una infección por *Aspergillus fumigatus*, o una enfermedad asociada con una micosis tal como una infección por *Aspergillus fumigatus*, o condiciones comórbidas con una micosis tal como una infección por *Aspergillus fumigatus*.

5 El compuesto de la invención se puede coformular con un segundo ingrediente activo o más, o el segundo ingrediente activo o más se puede formular para administrarse por separado, por la misma ruta o por una diferente.

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

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

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

20 Los socios combinados preferidos incluyen intraconazol, voriconazol, caspofungina y posaconazol.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un kit de partes que comprende:
25 (a) una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la invención opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; (b) una composición farmacéutica que comprende un segundo ingrediente activo opcionalmente en combinación con uno o más diluyentes o vehículos; (c) opcionalmente una o más composiciones farmacéuticas adicionales, cada una de las cuales comprende un tercer o más ingrediente activo opcionalmente en combinación con uno o
30 más diluyentes o vehículos y (d) instrucciones para la administración de las composiciones farmacéuticas a un sujeto que las necesite. El sujeto que lo necesite puede sufrir o ser susceptible a una micosis tal como infección por *Aspergillus fumigatus*.

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

Se espera que una cantidad de dosis adecuada para un ser humano de peso medio (50 a 70 kg) sea de alrededor de 50 µg a 10 mg/día, por ejemplo, de 500 µg a 5 mg/día, aunque la dosis precisa que debe administrarse la puede determinar un experto en la materia.

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

- exhibir una amplia gama de estabilidad térmica, como lo demuestra un alto punto de fusión (>200°C);
- ser susceptible a la micronización manteniendo su integridad polimórfica; y
- resistir la conversión a la Forma 2 en formulaciones destinadas a su administración, como en formulaciones distintas de las suspensiones acuosas.

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

- exhibir una amplia gama de estabilidad térmica como lo demuestra un alto punto de fusión (>180°C);
- poseer una biodisponibilidad eficaz para un medicamento tópico, en particular uno destinado a tratar enfermedades de los pulmones y mostrar una biodisponibilidad más alta que la de la Forma 1 cuando se administra por inhalación como una suspensión acuosa;
- ser susceptible a la micronización manteniendo su integridad polimórfica; y
- resistir la conversión en la Forma 1 en suspensiones acuosas destinadas a su administración a pacientes.

Parte experimental

Abreviaturas

Las abreviaturas no definidas pretenden transmitir su significado generalmente aceptado.

ac	acuoso
AUC	área bajo la curva
BW	peso corporal medio del grupo
conc.	concentración
c-hexano	ciclohexano
D	duración de exposición
DME	1,2-dimetoxietano
DMSO	dimetilsulfóxido
DSC	calorimetría diferencial de barrido
Et ₂ O	dietiléter
EtOH	etanol

	Exp	experimento
	Evap	evaporación
	¹ H-NMR	resonancia magnética nuclear de protones (espectroscopia)
	HPLC	cromatografía líquida a presión elevada
5	<i>i</i> -BuOH	<i>iso</i> -butanol (2-metil-1-propanol)
	IPA	alcohol isopropílico (2-propanol)
	K ₂ EDTA	ácido dipotásico etilendiaminotetraacético
	KF	Karl Fischer (titulación)
	LC-MS/MS	cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem
10	LGC	cromatografía líquido-gas
	2-ME	2-metoxietanol
	MeCN	acetonitrilo
	MEK	metiletilcetona
	MeNO ₂	nitrometano
15	MIBK	metil isobutilcetona
	min	minutos
	MMAD	mediana de diámetro aerodinámico de masa
	MTBE	metil <i>tert</i> -butil éter
	N/A	no aplica
20	NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
	N.º	número
	PLM	microscopía de luz polarizada
	PrOAc	acetato de propilo
	RH	humedad relativa
25	RSD	desviación estándar relativa
	RT	temperatura ambiente
	RV	fase inversa
	TBME	éter metílico de butilo terciario
	temp	temperatura
30	TGA	análisis termogravimétrico
	THF	tetrahidrofurano
	vol	volumen
	SC	cristal individual
	TBME	<i>éter metílico de tert</i> -butilo

seg	segundos
UPLC	cromatografía líquida de ultra alta resolución
VT	temperatura variable
XRPD	difracción de rayos X en polvo (cristalografía)

5 Instrumentos y metodología

Las siguientes descripciones de instrumentos, metodologías y procedimientos pertenecen a experimentos que se realizaron en varios laboratorios y ubicaciones diferentes, por lo que se necesita el uso de una variedad de estos, equivalente en su efecto. Los expertos en la técnica apreciarán que se pueden variar muchos de estos parámetros, sin impedir el resultado deseado. Por lo tanto, aunque dichos instrumentos, metodologías y procesos descritos a continuación se han utilizado en algunas circunstancias, también constituyen condiciones experimentales ejemplares que se pueden utilizar para poner en práctica la presente invención. Por lo tanto, los instrumentos, metodologías y procesos que siguen no deben interpretarse como limitantes de la presente invención de ninguna manera.

15 Difracción de rayos X en polvo

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

Alternativamente, los patrones de difracción de rayos X en polvo se recolectaron en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), usando una etapa XYZ automatizada, microscopio de video láser para el posicionamiento automático de la muestra y un detector de área bidimensional HiStar. La óptica de rayos X constaba de un único espejo multicapa Göbel acoplado a un colimador estenopeico de 0.3 mm. Se llevó a cabo una verificación de rendimiento semanal utilizando un estándar certificado NIST 1976 de corindón (placa plana). La divergencia del haz fue de aproximadamente 4 mm. Se empleó un modo de barrido continuo θ - θ con una distancia de muestra a detector de 20 cm, proporcionando así un intervalo de 2 θ efectivo de 3.2°-29.7°. Normalmente, las muestras se expusieron al haz de rayos X durante 120 segundos. El software utilizado para la recopilación de datos fue GADDS para XP/2000 4.1.43 y los datos se analizaron y se presentaron utilizando DiffraC Plus EVA v15.0.0.0.

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

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

Las muestras se analizaron en condiciones ambientales como especímenes de placa plana usando polvo, tal como se recibieron. La muestra se empaquetó con cuidado en una cavidad cortada en una oblea de silicio pulida de fondo cero (510). La muestra se hizo girar en su propio plano durante el análisis. Los datos se recopilaron de la siguiente manera:

Intervalo angular: 2° a 42° 2 θ

Tamaño de paso: 0.05° 2 θ

Tiempo de recopilación: 0.5 seg/paso

Cristalografía de rayos X con fuente de luz de diamante

Los datos se recogieron en un difractómetro de 3 círculos Fluid Film Devices usando un detector Dectris Pilatus 2M. El cristal se montó en un bucle MiTeGen utilizando un aceite de perfluoropoliéter. La longitud de onda utilizada fue de 0.6889 Å. Todos los datos se recopilaron a 295 K. La estructura se resolvió mediante métodos directos automáticos de rutina y se refinó mediante el refinamiento por mínimos cuadrados en todos los valores de F^2 medidos únicos.

Espectroscopía de RMN de ^1H

Los espectros de RMN se recogieron en un instrumento Bruker de 400 MHz equipado con un muestreador automático y controlado por una consola DRX400. Los experimentos automatizados se adquirieron usando ICON-NMR v4.0.7 ejecutándose con Topspin v1.3 usando los experimentos estándares cargados de Bruker. Para la espectroscopia no rutinaria, los datos se adquirieron mediante el uso de Topspin solo. Las muestras se prepararon en DMSO- d_6 , a menos que se indique lo contrario. El análisis fuera de línea se llevó a cabo utilizando ACD Spectrum Processor 2012.

Calorimetría diferencial de barrido

Los datos de DSC se recopilaron en un TA Instrument Q2000 equipado con un muestreador

automático de 50 posiciones. La calibración de capacidad térmica se realizó con zafiro y la calibración de energía y temperatura con indio certificado. Por lo general, de 0.5 a 3 mg de muestra, contenida en una bandeja de aluminio perforada, se calentaron a 10 °C/min desde 25 °C a 300 °C (para velocidades de exploración lentas) o a 40 °C/min desde 25 °C. a 300 °C (para velocidades de escaneo rápidas). Se mantuvo una purga de nitrógeno seco a 50 mL/min sobre la muestra. El software de control del instrumento fue Advantage for Q Series v2.8.0.394 y Thermal Advantage v5.5.3, y los datos se analizaron mediante Universal Analysis v4.5A.

Análisis termogravimétrico

Los datos de TGA se recopilaron en un TA Instrument Q500 TGA equipado con un muestreador automático de 16 posiciones. La temperatura del instrumento se calibró utilizando alumel y níquel certificados. Por lo general, se cargaron de 5 a 10 mg de muestra en una bandeja de DSC de aluminio previamente tarada y se calentó a 10 °C/min desde temperatura ambiente hasta 350 °C. Se mantuvo una purga de nitrógeno a 60 mL/min sobre la muestra. El software de control del instrumento fue Advantage for Q Series v2.5.0.256 y Thermal Advantage v5.5.3, y los datos se analizaron mediante Universal Analysis v4.5A.

Determinación de la pureza química por HPLC

El análisis de pureza se realizó en un sistema de la serie Agilent HP1100 equipado con un detector de matriz de diodos utilizando el software ChemStation vB.04.03. Las muestras se prepararon por disolución en MeCN acuoso (mezcla 1:1) calentando a 50 °C para dar 0.5 mg/ml de una solución. Las muestras se procesaron usando los parámetros que se dan a continuación (**Tabla 2**).

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

Columna	Supelco Ascentis Express C18	
Dimensiones de la columna	100 x 4.6 mm x 2.7µm	
Temperatura de la columna	25°C	
Volumen de inyección	5 µL	
Longitud de onda de detección	255 nm	
Velocidad de flujo	2 mL/min	
Fase A	TFA al 0.1% en agua	
Fase B	TFA al 0.085% en MeCN	
Cronograma de elución de gradiente		
Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B

0	95	5
6	5	95
6.2	95	5
8	95	5

Preparación de polimorfos de Forma 1 y Forma 2

La referencia a «material de entrada bruto» en este documento se entiende como la Forma 3 que se sintetizó y se aisló de acuerdo con cualquiera de los métodos discutidos anteriormente. En la **Fig. 7** se muestra un trazado de XRPD de referencia representativa de este material y es consistente con un material de baja cristalinidad.

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

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

Preparación de polimorfos de forma 2 por maduración en MIBK

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

Preparación de la Forma 2 micronizada *mediante* recristalización en THF/TBME

El material de entrada bruto (476.4 g) se recogió en THF (3.82 l) a 45 a 55°C bajo nitrógeno. La solución tibia se clarificó a través de un filtro en línea mientras que se mantenía una temperatura interna de 45 a 55°C. Se añadió gota a gota TBME (0.72 l) durante un período de 1.5 h mientras que se mantenía una temperatura interna de 45 a 55°C. Se añadieron muestras del polimorfo Forma 2 (500 mg), seguido de la adición gota a gota de TBME clarificado (5.01 l) durante 10.5 horas a 45 a

55°C. Una vez completada la adición, la mezcla se enfrió a 0 °C durante 3.5 horas. Se continuó agitando a esta temperatura durante 7.5 horas más y la suspensión resultante se filtró al vacío y los sólidos se lavaron con una mezcla de THF clarificado (380 ml) y TBME (570 ml). La torta del filtro se secó por succión y los sólidos aislados se secaron al vacío a 45 °C bajo nitrógeno durante 21 h para dar un sólido blanquecino (401.4 g, 84.2 %) que se confirmó que era el polimorfo de Forma 2 por análisis de XRPD y DSC (**Figs. 11 y 12**, respectivamente).

La micronización del producto así obtenido proporcionó un polvo para el cual la distribución del tamaño de partícula, expresada en valores D, fue como sigue: $D_{10} = 0.42 \mu\text{M}$; $D_{50} = 1.24 \mu\text{M}$ y $D_{90} = 3.57 \mu\text{M}$. Los expertos en la materia apreciarán que estas características son adecuadas para un producto destinado a la administración por inhalación. El mantenimiento de la integridad polimórfica durante la micronización se confirmó a partir del trazado de XRPD obtenido después de la molienda (**Fig. 13**) que no muestra cambios significativos en comparación con lo obtenido antes de que se llevara a cabo la reducción del tamaño de partícula (**Fig. 11**). Por lo tanto, el polimorfo de Forma 2 es susceptible y estable frente al proceso de micronización requerido para obtener un material con las propiedades necesarias para su propósito previsto.

Caracterización de polimorfos de Forma 1 y Forma 2

Cristalografía de rayos X en polvo

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

Tabla 3: Picos de difracción de rayos X de polvo para las formas polimórficas 1 y 2 del compuesto

Forma 1			Forma 2		
2 θ Valor	Espaciado d (Å)	Intensidad relativa (%)	2 θ Valor	Espaciado d (Å)	Intensidad relativa (%)
5.06	17.46	12.95	5.37	16.44	4.84

5

10

15

20

25

30

35

5.65	15.65	6.09	10.75	8.23	16.17
6.99	12.64	12.06	11.54	7.67	8.23
7.35	12.02	5.80	11.85	7.47	3.04
7.91	11.18	6.55	12.77	6.93	3.63
8.15	10.85	3.43	14.41	6.15	2.05
10.17	8.70	21.46	15.88	5.58	8.28
11.13	7.95	2.80	16.19	5.48	3.95
11.60	7.63	7.57	16.61	5.33	94.97
12.84	6.89	2.75	17.02	5.21	22.15
13.11	6.75	3.15	17.45	5.08	10.17
14.51	6.10	3.51	17.91	4.95	3.92
15.28	5.80	2.80	18.72	4.74	22.45
15.88	5.58	2.71	19.08	4.65	31.18
16.28	5.45	10.51	19.52	4.55	24.12
16.66	5.32	25.57	20.05	4.43	7.78
17.49	5.07	13.92	20.29	4.38	13.83
17.85	4.97	37.53	21.28	4.18	82.09
18.17	4.88	14.59	21.66	4.10	73.31
18.82	4.71	10.26	22.00	4.04	21.08
19.38	4.58	13.53	22.38	3.97	38.28
19.70	4.51	100.00	22.65	3.93	100.00
20.43	4.35	8.01	23.16	3.84	7.67
20.83	4.26	8.72	23.43	3.80	9.21
21.26	4.18	6.69	23.89	3.73	8.79
21.53	4.13	6.81	24.43	3.64	11.18
21.00	4.04	13.99	24.94	3.57	12.45
22.52	3.95	14.36	25.20	3.53	8.40
22.87	3.89	5.00	25.89	3.44	8.37
23.32	3.81	21.62	26.56	3.36	36.79
24.20	3.68	15.27	26.88	3.32	25.43
24.67	3.61	12.85	27.35	3.26	7.51

	25.00	3.56	2.49	27.83	3.21	6.36
	25.46	3.50	1.14	28.23	3.16	3.86
	25.90	3.44	1.80	30.37	2.94	1.53
	26.26	3.39	2.58	31.04	2.88	1.93
5	26.69	3.34	12.65	31.78	2.82	2.51
	27.44	3.25	8.81	32.92	2.72	3.62
	28.10	3.18	4.18	33.30	2.69	3.08
	28.37	3.15	3.22	34.23	2.62	1.65
10	29.50	3.03	1.69			
	30.52	2.93	0.62			
	31.07	2.88	0.51			
	31.70	2.82	0.80			
	32.77	2.73	0.29			
15	33.10	2.71	0.32			
	33.83	2.65	0.95			
	34.15	2.63	1.52			

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

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

Tabla 4: Parámetros de refinamiento de estructura y datos de cristal para la forma polimórfica 1

Formula empírica	$\text{C}_{38} \text{H}_{37} \text{F}_3 \text{N}_6 \text{O}_3$	
Peso de la fórmula	682.73	
Temperatura	295(2) K	
Longitud de onda	0.6889 Å	
Sistema cristalino	ortorrómbico	
Grupo espacial	P 21 21 21	
Dimensiones de la celda unitaria	$a = 16.7962(3) \text{ Å}$	$\alpha = 90^\circ$
	$b = 23.5841(6) \text{ Å}$	$\beta = 90^\circ$

27

 $c = 25.5756(6) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$

Volumen	10131.1(4) $\text{\AA}^3$
Z	12
Densidad (calculada)	1.343 mg/m^3
Coefficiente de absorción	0.059 mm^{-1}
F(000)	4296
Tamaño de cristal	7 x 12 x 140 μm
Rango theta para la recopilación de datos	1.406 a 24.226°

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

Tabla 5: Parámetros de refinamiento de estructura y datos de cristal para la forma polimórfica 2

Formula empírica	$\text{C}_{38} \text{H}_{37} \text{F}_3 \text{N}_6 \text{O}_3$
Peso de la fórmula	682.73
Temperatura	295(2) K
Longitud de onda	0.6889 $\text{\AA}$
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	P 21
Dimensiones de la celda unitaria	$a = 16.8148(7) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$
	$b = 5.6467(2) \text{ \AA}$ $\beta = 101.540(3)^\circ$
	$c = 35.5556(11) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$
Volumen	3307.7(2) $\text{\AA}^3$
Z	4
Densidad (calculada)	1.371 mg/m^3
Coefficiente de absorción	0.060 mm^{-1}
F(000)	1432
Tamaño de cristal	5 x 5 x 50 μm
Rango theta para la recopilación de datos	1.133 a 24.246°

Relaciones de estabilidad termodinámica

Estabilidad termodinámica de las formas polimórficas 1 y 2 a temperaturas variables

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

Tabla 6: Análisis de XRPD de suspensiones de formas 1 y 2 maduradas a temperaturas variables

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

Notas al pie: a. Según lo determinado por análisis de XRPD después de 72 horas;

b. La disolución se produjo a esta temperatura; sólido obtenido por ligero enfriamiento.

Perfilado mediante calorimetría diferencial de barrido

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

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

Para obtener un valor exacto del calor de fusión (ΔH_f) de la Forma polimórfica 1 y la Forma polimórfica 2, se usó DSC de barrido rápido (utilizando una velocidad de calentamiento de 40 °C/min)

para eliminar el evento de recristalización de la Forma 1 de la fusión de la Forma 2 que se produce a velocidades de exploración más lentas (10 C/min). El análisis repetido ($n = 10$) de las mismas muestras de los polimorfos mostró que las Formas 1 y 2 tenían calores medios de fusión de 72.28 J/g y 77.15 J/g respectivamente (**Tabla 7**).

Tabla 7: Datos de fusión de trazados de DSC de escaneo rápido para las formas 1 y 2.

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

La **Figura 16** comprende un trazado de DSC de exploración rápida de esta muestra de Forma polimórfica 1 y revela que tiene un punto de fusión de 202.6 °C. De manera similar, la **Figura 17** expone un trazado de DSC de exploración rápida de esta muestra de Forma polimórfica 2 y revela que tiene un punto de fusión de 182.6 °C.

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

Análisis termogravimétrico (TGA)

El perfil de TGA se llevó a cabo de acuerdo con los métodos descritos anteriormente y se usó para determinar la cantidad de disolventes residuales asociados con los polimorfos del Compuesto I. Además, se usó para medir la cantidad de disolvente liberado al calentarse de las formas solvatadas del Compuesto I. Los niveles típicos de disolvente residual que se encuentran en las muestras de los polimorfos del Compuesto I son los siguientes.

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

La muestra de Forma 2 derivada de EtOH exhibió una reducción de peso del 0.2 % p/p de 25 a 150 °C, atribuida a la pérdida de 0.03 mol de EtOH. La degradación del Compuesto I comenzó a 320 °C. El material polimórfico de Forma 2 aislado de MIBK no mostró reducción de peso hasta

que la muestra comenzó a degradarse a 320 °C (**Fig. 18**). El solvato de anisol experimentó una pérdida del 13.4 % p/p cuando la muestra se calentó entre 25 y 160 °C (datos no mostrados).

Experimentos de suspensión y siembra cruzada

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

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

Entrada	Disolvente Sistema	Temp °C	Forma polimórfica por XRPD
1	PrOAc	5	2
2		25	
3		50	
4	TBME	5	1 y 2
5		25	2
6		50	
7	Tolueno	5	1 y 2
8		25	2
9		50	
10	IPA:	5	1 y 2
11	Agua	25	
12	(5%)	50	

Nota al pie: Todas las muestras permanecieron como suspensiones durante la maduración

Esta observación sugiere que la solubilidad del Compuesto I es demasiado baja en este

sistema de disolventes para que ocurra una transformación completa o que estas condiciones son intrínsecamente menos favorables para la transformación de la Forma 1 en la Forma 2. Para determinar la influencia del agua en determinar el resultado de dichos experimentos de acondicionamiento, se examinó el comportamiento del polimorfo de Forma 2 en medios orgánicos nominalmente secos y también en mezclas acuosas monofásicas con disolventes miscibles en agua.

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

Tabla 9: Destino de la Forma 2 suspendida en acetona, agua y mezclas de acetona y agua.

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

Para investigar la generalidad de esta transformación imprevista, se llevó a cabo un experimento similar en THF y en mezclas de THF/agua. De acuerdo con los datos descritos anteriormente, se encontró que la incubación del Compuesto I como Forma polimórfica 2 en THF

solo, tanto a 25 como a 50 °C durante un período de al menos 4 horas, no tuvo efecto sobre la composición polimórfica de la mezcla. Sin embargo, la adición de agua mostró un efecto pronunciado sobre la conversión del polimorfo de Forma 2 en Forma 1 que se observó que tenía lugar tanto a temperaturas más bajas como más altas (**Tabla 10**). A 25 °C, esas mezclas que comprenden 10% y 20% de agua regresaron a la Forma 1 después de 4 y 24 horas, respectivamente (**Tabla 10, Entradas 2 y 3**). Sorprendentemente, a 50°C todas las mezclas acuosas de THF dieron como resultado la generación del estado cristalino de Forma 1 (**Tabla 10, Entradas 6-8**).

Tabla 10: Destino de la suspensión de la Forma 2 en THF y mezclas de THF y agua

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

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

Es evidente que la presencia de agua induce la transición polimórfica descrita anteriormente. Sin embargo, aparte de los niveles bajos, el agua es un potente antidisolvente en estos sistemas y reduce notablemente la solubilidad de la sustancia farmacológica en la mezcla de disolvente acuoso a medida que aumenta su proporción. La consecuencia de este perfil de solubilidad es que, en agua sola o en mezclas de disolventes ricas en agua, el proceso de conversión de la Forma 2 a la Forma 1 no se produce o se ve inhibido por la solubilidad marginal, particularmente a temperatura ambiente. En el caso de la acetona y especialmente en el THF, el aumento de la temperatura eleva la solubilidad de la entrada de Forma 2 y acelera su transformación al estado de Forma 1.

Un patrón revelador similar de interconversión se derivó de un experimento en el que la Forma 2 se suspendió en varias mezclas de dioxano y agua a temperatura ambiente y temperatura elevada (**Tabla 11**). En presencia de un 10 % de agua, el polimorfo de Forma 1 es evidente en la

mezcla de suspensión en una hora a 25 °C. Sin embargo, cuando el contenido de agua se eleva al 40 %, la transición se retarda hasta tal punto que solo la muestra tomada a las 24 horas se reveló como presente como Forma 1. Este sistema ternario se comportó de manera similar a 50 °C. Sin embargo, a la temperatura más alta de 65 °C, la tasa de renovación aumenta de manera que la Forma 1 se generó después de 3 horas. De acuerdo con los datos obtenidos de los experimentos descritos anteriormente, aumentar la proporción de agua al 80 % en este sistema fue suficiente para detener la interconversión polimórfica a 25 °C, 50 °C e incluso a 65 °C.

Tabla 11: Destino de la suspensión de la Forma 2 en mezclas de 1,4-dioxano y agua

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

† Trazado de la Forma 2 restante

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

La elevación de la temperatura a 50 °C promovió el proceso de transformación de tal manera que se observó la interconversión polimórfica en el punto de tiempo de 24 horas para las mezclas en las que el contenido de agua excede el 2 %. Es evidente a partir de estos datos que las condiciones ambientales a las que se expone el Compuesto I determinan no solo cuál de los dos polimorfos, 1 o 2, se produce, sino también la velocidad a la que tiene lugar la interconversión.

Tabla 12: Destino de la suspensión de la Forma 2 en mezclas de MEK y agua

	Contenido de agua (% vol)	Temp °C	Forma polimórfica por XRPD
	1	25	2
5	2		2
	4		2
	6		2
	8		1
10	1	50	2
	2		2
	4		1
15	6		1
	8		1

La influencia de la composición polimórfica inicial en el destino de las muestras se investigó equilibrando los polimorfos individuales o una mezcla igual de ambos en MEK anhidro y THF, así como en los mismos disolventes dopados con agua al 5 %.

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

	Entrada	Disolvente	Forma por XRPD	
			Entrada	Posterior a equilibrio ^a
25	1	MEK	1	1
	2		2	2
	3		1 + 2	2
30	4	THF	1	1 ^b
	5		2	2
	6		1 + 2	2
	7	MEK/ agua	1	1
35	8	5 %	2	2

9		1 + 2	1
10		1	1
11	THF/ agua	2	1
12	5 %	1 + 2	1

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

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

Los resultados observados cuando se mezcló un 5% de agua con los dos disolventes indican que el predominio de las dos formas se invirtió en estas condiciones, teniendo en cuenta los factores cinéticos. En MEK acuosa (5 % de agua), los polimorfos individuales volvieron a permanecer sin cambios durante la duración del experimento (**Tabla 13, Entradas 7 y 8**). Por el contrario, la mezcla polimórfica binaria convertida en Forma 1 en este medio (**Tabla 13, Entrada 9**). En THF acuoso (5% de agua) fue especialmente evidente el predominio de la Forma 1 como el polimorfo más preferido. En este entorno, la suspensión del Formulario 1 se mantuvo sin cambios (**Tabla 13, Entrada 10**), en consonancia con el resultado observado para aq MEK en las mismas condiciones.

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

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

Se llevó a cabo un estudio para comparar el transcurso del tiempo de las concentraciones de fármaco sin cambios en plasma después de una dosis única de inhalación de la Forma 1 o la Forma

2 en ratas.

La rata macho RccHan™:WIST se consideró una especie y una cepa adecuadas debido a su aceptación por parte de las agencias reguladoras. La vía de administración por inhalación se eligió para simular las condiciones de administración clínica. En el estudio se utilizaron un total de 14 animales (seis animales por grupo con dos animales de repuesto), de 10 a 12 semanas de edad y con un peso de 306 a 341 g al comienzo del tratamiento farmacológico. El tratamiento consistió en una única exposición por inhalación de 2 horas con una formulación nebulizada de la Forma 1 micronizada (98,94 % de pureza) para los animales del Grupo 1 o la Forma 2 micronizada (98,10 % de pureza) para los animales del Grupo 2. Se determinaron los parámetros farmacocinéticos de las dos formas polimórficas para apoyar los estudios de farmacología y toxicología en animales y estudios clínicos en humanos.

Las suspensiones se fabricaron preparando primero una solución concentrada de los tensioactivos (solución humectante) y una solución salina. Estos fueron luego utilizados para hacer el vehículo. Se preparó una solución salina como sigue. Se pesó cloruro de sodio (50 g) en un matraz aforado de 5000 ml, se enrasó con agua, se agitó con un agitador magnético durante 10 min y luego se pasó a través de un filtro de membrana de 0.22 µm. Se preparó una solución humectante como sigue. Se pesó el lipoide S100 (10 g) en una botella Duran de 2000 ml, se agregaron 1000 g de propilenglicol y la mezcla se agitó en un mezclador Silverson equipado con un tamiz de alto cizallamiento de 1" durante 1 min a 8000 rpm y luego se pasó a través de un Filtro de membrana de 0.22 µm. El vehículo se preparó de la siguiente manera. Se transfirió la solución humectante (500 ml) a un matraz de 5000 ml, se llevó al volumen total con solución salina, se agitó con un agitador magnético durante 10 min y luego se pasó a través de un filtro de membrana de 0.22 µm.

Se preparó un lote de 1000 ml de una suspensión de 4 mg/ml del Compuesto I como sigue. Se pesó el compuesto I (4.00 g) en un vaso de precipitados pequeño, se añadieron 100 ml de solución humectante y la mezcla se agitó con un mezclador Silverson equipado con un tamiz de alto cizallamiento de 1" durante 5 min a 8000 rpm. Luego, la mezcla se transfirió a una botella Duran de 5000 ml usando solución salina y se agitó usando un mezclador Silverson equipado con una malla de alto cizallamiento de 1" durante 5 min a 8000 rpm, después de lo cual se almacenó entre 2 y 8 °C. Mayor o menor Se prepararon suspensiones de concentración (rango de 0.2 a 20 mg/mL) ajustando el peso de entrada de API según fuera apropiado para suspensiones de mg/mL más altas o diluyéndolas más con vehículo para suspensiones de mg/ml más bajas. Todas las formulaciones se agitaron magnéticamente durante al menos 30 min y se evaluaron visualmente antes de la administración.

Las ratas se aclimataron al procedimiento de dosificación por inhalación durante tres días consecutivos antes de la dosificación. Los animales se trataron con la sustancia de ensayo mediante

la administración por inhalación de aerosol durante 120 min a través de la exposición únicamente por el hocico, a una concentración de aerosol objetivo de 25.2 µg/l. Las estimaciones de la dosis inhalada a partir de una exposición de 2 horas y un peso corporal supuesto de 300 g se calcularon mediante la fórmula:

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

donde: C es la concentración de aerosol (µg/l); RMV es el volumen minuto respiratorio (l/min); D es la duración de la exposición (120 minutos) y BW es el peso corporal medio del grupo (kg). A continuación, se presentan los datos resumidos de las concentraciones medias de aerosol alcanzadas, la dosis inhalada estimada y la distribución del tamaño de partículas (PSD). (**Tabla 14**).

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

Grupo	Concentración aerosol	Dosis estimada inhalada	MMAD	σg
N.º	promedio (µg/l)	(mg/kg)	(µm)	
1	28.8	2.48	2.3	1.60
2	32.6	2.82	2.2	1.70

Notas al pie: MMAD. Mediana de diámetro aerodinámico de masa; σg. Desviación estándar geométrica

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

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

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

validado.

Procedimientos de extracción y análisis

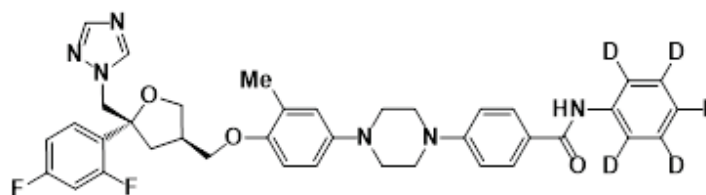
Las muestras de plasma de rata se mezclaron en vórtex y se extrajo una alícuota de 25 µl y se trató con 12,5 µl de solución de trabajo estándar interna (que comprende 20 ng/ml del compuesto 2) y 25 µl de solución acuosa de formiato de amonio 10 mM. La mezcla se agitó durante 5 min a 1400 rpm, después de lo cual se añadieron 300 µl de MTBE y luego la muestra se mezcló en tambor giratorio durante 10 min. Después de la centrifugación a 3500 g durante 5 min, se extrajo una alícuota de 150 µl de la capa orgánica y se evaporó hasta sequedad bajo nitrógeno a 50 °C durante aproximadamente 15 min. El residuo se reconstituyó en 100 µl de una mezcla de acetonitrilo y agua (50:50) que contenía ácido fórmico al 0.1 % y se mezcló en vortex durante 5 min a 1400 rpm. Las muestras preparadas de esta manera luego se analizaron usando un LC-MS/MS validado para determinar la concentración plasmática original del Compuesto I.

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

Tabla 15: Perfil de gradiente de eluyente de HPLC

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

El Compuesto I se usó como un estándar de referencia y el Compuesto 2 tetradeuteroderivado se empleó como estándar interno. El compuesto 2 es 4-(4-(4-(((3*R*,5*R*)-5-((1*H*-1,2,4-triazol-1-il)metil)-5-(2,4-difluorofenil)tetrahidrofuran-3-il)metoxi)-3-metilfenil)piperazin-1-il)-*N*-(4-fluorofenil-2,3,5,6-*d*₄)benzamida.



Compuesto 2

Todo el control del instrumento, la recopilación de datos, la integración y el almacenamiento del área de picos se realizó con MassLynx (versión 4.1). Se calculó la respuesta del espectrómetro de masas (proporción del área de pico del analito al patrón interno) de cada estándar de calibración mediante Watson LIMS (versión 7.2) y se graficó en función de la concentración nominal (preparada). Se usó un análisis de regresión lineal de mínimos cuadrados ponderado ($1/x^2$) para calcular una ecuación de la curva de calibración. Las concentraciones del Compuesto I en las muestras se volvieron a calcular a partir de las curvas de calibración con 3 cifras significativas. Se utilizó Microsoft Excel 2010 para los cálculos posteriores. Todos los porcentajes se presentan con un decimal.

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

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

Tabla 16: Media de parámetros farmacocinéticos para las formas 1 y 2 del compuesto I después de su administración por inhalación a ratas

Parámetros farmacocinéticos	Media	
	Forma 1	Forma 2
Dosis nominal (mg/kg)	2.2	2.2
Dosis inhalada estimada (mg/kg)	2.48	2.82
C_{max} (ng/ml)	4.95	8.59
T_{max} (h)	6	6
AUC_t (ng.h/ml) ^a	122	230

AUC_t dosis normalizada (ng.h/ml) ^b	122	202
Biodisponibilidad relativa	Referencia (100%)	166%

Notas al pie: **a.** Ambos valores de AUC_t son de 0 a 48 h; **b.** AUC_t de la Forma 2 normalizada a la dosis alcanzada para la Forma 1 (2.48 mg/kg)

Concentraciones en plasma

Las concentraciones plasmáticas del fármaco tras la administración por inhalación de las Formas 1 y 2 permanecieron cuantificables hasta 48 horas después del comienzo de la exposición para ambos grupos y se presentan a continuación (**Tablas 17 y 18** respectivamente). Los perfiles de concentración media en plasma en función de tiempo derivados de estos se representan gráficamente (**Figs. 19 y 20** para las Formas 1 y 2 respectivamente).

Tabla 17: Concentraciones en plasma del fármaco después de la administración por inhalación de la Forma 1 a ratas macho en un nivel de dosis nominal de 2.2 mg/kg

Tiempo hr ^a	Concentración de fármaco (ng/ml) en animales por n.º						Media	sd
	1	2	3	4	5	6		
IAD	1.16	0.826	1.35	-	-	-	1.11	0.27
3	-	-	-	5.31	4.35	2.41	4.02	1.48
4	4.73	6.32	3.78	-	-	-	4.94	1.28
6	-	-	-	5.38	3.97	5.49	4.95	0.85
8	3.28	NS	2.88	-	-	-	3.08	-
12	-	-	-	4.05	NS	3.64	3.85	-
24	2.47	3.00	3.85	2.75	2.02	3.03	2.85	0.62
28	1.85	2.22	3.92	1.87	NS	2.04	2.38	0.87
32	1.36	1.85	2.79	1.66	2.20	1.32	1.86	0.56
36	1.21	1.36	1.74	1.70	1.01	1.80	1.47	0.32
48	1.10	1.45	1.28	1.26	NS	1.19	1.26	0.13

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

Tabla 18: Concentraciones en plasma del fármaco después de la administración por inhalación de la Forma 2 a ratas macho en un nivel de dosis nominal de 2.2 mg/kg

Tiempo	Concentración de fármaco (ng/ml) en animales por n.º	Media	sd
--------	--	-------	----

hr ^a	1	2	3	4	5	6		
IAD	2.24	2.59	3.15	-	-	-	2.66	0.46
3	-	-	-	8.95	5.40	6.01	6.79	1.90
4	7.53	9.31	8.88	-	-	-	8.57	0.93
6	-	-	-	11.8	5.38	NS	8.59	-
8	6.85	5.90	6.79	-	-	-	6.51	0.53
12	-	-	-	10.7	4.57	5.84	7.04	3.24
24	11.5	3.24	4.22	5.26	3.58	3.24	5.17	3.19
28	8.15	3.17	3.32	4.15	2.94	2.93	4.11	2.03
32	7.72	3.50	3.33	4.05	2.75	2.51	3.98	1.91
36	6.28	2.43	2.54	3.59	2.49	2.43	3.29	1.53
48	3.78	1.79	1.89	2.52	1.83	1.91	2.29	0.78

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

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

Biodisponibilidad relativa

La biodisponibilidad relativa (RF) de los dos polimorfos tras la administración por inhalación se calculó mediante la fórmula:

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

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

administración por inhalación a ratas.

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

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

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

Resumen de datos

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

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra «comprender» y variaciones tales como «comprende» o «que comprende» implican la inclusión de un número entero, paso o grupo de

enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro número entero, paso o grupo de números enteros o pasos.

Todas las publicaciones, solicitudes de patente y referencias mencionadas en la memoria descriptiva de la presente invención se incorporan a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

La invención abarca todas las combinaciones de grupos preferidos y más preferidos, grupos adecuados y más adecuados y modalidades de los grupos mencionados anteriormente.

Referencias

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

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

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

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

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

Shivaprakash M., Rudramurthy S.M., Colley T., Abdolrasouli A., Ashman J., Dhaliwal M., Kaur H., Armstrong-James D., Strong P., Rapeport G., Schelenz S., Ito K. y Chakrabarti A. «*In vitro*» antifungal activity of a novel topical triazole PC945 against emerging yeast *Candida auris*.» *J. Antimicrob. Chemother.*, 2019, 74(10); 2943-2949.

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