

Traduzione del testo del brevetto europeo n° **2820001**

Titolare: **AiCuris Anti-infective Cures GmbH**

Titolo: **Sali di sodio e di calcio di un derivato di diidrochinazolina e loro uso come agenti antivirali**

5

* * * * *

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda sali di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il} acetico e loro solvati.

L'invenzione riguarda inoltre procedimenti per la loro produzione, questi composti per l'uso per il trattamento e/o la profilassi di malattie, in particolare di infezioni virali nonché loro uso per la produzione di medicinali per il trattamento e/o la profilassi di infezioni virali, in particolare per il trattamento e/o la profilassi di infezioni causate da citomegalovirus o un altro rappresentante del gruppo dei virus dell'Herpes. Acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il} acetico è noto ad esempio da WO 2004/096778 ed è stato sviluppato dalla Richiedente in qualità di promettente candidato come sostanza attiva antivirale, in particolare per combattere infezioni causate dal citomegalovirus umano (HCMV). Nello sviluppo, si è tuttavia dimostrato estremamente complesso ottenere il composto in forma cristallina, sia sottoforma di zwitterione, sia sottoforma di sale, e fino a questo momento lo sviluppo è avvenuto utilizzando lo zwitterione in forma amorfa. L'uso di sostanze amorfe per la produzione di medicinali è tuttavia indesiderato, da un lato in considerazione del fatto che spesso, con sostanze amorfe, è difficile garantire una purezza uniforme, nonché altresì in considerazione del fatto che spesso, con sostanze amorfe, è difficile garantire parametri farmacologici costanti, come ad esempio una biodisponibilità costante.

25 Scopo dell'invenzione è pertanto descrivere sali di acido {8-fluoro-2-[4-(3-

metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidro-chinazolin-4-
il}acetico con i quali sia possibile ottenere prodotti cristallini. Affinché i sali possano essere
impiegati in modo opportuno nello sviluppo di farmaci, essi devono inoltre avere una stabilità
di stoccaggio di lunga durata. Infine, i composti cristallini dovrebbero essere altresì ben
5 solubili in mezzo acquoso e in particolare in presenza di pH fisiologico.

Inoltre, i sali secondo l'invenzione presentano una purezza elevata.

L'espressione "prodotto cristallino" nel contesto della presente invenzione indica sali di sodio
dell'acido S(+)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-
(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico e sali di calcio dell'acido S(+)-{8-
10 fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-
diidrochinazolin-4-il}acetico, che con analisi di diffrazione dei raggi X presentano il
caratteristico pattern a picchi come rappresentato nelle Figure 1 - 3 corrispondenti, o un pattern
a picchi analogo.

Nel contesto dell'invenzione l'espressione "stabile allo stoccaggio" per i sali secondo
15 l'invenzione a 25°C indica una percentuale minima di acido {8-fluoro-2-[4-(3-
metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-
il}acetico > 90%, preferibilmente > 95%, nel modo massimamente preferito > 99% per almeno
due, preferibilmente almeno tre, in modo ancor più preferito almeno sei, nel modo
massimamente preferito 12 mesi di stoccaggio, in caso di analisi di detti sali per mezzo di uno
20 dei metodi di HPLC 1 - 3. Detta stabilità di stoccaggio dei sali viene considerata sufficiente
nell'ambito dell'invenzione.

Sorprendentemente è stato a questo punto scoperto che acido {8-fluoro-2-[4-(3-
metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-
il}acetico con cationi di sodio e di calcio forma sali cristallini ben definiti. È inoltre emerso
25 che questi sali hanno buona solubilità nonché anche buona stabilità di stoccaggio in mezzo

acquoso, in particolare in presenza di pH fisiologico.

Inoltre, i sali di sodio e calcio cristallini, ottenuti secondo l'invenzione, dell'acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico si contraddistinguono per un'elevata purezza.

5 Le espressioni "elevata purezza, purezza e puro" nel contesto dei sali di sodio dell'acido S(+)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico e sali di calcio dell'acido S(+)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico indicano la presenza dei suddetti come sostanza in una miscela di sostanze con una
10 percentuale complessiva < 0,1 %, preferibilmente < 0,08%, in modo ulteriormente preferito < 0,05%, nel modo massimamente preferito < 0,01% delle loro impurità note acido di-p-toluoil-D-acetico, e/o S-chinazolilpiperazina, e/o chinazolin etilestere e/o chinazolildipiperazina, e/o loro impurità non specifiche, quando misurate mediante HPLC secondo l'esempio di realizzazione F).

15 Oggetto dell'invenzione sono pertanto i sali di sodio cristallini e i sali di calcio cristallini di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico, nonché i loro solvati.

Sali di sodio e calcio di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico nell'ambito dell'invenzione sono
20 addotti di una reazione dell'acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico con basi di sodio o calcio, in particolare idrossido di sodio o idrossido di calcio. L'acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico e i controioni di sodio ovvero di calcio possono essere qui presenti in qualsiasi
25 rapporto. Il rapporto è in tal caso preferibilmente un numero intero (ad esempio 1:1, 1:2, 1:3,

3:1, 2:1). I sali possono in tal caso essere prodotti attraverso una reazione diretta dell'acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico con basi di sodio o di calcio o attraverso produzione di un altro sale basico dell'acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico seguita da uno scambio del controione. Nell'ambito dell'invenzione come solvati vengono indicate quelle forme dei sali di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico che formano un complesso mediante coordinazione con molecole di solvente. Gli idrati sono una forma speciale dei solvati in cui avviene la coordinazione con acqua.

Nell'ambito della presente invenzione è preferito il sale monocalcico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico e in particolare il 2,5-idrato e il 3,5-idrato del sale monocalcico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico. Nell'ambito dell'invenzione è ulteriormente preferito il sale monosodico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico e in particolare il 3-idrato del sale monosodico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico.

Nell'ambito dell'invenzione è ulteriormente preferito un 2,5-idrato del sale monocalcico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico, che nel diffrattogramma su polvere XRD mostra picchi caratteristici a circa 6.1, 9.2 e 15.5 gradi 2-theta.

Nell'ambito dell'invenzione è ulteriormente preferito un 3,5-idrato del sale monocalcico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-

diidrochinazolin-4-il}acetico, che nel diffrattogramma su polvere XRD mostra picchi caratteristici a circa 6.2, 12.4 e 22.4 gradi 2-theta.

Nell'ambito dell'invenzione è ulteriormente preferito un 3-idrato del sale monosodico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)-fenil]-3,4-

5 diidrochinazolin-4-il]acetico, che nel diffrattogramma su polvere XRD mostra picchi caratteristici a circa 6.2, 20.9 e 22.4 gradi 2-theta.

Come risulta senz'altro chiaro al tecnico del ramo, acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-

10 il}acetico presenta uno stereocentro in corrispondenza del carbonio in posizione 4 dell'anello diidrochinazolinico. Nell'ambito della presente invenzione è particolarmente preferito il caso in cui questo carbonio presenta la configurazione S.

I sali secondo l'invenzione vengono prodotti generalmente attraverso reazione di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-

15 diidrochinazolin-4-il}acetico o di un relativo sale acido con una base di sodio o calcio, in particolare idrossido di sodio o idrossido di calcio, in un solvente.

È inoltre possibile far reagire un sale basico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico, in cui non si tratta di un sale di sodio o di calcio, con una sorgente di cationi di sodio o di calcio in un solvente.

20 In particolare, nelle reazioni sopra menzionate viene impiegata come solvente una miscela di almeno un di-(C₁-C₄)-alchil etero e almeno un (C₁-C₄)-alcol.

Oggetto dell'invenzione è pertanto altresì un procedimento per la produzione di un sale di sodio o di calcio di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico con i seguenti passaggi:

25 a.) disciogliere acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-

(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}-acetico o un suo solvato in una miscela composta da almeno un di-(C₁-C₄)-alchiletere e almeno un (C₁-C₄)-alcol, eventualmente sotto riscaldamento.

b.) aggiungere NaOH o Ca(OH)₂ alla soluzione ottenuta nel passaggio a.),

5 c.) rimuovere una parte del solvente dalla soluzione ottenuta nel passaggio b.) ed eventualmente inoculare con germi cristallini adeguati, allo scopo di indurre la cristallizzazione del sale ovvero di un solvato del sale,

d.) separare il sale o suo solvato cristallizzato nel passaggio c.),

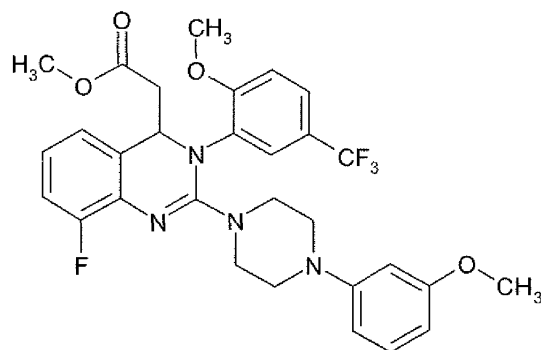
e.) eventualmente agitare il sale o solvato ottenuto nel passaggio d.) in un solvente idoneo, preferibilmente in una miscela composta da acqua e almeno un (C₁-C₄)-alcol per ottenere un solvato desiderato, e

f.) essiccare il sale o solvato ottenuto nel passaggio d.) o e.).

I sali secondo l'invenzione in tal modo ottenuti possono essere eventualmente elaborati, ad esempio ricristallizzati o sottoposti a micronizzazione, allo scopo di adattare ulteriormente le loro proprietà fisiche allo scopo di impiego.

L'acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico usato per la produzione dei sali secondo l'invenzione è noto e può essere prodotto ad esempio seguendo il procedimento descritto in WO 2006/133822.

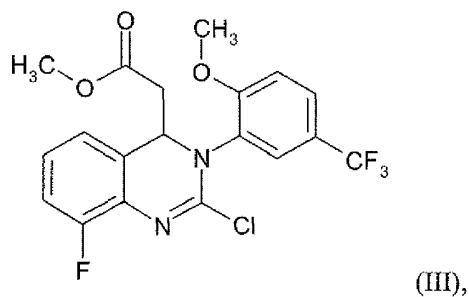
In particolare la produzione avviene attraverso la saponificazione dell'estere di un composto della formula (II)



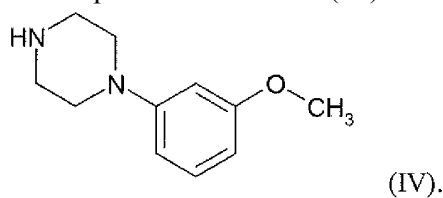
(II),

con una base.

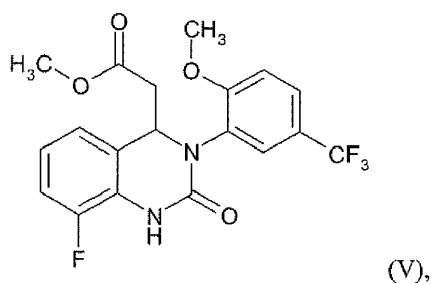
Il composto della formula (II) può essere prodotto attraverso reazione di un composto della formula (III)



5 in presenza di una base con un composto della formula (IV)

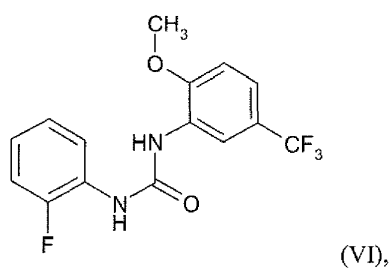


Il composto della formula (III) può essere prodotto attraverso reazione di un composto della formula (V)



10 con ossicloruro di fosforo, tricloruro di fosforo o pentacloruro di fosforo in presenza di una base.

Il composto della formula (V) può essere prodotto attraverso reazione di un composto della formula (VI)



nel primo passaggio con metilestere di acido acrilico in presenza di un catalizzatore al palladio e oleum e nel secondo passaggio con una base.

Composti delle formule (IV) e (VI) sono di per sé noti al tecnico del ramo o possono essere prodotti seguendo procedimenti convenzionali, noti in letteratura.

- 5 La saponificazione dell'estere di un composto della formula (II) a dare acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico avviene attraverso reazione di un composto della formula (II) con una base in un solvente inerte, in un intervallo di temperatura da 18°C fino al riflusso del solvente, preferibilmente da 18 a 50°C, in modo particolarmente preferito da 20 a 30°C, a pressione
- 10 normale, nel corso di ad esempio 0,5 fino a 10 ore, preferibilmente nel corso di 1 fino a 5 ore. Esempi di basi sono idrossidi alcalini quali idrossido di sodio, di litio, di potassio, o carbonati alcalini quali carbonato di cesio, di sodio o carbonato di potassio, o alcolati quali metanolato di sodio o metanolato di potassio o etanolato di sodio o di potassio, la base essendo ad esempio presente in soluzione acquosa.
- 15 Solventi inerti sono ad esempio eteri quali 1,2-dimetossietano, metil-*terz*-butiletere (MTBE), diossano, tetraidrofurano, glicoldimetiletere o dietilenglicoldimetiletere, alcoli quali metanolo, etanolo, n-propanolo, iso-propanolo, n-butanolo o *terz.*-butanolo, o acqua, o miscele di solventi.
- Viene preferito idrossido di sodio in acqua e MTBE.
- 20 La sintesi di un composto della formula (II) a partire da un composto della formula (III) e da un composto della formula (IV) in presenza di una base avviene in un solvente inerte, in un intervallo di temperatura compreso fra 40°C e il riflusso del solvente, preferibilmente corrispondente al riflusso del solvente, a pressione normale, nel corso di ad esempio 2 fino a 48 ore, preferibilmente nel corso di 4 fino a 12 ore.
- 25 Le basi sono ad esempio basi amminiche quali 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), 1-

(3-metossifenil)piperazina o trietilammina, o altre basi quali potassio-terz.-butilato.

Solventi inerti sono ad esempio clorobenzene o eteri quali 1,2-dimetossietano, diossano, glicoldimetiletere o dietilenglicoldimetiletere.

Preferibilmente, DBU è in diossano.

- 5 La conversione di un composto della formula (V) in un composto della formula (III) avviene attraverso reazione di un composto della formula (V) con ossicloruro di fosforo, tricloruro di fosforo o pentacloruro di fosforo, preferibilmente ossicloruro di fosforo, in presenza di una base in un solvente inerte, in un intervallo di temperatura compreso fra 40°C e il riflusso del solvente, preferibilmente corrispondente al riflusso del solvente, a pressione normale, nel corso di ad esempio 1 fino a 48 ore, preferibilmente nel corso di 2 fino a 12 ore.

Le basi sono ad esempio ammine quali 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene (DBU), piridina o trietilammina, o altre basi quali potassio-terz.-butilato.

Solventi inerti sono ad esempio idrocarburi quali benzene, xilene, toluene o clorobenzene.

Preferibilmente, DBU è in clorobenzene.

- 15 La conversione di un composto della formula (VI) in un composto della formula (V) avviene nel primo passaggio attraverso reazione di un composto della formula (VI) con metilestere di acido acrilico in presenza di un catalizzatore al palladio e oleum in un solvente in un intervallo di temperatura compresa fra 0°C e 40°C, preferibilmente a temperatura ambiente e nel secondo passaggio attraverso reazione con una base in un solvente inerte, in un intervallo di temperatura compreso fra 40°C e il riflusso del solvente, preferibilmente corrispondente al riflusso del solvente, a pressione normale, nel corso di ad esempio 1 fino a 48 ore, preferibilmente nel corso di 2 fino a 12 ore.

- 20 Catalizzatori al palladio nel primo passaggio sono ad esempio palladio(II)acetato, bis(trifenilfosfin)palladio(II)cloruro, tetrakis(trifenilfosfin)palladio(0), bis(tris(o-
25 totil)fosfino)palladio-(II)-cloruro o un catalizzatore al palladio prodotto a partire da

bis(acetonitril)-dicloropalladio o palladio(II)acetato e un ligando, ad esempio tris(o-tolil)fosfina, trifenilfosfina o difenilfosfinoferrocene.

Solventi nel primo passaggio sono ad esempio acidi organici quali acido acetico o acido propionico.

5 Preferibilmente, il palladio(II)acetato è in acido acetico.

Le basi nel secondo passaggio sono ad esempio DBU, trietilammina o diisopropiletilammina.

Solventi inerti nel secondo passaggio sono ad esempio eteri quali 1,2-dimetossietano, diossano, glicoldimetil etero o dietilenglicoldimetil etero, idrocarburi quali benzene, xilene o toluene, o altri solventi quali isobutironitrile, acetonitrile, acetone, nitrobenzene,

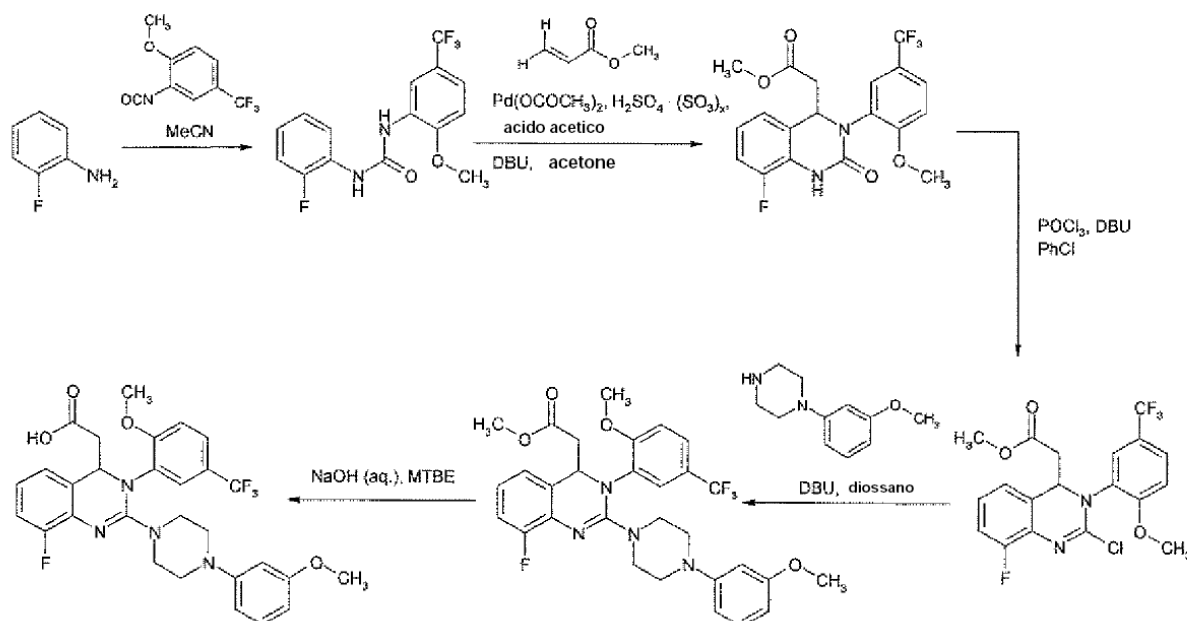
10 dimetilformammide, dimetilacetammide, dimetilsolfossido o N-metilpirrolidone.

Preferibilmente, DBU è in acetone.

La produzione dell'acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico usato per la produzione dei sali secondo l'invenzione è illustrato in maggiore dettaglio a titolo esemplificativo nel seguente

15 schema di sintesi 1. Lo schema di sintesi è qui puramente esemplificativo e non va inteso in alcun modo come limitante.

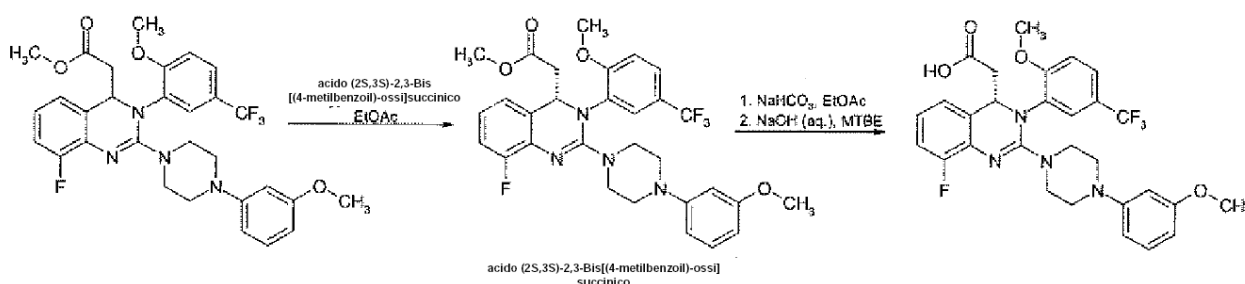
Schema di sintesi 1



Come già menzionato precedentemente, l'acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico viene preferibilmente impiegato nella forma dell'S-enantiomero. Questo S-enantiomero può essere

5 in tal caso prodotto ad esempio nel modo rappresentato nel seguente schema di sintesi 2.

Schema di sintesi 2



I sali secondo l'invenzione mostrano un'azione antivirale nei confronti di rappresentanti del gruppo dei virus dell'Herpes (Herpesvirus), in particolare nei confronti dei Citomegalovirus (CMV) in particolare nei confronti del Citomegalovirus umano (HCMV). Essi sono pertanto

adatti per il trattamento e la profilassi di malattie, in particolare di infezioni virali, in particolari causate dai virus qui menzionati, e le malattie infettive da essi provocate. Con infezione virale si intende qui sia un'infezione da parte di un virus, sia una malattia provocata da un'infezione da parte di un virus.

- 5 I sali secondo l'invenzione possono essere utilizzati, grazie alle loro proprietà, per la produzione di medicinali idonei alla profilassi e/o al trattamento di malattie, in particolare infezioni virali.

Si possono ad esempio menzionare, come campi applicativi:

- 1) trattamento e profilassi di infezioni da HCMV in pazienti affetti da AIDS (retinite, 10 polmonite, infezioni gastrointestinali).
- 2) trattamento e profilassi di infezioni da Citomegalovirus in pazienti che hanno subito trapianti di midollo osseo e di organi, i quali si ammalano spesso gravemente di polmonite da HCMV, encefalite da HCMV, nonché infezioni gastrointestinali e sistemiche da HCMV.
- 3) trattamento e profilassi di infezioni da HCMV in neonati e bambini.
- 15 4) trattamento di un'infezione da HCMV acuta in donne gravide.
- 5) trattamento dell'infezione da HCMV in pazienti immunosoppressi in caso di cancro e di terapia del cancro.
- 6) trattamento di pazienti affetti da cancro positivi all'HCMV con lo scopo di ridurre la progressione del tumore mediata da HCMV (cfr. J. Cinatl , et al., FEMS Microbiology 20 Reviews 2004, 28, 59-77).

I sali secondo l'invenzione vengono utilizzati preferibilmente per la produzione di medicinali idonei alla profilassi e/o al trattamento di infezioni dovute a un rappresentante del gruppo dei virus dell'Herpes, in particolare a un Citomegalovirus, in particolare al Citomegalovirus umano.

- 25 I sali secondo l'invenzione, grazie alle loro proprietà farmacologiche, possono essere utilizzati

da soli e, all'occorrenza, anche in combinazione con altri principi attivi, in particolare sostanze antivirali come ad esempio Valganciclovir, Ganciclovir, Valaciclovir, Aciclovir, Foscarnet, Cidofovir e derivati utilizzati per il trattamento e/o la prevenzione di infezioni virali, in particolare di infezioni da HCMV.

- 5 Ulteriore oggetto della presente invenzione riguarda i sali secondo l'invenzione in un procedimento per il trattamento e/o la profilassi di malattie, preferibilmente di infezioni virali, in particolare di infezioni causate da Citomegalovirus umano (HCMV) o da un altro rappresentante del gruppo dei virus dell'Herpes.

Viene descritto l'utilizzo dei sali secondo l'invenzione per il trattamento e/o la profilassi di
10 malattie, in particolare delle malattie sopra menzionate.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è l'utilizzo dei sali secondo l'invenzione per la produzione di un medicinale per il trattamento e/o la profilassi di malattie, in particolare delle malattie sopra menzionate.

Viene descritto un procedimento per il trattamento e/o la profilassi di malattie, in particolare
15 delle malattie sopra menzionate, utilizzando una quantità efficace dal punto di vista antivirale dei sali secondo l'invenzione.

I sali secondo l'invenzione possono agire a livello sistemico e/o locale. A tale scopo, essi possono essere applicati in maniera idonea come ad esempio per via orale, parenterale, polmonale, nasale, sublinguale, linguale, buccale, rettale, dermica, transdermica,
20 congiuntivale, ottica o come impianto ovvero stent.

Per queste modalità di applicazione è possibile somministrare i sali secondo l'invenzione in forme di applicazione idonee.

Per l'applicazione orale sono adatte forme di applicazione che rilasciano i sali secondo l'invenzione, funzionanti secondo lo stato dell'arte, in modo rapido e/o modificato, che
25 contengono i composti secondo l'invenzione in forma cristallina e/o amorfizzata e/o disciolta,

come ad esempio compresse (compresse non rivestite o rivestite, ad esempio con rivestimenti gastroresistenti o a scioglimento ritardato o insolubili che controllano il rilascio del composto secondo l'invenzione), compresse che si disgregano rapidamente nel cavo orale o pellicole/ostie, pellicole/liofilizzati, capsule (ad esempio capsule dure o di gelatina molle),
5 confetti, granulati, pellet, polvere, emulsioni, sospensioni, aerosol o soluzioni.

L'applicazione parenterale può avvenire evitando una fase di assorbimento (ad esempio intravenosa, intra-arteriosa, intracardiale, intraspinale o lombare) o con inclusione di un assorbimento (ad esempio intramuscolare, sottocutanea, intracutanea, percutanea o intraperitoneale). Per l'applicazione parenterale sono adatte come forme di applicazione, fra le
10 altre, preparazioni per iniezioni o infusioni nella forma di soluzioni, sospensioni, emulsioni, liofilizzati o polveri sterili.

Per le altre modalità di applicazione sono adatte ad esempio forme farmaceutiche per inalazione (fra le altre, inalatori per polveri, nebulizzatori), gocce, soluzioni, spray nasali; compresse per applicazione linguale, sublinguale o buccale, pellicole/ostie o capsule,
15 supposte, preparazioni auricolari o oculari, capsule vaginali, sospensioni acquose (lozioni, misture), sospensioni lipofile, pomate, creme, sistemi terapeutici transdermici, latte, paste, schiume, polveri aspersorie, impianti o stent

I sali secondo l'invenzione possono essere trasformati nelle forme di applicazione elencate. Ciò può avvenire in modo di per sé noto attraverso miscele con eccipienti inerti, non tossici, farmaceuticamente adeguati. Fra questi eccipienti vi sono fra gli altri veicoli (ad esempio
20 cellulosa microcristallina, lattosio, mannitolo), solventi (ad esempio glicole polietilenico liquido), emulsionanti e sostanze disperdenti o umettanti (ad esempio dodecilsolfato di sodio, polioissorbitanoleato) leganti (ad esempio polivinilpirrolidone), polimeri sintetici e naturali (ad esempio albumina), stabilizzatori (ad esempio antiossidanti come ad esempio acido
25 ascorbico), coloranti (ad esempio pigmenti inorganici come ad esempio ossidi di ferro) e

correttori del sapore e /o dell'odore.

Ulteriore oggetto della presente invenzione sono medicinali che contengono almeno un sale secondo l'invenzione, convenzionalmente insieme ad uno o più eccipienti inerti, non tossici, farmaceuticamente idonei, nonché il loro utilizzo per gli scopi sopra menzionati.

- 5 In generale, per ottenere risultati efficaci, si è dimostrato vantaggioso, in caso di applicazione intravenosa, somministrare quantità, riferite al principio attivo puro, comprese fra circa 0,001 e 10 mg/kg, preferibilmente circa 0,01 e 5 mg/kg di peso corporeo. In caso di applicazione orale, il dosaggio corrisponde convenzionalmente a circa 0,01 - 25 mg/kg, preferibilmente 0,1 - 10 mg/kg di peso corporeo.
- 10 Tuttavia, può essere eventualmente necessario discostarsi dalle quantità menzionate, e precisamente in funzione del peso corporeo, della modalità di applicazione, della reazione individuale al principio attivo, al tipo di preparazione e al momento ovvero intervallo in cui avviene l'applicazione. Così, in alcuni casi può essere sufficiente una quantità inferiore a quella minima summenzionata, mentre in altri casi è necessario superare i limiti sopra citati. In caso
- 15 di applicazione di quantità maggiori, è raccomandabile distribuire le stesse in una pluralità di somministrazioni singole nel corso della giornata.

Resta inteso che le caratteristiche sopra menzionate e quelle ancora da illustrare successivamente sono utilizzabili non soltanto nelle combinazioni di volta in volta indicate, ma anche in altre combinazioni o singolarmente, senza discostarsi dall'ambito della presente

20 invenzione.

L'invenzione viene ora di seguito illustrata in maggiore dettaglio sulla base di esempi, nonché in riferimento ai disegni allegati. Si mostrano:

- Fig. 1 un diffrattogramma su polvere XRD di un 3-idrato del sale sodico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico, che è stato prodotto secondo l'esempio 2; e
- 25

Fig. 2 un diffrattogramma su polvere XRD di un 2,5-idrato del sale di calcio di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico, che è stato prodotto secondo l'esempio 3; e

Fig. 3 un diffrattogramma su polvere XRD di un 3,5-idrato del sale di calcio di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico, che è stato prodotto secondo l'esempio 4.

Fig. 4 cromatogramma HPLC per sale sodico di acido S(+)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico.

10 Fig. 5 analisi con cromatogramma HPLC secondo Fig.4 in forma tabellare.

Le indicazioni percentuali nei test ed esempi seguenti sono percentuale in peso, salvo altrimenti specificato; la parti sono parti in peso. Rapporti di solventi, rapporti di diluizione e indicazioni sulla concentrazione di soluzioni liquide si riferiscono di volta in volta al volume.

Lista delle abbreviazioni:

15	ACN	acetonitrile
	API	active pharmaceutical ingredient (principio farmaceutico attivo)
	API-ES-pos.	Atmospheric pressure ionization, electrospray (ionizzazione a pressione atmosferica, elettrospray), positiva (con MS)
	API-ES-neg.	Atmospheric pressure ionization, electrospray (ionizzazione a pressione atmosferica, elettrospray), negativa (con MS)
20	ca.	circa
	CI, NH ₃	ionizzazione chimica (con ammoniaca)
	DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
	DMAP	4-(dimetilammino)piridina
25	DMSO	dimetilsolfossido

	ESTD	standardizzazione esterna
	H	ora(e)
	HPLC	cromatografia liquida a pressione elevata (high pressure liquid chromatography)
5	konz.	concentrato
	min.	minuti
	MS	spettrometria di massa
	MTBE	metil- <i>terz</i> -butiletere
10	NMR	spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (nuclear magnetic resonance spectroscopy)
	R _T	tempo di ritenzione (con HPLC)
	VTS	essiccatore sottovuoto ad armadio

Metodi HPLC generali:

Metodo 1 (HPLC): Strumento: HP 1050 con rilevamento a lunghezza d'onda variabile;
15 colonna: Phenomenex-Prodigy ODS (3) 100A, 150 mm x 3 mm, 3 µm; eluente A: (1,0 g KH₂PO₄ + 1,0 mL H₃PO₄) / 1 acqua, eluente B: acetonitrile; gradiente: 0 min 10% B, 25 min 80% B, 35 min 80% B; portata: 0,5 ml/min; Temp.: 45°C; rilevamento UV: 210 nm.

Metodo 2 (HPLC): Strumento: HP 1050 con rilevamento a lunghezza d'onda variabile;
20 colonna: Chiral AD-H, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm; eluente A: *n*-eptano + 0,2 % dietilammina, eluente B: isopropanolo + 0,2 % dietilammina; gradiente: 0 min 12,5 % B, 30 min 12,5 % B; portata: 1 ml/min; Temp.: 25°C; rilevamento UV: 250 nm.

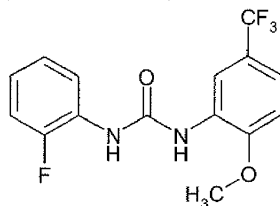
Metodo 3 (HPLC): Strumento: HP 1050 con rilevamento a lunghezza d'onda variabile;
colonna: Chiral AD-H, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm; eluente A: *n*-eptano + 0,2 % dietilammina, eluente B: isopropanolo + 0,2 % dietilammina; gradiente: 0 min 25 % B, 15 min 25 % B;
25 portata: 1 ml/min; Temp.: 30°C; rilevamento UV: 250 nm.

Esempi

A) Produzione di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico

Esempio 1A

- 5 *N*-(2-fluorofenil)-*N'*-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]urea



- 2-metossi-5-trifluorometilfenilisocianato (78 kg) viene fuso a ca. 35°C e disciolto in acetoneitrile (complessivamente ca. 270 l), poi viene aggiunta 2-fluoroanilina (39,9 kg) e si esegue lavaggio con acetoneitrile (ca. 25 l). La soluzione limpida risultante viene agitata per 4
- 10 h sotto riflusso e poi raffreddata fino a ca. 75°C. A questa temperatura la soluzione viene inoculata con germi cristallini del prodotto finale desiderato (200 g), agitata per altri 15 min. e poi raffreddata nel corso di 3 h fino a 0°C. Il prodotto cristallino ottenuto viene isolato attraverso centrifugazione, lavato con acetoneitrile freddo (due volte ca. 13 l) ed essiccato a 45°C nel VTS con azoto di trascinamento (ca. 3,5 h). Vengono quindi complessivamente
- 15 ottenuti 101,5 kg di *N*-(2-fluorofenil)-*N'*-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]urea come solido, corrispondente all'85,9 % della teoria.

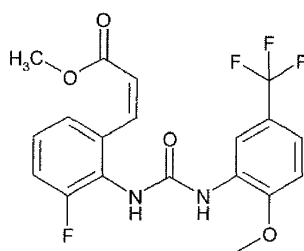
¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ = 8,93 (s, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,52 (d, ³J = 2,3, 2H), 7,55 (d, ²J = 7,7, 1H), 7,38-7,26 (m, 3H), 7,22 (d, ²J = 8,5, 1H), 4,00 (s, 3H) ppm;

MS (API-ES-pos.): m/z = 409 [(M+H)⁺, 100 %];

- 20 HPLC (metodo 1): R_T = 22,4 e 30,6 min.

Esempio 2A

Metil-(2Z)-3-[3-fluoro-2-({[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]carbamoil}ammino)-fenil]acrilato



In un primo reattore, *N*-(2-fluorofenil)-*N'*-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]urea (51 kg) vengono disciolti in acido acetico (ca. 430 l) sotto atmosfera di azoto. Alla soluzione formata si viene aggiunto metilacrilato (20,1 kg) e la sospensione formata si viene agitata fino al
5 successivo utilizzo. In un secondo reattore viene posto acido acetico (950 l), aggiunto con cautela oleum (57 kg) e disciolto palladio(II)acetato (7 kg) nella miscela ottenuta. La sospensione formata nel primo reattore viene a questo punto aggiunta, nel corso di circa 2 h, alla miscela ottenuta nel secondo reattore, la miscela di reazione venendo inondata con una miscela composta da 96% azoto e 4% ossigeno e la miscela di reazione ottenuta viene agitata
10 per ca. 18 h a temperatura ambiente. Successivamente, una parte dell'acido acetico (ca. 900 l) viene rimossa per distillazione, alla restante miscela di reazione viene aggiunta acqua (ca. 500 l) nel corso di ca. 1 h e la sospensione ottenuta viene agitata per 1 h. Il solido ottenuto viene rimosso per filtrazione, lavato una volta con una miscela di acido acetico e acqua (1 : 1) e due volte con acqua e in seguito essiccato a ca. 30 mbar e 50°C. Vengono quindi
15 complessivamente ottenuti 44,8 kg di *metil*-(2*Z*)-3-[3-*fluoro*-2-({[2-*metossi*-5-(*trifluorometil*)*fenil*]carbamoil}-ammino)*fenil*]acrilato come solido, corrispondenti al 65,0 % della teoria.

¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ = 9,16 (s, 1H), 8,84 (s, 1H), 8,45 (d, 1,7Hz, 1H), 7,73 (m, 2H), 7,33 (m, 3H), 7,22 (d, 8,6Hz, 1H), 6,70 (d, 16Hz, 1H), 3,99 (s, 3H), 3,71 (s, 3H) ppm;

20 MS (API-ES-pos.): m/z = 429,9 [(M+NH₄)⁺]; 412,9 [(M+H)⁺]

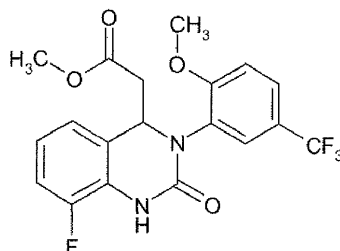
HPLC:R_T= 46,4 min.

Strumento: HP 1100 con rilevamento a lunghezza d'onda variabile; colonna: Phenomenex-Prodigy ODS (3) 100A, 150 mm x 3 mm, 3 μm; eluente A: (1,36 g KH₂PO₄ + 0,7 ml H₃PO₄)

/ l acqua, eluente B: acetonitrile; gradiente: 0 min 20% B, 40 min 45% B, 50 min 80% B, 65 min 80% B; portata: 0,5 ml/min; Temp.: 55°C; rilevamento UV: 210 nm.

Esempio 3A

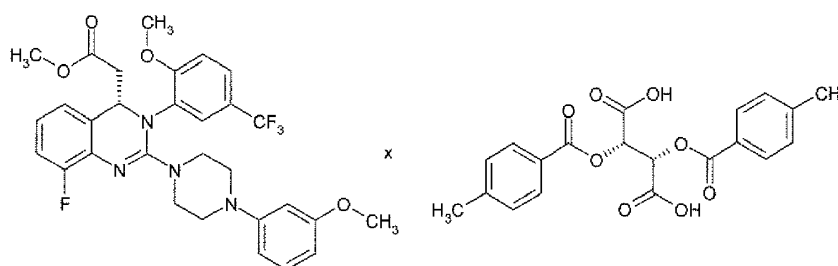
metilestere dell'acido {8-fluoro-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-2-osso-1,2,3,4-
5 tetraidrochinazolin-4-il}acetico



Il composto di esempio 2A (75 kg) viene sospeso in acetone (1600 l) e viene aggiunto DBU
(5,7 kg). La sospensione risultante viene riscaldata fino a riflusso e agitata sotto riflusso per 4
h. La soluzione ottenuta viene raffreddata a una temperatura di mantello di 55°C e filtrata
10 attraverso farina fossile. Una parte del solvente viene rimossa attraverso distillazione dalla
miscela di reazione (ca. 1125 l) e il riflusso residuo viene raffreddato per 2 h fino a 0°C. Il
solido formatosi viene rimosso per separazione attraverso centrifugazione e lavato due volte
con acetone freddo (ca. 15 l) ed essiccato per tutta la notte a 45°C sotto pressione ridotta con
azoto di trascinamento fino alla costanza della massa. Vengono quindi complessivamente
15 ottenuti 58,3 kg di *metilestere di acido {8-fluoro-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-2-osso-
1,2,3,4-tetraidrochinazolin-4-il}acetico* come solido, corrispondente all'84,1 % della teoria.
HPLC (metodo 1): $R_T = 19,4$ min.

Esempio 4A

metilestere di acido (2*S*,3*S*)-2,3-Bis[(4-metilbenzoil)ossi]succinico-metilestere di acido {(4*S*)-
20 8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)-piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-
diidrochinazolin-4-il}-acetico (1:1-sale) clorurazione/amminazione/cristallizzazione



Una soluzione di metilestere di acido {8-fluoro-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-2-osso-1,2,3,4-tetraidrochinazolin-4-il} acetico (esempio 3A, 129,2 kg) in clorobenzene (800 l) viene riscaldato fino a riflusso ed essiccato azeotropicamente. Viene aggiunto ossicloruro di fosforo (144 kg) e la miscela di reazione viene agitata per 3 h sotto riflusso. Successivamente viene aggiunto DBU (95 kg) e clorobenzene (45 l) e si agita per altre 9 h sotto riflusso. La miscela di reazione viene raffreddata fino a temperatura ambiente, idrolizzata attraverso aggiunta in acqua, diluita con clorobenzene (80 l) e neutralizzata con soluzione acquosa di ammoniaca (25%). Le fasi vengono separate e la fase organica viene lavata con acqua e il solvente rimosso per distillazione. Il residuo rimanente viene disciolto in diossano (170 l). Vengono aggiunti 3-metossifenilpiperazina (66 kg), DBU (52 kg) e altri 90 l di diossano e la miscela di reazione viene riscaldata per 4 h sotto riflusso. La miscela di reazione viene raffreddata a temperatura ambiente, miscelata con estere acetico (1300 l), lavata 1x con acqua, 3 x con 0.2 N HCl, e 1x con soluzione acquosa di NaCl e il solvente viene rimosso per distillazione. Il residuo ottenuto viene disciolto in estere acetico (800 l) e introdotto in una soluzione composta da acido (2*S*,3*S*)-2,3-Bis[(4-metilbenzoyl)ossi]succinico (121 kg) in estere acetico (600 l). La miscela risultante viene agitata per circa 60 min. a temperatura ambiente, poi inoculata con acido (2*S*,3*S*)-2,3-Bis[(4-metilbenzoyl)ossi]-succinico-metilestere di acido {(4*S*)-8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)-fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il} acetico e agitata per 3 giorni a temperatura ambiente. Successivamente si raffredda fino a 0 - 5°C e si agita per altre 3 h. La sospensione viene rimossa per aspirazione e lavata a porzioni con etilacetato. Si ottengono così complessivamente circa 141 kg (calcolati a secco) del sale

come solido, corrispondenti a circa il 46,2 % della teoria tramite tre stadi (clorurazione, amminazione e cristallizzazione) con riferimento al racemato.

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, d_6 -DMSO): $\delta = 7,90$ (d, $^2J = 7,8$, 4H), $7,56$ (d, $^2J = 8,3$, 1H), $7,40$ (d, $^2J = 7,8$, 4H), $7,28$ - $7,05$ (m, 4H), $6,91$ - $6,86$ (m, 2H), $6,45$ (d, $^2J = 8,3$, 1H), $6,39$ - $6,36$ (m, 2H),
5 $5,82$ (s, 2H), $4,94$ (m, 1H), $4,03$ (q, $^2J = 7,1$, 2H), $3,83$ (brs, 3H), $3,69$ (s, 3H), $3,64$ (s, 3H),
 $3,47$ - $3,36$ (m, 8H e acqua, 2H), $2,98$ - $2,81$ (m, 5H), $2,58$ - $2,52$ (m, 1H), $2,41$ (s, 6H), $1,99$ (s, 3H), $1,18$ (t, $^2J = 7,2$, 3H) ppm;

HPLC (metodo 1): $R_T = 16,6$ e $18,5$ min.

Esempio 5A

10 acido (2*S*,3*S*)-2,3-Bis[(4-metilbenzoi)ossi]succinico-metilestere di acido{(4*S*)-8-fluoro-2-[4-
{3-metossifenil}piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-{trifluorometil}fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-
il}acetico (1:1-sale) / ricristallizzazione acido (2*S*,3*S*)-2,3-Bis[(4-metilbenzoi)ossi]succinico
- metilestere di acido (S) {(4*S*)-8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-
(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico (1:1-sale) (141 kg, calcolato a secco)
15 viene sospeso in etilacetato (1400 l) e disciolto attraverso riscaldamento fino a riflusso (77°C).
La soluzione viene filtrata e raffreddata lentamente fino a temperatura ambiente. È così
avvenuta una cristallizzazione spontanea. La sospensione viene agitata per 16 h a RT,
successivamente raffreddata fino a 0-5°C e agitata per altre 3 h. La sospensione viene rimossa
per aspirazione e lavata con etilacetato freddo. I cristalli vengono essiccati per 16 h sottovuoto
20 a circa 40 °C. Vengono quindi complessivamente ottenuti 131,2 kg del sale come solido,
corrispondente al 93,0 % della teoria.

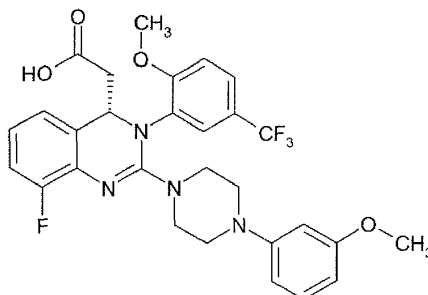
HPLC (metodo 1): $R_T = 16,9$ e $18,8$ min.;

HPLC (metodo 3): 99,9 % e.e.

Esempio 6A

25 Acido (S)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-(2-metossi-5-trifluorometilfenil)-

3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico



Una miscela di acido (2*S*,3*S*)-2,3-Bis[(4-metilbenzoi)ossi]succinico-metilestere di acido
{(4*S*)-8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-
5 diidrochinazolin-4-il}acetico (1:1-sale) (30,8 kg), bicarbonato di sodio (16.4 kg) e acqua (315
l) viene miscelato con MTBE (160 l). Le fasi vengono separate e la fase organica viene trattata
con 35 l di una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio al sette per cento circa. Le fasi
vengono separate e la fase organica viene miscelata con 125 l di una soluzione di idrossido di
sodio acquosa al quattro per cento circa. La miscela di reazione viene riscaldata fino al riflusso,
10 il solvente viene distillato delicatamente fino ad essiccazione e il contenuto del reattore viene
successivamente agitato per altre 5 h a 55 - 60 °C. La miscela di reazione viene poi miscelata
e agitata a circa 22 °C con MTBE (160 l) e acqua (65 l). Le fasi vengono separate e la fase
organica viene estratta con una soluzione acquosa di cloruro di sodio (30 l) al sei per cento
circa. Le fasi acquose raggruppate vengono agitate con acqua (25 l) e MTBE (160 l) e il valore
15 di pH viene impostato con approssimativamente IN di acido cloridrico fino a circa 6,5. La fase
organica viene rimossa per separazione, il solvente distillato delicatamente fino
all'essiccazione e il residuo disciolto in acetone (ca. 75 l). Viene eseguito uno scambio di
solvente con acetone (6 processi di distillazione con ciascuno ca. 130 l). Il prodotto obiettivo
viene successivamente fatto precipitare attraverso aggiunta in acqua, isolato attraverso
20 centrifugazione ed essiccato nell'essiccatore sottovuoto. Vengono quindi complessivamente
ottenuti 16,5 kg di *acido (S)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-(2-metossi-5-
trifluorometilfenil)-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico* come solido amorfo, corrispondenti al

96,4 % della teoria.

¹H NMR (300 MHz, d₆-DMSO): δ = 7,53 (d, ²J = 8,4, 1H), 7,41 (brs, 1H), 7,22 (d, ²J = 8,5, 1H), 7,09-7,01 (m, 2H), 6,86 (m, 2H), 6,45 (dd, ²J = 8,2, ³J = 1,8, 1H), 6,39-6,34 (m, 2H), 4,87 (t, ²J = 7,3, 1H), 3,79 (brs, 3H), 3,68 (s, 3H), 3,50-3,38 (m, 4H), 2,96-2,75 (m, 5H), 2,45-2,40 (m, 1H) ppm;

MS (API-ES-neg.): m/z = 571 [(M-H), 100 %];

HPLC (metodo 1): R_T = 15,1 min;

HPLC (metodo 2): 99,8 % e.e.; Pd (ICP): <1 ppm.

B) Esempi di realizzazione

10 **Esperimenti di cristallizzazione**

Esperimenti di cristallizzazione per l'individuazione di un sale cristallino adeguato di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico sono stati eseguiti sia per sali acidi, sia per sali basici. Gli esperimenti di cristallizzazione hanno avuto luogo partendo da acido (*S*)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico e dal rispettivo acido ovvero base, o attraverso sospensione nel solvente di volta in volta indicato per una settimana a 20°C, o attraverso una cristallizzazione attraverso raffreddamento/evaporazione a partire da una soluzione, mantenuta per 4 ore a 50°C, seguita da un lento raffreddamento fino a 20°C con una velocità di 3°C/ora.

20 I risultati degli esperimenti di cristallizzazione con acidi ovvero basi sono di seguito indicati in Tabella 1 e Tabella 2, l'abbreviazione API stando per acido (*S*)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico.

25 "API" è l'acronimo di "active pharmaceutical ingredient" (dall'inglese per principio farmaceutico attivo).

Tabella 1

<u>Esperimenti di cristallizzazione con utilizzo di controioni acidi</u>				
Controioni	Rapporto API: Controioni	Procedimento	solvente	Risultato (XRPD)
HCL	1:2	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile, metanolo e etanolo	
acido citrico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	
acido fosforico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile, metanolo e etanolo	
acido gluconico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	
acido lattico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	
acido maleico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	
acido succinico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	
acido solforico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	
acido tartarico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo

<u>Esperimenti di cristallizzazione con utilizzo di controioni acidi</u>				
Controioni	Rapporto API: Controioni	Procedimento	solvente	Risultato (XRPD)
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	
acido benzoico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	
acido fumarico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	
acido maleico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	
acido metansolfonico	1:1	raffreddamento	acetone, acetonitrile, metanolo, THF	amorfo
		sospensione	acqua, acetonitrile metanolo e etanolo	

Tabella 2

<u>Esperimenti di cristallizzazione con utilizzo di controioni basici</u>				
Controioni	Procedimento	solvente	Risultato	
NaOH	raffreddamento	acetone+isopropiletere 1:1, acetonitrile+isopropiletere 1:1,	cristallino: metanolo, etanolo amorfo: tutti	
	sospensione	metanolo+isopropiletere 1:1, THF e isopropiletere 1:1 acqua, acetonitrile, metanolo e etanolo	altro	
Erbumina	raffreddamento	acetone+isopropiletere 1:1, acetonitrile+isopropiletere 1:1,	amorfo	
	sospensione	metanolo+isopropiletere 1:1,		
	THF	THF e isopropiletere 1:1 acqua, acetonitrile, metanolo e etanolo		
2-ammino-2-metilpropanolo	raffreddamento	acetone+isopropiletere acetonitrile+isopropiletere 1:1,	amorfo	

<u>Esperimenti di cristallizzazione con utilizzo di controioni basici</u>			
Controioni	Procedimento	solvente	Risultato
	sospensione	metanolo+isopropiletere 1:1, THF e isopropiletere 1:1 acqua, acetonitrile, metanolo e etanolo	
2-ammino-2-metil-1,3-propandiolo	raffreddamento	acetone+isopropiletere 1:1, acetonitrile+isopropiletere 1:1,	cristallino: THF, acetonitrile amorfo: tutti gli altri
	sospensione	metanolo+isopropiletere 1:1, THF e isopropiletere 1:1 acqua, acetonitrile, metanolo e etanolo	
trometamina	raffreddamento	acetone+isopropiletere 1:1, acetonitrile+isopropiletere 1:1,	amorfo
	sospensione	metanolo+isopropiletere 1:1, THF e isopropiletere 1:1 acqua, acetonitrile, metanolo e etanolo	
dimetilamminoetanolo	raffreddamento	acetone+isopropiletere 1:1, acetonitrile+isopropiletere 1:1,	amorfo
	sospensione	metanolo+isopropiletere 1:1, THF e isopropiletere 1:1 acqua, acetonitrile, metanolo e etanolo	
lisina	raffreddamento	acetone+isopropiletere 1:1, acetonitrile+isopropiletere 1:1,	amorfo
	sospensione	metanolo+isopropiletere 1:1, THF e isopropiletere 1:1 acqua, acetonitrile, metanolo e etanolo	
N-(2-idrossietil)pirrolidina	raffreddamento	acetone+isopropiletere 1:1, acetonitrile+isopropiletere 1:1,	amorfo
sospensione	sospensione	metanolo+isopropiletere 1:1, THF e isopropiletere 1:1 acqua, acetonitrile, metanolo e etanolo	

Quello che colpisce in questi esperimenti è il fatto che, in generale, si è dimostrato estremamente difficile produrre sali cristallini di acido (S)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico, in particolare è evidente che la cristallizzazione ha fallito completamente con

5 l'utilizzo di controioni acidi.

Il sale 2-ammino-2-metil-1,3-propandiolo di acido (S)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico è piuttosto inadatto per l'elaborazione farmaceutica a causa del fatto che esso cristallizza esclusivamente in solventi organici quali tetraidrofurano e acetonitrile, il che può portare a

5 impurità indesiderate.

In considerazione dei risultati positivi ottenuti con idrossido di sodio, sono stati eseguiti ulteriori esperimenti di cristallizzazione utilizzando idrossidi di metalli alcalini ovvero di metalli alcalino-terrosi in presenza di condizioni di cristallizzazione analoghe a quelle del sale sodico. È qui emerso che è stato possibile ottenere ulteriori sali cristallini esclusivamente

10 utilizzando idrossido di calcio.

Esempio 1

Sale monosodico di acido (S)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico:

331,1 g di acido (S)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico (esempio 6A) vengono disciolti in un

15 pallone a tre colli da 2000 ml in 1300 ml di una miscela di etanolo e diisopropilere (1:1). Alla soluzione vengono aggiunti 21,9 g (546,84 mmol) di NaOH come solido. La miscela viene riscaldata per 25 min. fino a una temperatura interna di 50°C, venendo ottenuta una soluzione limpida di colore arancione. La soluzione così ottenuta viene agitata per 3 h a questa

20 temperatura, formandosi già dopo 1 h una sospensione diluita. La miscela di reazione viene successivamente raffreddata nel corso di 10 h, con una velocità di raffreddamento di 3°C/h, fino a una temperatura interna di 20°C e agitata per altre 5 h a questa temperatura. Il volume complessivo della miscela di reazione viene ridotto sottovuoto fino a ca. 750 ml e la sospensione ottenuta viene agitata a 20°C per 2 h. Successivamente, alla miscela di reazione

25 ottenuta vengono aggiunti 250 ml di diisopropilere nel corso di 10 min. e la miscela ottenuta

viene agitata per altre 2 h. Il prodotto cristallino ottenuto viene rimosso per aspirazione, lavato 2x con rispettivamente 250 ml di diisopropil etero ed essiccato a 20°C e 160 mbar per 20 h nell'essiccatore sottovuoto ad armadio. Il solido cristallino così ottenuto viene successivamente sottoposto ad essiccazione secondaria per 10 min. a 90°C in un essiccatore IR e per altre 16 h a 60°C nuovamente nell'essiccatore sottovuoto ad armadio. Si ottengono così complessivamente 274,4 g (86% della teoria) del sale sodico cristallino desiderato.

Esempio 2

Produzione del 3-idrato del sale monosodico di acido (S)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico:

Ca. 300 mg del sale sodico di esempio 1 vengono sospesi in 1 ml di etanolo (contenuto 4 % di acqua) e agitati a 25°C per una settimana. Il solido ottenuto viene rimosso per filtrazione e il residuo essiccato a temperatura ambiente in presenza di umidità ambiente. Il residuo ottenuto corrisponde al composto del titolo sottoforma di triidrato.

Il residuo ottenuto è stato analizzato mediante diffrazione dei raggi X. Il diffrattogramma qui ottenuto è rappresentato in Fig. 1.

Il diffrattogramma a raggi X è stato rilevato con un diffrattometro XRD a trasmissione/riflessione X'Pert PRO (PANalytical) a temperatura ambiente (irraggiamento: rame, K α 1, lunghezza d'onda: 1,5406 Å). Non è stata eseguita alcuna preparazione del campione.

Le liste dei picchi per il sale dell'esempio 2 nonché i sali degli esempi 3 e 4 sono riprodotti di seguito in Tabella 3.

Tabella 3

<u>Liste dei picchi del diffrattogramma su polvere dei sali di esempio 2, 3 e 4</u>		
2 Theta		
Esempio 2	Esempio 3	Esempio 4
6,2	4,6	6,0
9,4	6,1	6,2
11,3	6,3	7,6
12,4	7,6	9,0
12,9	8,8	9,4
15,6	9,2	9,6
16,4	10,6	10,7
16,8	11,0	11,2
17,9	11,2	11,6
18,6	11,6	12,1
18,9	12,2	12,4
19,9	12,3	13,1
20,9	12,6	15,1
21,5	12,8	15,4
21,8	13,0	16,0
22,4	13,3	16,1
22,7	13,9	16,3
23,5	14,5	16,6
24,9	15,3	16,9
25,2	15,5	17,4
25,9	16,2	17,7
26,4	16,3	18,2

<u>Liste dei picchi del diffrattogramma su polvere dei sali di esempio 2, 3 e 4</u>		
2 Theta		
Esempio 2	Esempio 3	Esempio 4
26,7	16,5	18,3
27,2	16,7	18,9
27,4	17,0	19,2
28,1	17,5	19,5
28,5	17,7	19,8
29,5	18,1	20,0
30,1	18,5	20,5
30,8	18,7	20,7
31,2	19,4	21,3
32,1	19,7	21,8
32,5	20,5	22,0
32,8	20,8	22,4
33,3	21,3	22,7
34,9	21,5	23,8
35,6	21,7	24,2
36,2	22,2	24,5
36,8	22,3	25,4
36,8	23,0	26,2
37,9	23,3	26,3
	23,7	26,5
	24,2	27,0
	24,8	27,5

<u>Liste dei picchi del diffrattogramma su polvere dei sali di esempio 2, 3 e 4</u>		
2 Theta		
Esempio 2	Esempio 3	Esempio 4
	25,4	28,3
	25,9	29,4
	26,3	31,5
	26,5	34,1
	26,9	35,9
	27,3	37,0
	27,9	37,3
	28,2	
	28,7	
	29,0	
	29,3	
	30,5	
	31,9	
	32,4	
	33,1	
	34,1	
	34,1	
	36,0	
	37,4	

Esempio 3

Produzione del 2,5 idrato del sale di calcio di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico:

10 g di acido (S)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico (esempio 6A) vengono disciolti in un pallone a tre colli da 50 ml in 45 ml di etanolo e alla soluzione formatasi vengono aggiunti 1,294 g di Ca(OH₂) come solido nella forma di una polvere. La sospensione ottenuta viene
5 riscaldata nel corso di 25 min. fino a 50°C e poi agitata per 3 h a questa temperatura. Alla sospensione ottenuta in questo modo vengono aggiunti 62,6 g di acqua e la soluzione così ottenuta viene raffreddata fino a 0°C. Alla soluzione così ottenuta vengono aggiunti germi cristallini precedentemente prodotti e la sospensione presentante un prodotto parzialmente oleoso viene riscaldata fino a temperatura ambiente e lasciata a riposo per 72 h a temperatura
10 ambiente. La sospensione ottenuta viene nuovamente raffreddata fino a 0°C e agitata per 2 h a questa temperatura. Il prodotto cristallino ottenuto viene rimosso per filtrazione e lavato 2x con rispettivamente 15 ml di una miscela di etanolo e acqua 1:1 e poi essiccato a 50°C e 160 mbar nell'essiccatore sottovuoto ad armadio. Vengono ottenuti complessivamente 7,4 g (68,5% della teoria) del sale come solido cristallino.

15 Utilizzando il solido cristallino ottenuto nell'esempio 3 è stato rilevato, alle stesse condizioni menzionate nell'esempio 2, un diffrattogramma su polvere XRD, rappresentato in Fig. 2.

Esempio 4

3,5-idrato del sale di calcio di acido (S)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico

20 Circa 100 mg del sale ottenuto nell'esempio 3 vengono sospesi in 1 ml di etanolo acqua 1:1 e la sospensione ottenuta viene agitata per 1 settimana a 25°C. Il solido cristallino ottenuto viene rimosso per filtrazione e il residuo ottenuto essiccato a temperatura ambiente e umidità ambiente. Il residuo ottenuto corrisponde al 3,5-idrato del sale di calcio di acido (S)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-
25 diidrochinazolin-4-il}acetico.

Utilizzando il solido cristallino ottenuto nell'esempio 4 è stato tracciato, alle stesse condizioni menzionate nell'esempio 2, un diffrattogramma su polvere XRD, rappresentato in Fig. 3.

C) Determinazioni di solubilità

Per la determinazione della solubilità, dal sale di esempio 2 è stata preparata una soluzione
5 satura in tampone fosfato a pH 7,0 e la stessa è stata agitata a temperatura ambiente per 2 h.
Le sospensioni ottenute sono state filtrate tramite un filtro a siringa (diametro dei pori 0,45
µm) e le soluzioni limpide sono state misurate in seguito a diluizione per HPLC. Come
campione zero è stato utilizzato tampone fosfato puro. La solubilità è stata calcolata
sull'assorbimento di una soluzione di riferimento dello zwitterione amorfo in tampone fosfato.
10 I risultati della misurazione sono rappresentati di seguito in Tabella 4.

Tabella 4

Composto	Solubilità in tampone [mg/ml]
Esempio 6a	0,4 (a pH 7)
Esempio 2	> 91,7

D) Valutazione dell'efficacia fisiologica

L'efficacia in vitro dei composti secondo l'invenzione sulla replicazione dell'HCMV
(Citomegalovirus umano) può essere mostrata nel seguente saggio antivirale: Test di riduzione
15 della fluorescenza per HCMV.

I composti sperimentali vengono impiegati come soluzioni 50 millimolari (mM) in
dimetilsolfossido (DMSO). Come composti di riferimento possono essere utilizzati ad
esempio Ganciclovir®, Foscarnet® o Cidofovir®. Un giorno prima dell'inizio del test, $1,5 \times$
 10^4 di fibroblasti di prepuzio umani (cellule NHDF)/pozzetto sono stati seminati in 200 µl di
20 terreno di coltura cellulare nei pozzetti B2-G11 di piastre da 96 pozzetti (neri con fondo
trasparente). I pozzetti situati ai bordi di ciascuna piastra da 96 pozzetti vengono riempiti
solamente con 200µl di terreno, per evitare effetti margine. Il giorno dell'esperimento, il

terreno di coltura cellulare dei pozzetti B2 - G11 di ciascuna piastra da 96 pozzetti viene aspirato via e sostituito da 100µl di sospensione virale (molteplicità di infezione (MOI): 0.1-0.2). Il virus utilizzato è un HCMV ricombinante, che ha una cassetta di espressione per la proteina fluorescente verde (GFP) integrata nel genoma del virus (HCMV AD 169 RV-HG(E. M. Borst, K. Wagner, A. Binz, B. Sodeik, and M. Messerle, 2008, J. Virol. 82:2065-2078.).

5 Dopo un tempo di incubazione di 2h a 37°C e 5% di CO₂, l'inoculato virale viene aspirato via e tutti i pozzetti, ad eccezione dei pozzetti nella colonna 3, vengono riempiti con 200µl di terreno di coltura cellulare. La colonna 2 non viene trattata ulteriormente e funge da controllo virale. I pozzetti nella colonna 3 vengono riempiti rispettivamente in doppia determinazione

10 con 300µl di sostanza sperimentale (diluata in terreno di coltura cellulare). La concentrazione della rispettiva sostanza antivirale in colonna 3 corrisponde a 27 volte la concentrazione del valore EC₅₀ rispettivamente atteso. La sostanza sperimentale in colonna 3 viene diluita in 8 passaggi 1:3 sulla piastra da 96 pozzetti, trasferendo di volta in volta 100µl di una colonna nella colonna di volta in volta a destra, e miscelandoli qui con i 200µl di terreno di coltura

15 cellulare presenti. In questo modo vengono testate tre sostanze antivirali in doppia determinazione. Le piastre vengono incubate 7 giorni a 37°C / 5% CO₂. In seguito, tutti i pozzetti di una piastra 3 x vengono lavati con PBS (tampone fosfato salino) lavati e riempiti con 50 µl di PBS. In seguito l'intensità della GFP di ciascun pozzetto di una piastra da 96 pozzetti viene determinata per mezzo di un apparecchio di lettura di fluorescenza (FluoBox;

20 Bayer Technology Services GmbH; impostazioni di filtro: GFP, Ex 480nm, Em 520nm). Dai valori di misurazione così ottenuti può essere rilevato l'EC₅₀ di una sostanza anti-HCMV:

EC₅₀ (GFP-RA) = concentrazione di sostanza in µM che riduce del 50% la fluorescenza di GFP in cellule infettate rispetto al controllo virale non trattato.

Dati di lavoro in vitro rappresentativi per i composti secondo l'invenzione sono riportati in

25 Tabella 5:

Tabella 5

Virus-ceppo	Esempio 6A EC₅₀ [µM]	Esempio 2 EC₅₀ [µM]	Ganciclovir EC₅₀ [µM]
AD169 RV- HG	0.0034	0.0039	2.2

E) Preparazioni farmaceutiche

I composti secondo l'invenzione possono essere trasformati in preparazioni farmaceutiche nel modo seguente:

5 **i.v. Soluzione:**

Per la produzione di una prima soluzione madre 1,0 g del sale di esempio 2 viene disciolto in 10 ml di acqua per iniezione, e si agita fino a ottenere una soluzione limpida. Questa soluzione viene aggiunta lentamente a una soluzione di tampone fosfato 20 mM per produrre soluzioni per la somministrazione intravenosa con concentrazioni di 5 mg/ml ovvero 10 mg/ml. I valori di pH delle rispettive soluzioni erano di circa pH 7,6 (5 mg/ml) e circa pH 7,7 (10 mg/ml). Al termine, le soluzioni ottenute vengono filtrate in modo sterile e versate in contenitori adatti sterilizzati. I contenitori vengono chiusi con tappi per infusione e cappucci flangiati.

Eventualmente le soluzioni così prodotte possono essere liofilizzate per lo stoccaggio prima della chiusura, e successivamente ricostituite per l'utilizzo.

15 **Compressa:**

Per la produzione di una formulazione orale solida il sale dell'esempio 2 (50%) viene setacciato e miscelato con calcio idrogeno fosfato diidrato (48%), croscarmellosa sodica (5%), polivinilpirrolidone (5%) e gel di silice colloidale (1%). Successivamente viene aggiunto magnesio stearato setacciato (1%). Questa miscela compressa viene poi direttamente trasformata in compresse.

F) Purezza

Sale di sodio di acido S(+)- {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)-fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il} acetico:

Esecuzione:

313,1 g di acido S(+)- {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico sono stati posti in palloni da 2000 ml con giunti smerigliati piatti. In seguito sono stati aggiunti 1300 ml di una miscela di EtOH (denaturato)/diisopropiletere (1:1), nonché 21,9 g di pastiglie di NaOH. Mediante controllo della temperatura interna la miscela è stata riscaldata a una temperatura interna di 50°C (T_m=51°C) per 25 minuti. Le pastiglie di NaOH si sciolgono; si forma una soluzione limpida di colore arancione. La miscela è stata agitata per tre ore, così da formare una sospensione. Nelle successive 10 ore la miscela è stata raffreddata, con una velocità di raffreddamento di 3°C all'ora, fino a una temperatura interna di 20°C e agitata per altre cinque ore a questa temperatura. Si è così formata una sospensione più densa con un volume complessivo di 1500 ml in un pallone con giunti smerigliati piatti, dei quali 400 ml sono volume di cristalli. Il volume complessivo viene ridotto sottovuoto a 110 fino a 90 mbar fino a circa 750 ml; temperatura interna 17-25°C, temperatura di mantello 35-50°C, distillato: 273 g. Quest'ultimo è stato agitato per ca. due ore. Nel corso di 10 minuti sono stati aggiunti 250 ml di diisopropiletere e si è agitato per due ore. Il prodotto ottenuto in questo modo viene isolato e lavato due volte con rispettivamente 250 ml di diisopropiletere; resa a umido: 284,8 g; M/W: 805,4 g. Il prodotto ottenuto è stato essiccato nel VTS a 50°C sotto atmosfera di azoto a ca. 160 mbar per 20 ore; peso finale 279,4 g. Questo prodotto è stato sottoposto alla seguente analisi.

Analisi

Determinazione del contenuto di sodio

200 mg di sostanza sperimentale (sale di sodio di acido S(+)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico) vengono convenzionalmente miscelati con HNO₃ in eccesso e digeriti in un sistema

di digestione sottopressione supportato da micropozzetti (secondo il metodo 2011-0606601 Currenta, Leverkusen). Viene analizzato il contenuto di sodio della soluzione mediante spettroscopia di assorbimento atomico a fiamma (secondo il metodo 2011-0267201 Currenta, Leverkusen).

- 5 Risultato: Sale di sodio di acido S(+)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico: 3,5 % p/p sodio

Modificazione raggi X: cristallina

Determinazione del solvente residuo: 0,03 % p/p diisopropiletere

Analisi HPLC

- 10 Analisi delle seguenti impurità specifiche e non specifiche di sale sodico di acido S(+)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico.

chinazolilpiperazina

acido di-p-toluoiltartarico

- 15 chinazolildipiperazina

chinazolinetilestere

singole impurità non specifiche

mediante cromatografia liquida a pressione elevata (HPLC);

Metodo in fase inversa;

- 20 Rilevamento: Intervallo UV;

Analisi: Metodo di percentuale di area con fattori di correzione di area

Apparecchiature

1. Cromatografo liquido a pressione elevata con comparto colonne termostato, rilevatore UV e sistema di valutazione dei dati

- 25 2. Colonna metallica in acciaio inossidabile

lunghezza:	15 cm
Diametro interno:	3,0 mm
riempimento:	Prodigy ODS III, 3 µm

Reagenti

1. acetonitrile, per l'HPLC
2. diidrogenofosfato di potassio, p.a.
3. acido o-fosforico all'85%, p.a.

5 **Soluzione di prova**

campione di ca. 22 mg di sale di sodio di acido S(+)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico; pesato in modo esatto, viene disciolto in acetonitrile a 50,0 ml.

Soluzione di calibrazione

- 10 standard di riferimento di ca. 22 mg di acido S(+)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico; pesato in modo esatto, viene disciolto in acetonitrile a 50,0 ml.

Soluzione di confronto

- 15 Una soluzione di confronto è stata prodotta in modo analogo alla soluzione di calibrazione, che contiene in aggiunta le impurità organiche (chinazolilpiperazina, acido di-p-toluoltartarico, chinazolildipiperazina, chinazolinetilestere) in quantità ridotta.

Condizioni HPLC

- 20 Le condizioni indicate valgono come valori orientativi e possono essere eventualmente adattate alle possibilità tecniche del cromatografo e alle proprietà della rispettiva colonna, allo scopo di ottenere separazioni ottimali.

Agente eluente

A. sciogliere 1,36 g di diidrogenofosfato di potassio e 0,7 ml di acido o-fosforico all'85% con

acqua a 1000,0 ml

B. acetonitrile

Portata

0,5 ml/min

5 **Temperatura del comparto colonne**

55 °C

Rilevamento

Lunghezza d'onda misurata:	210 nm
Larghezza di banda:	4 nm

Volume di iniezione

3 µl

10 **Tempo di equilibrio**

10 min (in presenza di condizioni di partenza)

Gradiente

tempo [min]	% A	% B
0,00	80	20
40,00	55	45
50,00	20	80
65,00	20	80

Tempo di processo del cromatogramma

65 min

15 **Precisione**

La deviazione standard relativa delle superfici di 6 iniezioni dello standard di riferimento deve essere $\leq 1,5\%$.

Esecuzione:

Sottoporre a cromatografia soluzione di prova, soluzione di calibrazione e soluzione di confronto in presenza delle condizioni indicate.

	RT [min]	RRT	RF
BAY 73-6327	circa 27,9	1,00	1,00
acido di-p-toluoltartarico	circa 30,5	1,09	1,94
chinazolilpiperazina	circa 34,4	1,24	1,02
chinazolinetilestere	circa 38,1	1,37	1,05
chinazolildipiperazina	circa 42,9	1,54	0,81

Valutazione

Integrazione elettronica delle superfici di picco.

5 **Calcolo del contenuto delle impurità organiche (HPLC)**

Metodo di percentuale di area con fattori di correzione di area (RF), se disponibile.

Risultato

Sale di sodio di acido S(+)-{8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico:

10 99,9% F1%

0,0 F1% per impurità organiche note

0,07 F1% impurità non specifiche più grandi

0,0907 F1% singole componenti secondarie non specifiche più grandi

88,0 % p/p

15 Per il cromatogramma HPLC l'analisi dello stesso, si vedano le figure 4 e 5.

* * * * *

RIVENDICAZIONI

1. Sale di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico o un suo solvato, scelto dal gruppo

costituito dai sali di sodio cristallini di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico, dai sali di calcio cristallini di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico e loro solvati.

- 5 2. Sale secondo la rivendicazione 1, trattandosi del sale monocalcico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico o un suo solvato.
3. Sale secondo la rivendicazione 2, trattandosi del 2,5-idrato del sale monocalcico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-
- 10 diidrochinazolin-4-il}acetico.
4. Sale secondo la rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto che esso, nel diffrattogramma su polvere XRD, mostra picchi caratteristici a circa 6.1, 9.2 e 15.5 gradi 2-theta.
5. Sale secondo la rivendicazione 2, trattandosi del 3,5-idrato del sale monocalcico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-
- 15 diidrochinazolin-4-il}acetico.
6. Sale secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che esso, nel diffrattogramma su polvere XRD, mostra picchi caratteristici a circa 6.2, 12.4 e 22.4 gradi 2-theta.
7. Sale secondo la rivendicazione 1, trattandosi del sale monosodico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-
- 20 il}acetico o un suo solvato.
8. Sale secondo la rivendicazione 7, trattandosi del 3-idrato del sale monosodico di acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}acetico.
9. Sale secondo la rivendicazione 8, caratterizzato dal fatto che esso, nel diffrattogramma su
- 25 polvere XRD, mostra picchi caratteristici a circa 6.2, 20.9 e 22.4 gradi 2-theta.

10. Procedimento per la produzione di un sale secondo una delle rivendicazioni 1 - 9 con i seguenti passaggi:

- a.) disciogliere acido {8-fluoro-2-[4-(3-metossifenil)piperazin-1-il]-3-[2-metossi-5-(trifluorometil)fenil]-3,4-diidrochinazolin-4-il}-acetico o un suo solvato in una miscela
5 composta da almeno un (C₁-C₄)-dialchil etero e almeno un (C₁-C₄)-alcol, eventualmente sotto riscaldamento.
- b.) aggiungere NaOH o Ca(OH)₂ alla soluzione ottenuta nel passaggio a.),
- c.) rimuovere una parte del solvente dalla soluzione ottenuta nel passaggio b.) ed eventualmente inoculare con germi cristallini, allo scopo di indurre la cristallizzazione del sale
10 ovvero di un solvato di un sale,
- d.) separare il sale o suo solvato cristallizzato nel passaggio c.),
- e.) eventualmente agitare il sale o solvato ottenuto nel passaggio d.) in un solvente idoneo, preferibilmente in una miscela composta da acqua e almeno un (C₁-C₄)-alcol per ottenere un solvato desiderato, e
- 15 f.) essiccare il sale o solvato ottenuto nel passaggio d.) o e.).

11. Sale secondo una delle rivendicazioni 1 - 9 per l'uso in un procedimento per il trattamento e/o la profilassi di malattie, in particolare di infezioni virali, preferibilmente di infezioni causate da HCMV o da un altro rappresentante del gruppo dei virus dell'Herpes.

12. Medicinale contenente un sale secondo una delle rivendicazioni 1 - 9 in combinazione con
20 almeno un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

13. Medicinale secondo la rivendicazione 12 per l'uso in un procedimento per il trattamento e/o la profilassi di infezioni virali, preferibilmente di infezioni causate da HCMV o da un altro rappresentante del gruppo dei virus dell'Herpes.

14. Sale secondo una delle rivendicazioni 1 - 9 per l'uso come medicinale in particolare come
25 medicinale per il trattamento e/o la profilassi di malattie, in particolare di infezioni virali,

preferibilmente di infezioni causate da HCMV o da un altro rappresentante del gruppo dei virus dell'Herpes.

15. Uso di un sale secondo una delle rivendicazioni 1 - 9 per la produzione di un farmaco per il trattamento e/o la profilassi di infezioni virali preferibilmente di infezioni causate da HCMV
5 o da un altro rappresentante del gruppo dei virus dell'Herpes.

16. Sale secondo una delle rivendicazioni 1 - 9 o medicinale secondo la rivendicazione 12 o 13 per l'uso nel combattere infezioni virali, preferibilmente infezioni causate da HCMV o da un altro rappresentante del gruppo dei virus dell'Herpes in un essere umano e un animale che necessita di un simile trattamento.

10

* * * * *

Traduzione delle diciture riportate sui disegni

Tavola 1-3/5

Figura 1-3

<Intensität> = <intensità>

15 **Tavola 4/5**

Figura 4

<Na-Salz> = <sale di sodio>

<Minuten> = <minuti>

Tavola 5/5

20 **Figura 5**

<Peak-höhe> = <altezza del picco>

<Fläche> = <superficie>

<Bezeichnung> = <Denominazione>

<bericht. Einzelwert> = <valore singolo riportato>

25 <Sum> = somma

<fehlt> = <assente>

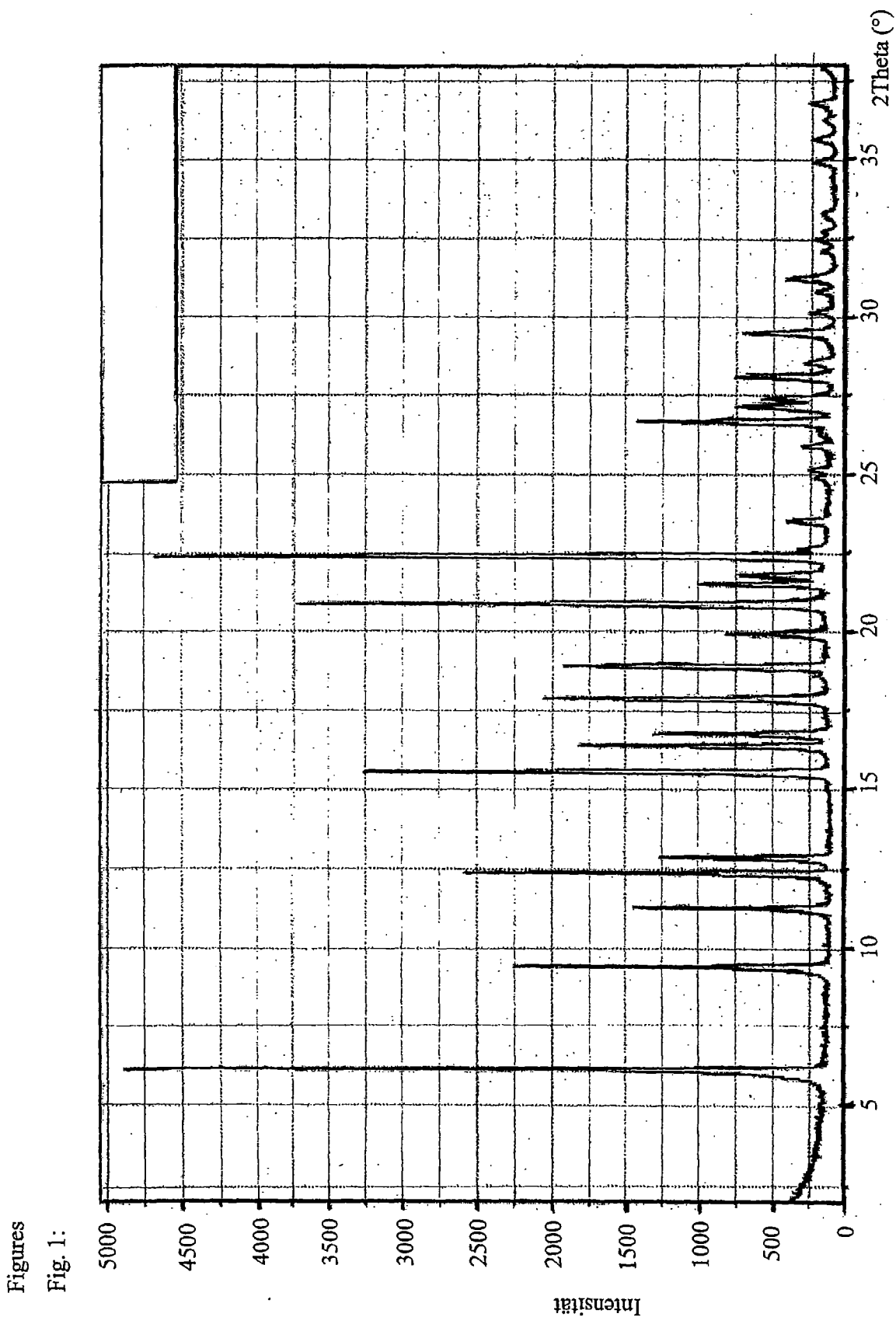
<Na-Salz> = <sale di sodio>

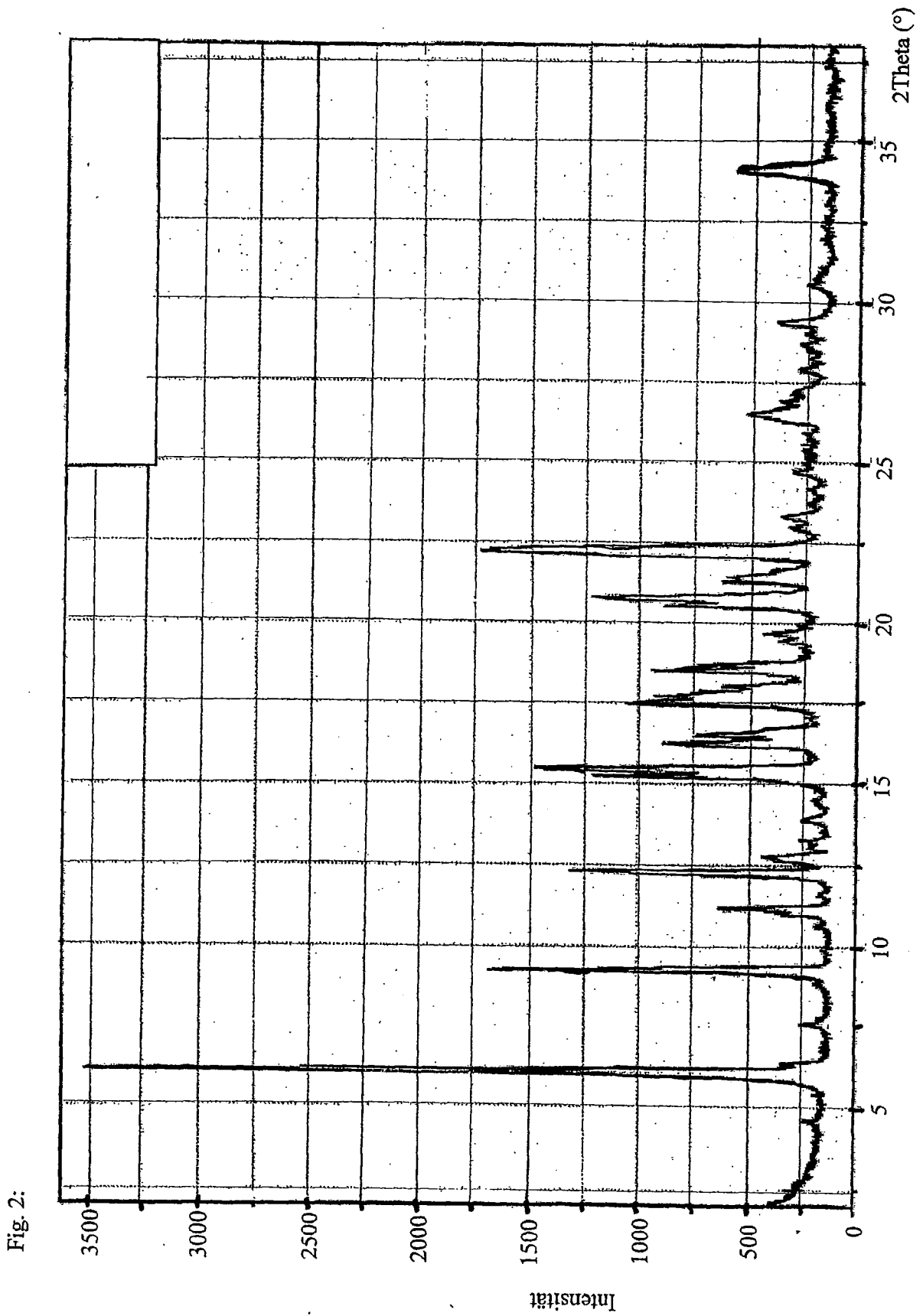
<Di-p-toluoylweinsäure> = <acido di-p-toluoil tartarico>

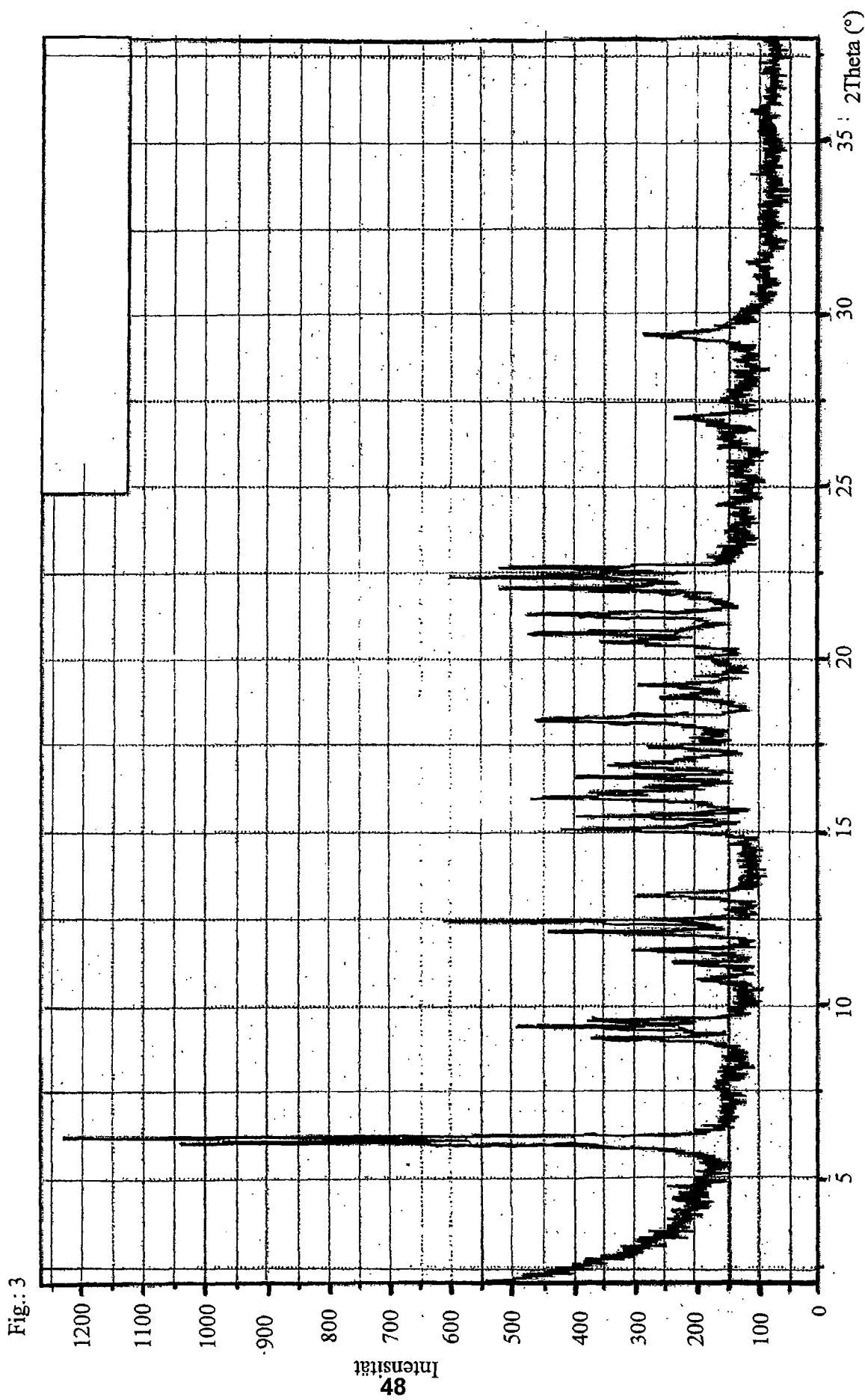
<Chinazolylpiperazin> = <Chinazolilpiperazina>

5 <Chinazolinethylester> = <Chinazolinetilestere>

<Chinazolylidipiperazin> = <Chinazolildipiperazina>







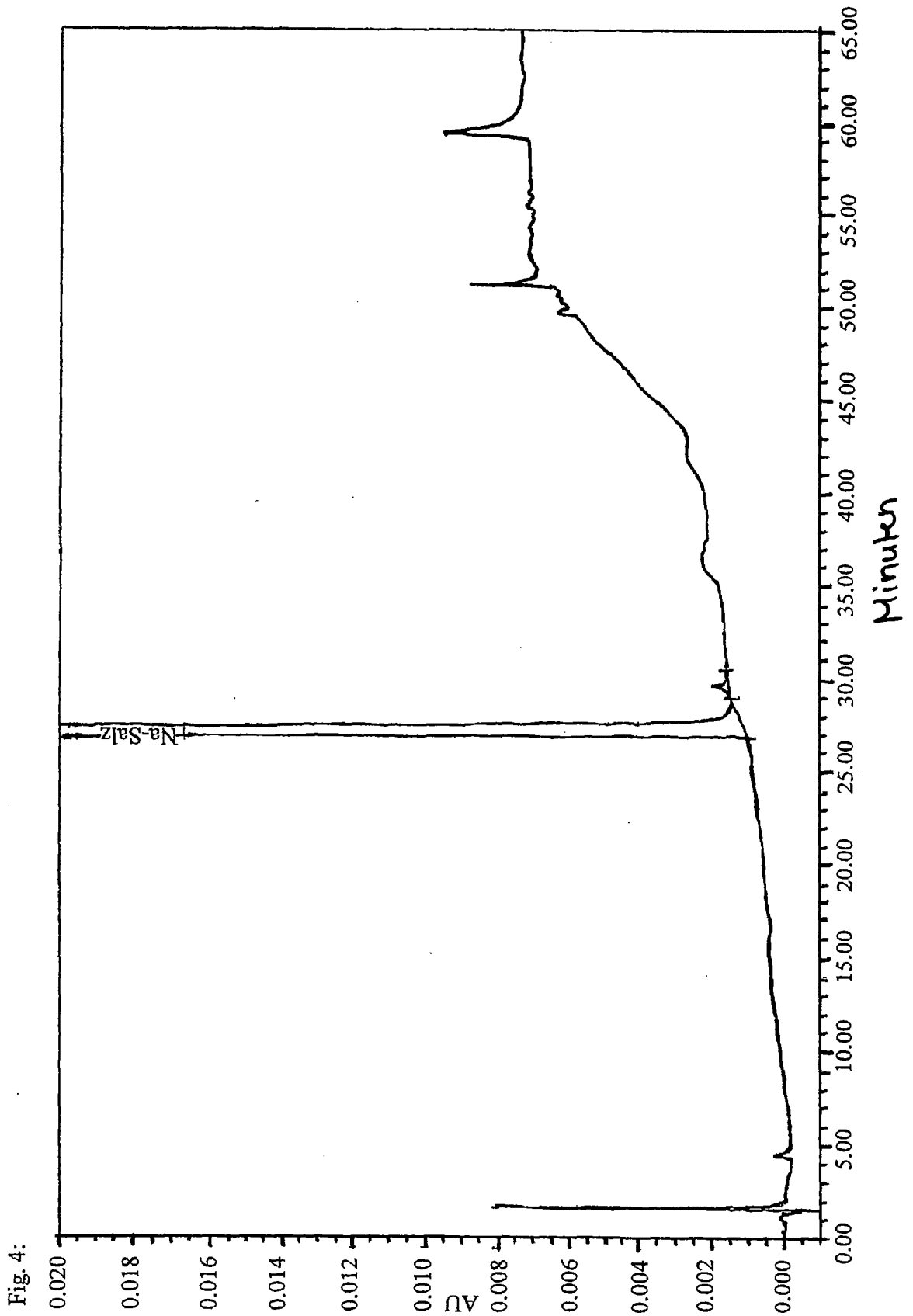


Fig. 4:

Fig. 5:

	RT	RRT	Peak- höhe (μ AU)	Code	Fläche (μ V*sec)	FKF	Norm%	Bezeichnung	bericht. Einzel- wert
1	26.986	1.00	538852	BB	9219786	1.00	99.9093	Na-Salz	99.9093
2	29.050			fehlt				Di-p-toluylweinsäure	
3	29.640	1.10	427	BB	8373		0.0907		0.0907
4	33.407			fehlt				Chinazoldipiperazin	
5	36.932			fehlt				Chinazolinethylester	
6	41.822			fehlt				Chinazoldipiperazin	
Sum							100.0000		