

SIB EX4568R

P065535SM:DJW/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° **13740185.7**, pubblicazione n° **2872488**

a nome di **Fibrogen, Inc.**

di **409 Illinois Street, San Francisco, California 94158, U.S.A.**

* * * * *

"FORME CRISTALLINE DI UN INIBITORE DI PROLIL IDROSSILASI"

DESCRIZIONE

Campo

La presente descrizione si riferisce a forme solide cristalline di acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico, al procedimento di preparazione delle forme, e a loro composizioni farmaceutiche e metodi d'uso.

Stato della tecnica

Un composto può esistere in una o più forme cristalline. Le forme cristalline di una sostanza medicinale possono avere proprietà fisiche diverse, tra cui punto di fusione, solubilità, velocità di dissoluzione, proprietà ottiche e meccaniche, tensione di vapore, igroscopicità, forma delle particelle, densità e scorrevolezza. Queste proprietà possono avere un effetto diretto sulla capacità di elaborare e/o produrre un composto come prodotto farmaceutico. Le forme cristalline possono anche manifestare stabilità e biodisponibilità differenti. La forma cristallina più stabile di un prodotto farmaceutico viene spesso scelta durante lo sviluppo del farmaco in base al potenziale minimo di conversione in un'altra forma cristallina e alla sua maggiore stabilità chimica. Per garantire la qualità, la sicurezza e l'efficacia di un prodotto farmaceutico, è importante scegliere una forma cristallina stabile, prodotta in modo riproducibile e con proprietà fisico-chimiche favorevoli.

Acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico (di seguito, il composto A) è un potente inibitore del fattore inducibile per ipossia (HIF) prolil idrossilasi, come descritto in Brevetto U.S.A. N. 7.323.475. Gli inibitori della prolil idrossilasi HIF sono utili per aumentare la stabilità e/o l'attività di HIF, e sono utili tra l'altro per il trattamento e prevenzione dei disturbi associati a HIF, inclusi anemia, ischemia e ipossia.

SOMMARIO

La presente descrizione soddisfa questi bisogni e altri fornendo forme cristalline di Composto A, sali e solvati. La presente descrizione fornisce anche una forma amorfa del Composto A. La presente descrizione fornisce anche composizioni farmaceutiche comprendenti forme amorfe o una o più forme cristalline del Composto A. La descrizione fornisce anche procedimenti per preparare le forme solide amorfe e cristalline e metodi per usarle per trattare e prevenire disturbi associati a HIF, incluse condizioni che comportano anemia, ischemia e ipossia.

Pertanto, una realizzazione fornita è acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino (Composto A Forma A) caratterizzato da un diffrattogramma da polvere a raggi X che comprende il seguente picchi: 8,5, 12,8, 16,2, 21,6, 22,9 e 27,4 °2θ ± 0,2 °2θ.

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino emi-idrato (Composto A Forma B) caratterizzato da un diffrattogramma a raggi X da polvere comprendente i seguenti picchi: 4,2, 8,3, e 16,6 °2θ ± 0,2 °2θ.

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino esafluoropropan-2-olo solvato (Composto A Forma C) caratterizzato da un diffrattogramma a raggi X da polvere comprendente i seguenti picchi: 4,5, 13,7, e 16,4 °2θ ± 0,2 °2θ.

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino DMSO:acqua solvato (Composto A Forma D) caratterizzato da un diffrattogramma a raggi X da polvere comprendente i seguenti picchi: 8,4, 8,5, e 16,8 °2θ ± 0,2 °2θ.

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino sale di sodio (Composto A sale di sodio) caratterizzato da un diffrattogramma a raggi X da polvere comprendente i seguenti picchi: 5,3, 16,0, e 21,6 °2θ ± 0,2 °2θ.

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino sale di L-arginina (Composto A sale di L-arginina) caratterizzato da un diffrattogramma a raggi X da polvere comprendente i seguenti picchi: 20,8, 21,8, e 25,4 °2θ ± 0,2 °2θ.

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino sale di L-lisina (Composto A sale di L-lisina) caratterizzato da un diffrattogramma a raggi X da polvere comprendente i seguenti picchi: 19,8, 20,7, e 21,2 °2θ ± 0,2 °2θ.

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino sale di etanolammina (Composto A sale di etanolammina) caratterizzato da un diffrattogramma a raggi X da polvere comprendente i seguenti picchi: 21,8, 22,7, e 27,1 °2θ ± 0,2 °2θ.

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino sale di

dietanolammina (Composto A sale di dietanolammina) caratterizzato da un diffrattogramma a raggi X da polvere comprendente i seguenti picchi: 16,9, 23,7, e 25,0 °2θ± 0,2 °2θ.

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino sale di trometamina (Composto A sale di trometamina) caratterizzato da un diffrattogramma a raggi X da polvere comprendente i seguenti picchi: 10,1, 14,2, e 21,1 °2θ ± 0,2 °2θ.

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico amorfo (Composto A amorfo).

È descritto anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico sostanzialmente amorfo sale di potassio (Composto A sale di potassio).

Ancora un'altra realizzazione fornita è diretta ad una composizione farmaceutica comprendente Composto A Forma A, ed un eccipiente accettabile farmaceuticamente.

Inoltre, la descrizione fornisce in una realizzazione Composto A Forma A per l'uso in un metodo per trattare, pretrattare o ritardare l'insorgenza o la progressione di una condizione mediata almeno in parte dal fattore inducibile dall'ipossia (HIF). Il metodo comprende la somministrazione a un paziente che ne ha bisogno di una quantità terapeuticamente efficace di Composto A Forma A.

Inoltre è fornito Composto A Forma A per l'uso in un metodo per trattare, pretrattare o ritardare l'insorgenza o la progressione di una condizione mediata almeno in parte da eritropoietina (EPO), comprendente la somministrazione a un paziente che ne ha bisogno, di una quantità terapeuticamente efficace del Composto A Forma A.

È fornito anche Composto A Forma A per l'uso in un metodo per trattare, pretrattare o ritardare l'insorgenza o la progressione di anemia, comprendente la somministrazione a un paziente che ne ha bisogno, di una quantità terapeuticamente efficace di Composto A Forma A.

È fornito anche Composto A Forma A per l'uso in un metodo di inibizione dell'attività di un enzima HIF idrossilasi, il metodo comprendente il mettere in contatto l'enzima HIF idrossilasi e una quantità terapeuticamente efficace di Composto A Forma A.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

FIG. 1 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A.

FIG. 2 è una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) di Composto A Forma A.

FIG. 3 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma B (in basso) riportato in grafico con un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in alto).

FIG. 4 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A Forma B.

FIG. 5 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma C (in basso) riportato in grafico con un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in alto).

FIG. 6 è una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in alto) e un'analisi termogravimetrica (TGA) (in basso) di Composto A Forma C.

FIG. 7 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma D.

FIG. 8 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A Forma D.

FIG. 9 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A sale di sodio come isolato (in basso) e a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 10 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A sale di sodio.

FIG. 11 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A sale di L-arginina come isolato (in basso) e a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 12 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A sale di L-arginina.

FIG. 13 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A sale di L-lisina come isolato (in basso) e a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 14 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale

(DSC) (in basso) di Composto A sale di L-lisina.

FIG. 15 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in basso), Composto A sale di etanolammina modello 1 come isolato (secondo dal basso), Composto A sale di etanolammina modello 3 a 40°C/75% RH (in mezzo), Composto A sale di etanolammina modello 2 come isolato (secondo dall'alto), e Composto A sale di etanolammina modello 2 a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 16 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A sale di etanolammina.

FIG. 17 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in basso), Composto A sale di dietanolammina modello 1 from acetone (secondo dal basso), Composto A sale di dietanolammina modello 1 da THF (secondo dall'alto), e Composto A sale di dietanolammina a 40°C/75% RH (modello 2, in alto).

FIG. 18 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A sale di dietanolammina.

FIG. 19 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in basso), e Composto A sale di trometamina come isolato (in mezzo) e a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 20 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A sale di trometamina.

FIG. 21 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A sale di potassio come isolato (in basso) e a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 22 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A sale di potassio.

FIG. 23 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A amorfo.

FIG. 24 è l'analisi termogravimetrica (TGA) di Composto A Forma A.

FIG. 25 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in basso), e Composto A sale di acido cloridrico come isolato (in mezzo) e a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 26 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale

(DSC) (in basso) di Composto A sale di acido cloridrico.

FIG. 27 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in basso), e Composto A sale di acido solforico come isolato (in mezzo) e a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 28 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A sale di acido solforico.

FIG. 29 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in basso), Composto A sale di acido metansolfonico modello 1 come isolato (secondo dal basso) e a 40°C/75% RH (in mezzo), e Composto A sale di acido metansolfonico modello 2 come isolato (secondo dall'alto) e a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 30 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A sale di acido metansolfonico.

FIG. 31 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in basso), Composto A sale di bis trietilammina come isolato (in mezzo) e Composto A sale di bis trietilammina a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 32 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A sale di bis trietilammina.

FIG. 33 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in basso), e Composto A sale semi-calcio (seconda raccolta) a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 34 è un'analisi termogravimetrica (TGA) (in alto) e una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) (in basso) di Composto A sale semi-calcio.

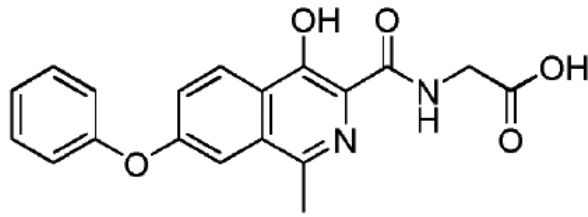
FIG. 35 è un modello di diffrazione di raggi X da polvere di Composto A Forma A (in basso), e Composto A sale semi-magnesio (seconda raccolta) a 40°C/75% RH (in alto).

FIG. 36 è una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) di Composto A sale semi-magnesio.

FIG. 37 è la configurazione molecolare di Composto A Forma A.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA

Il composto acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico (Composto A) è un potente inibitore di fattore inducibile da ipossia (HIF) proli idrossilasi e ha la seguente formula:

**Composto A**

La presente descrizione fornisce forme cristalline del Composto A, sali del Composto A e solvati del Composto A. La presente descrizione fornisce anche una forma amorfa del Composto A. La presente descrizione fornisce anche composizioni farmaceutiche comprendenti forme amorse o cristalline del Composto A. La descrizione fornisce anche procedimenti per la realizzazione delle forme solide amorse e cristalline e metodi per usarli per trattare e prevenire i disturbi associati a HIF, include condizioni che comportano anemia, ischemia e ipossia.

Prima di discutere in dettaglio, saranno definiti i seguenti termini.

1. Definizioni

Come qui usati, i seguenti termini hanno i seguenti significati.

Le forme singolari "un", "uno" e "il" e simili includono riferimenti plurali a meno che il contesto non indichi chiaramente il contrario. Così, per esempio, il riferimento a "un composto" include sia un singolo composto che una pluralità di composti diversi.

Il termine "circa" quando usato prima di una designazione numerica, ad esempio temperatura, tempo, quantità e concentrazione, compreso un intervallo, indica approssimazioni che possono variare di $\pm 10\%$, $\pm 5\%$ o $\pm 1\%$.

Il termine "solvato" si riferisce a un complesso formato dalla combinazione del composto A e di un solvente.

I termini "sostanzialmente amorfo" e "per lo più amorfo" si riferiscono al Composto A amorfo in cui può essere presente una piccola quantità di Composto A cristallino. In alcune realizzazioni, la quantità di composto A cristallino è inferiore a circa il 10%, o inferiore a circa il 5%, o inferiore a circa 2%, o inferiore a circa 1%, o inferiore a circa 0,2% o inferiore a circa 0,1 %.

"Somministrazione" si riferisce all'introduzione di un agente in un paziente. Può essere somministrata una quantità terapeutica, che può essere determinata dal medico curante o simile. Una via orale di somministrazione è preferita per le forme cristalline del Composto A qui descritto. I termini e le frasi correlate "somministrare" e

"somministrazione di", quando usati in connessione con un composto o una composizione farmaceutica (e equivalenti grammaticali) si riferiscono sia alla somministrazione diretta, che può essere somministrata ad un paziente da un medico o ad auto-somministrazione da parte del paziente e/o somministrazione indiretta, che può essere l'atto di prescrivere un farmaco. Ad esempio, un medico che istruisce un paziente ad auto-somministrarsi un farmaco e/o fornisce al paziente una prescrizione per un farmaco è il somministrare il farmaco al paziente. In ogni caso, la somministrazione comporta il rilascio del farmaco al paziente.

"Eccipiente" come usato nella presente indica una sostanza inerte o inattiva usata nella produzione di prodotti farmaceutici, inclusa senza alcuna limitazione qualsiasi sostanza usata come legante, disintegrante, rivestimento, ausilio di compressione/incapsulamento, crema o lozione, lubrificante, parenterale, dolcificante o aromatizzante, agente di sospensione/gelificazione o agente di granulazione a umido. I leganti includono *ad es.*, carbopol, povidone, gomma di xantano, *ecc.*; i rivestimenti includono, *ad es.*, ftalato acetato di cellulosa, etilcellulosa, gomma di gellano, maltodestrina, *ecc.*; gli ausili di compressione/incapsulamento includono *ad es.*, carbonato di calcio, destrosio, fruttosio, miele, lattosio (anidro o monoidrato, opzionalmente in combinazione con aspartame, cellulosa o cellulosa microcristallina), amido, saccarosio, *ecc.*; i disintegranti includono, *ad es.*, sodio croscarmellosso, gomma gellan, sodio amido glicolato, *ecc.*; creme e lozioni includono, *ad es.*, maltodestrina, carragenina, *ecc.*; i lubrificanti includono *ad es.*, magnesio stearato, acido stearico, sodio stearil fumarato, *ecc.*; materiali per compresse masticabili includono, *ad es.*, destrosio, fruttosio *dc*, lattosio (monoidrato, opzionalmente in combinazione con aspartame o cellulosa), *ecc.*; i parenterali includono *ad es.*, mannitolo, povidone, *ecc.*; i plastificanti includono *ad es.*, dibutil sebacato, polivinilacetato ftalato, *ecc.*; agenti sospendenti/gelificanti includono, *ad es.*, carragenina, sodio amido glicolato, gomma di xantano, *ecc.*; gli edulcoranti includono *ad es.*, aspartame, destrosio, fruttosio, sorbitolo, saccarosio, *ecc.*; e gli agenti di granulazione a umido includono, *ad es.*, carbonato di calcio, maltodestrina, cellulosa microcristallina, *ecc.*

"Quantità terapeuticamente efficace" o "quantità terapeutica" si riferisce a una quantità di un farmaco o di un agente che, somministrata a un paziente affetto da una condizione, avrà l'effetto terapeutico previsto, ad esempio, attenuazione, miglioramento, palliazione o eliminazione di uno o più manifestazioni della condizione nel

paziente. La quantità terapeuticamente efficace varierà a seconda del soggetto e della condizione da trattare, il peso e l'età del soggetto, la gravità della condizione, la particolare composizione o eccipiente scelto, il regime di dosaggio da seguire, i tempi di somministrazione, le modalità di somministrazione e simili, ognuno dei quali può essere facilmente determinato da una persona di ordinaria esperienza nella tecnica. L'effetto terapeutico completo non si verifica necessariamente con la somministrazione di una dose e può verificarsi solo dopo la somministrazione di una serie di dosi. Pertanto, una quantità terapeuticamente efficace può essere somministrata in una o più somministrazioni. Ad esempio, e senza limitazione, una quantità terapeuticamente efficace di un agente, nel contesto del trattamento dell'anemia, si riferisce ad una quantità dell'agente che allevia, migliora, lenisce o elimina uno o più sintomi di anemia nel paziente.

"Trattamento", "trattando" e "trattare" sono definiti nel senso di agire su una malattia, disturbo o condizione con un agente per ridurre o migliorare gli effetti dannosi o altri effetti indesiderati della malattia, disturbo o condizione e/o loro sintomi. Il trattamento, come qui usato, copre il trattamento di un paziente umano e include: (a) ridurre il rischio di insorgenza della condizione in un paziente determinato per essere predisposto alla malattia ma non ancora diagnosticato come affetto dalla condizione, (b) impedire lo sviluppo della condizione, e/o (c) alleviare la condizione, cioè provocare la regressione della condizione e/o alleviare uno o più sintomi della condizione.

Un "modello XRPD" è un grafico x-y con l'angolo di diffrazione (cioè, $^{\circ}2\theta$) sull'asse x e l'intensità sull'asse y. I picchi all'interno di questo modello possono essere usati per caratterizzare una forma solida cristallina. Come con qualsiasi misura di dati, c'è variabilità nei dati XRPD. I dati sono spesso rappresentati unicamente dall'angolo di diffrazione dei picchi piuttosto che dall'intensità dei picchi poiché l'intensità del picco può essere particolarmente sensibile alla preparazione del campione (ad esempio, la dimensione delle particelle, il contenuto di umidità, il contenuto di solvente e gli effetti di orientamento preferiti influenzano la sensibilità), quindi campioni dello stesso materiale preparati in condizioni diverse possono produrre modelli leggermente diversi; questa variabilità è solitamente maggiore della variabilità degli angoli di diffrazione. Anche la variabilità dell'angolo di diffrazione può essere sensibile alla preparazione del campione. Altre fonti di variabilità derivano

dai parametri dello strumento e dall'elaborazione dei dati di raggi X grezzi: strumenti a raggi X differenti funzionano usando parametri diversi e questi possono portare a modelli XRPD leggermente diversi dalla stessa forma solida, e analogamente pacchetti software differenti elaborano dati di raggi X in maniera differente, e anche questo porta a variabilità. Queste e altre fonti di variabilità sono note agli esperti nella tecnica farmaceutica. A causa di tali fonti di variabilità, è normale assegnare una variabilità di $\pm 0,2 \text{ }^\circ 2\theta$ agli angoli di diffrazione nei modelli XRPD.

2. Forme solide del composto A

Come descritto in generale sopra, la presente descrizione fornisce forme solide di acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico (Composto A).

Composto A Forma A è caratterizzato dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere che comprende picchi a 8,5, 16,2, e 27,4 $^\circ 2\theta \pm 0,2 \text{ }^\circ 2\theta$. Il diffrattogramma comprende picchi addizionali a 12,8, 21,6, e 22,9 $^\circ 2\theta \pm 0,2 \text{ }^\circ 2\theta$. Forma A è caratterizzata anche dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere completo come sostanzialmente mostrato in Figura 1.

In alcune realizzazioni, Forma A è caratterizzata dalla sua curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 223°C. Forma A è caratterizzata anche dalla sua curva DSC completa come sostanzialmente mostrato in Figura 2.

Composto A Forma B è caratterizzato dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere che comprende picchi a 4,2, 8,3, e 16,6 $^\circ 2\theta \pm 0,2 \text{ }^\circ 2\theta$. Il diffrattogramma comprende picchi addizionali a 12,5, 14,1, e 17,4 $^\circ 2\theta \pm 0,2 \text{ }^\circ 2\theta$. Forma B è caratterizzata anche dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere completo come sostanzialmente mostrato in Figura 3.

Forma B può essere caratterizzata dalla sua curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 222°C, Forma B è caratterizzata anche dalla sua curva DSC completa come sostanzialmente mostrato in Figura 4.

Composto A Forma C è caratterizzato dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere che comprende picchi a 4,5, 13,7, e 16,4 $^\circ 2\theta \pm 0,2 \text{ }^\circ 2\theta$. Il diffrattogramma comprende picchi addizionali a 15,4, 15,5, e 20,6 $^\circ 2\theta \pm 0,2 \text{ }^\circ 2\theta$.

Forma C è caratterizzata anche dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere completo come sostanzialmente mostrato in Figura 5.

Forma C può essere caratterizzata dalla sua curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 222°C, Forma C è caratterizzata anche dalla sua curva DSC completa come sostanzialmente mostrato in Figura 6.

Composto A Forma D è caratterizzato dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere che comprende picchi a 8,4, 8,5, e 16,8 °2θ ± 0,2 °2θ. Il diffrattogramma comprende picchi addizionali a 4,2, 12,6, e 28,4 °2θ ± 0,2 °2θ. Forma D è caratterizzata anche dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere completo come sostanzialmente mostrato in Figura 7.

Forma D può essere caratterizzata dalla sua curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 222°C, Forma D è caratterizzata anche dalla sua curva DSC completa come sostanzialmente mostrato in Figura 8.

Composto A sale di sodio è caratterizzato dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere che comprende picchi a 5,3, 16,0, e 21,6 °2θ ± 0,2 °2θ. Il diffrattogramma comprende picchi addizionali a 18,7, 19,2, e 24,0 °2θ ± 0,2 °2θ. Composto A sale di sodio è caratterizzato anche dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere completo come sostanzialmente mostrato in Figura 9.

Composto A sale di sodio può essere caratterizzato dalla sua curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 314°C, Composto A sale di sodio è caratterizzato anche dalla sua curva DSC completa come sostanzialmente mostrato in Figura 10.

Composto A sale di L-arginina è caratterizzato dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere che comprende picchi a 20,8, 21,8, e 25,4 °2θ ± 0,2 °2θ. Il diffrattogramma comprende picchi addizionali a 22,7, 23,4, e 26,4 °2θ ± 0,2 °2θ. Composto A sale di L-arginina è caratterizzato anche dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere completo come sostanzialmente mostrato in Figura 11.

Composto A sale di L-arginina può essere caratterizzato dalla sua curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 210°C. Composto A sale di L-arginina è caratterizzato

anche dalla sua curva DSC completa come sostanzialmente mostrato in Figura 12.

Composto A sale di L-lisina è caratterizzato dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere che comprende picchi a 19,8, 20,7, e 21,2 °2θ ± 0,2 °2θ. Il diffrattogramma comprende picchi addizionali a 10,2, 16,9, e 18,4 °2θ ± 0,2 °2θ. Composto A sale di L-lisina è caratterizzato anche dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere completo come sostanzialmente mostrato in Figura 13.

Composto A sale di L-lisina può essere caratterizzato dalla sua curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 237°C. Composto A sale di L-lisina è caratterizzato anche dalla sua curva DSC completa come sostanzialmente mostrato in Figura 14.

Composto A sale di etanolamina è caratterizzato dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere che comprende picchi a 21,8, 22,7, e 27,1 °2θ ± 0,2 °2θ. Il diffrattogramma comprende picchi addizionali a 21,1, 26,2, e 26,6 °2θ ± 0,2 °2θ. Composto A sale di etanolamina è caratterizzato anche dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere completo come sostanzialmente mostrato in Figura 15.

Composto A sale di etanolamina può essere caratterizzato dalla sua curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 171°C. Composto A sale di etanolamina è caratterizzato anche dalla sua curva DSC completa come sostanzialmente mostrato in Figura 16.

Composto A sale di dietanolamina è caratterizzato dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere che comprende picchi a 16,9, 23,7, e 25,0 °2θ ± 0,2 °2θ. Il diffrattogramma comprende picchi addizionali a 19,6, 22,6, e 26,0 °2θ ± 0,2 °2θ. Composto A sale di dietanolamina è caratterizzato anche dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere completo come sostanzialmente mostrato in Figura 17.

Composto A sale di dietanolamina può essere caratterizzato dalla sua curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 150°C. Composto A sale di dietanolamina è caratterizzato anche dalla sua curva DSC completa come sostanzialmente mostrato in Figura 18.

Composto A sale di trometamina è caratterizzato dal suo diffrattogramma di raggi X da polvere che comprende picchi a 10,1, 14,2, e 21,1 °2θ ± 0,2 °2θ. Il diffrattogramma comprende picchi addizionali a 20,1, 25,7, e 28,4 °2θ ± 0,2 °2θ. Composto A sale di trometamina è caratterizzato anche dal suo diffrattogramma di raggi X da

polvere completo come sostanzialmente mostrato in Figura 19.

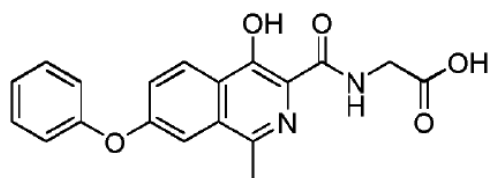
Composto A sale di trometamina può essere caratterizzato dalla sua curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 176°C. Composto A sale di trometamina è caratterizzato anche dalla sua curva DSC completa come sostanzialmente mostrato in Figura 20.

È fornito anche acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico amorfo (Composto A amorfo) e acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico sostanzialmente amorfo sale di potassio (Composto A sale di potassio). Il Composto A sale di potassio sostanzialmente amorfo è stato caratterizzato da una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 291°C (Figura 22).

Come descritto negli Esempi seguenti, Forma A è la forma cristallina più stabile tra Forma B, C, e D di Composto A.

3. Composizioni farmaceutiche, formulazioni e vie di somministrazione

In un aspetto, la presente descrizione è rivolta ad una composizione farmaceutica comprendente una o più forme cristalline di acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico (Composto A) avente la seguente struttura:



Composto A

o un suo sale, e almeno un eccipiente accettabile farmaceuticamente.

La composizione farmaceutica comprende il Composto A Forma A e almeno un eccipiente accettabile farmaceuticamente.

In una realizzazione, la composizione farmaceutica comprende il Composto A in Forma A. In una realizzazione, la composizione farmaceutica comprende composto A in cui almeno circa l'85% del composto A è in forma A.

In una realizzazione, la composizione farmaceutica comprende il composto A in cui almeno circa il 90% del

composto A è in forma A. In una realizzazione, la composizione farmaceutica comprende il composto A in cui almeno circa il 95% del composto A è in forma A. In una realizzazione, la composizione farmaceutica comprende il composto A in cui almeno circa 99% del composto A è in forma A. In una realizzazione, la composizione farmaceutica comprende il composto A in cui almeno circa il 99,5% del composto A è in forma A. In una realizzazione, la composizione farmaceutica comprende il composto A in cui almeno circa 99,9% del Composto A è in Forma A. In una realizzazione, la composizione farmaceutica comprende il Composto A in cui almeno circa il 99,99% del Composto A è in Forma A.

In una realizzazione, la composizione farmaceutica comprende inoltre un agente terapeutico aggiuntivo scelto dal gruppo costituito da vitamina B12, acido folico, solfato ferroso, eritropoietina umana ricombinante e un agente stimolante l'eritropoiesi (ESA). In un'altra realizzazione, la composizione farmaceutica è formulata per somministrazione orale. In un'altra realizzazione, la composizione farmaceutica è formulata come una compressa o una capsula.

Le forme cristalline della presente descrizione possono essere fornite direttamente o in composizioni farmaceutiche insieme ad eccipienti adatti, come è ben noto nella tecnica. Vari trattamenti qui realizzati possono comprendere la somministrazione di una quantità efficace di una forma cristallina della descrizione a un soggetto che ne ha bisogno, ad esempio un soggetto che ha o è a rischio di anemia dovuta, *ad es.*, ad insufficienza renale cronica, diabete, cancro, AIDS, radioterapia, chemioterapia, dialisi renale o chirurgia. In una realizzazione, il soggetto è un soggetto mammifero, e in una realizzazione, il soggetto è un soggetto umano.

Una quantità efficace di una forma cristallina può essere determinata facilmente tramite sperimentazione di routine, così come la via di somministrazione più efficace e conveniente e la formulazione più appropriata. In una realizzazione, il dosaggio può variare da 0,05 mg/kg a circa 700 mg/kg al giorno. Tipicamente, il dosaggio può variare da circa 0,1 mg/kg a circa 500 mg/kg; da circa 0,5 mg/kg a circa 250 mg/kg; da circa 1 mg/kg a circa 100 mg/kg; da circa 1 mg/kg a circa 10 mg/kg; da circa 1 mg/kg a circa 5 mg/kg; o da circa 1 mg/kg a circa 2 mg/kg. Ad esempio, il dosaggio può essere di circa 1,0 mg/kg; circa 1,2 mg/kg; circa 1,5 mg/kg; circa 2,0 mg/kg; o circa 2,5 mg/kg. Varie formulazioni e sistemi di somministrazione di farmaci sono disponibili nella

tecnica (si veda, ad esempio, Gennaro, A.R., ed. (1995) Remington's Pharmaceutical Sciences).

Vie di somministrazione adatte possono, ad esempio, includere somministrazione orale, rettale, transmucosa, nasale o intestinale e parenterale, incluse iniezioni intramuscolari, sottocutanee, intramidollari, nonché iniezioni intratecali, intraventricolari, endovenose, intraperitoneali, intranasali o intraoculari dirette. La forma cristallina o sua composizione possono essere somministrate in un modo locale piuttosto che sistemico. Ad esempio, una forma cristallina o una sua composizione possono essere rilasciate mediante iniezione o in un sistema di somministrazione mirato del farmaco, come una formulazione a deposito o a rilascio prolungato. In una realizzazione, la via di somministrazione è orale.

Le composizioni farmaceutiche della presente descrizione possono essere fabbricate mediante qualsiasi dei metodi ben noti nella tecnica, ad esempio per mezzo di procedimenti convenzionali di miscelazione, dissoluzione, granulazione, produzione di confetti, levigatura, emulsione, incapsulamento, intrappolamento o liofilizzazione. Come menzionato sopra, le composizioni possono includere uno o più eccipienti accettabili farmaceuticamente che facilitano il trattamento di molecole attive in preparazioni per uso farmaceutico.

La formulazione corretta dipende dalla via di somministrazione scelta. Per l'iniezione, per esempio, la composizione può essere formulata in soluzioni acquose, preferibilmente in tamponi fisiologicamente compatibili come soluzione di Hanks, soluzione di Ringer o tampone fisiologico salino. Per la somministrazione trans-mucosa o nasale, nella formulazione vengono usati penetranti appropriati alla barriera da permeare. Tali penetranti sono generalmente noti nella tecnica. In una realizzazione preferita della presente descrizione, le presenti forme cristalline vengono preparate in una formulazione destinata alla somministrazione orale. Per la somministrazione orale, esso può essere formulato facilmente combinando le forme cristalline con eccipienti accettabili farmaceuticamente ben noti nella tecnica. Tali eccipienti consentono di formulare le forme cristalline della descrizione come compresse, pillole, confetti, capsule, liquidi, gel, sciroppi, impasti, sospensioni e simili, per l'ingestione orale da parte di un soggetto. Le forme cristalline possono anche essere formulate in composizioni rettali come supposte o clisteri di ritenzione, *ad es.*, contenenti basi di supposte convenzionali

come burro di cacao o altri gliceridi.

Preparazioni farmaceutiche per uso orale possono essere ottenute usando eccipienti solidi, opzionalmente macinando una miscela risultante ed elaborando la miscela di granuli, dopo aver aggiunto ausiliari adatti, se desiderato, per ottenere compresse o nuclei di confetti. Adatti eccipienti sono, ad esempio, riempitivi come zuccheri, inclusi lattosio, saccarosio, mannitolo o sorbitolo; preparazioni di cellulosa come, per esempio, amido di mais, amido di frumento, amido di riso, amido di patata, gelatina, gomma adragante, metilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, sodio carbossimetilcellulosa, cellulosa microcristallina e/o polivinilpirrolidone (PVP o povidone). Se desiderato, si possono aggiungere agenti disintegranti, come polivinilpirrolidone reticolato, agar, sodio croscarmellosso o acido alginico o un suo sale come alginato di sodio. Inoltre, possono essere inclusi agenti umettanti come sodio dodecil solfato o lubrificanti come magnesio stearato.

I nuclei di confetti sono forniti con rivestimenti adatti. A tale scopo possono essere usate soluzioni concentrate di zucchero che possono opzionalmente contenere gomma arabica, talco, polivinilpirrolidone, gel di carbopol, polietilenglicole e/o biossido di titanio, soluzioni di lacca e solventi organici adatti o miscele di solventi. Coloranti o pigmenti possono essere aggiunti alle compresse o ai rivestimenti di confetti per identificare o caratterizzare diverse combinazioni di dosi attive.

Le preparazioni farmaceutiche per la somministrazione orale includono capsule "push-fit" fatte di gelatina, nonché capsule morbide sigillate fatte di gelatina e un plastificante, come glicerolo o sorbitolo. Le capsule "push-fit" possono contenere i principi attivi in miscela con cariche come lattosio, leganti come amidi e/o lubrificanti come talco o stearato di magnesio e, opzionalmente, stabilizzanti. Nelle capsule molli, le forme cristalline possono essere disciolte o sospese in liquidi adatti, come oli grassi, paraffina liquida o polietilenglicoli liquidi. Inoltre, possono essere aggiunti stabilizzanti. Tutte le formulazioni per somministrazione orale devono essere in dosi adatte a tale somministrazione.

In una realizzazione, le forme cristalline qui descritte possono essere somministrate per via transdermica, ad esempio attraverso un cerotto cutaneo, o per via topica. In un aspetto, le formulazioni transdermiche o topiche possono inoltre comprendere uno o più amplificatori di penetrazione o altri effettori, inclusi agenti che

migliorano la migrazione del composto rilasciato. La somministrazione transdermica o topica potrebbe essere preferita, ad esempio, in situazioni in cui si desidera un rilascio specifico per sito.

Per la somministrazione per inalazione, le forme cristalline per l'uso secondo la presente descrizione sono convenientemente fornite sotto forma di una presentazione di aerosol spray da confezioni pressurizzate o da un nebulizzatore, con l'uso di un propellente adatto, *ad es.*, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, anidride carbonica o qualsiasi altro gas adatto. Nel caso di un aerosol pressurizzato, l'unità di dosaggio appropriata può essere determinata fornendo una valvola per erogare una quantità misurata. Capsule e cartucce di, per esempio, gelatina, per l'uso in un inalatore o insufflatore possono essere formulate. Questi contengono tipicamente una miscela di polvere della forma cristallina e una base di polvere adatta come lattosio o amido.

Composizioni formulate per somministrazione parenterale per iniezione, *ad es.*, mediante iniezione di bolo o infusione continua possono essere presentate in forma di dosaggio unitario, *ad es.*, in fiale o in contenitori multi-dose, con un conservante aggiunto. Le composizioni possono assumere forme come sospensioni, soluzioni o emulsioni in veicoli oleosi o acquosi e possono contenere agenti di formulazione come agenti sospendenti, stabilizzanti e/o disperdenti. Le formulazioni per la somministrazione parenterale includono soluzioni acquose o altre composizioni in forma solubile in acqua.

Le sospensioni delle forme cristalline possono anche essere preparate come appropriate sospensioni oleose per iniezione. Adatti solventi o veicoli lipofili comprendono oli grassi come olio di sesamo e esteri di acidi grassi sintetici, come etil oleato o trigliceridi o liposomi. Le sospensioni di iniezione acquose possono contenere sostanze che aumentano la viscosità della sospensione, come sodio carbossimetilcellulosa, sorbitolo o destrano. Opzionalmente, la sospensione può anche contenere stabilizzanti o agenti adatti che aumentano la solubilità delle forme cristalline per consentire la preparazione di soluzioni altamente concentrate. In alternativa, il principio attivo può essere in forma di polvere per la costituzione con un veicolo adatto, *ad es.*, acqua sterile apirogena, prima dell'uso.

Come menzionato sopra, le composizioni della presente descrizione possono anche essere formulate come una

preparazione di deposito. Tali formulazioni a lunga durata d'azione possono essere somministrate per impianto (ad esempio, per via sottocutanea o intramuscolare) o per iniezione intramuscolare. Così, per esempio, le presenti forme cristalline possono essere formulate con adatti materiali polimerici o idrofobici (ad esempio come emulsione in un olio accettabile) o resine a scambio ionico, o come derivati poco solubili, per esempio come sale poco solubile.

Per qualsiasi composizione usata nei vari trattamenti qui realizzati, una dose terapeuticamente efficace può essere stimata inizialmente usando una varietà di tecniche ben note nella tecnica. Ad esempio, in un saggio di coltura cellulare, una dose può essere formulata in modelli animali per ottenere un intervallo di concentrazione circolante che include la CI_{50} come determinata nella coltura cellulare. Intervalli di dosaggio appropriati per soggetti umani possono essere determinati, ad esempio, usando dati ottenuti da saggi di colture cellulari e studi su animali non umani. In una realizzazione, il dosaggio può essere da 0,05 mg/kg a circa 700 mg/kg somministrato periodicamente. Il dosaggio può essere somministrato una volta al giorno, a giorni alterni, una, due o tre volte alla settimana o ad altri intervalli appropriati, come possono essere facilmente determinati dai medici competenti. In genere il dosaggio viene somministrato 2 o 3 volte a settimana. Tipicamente, il dosaggio può variare da circa 0,1 mg/kg a circa 500 mg/kg; da circa 0,5 mg/kg a circa 250 mg/kg; da circa 1 mg/kg a circa 100 mg/kg; da circa 1 mg/kg a circa 10 mg/kg; da circa 1 mg/kg a circa 5 mg/kg; o da circa 1 mg/kg a circa 2 mg/kg. Ad esempio, il dosaggio può essere di circa 1,0 mg/kg; circa 1,2 mg/kg; circa 1,5 mg/kg; circa 2,0 mg/kg; o circa 2,5 mg/kg.

Una dose terapeuticamente efficace di un composto si riferisce a quella quantità del composto che risulta in un miglioramento dei sintomi o un prolungamento della sopravvivenza in un soggetto. La tossicità e l'efficacia terapeutica di tali molecole possono essere determinate mediante procedure farmaceutiche standard in colture cellulari o animali sperimentali, ad esempio determinando la DL_{50} (la dose letale per il 50% della popolazione) e la CE_{50} (la dose terapeuticamente efficace nel 50% della popolazione). Il rapporto di dose tra effetti tossici e terapeutici è l'indice terapeutico, che può essere espresso come il rapporto DL_{50}/DE_{50} . I composti che mostrano alti indici terapeutici sono preferiti.

I dosaggi preferibilmente rientrano in un intervallo di concentrazioni circolanti che include la DE_{50} con poca o nessuna tossicità. I dosaggi possono variare entro questo intervallo a seconda della forma di dosaggio usata e della via di somministrazione usata. La formulazione esatta, la via di somministrazione e il dosaggio dovrebbero essere scelti, secondo metodi noti nella tecnica, in considerazione delle specificità della condizione di un soggetto.

La quantità e l'intervallo di dosaggio possono essere regolati individualmente per fornire livelli plasmatici della porzione attiva che sono sufficienti a modulare un parametro desiderato, ad esempio livelli plasmatici di eritropoietina endogena, *cioè* concentrazione minima efficace (MEC). La MEC varierà per ciascun composto ma può essere stimata, ad esempio, da dati *in vitro*. I dosaggi necessari per raggiungere la MEC dipenderanno dalle caratteristiche individuali e dalla via di somministrazione. Composti o loro composizioni dovrebbero essere somministrati usando un regime che mantiene i livelli plasmatici al di sopra della MEC per circa il 10-90% della durata del trattamento, preferibilmente circa il 30-90% della durata del trattamento e più preferibilmente tra il 50% e il 90%. Nei casi di somministrazione locale o di assorbimento selettivo, l'effettiva concentrazione locale del farmaco potrebbe non essere correlata alla concentrazione plasmatica. In alternativa, la modulazione di un parametro desiderato, ad esempio la stimolazione dell'eritropoietina endogena, può essere ottenuta mediante 1) somministrazione di una dose di carico seguita da una dose di mantenimento, 2) somministrazione di una dose di induzione per ottenere rapidamente il parametro desiderato, ad esempio livelli di eritropoietina, entro un intervallo bersaglio, seguito da una dose di mantenimento più bassa per mantenere, per esempio, l'ematocrito, entro un intervallo bersaglio desiderato, o 3) dosaggio intermittente ripetuto.

La quantità di composto o composizione somministrata dipenderà, naturalmente, da una varietà di fattori, tra cui sesso, età e peso del soggetto trattato, gravità della patologia, modo di somministrazione e giudizio del medico curante.

Le presenti composizioni possono, se desiderato, essere presentate in una confezione o dispositivo di erogazione contenente una o più forme di dosaggio unitarie contenenti l'ingrediente attivo. Una tale confezione o dispositivo può, per esempio, comprendere un foglio di metallo o di plastica, come un *blister*. La confezione o dispositivo di

erogazione può essere accompagnato da istruzioni per la somministrazione. Composizioni comprendenti una forma cristallina della descrizione formulate in un eccipiente farmaceutico compatibile possono anche essere preparate, collocate in un contenitore appropriato ed etichettate per il trattamento di una condizione indicata. Le condizioni adatte indicate sull'etichetta possono includere il trattamento di condizioni, disturbi o malattie in cui l'anemia è un'indicazione principale.

4. Metodo d'uso

Un aspetto della descrizione fornisce acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico (Composto A) Forma A, o una composizione comprendente Composto A Forma A per l'uso in trattare varie condizioni o disturbi come descritti nella presente. Essa fornisce anche la forma cristallina, o sua composizione o medicamento, per trattare, pretrattare o ritardare la progressione o l'insorgenza di varie condizioni o disturbi come qui descritti.

In una realizzazione, almeno circa l'85% del composto usato nel metodo è composto A di composizione A. In una realizzazione, almeno circa il 90% del composto usato nel metodo è Composto A Forma A. In una realizzazione, almeno circa il 95% del composto usato nel metodo è Composto A Forma A. In una realizzazione, almeno circa il 99% del composto usato nel metodo è Composto A Forma A. In una realizzazione, almeno circa il 99,5% del composto usato nel metodo è Composto A Forma A. In una realizzazione, almeno circa il 99,9% del composto usato nel metodo è Composto A Forma A. In una realizzazione, almeno circa il 99,99% del composto usato nel metodo è Composto A Forma A.

I medicinali o composizioni possono essere usati per modulare la stabilità e/o l'attività di HIF e quindi attivare l'espressione genica regolata da HIF. Il composto cristallino A forma A, o sua composizione o medicamento, può essere usato in metodi per trattare, pretrattare o ritardare la progressione o insorgenza di condizioni associate con HIF incluse, ma non limitate a, condizioni anemiche, ischemiche e ipossiche. In varie realizzazioni, il composto cristallino A forma A, o sua composizione o medicamento, viene somministrato immediatamente dopo una condizione che produce ischemia acuta, *ad es.*, infarto del miocardio, embolia polmonare, infarto intestinale, ictus ischemico e danno renale ischemico-da ri-perfusione. In un'altra realizzazione, il composto cristallino A

forma A, o sua composizione o medicamento, viene somministrato a un paziente diagnosticato con una condizione associata allo sviluppo di ischemia cronica, *ad es.*, cirrosi cardiaca, degenerazione maculare, embolia polmonare, insufficienza respiratoria acuta, sindrome da sofferenza respiratoria del neonato, e insufficienza cardiaca congestizia. In ancora un'altra realizzazione, il composto cristallino A forma A, o sua composizione o medicamento, viene somministrato immediatamente dopo un trauma o una ferita. In altre realizzazioni, il composto cristallino A forma A, o sua composizione o medicamento, può essere somministrato a un soggetto in base a condizioni predisponenti, *ad es.*, ipertensione, diabete, malattia arteriosa occlusiva, insufficienza venosa cronica, malattia di Raynaud, ulcere cutanee croniche, cirrosi, insufficienza cardiaca congestizia e sclerosi sistemica. In ancora altre realizzazioni, il composto cristallino A forma A, o sua composizione o medicamento, può essere somministrato per pre-trattare un soggetto per diminuire o prevenire lo sviluppo di danno tissutale associato con ischemia o ipossia.

Il composto cristallino A forma A, o sue composizioni o medicinali, può anche essere usato per aumentare l'eritropoietina endogena (EPO). Il composto cristallino A forma A, o sua composizione o medicamento, può essere somministrato per prevenire, pretrattare o trattare condizioni associate all'EPO, incluse, *ad es.*, condizioni associate ad anemia e disturbi neurologici. Le condizioni associate all'anemia comprendono disturbi come malattia renale acuta o cronica, diabete, cancro, ulcere, infezione da virus, *ad es.*, HIV, batteri o parassiti; infiammazione, ecc. Le condizioni anemiche possono includere anche quelle associate a procedure o trattamenti inclusi, *ad es.*, radioterapia, chemioterapia, dialisi e chirurgia. I disturbi associati all'anemia includono inoltre emoglobina e/o eritrociti anormali, come quelli riscontrati in disturbi come l'anemia microcitica, l'anemia ipocromica, l'anemia aplastica, ecc.

La descrizione è anche rivolta a composto cristallino A forma A, o sua composizione o medicamento, per uso in un metodo per trattare, pretrattare o ritardare l'insorgenza di una condizione associata a un disturbo scelto dal gruppo costituito da disturbi anemici; disturbi e/o lesioni neurologici inclusi casi di ictus, traumi, epilessia e malattie neurodegenerative; ischemia cardiaca compreso, ma non limitato a, infarto del miocardio e insufficienza cardiaca congestizia; ischemia epatica inclusa, ma non limitata a, cirrosi cardiaca; ischemia renale compreso, ma

non limitato a, insufficienza renale acuta e insufficienza renale cronica; disturbi vascolari periferici, ulcere, ustioni e ferite croniche; embolia polmonare; e danno ischemico-da riperfusione.

La descrizione è anche rivolta ad un metodo di inibizione dell'attività di almeno un enzima idrossilasi che modifica la subunità alfa del fattore inducibile da ipossia. L'enzima HIF idrossilasi può essere una prolil idrossilasi compreso, ma non limitato a, il gruppo costituito da EGLN1, EGLN2 ed EGLN3 (noto anche come PHD2, PHD1 e PHD3, rispettivamente), descritto da Taylor (2001, Gene 275: 125-132), e caratterizzato da Aravind e Koonin (2001, Genome Biol 2: RESEARCH0007), Epstein et al. (2001, Cell 107: 43-54), e Bruick e McKnight (2001, Science 294: 1337-1340). Il metodo comprende il mettere a contatto l'enzima con una quantità efficace inibente di una o più forme cristalline o amorfe del composto A. In alcune realizzazioni, l'enzima HIF idrossilasi è una asparaginil idrossilasi o una prolil idrossilasi. In altre realizzazioni, l'enzima HIF idrossilasi è un fattore che inibisce HIF, EGLN1, EGLN2 o EGLN3 umani.

ESEMPI

Salvo diversa indicazione, le seguenti abbreviazioni usate in tutta la descrizione hanno le seguenti definizioni:

°C	Grado Celsius
Ac	Acetile
ca.	Circa
d	Doppietto
dd	Doppietto di doppietti
DMA	dimetilammina
DMEM	Terreno essenziale minimo di Eagle
DMF	Dimetilformammide

DMSO	Dimetisolfossido
DSC	Calorimetria a scansione differenziale
EDTA	acido etilendiamminotetraacetico
EtOAc	Acetato di etile
eq.	equivalenti
FBS	Siero fetale bovino
g	Grammo
Gly	glicina
h	Ore
HEPES	Acido 4-(2-idrossietil)-1-piperazinetansolfonico
HPLC	Cromatografia liquida ad alta prestazione
IPA	Alcol isopropilico
iPrOAc	Isopropilacetato
J	Joule
J	Costante di accoppiamento
kg	Chilogrammo

kV	Kilovolt
m	Multipletto
M	Molare
M+	Picco di massa
mA	Milliampere
Me	Metile
MEC	Concentrazione minima efficace
MeCN	Acetonitrile
MEK	Metil etil chetone
mg	Milligrammo
MHz	Megahertz
MIBK	Metil iso-butil chetone
min	Minuto
mIU	milli-unità internazionali
mL	Millilitro
mm	Millimetro

mM	millimolare
mol	Moli
MS	Spettroscopia di massa
NMR	Risonanza magnetica nucleare
PBS	Sistema di tampone fosfato
Ph	Fenile
RH	Umidità relativa
gpm	Giri al minuto
s	Singoletto
s	Secondi
TEA	trietilammina
TGA	Analisi termogravimetrica
THF	tetraidrofurano
Ts	Tosile
vol	Volume
w	peso

XRPD	Diffrazione di raggi X da polvere
δ	Spostamento chimico
μL	Microlitro
μM	micromolare

Diffrazione di raggi X da polvere (XRPD)

I modelli di diffrazione di raggi X da polvere sono stati raccolti su un diffrattometro GADDS Bruker AXS C2 usando radiazione Cu K α (40 kV, 40 mA), portacampione XYZ automatizzato, microscopio video laser per il posizionamento automatico del campione e un rivelatore di area bidimensionale HiStar. L'ottica a raggi X è costituita da un singolo specchio multistrato di Gobel accoppiato a un collimatore a foro di spillo di 0,3 mm. Un controllo delle prestazioni settimanale viene effettuato usando un corindone standard certificato NIST 1976 (lastra planare).

La divergenza del fascio, cioè la dimensione effettiva del fascio di raggi X sul campione, era di circa 4 mm. Una modalità di scansione continua θ - θ è stata impiegata con una distanza tra campione-rivelatore di 20 cm che fornisce un intervallo di 2θ efficace di 3,2° - 29,7°. Tipicamente il campione veniva esposto al fascio di raggi X per 120 secondi. Il software usato per la raccolta dei dati era GADDS per WNT 4.1.16 e i dati sono stati analizzati e presentati usando *DiffraC Plus* EVA v11.0.0.2 o v13.0.0.2.

In alternativa, i modelli di diffrazione di raggi X da polvere sono stati raccolti su un diffrattometro Bruker D8 usando la radiazione Cu K α (40 kV, 40 mA), goniometro θ - 2θ e divergenza di V4 e fenditure riceventi, un monocromatore Ge e un rivelatore Lynxeye. Lo strumento viene controllato per le prestazioni con uno standard di corindone certificato (NIST 1976). Il software usato per la raccolta dei dati era *DiffraC Plus* XRD Commander v2.5.0 e i dati sono stati analizzati e presentati usando *DiffraC Plus* EVA v11.0.0.2 o v13.0.0.2.

I campioni sono stati analizzati in condizioni ambientali come campioni a lastra piana usando la polvere così come ricevuta. Il campione è stato delicatamente impaccato in una cavità tagliata in un wafer di silicio levigato,

a sfondo zero (510). Il campione è stato ruotato sul proprio piano durante l'analisi. I dettagli della raccolta dati sono:

- Intervallo angolare: da 2 a 42° 20
- Passo: 0,05° 20
- Tempo di raccolta: 0,5 s/passaggio
- Durata dell'analisi: 7 minuti

Calorimetria a scansione differenziale (DSC)

Le DSC sono state raccolte su un TA Instruments Q2000 equipaggiato con un autocampionatore a 50 posizioni. La calibrazione per la capacità termica è stata effettuata usando zaffiro e la calibrazione per l'energia e la temperatura è stata effettuata usando indio certificato. Tipicamente 0,5 - 3 mg di ciascun campione, in una vaschetta di alluminio perforata, sono stati riscaldati a 10°C/min da 25°C a 300°C. Uno spurgo di azoto secco a 50 ml/min è stato mantenuto sul campione. DSC a temperatura modulata è stata effettuata usando un tasso di riscaldamento di base di 2°C/min e parametri di modulazione della temperatura di $\pm 0,318^\circ\text{C}$ (ampiezza) ogni 60 secondi (periodo). Il software di comando dello strumento era Advantage per Q Series v2.8.0.392 e Thermal Advantage v4.8.3 e i dati sono stati analizzati usando Universal Analysis v4.4A.

In alternativa, i dati DSC sono stati raccolti su un Mettler DSC 823e dotato di un auto-campionatore a 34 posizioni. Lo strumento è stato calibrato per l'energia e la temperatura usando indio certificato. Tipicamente 0,5-3 mg di ciascun campione, in una vaschetta di alluminio perforata, sono stati riscaldati a 10°C/min da 25°C a 300°C o da 25°C a 320°C. Un flusso di azoto a 50 ml/min è stato mantenuto sul campione. Il software di comando dello strumento e di analisi dei dati era STARe v9.20.

Analisi termo-gravimetrica (TGA)

I dati TGA sono stati raccolti su un Mettler TGNsDT A 851 e dotato di un autocampionatore a 34 posizioni. Lo strumento è stato calibrato in temperatura usando indio certificato. Tipicamente, 1-30 mg di ciascun campione sono stati caricati su un crogiolo di alluminio pre-pesato e sono stati riscaldati a 10°C/min da temperatura ambiente a 350°C. Un flusso di azoto a 50 ml/min è stato mantenuto sul campione. Il software di comando dello

strumento e di analisi dei dati era STARe v9.20.

Esempio 1. Preparazione del composto A Forma A

Metodi

L'acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino (Composto A Forma A) è stato preparato mediante i seguenti metodi.

Metodo I.

Il composto cristallino A Forma A (vedere Esempio 1, Metodo I) è stato usato in questo metodo. 15 mg del materiale cristallino sono stati usati con ciascun solvente aggiunto in incrementi fino ad ottenere una soluzione limpida o fino ad aggiungere 50 volumi (750 μ L) di solvente. I campioni sono stati sonicati per 5 secondi dopo ciascuna aggiunta di solvente. Quando erano insolubili, gli impasti venivano agitati a 500 gpm passando ciclicamente tra 25°C e 50°C (4 h a ciascuna temperatura) per un periodo da 16 ore a sei giorni. Qualsiasi soluzione risultante è stata poi lasciata evaporare a temperatura ambiente. I solidi ottenuti da questo esperimento sono stati analizzati mediante XRPD.

Ognuno dei seguenti solventi usati nel suddetto Metodo I forniva Forma A: acido acetico, acetone, acetofenone, benzonitrile, benzil alcol, butirronitrile, clorobenzene, cicloesano, 1,2-diclorobenzene, 1,2-dicloroetano, dimetossietano, dimetilacetammide, DMSO, 1,4-diossano, etilenglicole, EtOAc, formammide, esafluorobenzene, esano, IPA, IPA:10% acqua, iPrOAc, MeCN, MEK, MIBK, nitrometano, perfluoroesano, propionitrile, solfolano, t-butil metil etere, t-butanolo, tetralina, THF, e toluene.

Usando Metodo I, esafluoropropan-2-olo, metanolo e etanolo non fornivano Forma A.

Metodo II

Il composto cristallino A Forma A (vedere Esempio 1, Metodo VIII) è stato usato in questo metodo. 15 mg del materiale cristallino sono stati usati con 30 volumi (450 μ L) di solvente con l'eccezione di DMSO e DMA dove venivano usati 5 volumi. Gli impasti sono stati sonicati per 5 secondi. Gli impasti sono stati agitati a 500 gpm a 5°C per un periodo di sei giorni. Qualsiasi soluzione risultante è stata poi lasciata evaporare a temperatura ambiente. I solidi ottenuti sono stati analizzati mediante XRPD.

Ognuno dei seguenti solventi usati nel suddetto Metodo II forniva Forma A: benzonitrile, solfolano, formammide, tetralina, acetofenone, alcol benzilico, etilenglicole, 1,2-diclorobenzene, clorobenzene, cicloesanone, butirronitrile, acido acetico, nitrometano, propionitrile, dimetossietano, 1,2-dicloroetano, esafluorobenzene, t-butanolo, esano, e perfluoroesano.

Usando Metodo II, esafluoropropan-2-olo non forniva Forma A.

Metodo III

Il composto cristallino A Forma A (vedere Esempio 1, Metodo VIII) è stato usato in questo metodo. Metodo III è sostanzialmente come descritto in Metodo II, di cui sopra, con l'eccezione che gli impasti sono stati agitati a 500 gpm a 50°C per un periodo di sei giorni. I solidi ottenuti sono stati analizzati mediante XRPD.

Ognuno dei seguenti solventi usati nel suddetto Metodo III forniva Forma A: benzonitrile, solfolano, formammide, tetralina, acetofenone, alcol benzilico, etilenglicole, 1,2-diclorobenzene, clorobenzene, cicloesanone, butirronitrile, acido acetico, nitrometano, propionitrile, dimetossietano, 1,2-dicloroetano, esafluorobenzene, t-butanolo, esano, e perfluoroesano.

Usando Metodo III, dimetilacetammide, t-butil metil etere, e esafluoropropan-2-olo non fornivano Forma A.

Metodo IV

Il composto cristallino A Forma B (vedere Esempio 2) è stato usato in questo metodo. 15 mg del materiale cristallino sono stati usati con 30 volumi (450 µL) solvente con l'eccezione di DMSO e DMA dove sono stati usati 5 volumi. Gli impasti sono stati sonicati per 5 secondi. Gli impasti sono stati agitati a 500 gpm, eseguendo cicli tra 25°C e 50°C (4 h a ogni temperatura) per sei giorni. Qualsiasi soluzione risultante è stata poi lasciata evaporare rapidamente a temperatura ambiente. I solidi sono stati analizzati mediante XRPD.

Ognuno dei seguenti solventi usati nel suddetto Metodo IV forniva Forma A: benzonitrile, solfolano, formammide, tetralina, acetofenone, alcol benzilico, etilenglicole, 1,2-diclorobenzene, clorobenzene, cicloesanone, butirronitrile, acido acetico, t-butil metil etere, nitrometano, propionitrile, dimetossietano, 1,2-dicloroetano, esafluorobenzene, t-butanolo, esano, perfluoroesano, e esafluoropropan-2-olo.

Metodo V

Il composto cristallino A Forma A (vedere Esempio 1, Metodo VIII) è stato usato in questo metodo. 20 mg del materiale cristallino sono stati sciolti in THF (410 µL) prima dell'aggiunta di 10 volumi (200 µL) di solvente con l'eccezione di DMSO e DMA dove sono stati usati 5 volumi. Gli impasti sono stati agitati a 500 rpm eseguendo cicli tra 25°C e 50°C (4 h a ogni temperatura) per 48 ore. Qualsiasi soluzione ottenuta dopo i cicli di riscaldamento/raffreddamento è stata lasciata evaporare a temperatura ambiente. I solidi ottenuti sono stati analizzati mediante XRPD.

Ognuno dei seguenti solventi usati nel suddetto Metodo V forniva Forma A, Benzonitrile, solfolano, formammide, tetralina, acetofenone, alcol benzilico, etilenglicole, DMSO, 1,2-diclorobenzene, clorobenzene, cicloesano, butirronitrile, acido acetico, t-butil metil etere, propionitrile, dimetossietano, 1,2-dicloroetano, esafluorobenzene, t-butanolo, e esano.

Usando Metodo V, nitrometano, esafluoropropan-2-olo, e perfluoroesano non fornivano Forma A.

Metodo VI

Il composto cristallino A Forma A (30 mg, vedere Esempio 1, Metodo VIII) è stato sciolto in 10 mL di acetone. Questa soluzione è stata sottoposta a rapida evaporazione di solvente su un evaporatore rotante (40°C, 35-50 Torr), 12,85 mg del materiale risultante è stato usato con 10 volumi (128,5 µL) di solvente con l'eccezione di DMSO e DMA dove sono stati usati 5 volumi. Gli impasti sono stati sonicati per 5 secondi. Gli impasti sono stati agitati a 500 rpm tra 25°C e 50°C (cicli di 8 h) per un periodo di sei giorni. Qualsiasi soluzione risultante è stata poi lasciata evaporare a temperatura ambiente. I solidi ottenuti sono stati analizzati mediante XRPD.

Ognuno dei seguenti solventi usati nel suddetto Metodo VI forniva Forma A: benzonitrile, solfolano, formammide, tetralina, acetofenone, alcol benzilico, etilenglicole, DMSO, 1,2-diclorobenzene, clorobenzene, butirronitrile, acido acetico, t-butil metil etere, nitrometano, propionitrile, dimetossietano, 1,2-dicloroetano, esafluorobenzene, t-butanolo, e esano.

Usando Metodo VI, cicloesano, esafluoropropan-2-olo, e perfluoroesano non fornivano Forma A.

Metodo VII

Il composto cristallino A Forma A (vedere Esempio 1, Metodo VIII) è stato usato in questo metodo. 30 mg sono

stati sospesi in 7 volumi di solvente (10% acquoso). Gli impasti sono stati sonicati per 5 secondi. Gli impasti sono stati agitati a 500 rpm eseguendo cicli tra 25°C e 50°C (cicli di 8 h) per un periodo di quattro giorni. I solidi ottenuti sono stati analizzati mediante XRPD.

Ognuno dei seguenti solventi usati nel suddetto Metodo VII forniva Forma A: acetone, acetonitrile, etanolo, metanolo, 2-metil-THF, e IPA.

Metodo VIII

Una soluzione acquosa di idrossido di sodio è stata aggiunta lentamente ad una sospensione agitata di Composto A in acqua in un intervallo di temperatura (10°C fino a 90°C). Una soluzione di acido acetico in acqua è stata poi lentamente caricata in un intervallo di temperatura (10°C fino a 90°C) e la miscela è stata agitata. Il solido è stato filtrato, lavato con acqua, e seccato sotto vuoto a peso costante. Composto A Forma A è stato ottenuto come un solido cristallino da bianco a giallo chiaro.

Dati

Il modello XRPD per Composto A Forma A è mostrato in Figura 1 e picchi e loro intensità relative nel modello XRPD sono mostrati in Tabella 1 seguente.

Tabella 1. Picchi nel modello XRPD per Composto A Forma A

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
8,5	100
10,1	3,5
11,4	9,2
12,8	20,6
14,5	3,2
15,9	13,4
16,2	45,5

16,9	18,5
17,1	11,5
17,5	19,0
19,0	12,5
19,9	7,7
20,2	2,8
21,6	31,9
21,8	16,0
22,0	11,9
22,2	17,2
22,6	17,4
22,9	36,4
23,6	4,7
23,8	6,5
24,1	3,4
24,7	11,0
25,2	3,0
25,6	9,8
25,8	16,5
27,4	60,6

28,2	7,7
28,4	3,7
29,1	7,6
29,2	5,8
29,6	5,3
30,0	2,7
30,4	2,3
31,3	2,8
31,9	5,9
32,0	6,1
32,8	3,0
33,4	15,6
33,6	16,1
34,1	5,2
34,6	2,8
35,1	4,3
35,2	4,2
35,3	3,2
35,7	4,0
36,5	2,2

36,6	2,2
36,9	2,4
37,0	2,4
37,3	4,0
37,4	2,8
37,7	2,3
37,8	2,3
38,2	2,9
38,5	3,2
38,9	2,4
39,3	2,4
40,8	2,8
41,5	4,9

I risultati delle analisi di calorimetria a scansione differenziale e analisi termogravimetrica di Composto A Forma A sono presentati in Figura 2 e 24, rispettivamente. L'analisi termogravimetrica mostra perdita di peso trascurabile di circa 0,4% tra 25°C e 225°C, seguita da una perdita costante di peso al di sopra di 225°C, suggerendo sublimazione o decomposizione del materiale a queste temperature (Figura 24). L'analisi di calorimetria a scansione differenziale di Composto A Forma A mostrava una esotermia molto piatta nell'intervallo da circa 80-190°C, seguita da una netta endotermica a circa 224,3°C (massimo del picco). La netta endotermica corrispondeva alla fusione del materiale, come determinato da microscopia a supporto caldo.

La microscopia a supporto caldo di Composto A Forma A mostrava poca variazione del materiale al di sotto del suo punto di fusione. Alcuni cambiamenti nella birifrangenza sono stati osservati nell'intervallo di circa 150-200°C. Il campione fondeva nell'intervallo di temperatura di circa 218,5-222,4°C.

I dati di assorbimento dell'umidità per il Composto A Forma A hanno mostrato un aumento di peso trascurabile, circa lo 0,2% ottenuto da un'umidità relativa compresa tra il 5% e il 95%, che era perso per desorbimento. Il piccolo assorbimento di umidità del Composto A Forma A è indicativo di un materiale cineticamente non igroscopico.

Esempio 2. Preparazione di Composto A Forma B

Metodo

Composto cristallino A Forma B è stato ottenuto per liofilizzazione di Forma A in una miscela di 1,4-diossano:acqua (2:1). 20 mg del composto cristallino A Forma B è stato sciolto in 20 volumi di 1,4-diossano prima dell'aggiunta di 20 volumi di cosolvente. I sistemi di solvente sono stati lasciati evaporare a temperatura ambiente, sotto cappa. I solidi ottenuti da questo esperimento sono stati analizzati mediante XRPD.

Ognuno dei seguenti co-solventi usati nel suddetto metodo forniva Forma B. 1,4-Diossano:acqua (1:1), 1,4-diossano:acqua (1:1), 1,4-diossano:metanolo (1:1), 1,4-diossano: etanolo, 1,4-diossano:acetone (1:1), 1,4-diossano:THF (1:1), e 1,4-diossano:eptano (1:1).

Dati

Il modello XRPD per Composto A Forma B è mostrato in Figura 3 e picchi e loro intensità relative nel modello XRPD sono mostrati in Tabella 2 seguente. Il modello cristallino cambiava dopo che il campione veniva conservato a 25°C/96% UR per dodici giorni, tornando alla Forma A.

Tabella 2. Picchi nel modello XRPD per Composto A Forma B

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
4,2	53,9
8,3	100

9,8	1,3
10,5	1,1
11,5	1,0
12,5	12,9
12,7	8,3
12,9	1,3
14,1	13,7
15,8	3,9
16,6	76,3
17,4	10,4
19,2	3,7
20,9	8,2
21,0	3,7
21,8	3,7
22,7	3,0
22,9	4,6
24,9	2,7
25,0	4,9
25,9	1,5
27,5	1,5

28,4	2,1
28,8	1,7
29,3	9,0
30,0	1,3
30,8	1,4
31,6	1,2
33,5	6,9
33,6	9,9
35,2	1,5
37,0	1,2
37,9	4,3
41,6	0,8

Non è stato osservato alcun solvente residuo, ad eccezione dell'acqua. Una perdita di peso del 2,8% p/p tra temperatura ambiente e 90°C nel termogramma TGA suggeriva la presenza di 0,5 equivalenti di acqua (teorici 2,5% peso/peso) (Figura 4). Il termogramma DSC ha mostrato un evento endotermico associato alla perdita di peso (Figura 4). Un forte evento endotermico si verifica a 222,3°C (-127,8 J/g), che corrisponde alla fusione della Forma A.

I dati XRPD ad alta risoluzione sono stati raccolti nell'arco di un mese. Dopo un mese intero a temperatura ambiente (32 giorni), il campione (forma B) è quasi completamente convertito in forma A anidra.

Esempio 3. Preparazione del composto A Forma C

Metodo

Acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino solvato di esafluoropropan-2-olo (Composto A Forma C) è stato preparato seguendo la procedura descritta nei Metodi I, II, III e VI dell'esempio 1 usando esafluoropropan-2-olo come solvente.

Dati

Il modello XRPD per Composto A Forma C è mostrato in Figura 5 e picchi e loro intensità relative nel modello XRPD sono mostrati in Tabella 3 seguente.

Tabella 3. Picchi nel modello XRPD per Composto A Forma C

Posizione del picco ($^{\circ}2\theta$)	Intensità relativa (%)
4,5	100
8,5	1,6
9,1	7,9
10,2	1,9
11,2	2,5
11,8	1,2
12,5	1,2
13,7	37
15,4	9,2
15,5	8,3
15,6	3
16,4	11,5
16,9	2,5

17,7	3,3
18,3	2,7
18,7	1,2
19,0	2,3
19,8	2,5
20,6	8
21,9	3,5
22,4	1,5
22,5	2,3
22,9	6,3
23,3	3,1
23,8	3,4
24,6	2
25,2	2,3
25,4	3,1
25,7	1,9
26,0	1,5
27,5	1,2
27,9	2,3
28,4	2,6

29,1	1,4
29,4	1
29,8	1
30,2	1
30,8	2,1
31,6	1,2
31,7	1,5
32,2	1,3
32,3	1,1
33,1	0,9
34,1	1,4
34,2	1,5
35,1	0,9
35,5	0,8
37,0	0,9
37,8	1,1
38,7	1
40,2	0,7
40,9	1,1
41,8	1,2

Solvente residuo è stato osservato mediante NMR al protone ed è stato assegnato all'esafuoropropan-2-olo. L'analisi termica è stata effettuata anche su questo campione (Figura 6). Una perdita in peso del 7,8% p/p tra la temperatura ambiente e 130°C nel termogramma TGA suggeriva la presenza di 1/6 equivalenti di esafluoropropan-2-olo (teorici 7,36% p/p) nel campione. Il termogramma DSC ha mostrato un evento endotermico associato alla perdita di peso seguita da un piccolo evento esotermico (circa 130°C) (Figura 6). Un evento endotermico acuto si verifica a 222,2°C (-17,9 J/g), che corrisponde alla fusione della Forma A. In conclusione, il materiale isolato da esafluoropropan-2-olo è un solvato metastabile in condizioni ambientali e si converte in Forma A.

Esempio 4. Preparazione del composto A Forma D

Metodo

Acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino solvato di DMSO:acqua (Composto A Forma D) è stato preparato per lenta evaporazione da THF/DMSO (20 volumi THF/5 volumi DMSO) di composto A per lo più amorfo o forma A.

Dati

Il modello XRPD per Composto A Forma D è mostrato in Figura 8 e picchi e loro intensità relative nel modello XRPD sono mostrati in Tabella 4 seguente. Il campione (Forma D) convertiva a Forma A quando lasciato essiccare a temperatura ambiente.

Tabella 4. Picchi nel modello XRPD per Composto A Forma D

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
4,2	32,7
4,3	29,4
8,4	65
8,5	65
12,6	30,9

15,8	20,6
16,8	100
18,9	5,5
19,3	19,1
20,7	6,2
21,7	3,8
22,1	23
22,6	4,6
23,1	11,7
24,0	8,7
24,5	3,1
25,3	12,1
25,4	10,3
26,8	4
27,1	4,4
27,3	3,9
28,4	43
31,2	7,7
32,0	3,4
33,3	4,4

33,4	3
34,0	6,2
35,8	3,7
38,3	7,6
39,1	3,6
40,9	2,5
41,6	3,6

Solvente residuo è stato osservato mediante NMR al protone ed è stato assegnato al DMSO. Il termogramma TGA e il termogramma DSC sono mostrati nella Figura 8. La TGA mostra una prima perdita di peso tra 40-150°C del 18,5% (combinazione di acqua e DMSO) e una seconda perdita di peso tra 170-220°C (possibile DMSO). Due ampi eventi endotermici a 37,6°C e 90,4°C erano possibili a causa della perdita di acqua e DMSO. È stata osservata una piccola endotermica a 222,0°C a causa della fusione della Forma A.

Esempio 5. Preparazione dei sali del composto A

Metodo

Il Composto cristallino A Forma A è stato usato per preparare i seguenti sali. Composto A Forma A (50 mg per esperimento) è stato sciolto in acetone o THF (50 vol, 2,1 ml) a 50°C. Le soluzioni sono state trattate con 1,1 eq. molare del corrispondente ione (ad esempio, soluzione acquosa 1,0 M di idrossido di sodio, idrossido di potassio o acido cloridrico). La temperatura è stata mantenuta a 50°C per 20 minuti quindi raffreddata a 0°C a 0,1°C/min con agitazione. Dopo 20 ore a 0°C, i solidi sono stati filtrati, essiccati all'aria per 10 minuti e analizzati mediante le tecniche appropriate.

Dati

Composto A Sale di sodio

Il modello XRPD per Composto A sale di sodio è mostrato in Figura 9 e picchi e loro intensità relative nel modello XRPD sono mostrati in Tabella 5 seguente.

Tabella 5. Picchi nel modello XRPD per Composto A Sale di sodio

Posizione del picco ($^{\circ}2\theta$)	Intensità relativa (%)
5,3	22,0
8,1	4,4
11,1	10,9
13,5	9,3
15,1	5,2
16,0	100,0
17,0	9,6
18,7	20,0
19,2	13,3
21,6	30,7
22,9	7,7
24,0	12,6
25,3	7,5
26,2	11,0
28,9	10,1

La stechiometria (Composto A ionico : controione) è stata determinata pari a 1:1 mediante cromatografia ionica (Metrohm 761 Compact IC, IC Net software v2.3). Il termogramma TGA e il termogramma DSC sono mostrati

in Figura 10. Il termogramma TGA mostra una perdita di peso tra 40-90°C di 11,5%. Il termogramma DSC mostra un ampio evento endotermico a 64,1°C, seguito da due eventi esotermici a 150,5°C e 190,3°C e una fusione netta a 313,6°C. La purezza è stata determinata pari a circa 99,6%.

Composto A sale di potassio

La stechiometria (Composto A ionico : controione) è stata determinata pari a 1:1 mediante cromatografia ionica (Metrohm 761 Compact IC, IC Net software v2,3). Il modello XRPD per il composto A sale di potassio è mostrato in Figura 21. Come mostrato nella Figura, il sale di potassio è sostanzialmente amorfo. Analisi termica mostrava una possibile perdita di acqua seguita da un evento di ricristallizzazione per produrre forma cristallina non solvatata con una fusione a 291°C (Figura 22).

Composto A sale di L-arginina

Il modello XRPD per Composto A sale di L-arginina è mostrato in Figura 11 e picchi e loro intensità relative nel modello XRPD sono mostrati in Tabella 6 seguente.

Tabella 6. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di L-arginina

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
10,8	24,5
11,4	13,1
12,0	15,1
15,8	31,7
17,1	18,2
18,0	20,9
19,4	41,9
20,8	100,0
21,8	59,7

22,7	53,7
23,4	56,8
24,4	37,5
25,4	64,4
26,4	53,7
26,8	48,8
27,5	52,3
28,5	40,4
29,7	30,5

La stechiometria (Composto A ionico : controione) è stata determinata pari a circa 1:1 mediante NMR. Il termogramma TGA e il termogramma DSC sono mostrati in Figura 12. Il termogramma TGA mostra una perdita di peso tra 40-100°C di 4,5%. Il termogramma DSC mostra due ampi eventi endotermici a 79,6°C e 143,3°C, un evento esotermico a 172,5°C, seguita da un evento endotermico a 210,1°C. La purezza è stata determinata pari a circa 99,5%.

Composto A sale di L-lisina

Il modello XRPD per Composto A sale di L-lisina è mostrato in Figura 13 e picchi e loro intensità relative nel modello XRPD sono mostrati in Tabella 7 seguente.

Tabella 7. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di L-lisina

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
6,8	11,5
9,5	36,4
9,9	57,4

10,2	71,5
13,1	13,9
13,8	18,4
14,4	44,8
14,6	41,6
16,9	78,8
17,3	55,4
18,4	65,1
19,0	50,1
19,8	92,4
20,7	100,0
21,2	95,1
22,1	53,7
23,6	58,0
25,5	59,8
25,0	64,7
26,1	63,9
27,4	54,3
28,4	53,4
28,6	53,8

28,8	52,3
30,0	41,7
30,6	38,2

La stechiometria (Composto A ionico : controione) è stata determinata pari a circa 1:1 mediante NMR. Il termogramma TGA e il termogramma DSC sono mostrati in Figura 14. Il termogramma TGA mostra una perdita di peso tra 235-270°C di 12,1%. Il termogramma DSC mostra una fusione netta a 230,7°C e un ampio evento endotermico a 237,1°C. La purezza è stata determinata pari a circa 99,6%.

Composto A sale di etanolamina

I modelli XRPD per Composto A sale di etanolamina sono mostrati in Figura 15 e picchi e loro intensità relative nei modelli XRPD sono mostrati in Tabelle 8, 9 e 10 seguenti. Modello 1 è stato osservato da acetone, modello 2 è stato osservato da THF, e Modello 3 è stato osservato a 40°C/75% RH.

Tabella 8. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di etanolamina (Modello 1)

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
3,8	15,6
4,6	6,3
5,1	8,3
7,7	4,8
10,9	32,8
12,5	10,0
15,0	28,2
15,5	23,5
17,9	14,0

18,6	20,1
21,1	45,2
21,8	54,9
22,7	77,7
24,4	30,3
26,2	53,6
26,6	47,6
27,1	100,0

Tabella 9. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di etanolamina (Modello 2)

Posizione del picco ($^{\circ}2\theta$)	Intensità relativa (%)
12,5	25,5
13,1	22,4
14,9	12,8
15,9	37,4
16,7	29,3
17,1	68,0
17,8	19,4
18,5	79,6
20,2	42,4
21,4	73,3

22,8	100,0
23,8	80,2
24,7	34,6
25,7	57,9
26,8	28,9
27,4	19,0
28,0	32,7
29,5	41,4
30,8	19,6

Tabella 10. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di etanolamina (Modello 3)

Posizione del picco ($^{\circ}2\theta$)	Intensità relativa (%)
7,2	18,1
10,3	15,2
10,8	39,7
13,4	8,1
14,1	37,3
16,2	52,9
16,9	37,5
18,1	17,7
21,3	100,0

21,7	64,8
22,3	21,7
22,9	42,3
23,1	39,6
23,7	36,1
25,3	29,9
26,2	23,3
26,9	50,5
27,8	75,0
29,0	22,7
18,5	11,8

Sia per THF che per acetone, la stechiometria (Composto A ionico : controione) è stata determinata pari a circa 1:1 mediante NMR. Il termogramma TGA e il termogramma DSC per il composto A sale di etanolamina da acetone è mostrato in Figura 16. Il termogramma TGA mostra una perdita di peso tra 155-250°C di 10,1% (0,8 equivalenti di etanolamina). Il termogramma DSC mostra una fusione netta a 171,4°C e un ampio evento endotermico a 186,0°C. La purezza è stata determinata pari a circa 99,0%, per il composto A sale di etanolamina da THF, il termogramma TGA mostrava una perdita di peso tra 155-250°C di 10,1% (0,8 equivalenti di etanolamina), e il termogramma DSC mostrava una fusione netta a 172,4°C e un ampio evento endotermico a 185,5°C. La purezza è stata determinata pari a circa 99,1%.

Composto A sale di dietanolamina

I modelli XRPD per Composto A sale di dietanolammina sono mostrati in Figura 17 e picchi e loro intensità relative nei modelli XRPD sono mostrati in Tabelle 11 e 12 seguenti. Modello 1 è stato osservato da acetone e Modello 2 è stato osservato a 40°C/75% RH.

Tabella 11. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di dietanolammina (Modello 1)

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
6,6	6,6
11,2	12,5
11,8	21,6
13,0	9,5
14,5	13,6
15,6	22,9
16,9	100,0
19,6	37,5
20,5	27,7
21,4	23,1
22,6	37,3
23,7	42,9
25,0	46,9
26,0	36,5
27,1	35,3
28,3	20,8

29,4	17,1
30,6	13,2

Tabella 12. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di dietanolammina (Modello 2)

Posizione del picco ($^{\circ}2\theta$)	Intensità relativa (%)
5,9	9,4
8,9	5,9
11,1	23,9
11,5	13,9
11,9	12,7
13,9	7,0
14,9	27,7
16,0	100,0
18,3	20,0
20,0	11,9
20,9	32,5
21,5	20,5
22,3	26,4
23,3	54,6
24,0	17,1
24,8	33,5

25,6	22,4
27,6	27,7
29,0	20,1

La stechiometria (Composto A ionico : controione) è stata determinata pari a circa 1:1 mediante NMR. Il termogramma TGA e il termogramma DSC sono mostrati in Figura 18. Il termogramma TGA mostra una perdita di peso tra 155-250°C di 12,6%. Il termogramma DSC mostra una fusione netta a 150,2°C e un ampio evento endotermico a 172,2°C. La purezza è stata determinata pari a circa 99,7%.

Composto A sale di trometamina

Il modello XRPD per Composto A sale di trometamina è mostrato in Figura 19 e picchi e loro intensità relative nel modello XRPD è mostrato in Tabella 13 seguente.

Tabella 13. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di trometamina

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
9,4	4,3
10,1	100,0
11,8	8,5
13,4	15,3
14,2	53,0
15,0	5,1
16,9	20,3
19,2	12,9
20,1	23,5
21,1	69,2

22,3	21,4
23,4	14,7
24,3	13,6
25,1	10,5
25,7	21,5
26,3	16,9
28,4	22,9
29,2	12,0
30,0	17,1

La stechiometria (Composto A ionico : controione) è stata determinata pari a circa 1:1 mediante NMR. Il termogramma TGA e il termogramma DSC sono mostrati in Figura 20. Il termogramma TGA mostra una perdita di peso tra 180-260°C di 11,0%. Il termogramma DSC mostra una fusione netta a 176,5°C e un ampio evento endotermico a 182,6°C. La purezza è stata determinata pari a circa 99,7%.

Composto A sale di acido cloridrico

Il modello XRPD per Composto A sale di acido cloridrico è mostrato in Figura 25 e picchi e loro intensità relative nel modello XRPD è mostrato in Tabella 14 seguente.

Tabella 14. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di acido cloridrico

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
8,2	6,4
10,2	18,3
10,7	13,6
12,5	10,9

13,6	36,1
19,0	27,1
19,8	21,1
20,3	30,6
20,9	42,7
21,3	17,4
22,5	68,5
24,1	100,0
27,6	36,4
29,0	17,9
25,6	21,5

La stechiometria (Composto A ionico : controione) è stata determinata pari a circa 1:1 mediante cromatografia ionica. Il termogramma TGA e il termogramma DSC sono mostrati in Figura 26. Il termogramma TGA mostra una perdita di peso tra 100-170°C di 6,5% e una seconda perdita di peso tra 185-210°C di 3,4%. Il termogramma DSC mostra due piccoli eventi endotermici a 154,3 e 201,6°C, e una fusione netta a 223,0°C. La purezza è stata determinata pari a circa 99,1%.

Composto A sale di acido solforico

Il modello XRPD per Composto A sale di acido solforico è mostrato in Figura 27 essere una miscela del sale e Forma A. I picchi e loro intensità relative nel modello XRPD sono mostrati in Tabella 15 seguente.

Tabella 15. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di acido solforico

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
6,1	48,8

8,5	36,2
15,4	15,0
16,1	82,4
17,1	32,4
17,4	75,9
19,8	82,9
22,9	100,0
23,7	33,4
24,7	99,5
26,1	73,0
27,3	70,9
28,1	29,8
28,8	35,1
29,6	35,1

Il termogramma TGA e il termogramma DSC sono mostrati in Figura 28. Il termogramma TGA mostra una perdita di peso tra 10-110°C di 6,5% e una seconda perdita di peso tra 180-280°C di 27,4%. Il termogramma DSC mostra tre piccoli eventi endotermici a 31,8, 55,7 e 91,0 associati con la prima perdita di peso, e un grande, ampio evento endotermico a 201,4°C dovuto a decomposizione.

Composto A sale di acido metansolfonico

I modelli XRPD per Composto A sale di acido metansolfonico sono mostrati in Figura 29 e i picchi e loro intensità relative nei modelli XRPD sono mostrati in Tabelle 16 e 17 seguenti. Modello 1 è stato osservato da

acetone, e modello 2 è stato osservato da THF. Modello 1 ritornava a Forma A a 40°C/75% RH e modello 2 si riconvertiva ad una miscela di Forma A e Modello 1 a 40°C/75% RH.

Tabella 16. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di acido metansolfonico (Modello 1)

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
4,9	100,0
9,8	21,0
12,9	24,9
14,9	25,8
17,0	43,9
19,4	49,7
21,5	25,3
23,7	23,4
24,8	21,5

Tabella 17. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di acido metansolfonico (Modello 2)

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
4,6	25,8
6,9	18,4
7,1	12,7
9,7	8,3
12,2	26,6
11,6	8,8

13,6	15,5
14,0	20,1
17,7	31,7
18,7	100,0
20,5	93,8
22,1	44,8
23,1	24,7
23,7	30,7
24,6	54,3
25,6	30,3
26,4	21,6
27,0	36,7
28,4	17,2
29,3	25,4
30,5	14,1

Sia per THF che per acetone, la stechiometria (Composto A ionico : controione) è stata determinata pari a circa 1:1 mediante NMR. Il termogramma TGA e il termogramma DSC per il composto A sale di acido metansolfonico da THF è mostrato in Figura 30. Il termogramma TGA mostra una perdita di peso tra 40-100°C di 2,1%. Il termogramma DSC mostra un piccolo evento endotermico a 153,5°C e una netta endotermica a 166,9°C. La purezza è stata determinata pari a circa 99,3%, per il composto A sale di acido metansolfonico da acetone, il termogramma TGA non mostrava alcuna perdita di peso fino alla degradazione del campione a circa

180°C, e il termogramma DSC mostrava un evento endotermico a 144,5°C dovuta a fusione del campione. La purezza è stata determinata pari a circa 98,9%.

Esempio 6. Preparazione di Composto A amorfo

Composto A amorfo è stato ottenuto come segue. Composto cristallino A Forma A (500 mg) è stato sciolto in THF (1,5 mL) a temperatura ambiente. La soluzione è stata filtrata per rimuovere qualsiasi materiale cristallino residuo. Il solvente è stato rimosso mediante rapida evaporazione nell'evaporatore rotante. Un'aliquota del solido ottenuto è stata esaminata per XRPD. In alternativa, il Composto A amorfo è stato ottenuto mediante liofilizzazione del Composto A Forma A da una miscela di 1,4-diossano:acqua (2:1 v/v) oppure mediante impaccamento e sigillatura del Composto A in un tubo capillare, sciogliendo il campione su un banco caldo Kofler a circa 240°C per un minuto e raffreddando a temperatura ambiente. Un XRPD del composto amorfo A è mostrato in Figura 23.

Esempio 7. Preparazione di un sale bis TEA di composto A

Metodo

Il composto cristallino A forma A (50 mg) è stato sciolto in acetone (50 vol) a 50°C. La soluzione è stata trattata con 2,1 eq. mol. di trietilammina (TEA). La temperatura è stata mantenuta a 50°C per 20 minuti quindi raffreddata a 0°C a 0,1°C/min con agitazione. Dopo 72 a 0°C, i solidi sono stati filtrati, essiccati all'aria per 5 minuti e analizzati per XRPD. Le soluzioni sono state impostate per lenta evaporazione in condizioni ambientali.

Dati

Il modello XRPD per Composto A sale di bis TEA è mostrato in Figura 31 e picchi e loro intensità relative nel modello XRPD sono mostrati in Tabella 18 seguente.

Tabella 18. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale di bis trietilammina

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
5,5	4,2
9,2	5,0

10,1	29,4
11,7	13,2
13,3	8,0
13,7	17,3
14,5	42,5
14,7	52,1
15,2	9,3
15,7	14,3
16,3	16,0
17,0	36,9
18,4	11,9
19,4	31,5
20,4	21,7
20,7	27,3
22,6	100,0
22,9	23,9
23,9	29,9
24,8	14,6
25,5	38,5
26,3	16,7

27,2	37,1
28,1	62,2

Il termogramma TGA e il termogramma DSC sono mostrati in Figura 32. La TEA è stata isolata come bis-sale, tuttavia il sale iniziava a dissociarsi a Forma A dopo una settimana di conservazione a 40°C/75% RH.

Esempio 8. Preparazione di semi-sali di calcio e magnesio

Metodo

I sali di calcio e magnesio del Composto A sono stati preparati mediante scambio ionico dal sale di sodio. Il composto A (450 mg) è stato sciolto in acetone a 50°C (50 vol, 22,5 ml). La soluzione è stata trattata con 1,1 eq. molar di idrossido di sodio (soluzione di 1 M in acqua). Una sospensione è stata formata per aggiunta poi è stata raffreddata a 0°C a 0,1°C/min. Dopo 48 ore a 0°C, il solido è stato filtrato, essiccato all'aria per 10 minuti e analizzato con XRPD. Il sale sodico (50 mg) è stato sciolto in MeOH (20 vol, 1 ml) a temperatura ambiente. La soluzione è stata riscaldata a 50°C e poi trattata con il corrispondente ione (soluzioni 1 M in MeOH). Le miscele sono state raffreddate a 0°C a 0,1°C/min. Dopo 24 ore a 0°C, i solidi sono stati filtrati, essiccati all'aria per 5 minuti e analizzati con XRPD (primo raccolto). I liquidi sono stati conservati e impostati per una lenta evaporazione in condizioni ambientali per fornire un secondo raccolto. I materiali isolati dagli esperimenti di semi-sali di Ca⁺² e Mg⁺² cristallizzavano dopo un'incubazione di una settimana a 40°C/75% UR.

Dati

I modelli XRPD per il composto A semi-sali di calcio e magnesio sono mostrati in Figura 33 e Figura 35, rispettivamente. I picchi e loro intensità relative nei modelli XRPD sono mostrati in Tabelle 19 e 20 seguente.

Tabella 19. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale semi-calcio

Posizione del picco (°2θ)	Intensità relativa (%)
5,7	8,8
6,6	10,5
8,6	10,2

Posizione del picco ($^{\circ}2\theta$)	Intensità relativa (%)
9,7	8,1
10,9	24,0
11,5	63,5
12,9	36,4
13,4	20,5
14,4	32,8
14,6	34,0
15,3	20,8
17,0	27,6
17,7	19,6
20,0	29,0
21,6	31,0
23,1	51,9
23,8	39,2
24,4	52,4
25,9	100,0
27,0	88,1
28,1	40,3
29,3	25,7

Tabella 20. Picchi nel modello XRPD per Composto A sale semi-magnesio

Posizione del picco ($^{\circ}2\theta$)	Intensità relativa (%)
5,0	12,7
7,1	37,2
7,5	24,9
8,0	30,0
10,0	30,2
11,4	35,4
11,9	37,5
12,6	33,9
12,9	37,5
15,9	45,4
17,8	50,4
18,9	44,4
20,1	67,6
21,0	59,0
21,7	67,9
22,8	100,0

I termogrammi DSC per i semi-sali di calcio e magnesio di composto A sono mostrati nella Figura 34 e nella Figura 36, rispettivamente.

Esempio 9. Singolo cristallo di Composto A Forma A

Singoli cristalli sono stati fatti crescere da acetone con qualità sufficiente per la determinazione della struttura mediante diffrazione di raggi X a cristallo singolo.

La soluzione della struttura è stata ottenuta con metodi diretti, perfezionamento a minimi quadrati a matrice completa su F^2 con ponderazione $w^{-1} = \sigma^2 (F_o^2) + (0,0697P)^2 + (0,3149P)$, dove $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parametri di spostamento anisotropico, correzione di assorbimento empirica usando armoniche sferiche, implementato nell'algoritmo di scalabilità SCALE3 ABSPACK. Finale $wR^2 = \{\sum[w(F_o^2 - 2F_c^2)^2]/\sum[w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0,1376$ per tutti i dati, R_1 convenzionale = 0,0467 su valori F di 2496 riflessioni con $F_o > 4\sigma(F_o)$, $S = 1,045$ per tutti i dati e 248 parametri. Finale Δ/σ (max) 0,000, Δ/σ (media), 0,000. Mappa delle differenze finale tra +0,211 e -0,318 e \AA^{-3} .

Figura 37 mostra una vista di una molecola di Composto A Forma A dalla struttura cristallina che mostra lo schema di numerazione impiegato. Ellissoidi di spostamento atomico anisotropici per gli atomi diversi da idrogeno sono mostrati al livello di probabilità del 50%. Gli atomi di idrogeno sono visualizzati con un raggio arbitrariamente piccolo.

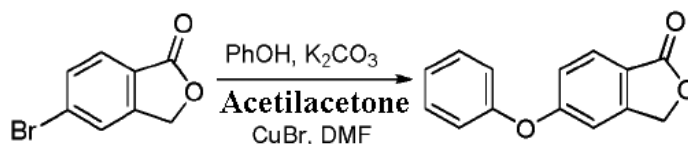
Tabella 21. Campioni sottoposti a studi di diffrazione di raggi X a cristallo singolo

Formula molecolare	$C_{19}H_{16}N_2O_5$				
Peso molecolare	352,34				
Sistema cristallino	Triclinico				
Gruppo spaziale	<i>P-1</i>	<i>a</i>	8,5208(13) \AA ,	α	98,415(11)°,
		<i>b</i>	9,2233(13) \AA ,	β	108,788(12)°,
		<i>c</i>	11,1859(14) \AA	γ	102,841(12)°
V	788,50(19) \AA^3				
Z	2				
D_c	1,484 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$				
μ	0,909 mm^{-1}				

Sorgente, λ	Cu-K α , 1,54178 Å
$F(000)$	368
T	100(2) K
cristallo	Prisma incolore, 0,11 x 0,05 x 0,02mm
Dati troncati a	0,80 Å
θ_{\max}	77,18°
Completezza	98,2%
Riflessioni	12441
Riflessioni uniche	3282
R_{int}	0,0406

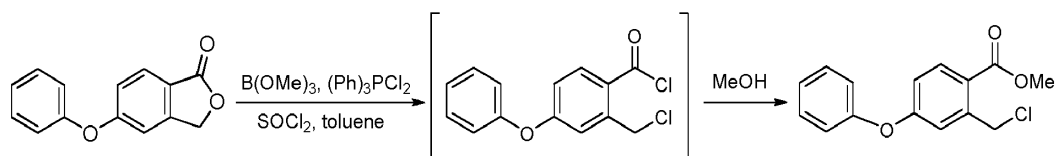
Esempio 10. Preparazione di Composto A

a) 5-Fenossiftalide



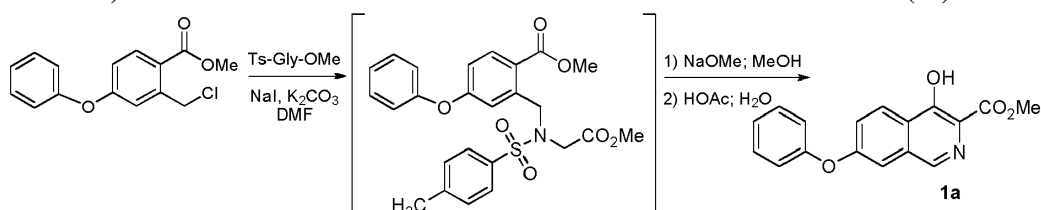
Un reattore è stato caricato con DMF (68 Kg) e l'agitazione è stata avviata. Il reattore è stato poi caricato con fenolo (51 kg), acetilacetone (8 kg), 5-bromoftalide (85 kg), bromuro di rame (9 kg) e carbonato di potassio (77 kg). La miscela è stata riscaldata al di sopra di 85°C e mantenuta fino al completamento della reazione e poi raffreddata. È stata aggiunta acqua. Il solido è stato filtrato e lavato con acqua. Il solido è stato sciolto in diclorometano e lavato con HCl acquoso e poi con acqua. Il solvente è stato rimosso sotto pressione ed è stato aggiunto metanolo. La miscela è stata agitata e filtrata. Il solido è stato lavato con metanolo ed essiccato in un forno con 5-fenossiftalide (resa: 72%, HPLC: 99,6%).

b) estere metilico dell'acido 2-clorometil-4-fenossibenzoico



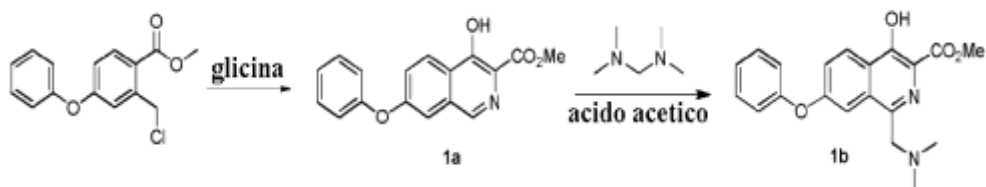
Un reattore è stato caricato con toluene (24 kg) e l'agitazione è stata iniziata. Il reattore è stato poi caricato con 5-fenossifthalide (56 Kg), tionil cloruro (41 Kg), trimetilborato (1 Kg), diclorotrifenilfosforano (2,5 Kg) e carbonato di potassio (77 Kg). La miscela è stata riscaldata a refluxo fino al completamento della reazione e il solvente è stato rimosso lasciando il cloruro di 2-clorometil-4-fenossibenzoile. Il metanolo è stato caricato e la miscela è stata riscaldata a temperatura superiore a 50°C fino al completamento della reazione. Il solvente è stato rimosso e sostituito con DMF. Questa soluzione del prodotto metilestere dell'acido 2-clorometil-4-fenossibenzoico in DMF è stata usata direttamente nel passaggio successivo (HPLC: 85%).

c) estere metilico dell'acido 4-idrossi-7-fenossisochinolin-3-carbossilico (1a)



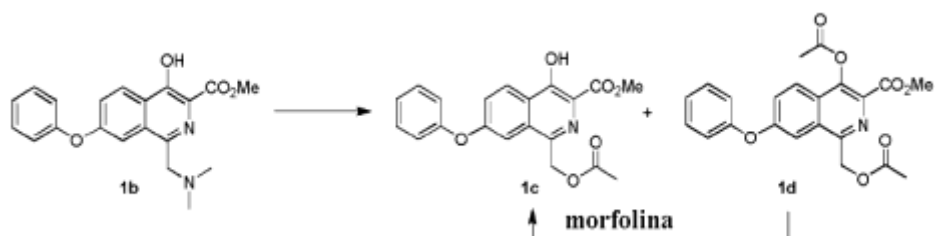
Un reattore è stato caricato con una soluzione di estere metilico dell'acido 2-clorometil-4-fenossibenzoico (~68 Kg) in DMF, ed è stata avviata l'agitazione. Il reattore è stato poi caricato con p-toluensolfonilglicina estere metilico (66 Kg), carbonato di potassio (60 Kg) e ioduro di sodio (4 Kg). La miscela è stata riscaldata ad almeno 50°C fino al completamento della reazione. La miscela è stata raffreddata. Metossido di sodio in metanolo è stato caricato e la miscela è stata agitata fino al completamento della reazione. Sono stati aggiunti acido acetico e acqua e la miscela è stata agitata, filtrata e lavata con acqua. Il solido è stato purificato mediante triturazione in acetone ed essiccato in un forno ottenendo **1a** (resa dal passaggio b): 58%; HPLC: 99,4%). ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 11,60 (s, 1 H), 8,74 (s, 1H), 8,32 (d, J = 9,0 Hz, 1 H), 7,60 (dd, J = 2,3 & 9,0 Hz, 1H), 7,49 (m, 3 H), 7,24 (m, 3 H), 3,96 (s, 3 H); MS-(+)-ione M+1 = 296,09

d) Metil 1-((dimetilammino)metil)-4-idrossi-7-fenossisochinolone-3-carbossilato (1b)



Un pallone è stato caricato con **1a** (29,5 g) e acido acetico (44,3 g \pm 5%), poi agitato. Bis-dimetilamminometano (12,8 g \pm 2%) è stato aggiunto lentamente. La miscela è stata riscaldata a $55 \pm 5^\circ\text{C}$ e mantenuta fino al completamento della reazione. Il prodotto di reazione è stato valutato mediante MS, HPLC e $^1\text{H NMR}$. $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,7 (s, 1 H), 8,38 (d, $J = 9,0$ Hz, 1 H), 7,61 (dd, $J = 9,0, 2,7$ Hz, 1 H), 7,49 (m, 3 H), 7,21 (m, 3 H), 5,34 (s, 2 H), 3,97 (s, 3 H), 1,98 (s, 3 H); MS-(+)-ione $M+1 = 368,12$.

e) Metil 1-((acetossi)metil)-4-idrossi-7-fenossiisochinolin-3-carbossilato (1c)



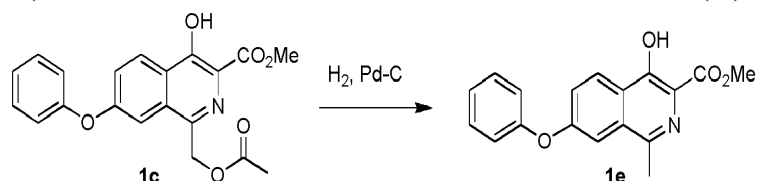
La soluzione di **1b** da a) di cui sopra è stata raffreddata al di sotto di 25°C , momento in cui è stata aggiunta anidride acetica (28,6 g \pm 3,5%) per mantenere la temperatura al di sotto di 50°C . La miscela risultante è stata riscaldata a $100 \pm 5^\circ\text{C}$ fino al completamento della reazione.

La soluzione di **1c** e **1d** di cui sopra è stata raffreddata a meno di $65 \pm 5^\circ\text{C}$. Acqua (250 mL) è stata aggiunta lentamente. La miscela è stata poi raffreddata a meno di $20 \pm 5^\circ\text{C}$ e filtrata. Il pannello umido è stato lavato con acqua (3 x 50 mL) e aggiunto ad un nuovo pallone. Sono stati aggiunti diclorometano (90 mL) e acqua (30 mL) e la miscela risultante è stata agitata. Lo strato di diclorometano è stato separato e valutato mediante HPLC.

Lo strato organico è stato aggiunto a un pallone e raffreddato a $5 \pm 5^\circ\text{C}$. Morfolina è stata aggiunta e la miscela è stata agitata fino al completamento della reazione. Il solvente è stato sostituito con una miscela di acetone/metanolo. Dopo il raffreddamento, composto **1c** precipitava ed è stato filtrato, lavato ed essiccato in un forno (resa: 81%, HPLC: $>$ 99,7%). $^1\text{H NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6) δ 11,6 (s, 1 H), 8,31 (d, $J = 9,0$ Hz, 1 H),

7,87 (d, $J = 2,3$ Hz, 1 H), 7,49 (m, 3 H), 7,24 (m, 3 H), 3,95 (s, 3 H), 3,68 (s, 2H), 2,08 (s, 6 H); MS-(+)-ione M + 1 = 357,17.

f) Metil 4-idrossi-1-metil-7-fenossisochinolin-3-carbossilato (1e)



Un reattore è stato caricato con **1c** (16,0 g), Pd/C (2,08 g), Na₂CO₃ anidro (2,56 g) e etil acetato (120 mL). Il pallone è stato spurgato sotto vuoto con azoto (3X) e spurgato sotto vuoto con idrogeno (3X). Il pallone è stato poi pressurizzato con idrogeno e agitato a circa 60°C fino al completamento della reazione. Il pallone è stato raffreddato a 20-25°C, la pressione rilasciata fino a quella ambiente, lo spazio della testa è stato spurgato con azoto per tre volte e la miscela è stata filtrata. Il filtrato era concentrato. È stato aggiunto metanolo. La miscela è stata agitata e poi raffreddata. Il prodotto precipitava ed è stato filtrato ed essiccato in forno (resa: 90%, HPLC: 99,7%).

g) Acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolina-3-carbonil)-ammino]-acetico (composto A)



Un pallone a pressione è stato caricato con **1e** (30,92 g), glicina (22,52 g), metanolo (155 mL), soluzione di metossido di sodio (64,81 g) e sigillato (in alternativa, è stato usato glicinato di sodio al posto di glicina e metossido di sodio). La reazione è stata riscaldata a circa 110°C fino a reazione completa. La miscela è stata raffreddata, filtrata, lavata con metanolo, essiccata sotto vuoto, disciolta in acqua e lavata con etil acetato. L'etil acetato è stato rimosso e allo strato acquoso risultante è stata aggiunta una soluzione di acido acetico (18,0 g). La sospensione è stata agitata a temperatura ambiente, filtrata e il solido lavato con acqua (3 x 30 mL), acetone freddo (5-10°C, 2 x 20 mL) ed essiccato sotto vuoto per ottenere **Composto A** (Resa: 86,1%, HPLC: 99,8%).

Esempio 11. Test biologici

Le forme solide qui fornite possono essere usate per inibire l'attività di HIF idrossilasi, aumentando così la stabilità e/o l'attività del fattore inducibile da ipossia (HIF), e possono essere usate per trattare e prevenire condizioni e disturbi associati a HIF (vedere, *ad es.*, Brevetto U.S.A. N. 7.323.475, Pubblicazione di domanda di brevetto U.S.A. N. 2007/0004627, Pubblicazione di domanda di brevetto U.S.A. N. 2006/0276477, e Pubblicazione di domanda di brevetto U.S.A. N. 2007/0259960).

L'attività biologica delle forme solide qui fornite può essere valutata usando qualsiasi metodo convenzionalmente noto. In particolari realizzazioni, cellule derivate da tessuti animali, preferibilmente tessuti umani, in grado di esprimere eritropoietina quando stimolate da composti dell'invenzione vengono coltivate per la produzione *in vitro* di proteine endogene. Le cellule contemplate per l'uso in tali metodi includono, ma non sono limitate a, cellule derivate da tessuti epatici, emopoietici, renali e neurali.

Le tecniche di coltura cellulare sono generalmente disponibili nella tecnica e includono qualsiasi metodo che mantenga la vitalità cellulare e faciliti l'espressione di proteine endogene. Le cellule vengono tipicamente coltivate in un terreno di coltura ottimizzato per la crescita cellulare, la vitalità e la produzione di proteine. Le cellule possono essere in sospensione o attaccate a un substrato e il terreno può essere fornito in modalità di alimentazione discontinua o in regime continuo. I composti dell'invenzione vengono aggiunti al mezzo di coltura a livelli che stimolano la produzione di eritropoietina senza compromettere la vitalità cellulare. L'eritropoietina prodotta dalle cellule viene secreta nel terreno di coltura. Il terreno viene poi raccolto e l'eritropoietina viene purificata usando metodi noti agli esperti nella tecnica. (Vedere, ad esempio, Lai et al. (1987) Brevetto U.S.A. N. 4.667.016; e Egrie (1985) Brevetto U.S.A. N. 4.558.006.)

Metodi di saggio adatti sono ben noti nella tecnica. I seguenti sono presentati solo come esempi e non intendono essere limitanti.

Saggio di stabilizzazione di HIF α a base di cellule

Cellule umane (ad es., cellule Hep3B da tessuto epatocellulare) derivate da vari tessuti sono state seminate separatamente in piastre di coltura da 35 mm, e coltivate a 37°C, 20% O₂, 5% CO₂ in terreno di coltura standard,

ad es., DMEM (modifica di Dulbecco del terreno Eagle), 10% di FBS (siero bovino fetale). Quando gli strati cellulari raggiungono la confluenza, il terreno è stato sostituito con terreno OPTI-MEM (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA) e gli strati cellulari sono stati incubati per circa 24 ore in 20% O₂ 5% CO₂ a 37°C. Composto A o 0,013% di DMSO (dimetilsolfossido) è stato poi aggiunto al terreno esistente e l'incubazione è stata continuata durante la notte.

Dopo l'incubazione, il terreno è stato rimosso, centrifugato e conservato per l'analisi (vedere i saggi VEGF ed EPO basati su cellule di seguito). Le cellule sono state lavate due volte in soluzione salina tamponata con fosfato fredda (PBS) e poi lisate in 1 mL di Tris 10 mM (pH 7,4), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% IGEPAL (Sigma-Aldrich, St. Louis MO) e una miscela di inibitori di proteasi (Roche Molecular Biochemicals) per 15 minuti su ghiaccio. I lisati di cellule sono stati centrifugati a 3.000 xg per 5 minuti a 4°C e sono state raccolte le frazioni citoplasmatiche (supernatante). I nuclei (pellet) sono stati risospesi e lisati in 100 µL di HEPES 20 mM (pH 7,2), NaCl 400 mM, EDTA 1 mM, ditiotreitolo 1 mM e una miscela di proteasi (Roche Molecular Biochemicals), centrifugati a 13.000 xg per 5 minuti a 4°C e sono state raccolte le frazioni proteiche nucleari (supernatante).

Le frazioni di proteine nucleari raccolte sono state analizzate per HIF-1 α usando un saggio immunologico QUANTIKINE (R&D Systems, Inc., Minneapolis MN) in base alle istruzioni del produttore.

Saggio EPO basato su cellule

Cellule Hep3B (cellule di carcinoma epatocellulare umano da ATCC, cat # HB-8064) sono state piastrate a 25.000 cellule per pozzetto in piastre a 96 pozzetti. Il giorno successivo, le cellule sono state lavate una volta con DMEM (Cellgro, cat # 10-013-CM) + siero bovino fetale 0,5% (Cellgro, cat # 35-010-CV) e incubate con varie concentrazioni di composto o controllo del veicolo (0,15% DMSO) in DMEM + 0,5% siero fetale bovino per 72 ore. Supernatanti di coltura senza cellule sono stati generati mediante trasferimento in una piastra a 96 pozzetti a fondo conico e centrifugazione per 5 minuti a 2000 gpm. Il supernatante è stato quantificato per EPO usando un kit ELISA per EPO umana (R&D Systems, cat # DEP 00).

I valori di EPO per i composti riportati qui (*ad es.*, Tabella 22) sono il valore misurato per le cellule più il composto meno il valore per il controllo del veicolo per la stessa preparazione cellulare. I valori di EPO per il

controllo del veicolo per le preparazioni cellulari variavano da 0-12,5 mIU/mL.

Saggio HIF-PH

Acido chetoglutarico α -[1- ^{14}C]-sale di sodio, sale sodico dell'acido alfa-chetoglutarico e peptide purificato per HPLC sono stati ottenuti da fonti commerciali, per esempio, Perkin-Elmer (Wellesley MA), Sigma-Aldrich e SynPep Corp. (Dublin CA), rispettivamente. I peptidi per uso nel saggio erano frammenti di HIF α come descritto sopra o come descritto nella pubblicazione internazionale WO 2005/118836. Ad esempio, un peptide HIF da usare nel saggio HIF-PH era [metossicumarina]-DLLEALAPYIPADDDFQL-ammide. HIF-PH, ad esempio HIF-PH2 (noto anche come EGLN1 o PHD2), è stato espresso in, per esempio, cellule di insetto Hi5 e parzialmente purificato, ad esempio attraverso una colonna di cromatografia a scambio ionico SP. L'attività enzimatica è stata determinata catturando $^{14}\text{CO}_2$ usando un saggio descritto da Kivirikko e Myllyla (1982, *Methods Enzymol.* 82: 245-304). Le reazioni di saggio contenevano 50 mM di HEPES (pH 7,4), 100 μM di acido α -chetoglutarico sale di sodio, 0,30 $\mu\text{Ci/mL}$ di acido α -chetoglutarico α -[1- ^{14}C]-sale di sodio, 40 μM di FeSO_4 , 1 mM di ascorbato, 1541,8 unità/ml di catalasi, con o senza 50 μM di substrato peptidico e varie concentrazioni di composto dell'invenzione. Le reazioni sono state avviate aggiungendo l'enzima HIF-PH.

Il ricambio percentuale dipendente da peptide è stato calcolato sottraendo il ricambio percentuale in assenza di peptide dal ricambio percentuale in presenza di peptide substrato. Inibizione percentuale e CI_{50} sono state calcolate usando il ricambio percentuale dipendente da peptide a date concentrazioni di inibitore. Il calcolo dei valori di CI_{50} per ciascun inibitore è stato condotto usando il software GraFit (Erithacus Software Ltd., Surrey UK). I risultati sono riassunti nella Tabella 22.

La seguente Tabella 22 era destinata a dimostrare l'utilità farmacologica del Composto A. Inibendo gli enzimi HIF proli idrossilasi (ad esempio PHD2, noto anche come EGLN1), il Composto A stabilizza HIF α , che poi si combina con HIF β per formare un fattore di trascrizione attivo che aumenta l'espressione di numerosi geni coinvolti nella risposta a condizioni ipossiche e ischemiche, inclusa eritropoietina (EPO). Pertanto, il Composto A può essere usato per la prevenzione, il pretrattamento o il trattamento di condizioni associate a HIF e/o EPO incluse condizioni anemiche, ischemiche e ipossiche.

Tabella 22

	CI₅₀ PHD2 (μM)	EPO* cellulare (mIU/mL)
Composto A Forma A	2,1	182

*** EPO cellulare misurato a 30 μM di composto in DMSO rispetto al controllo di solo DMSO**

RIVENDICAZIONI

1. Acido [(4-idrossi-1-metil-7-fenossi-isochinolin-3-carbonil)-ammino]-acetico cristallino (Composto A Forma A) caratterizzato da un diffrattogramma a raggi X da polvere comprendente i seguenti picchi: 8,5, 12,8, 16,2, 21,6, 22,9, e 27,4 $^{\circ}2\theta \pm 0,2^{\circ}2\theta$, quando misurato usando radiazione Cu K α .
2. Composto A Forma A secondo la rivendicazione 1, in cui il diffrattogramma è sostanzialmente come mostrato in Figura 1.
3. Composto A Forma A secondo la rivendicazione 1, caratterizzato da una curva di calorimetria a scansione differenziale (DSC) che comprende un evento endotermico a circa 223°C.
4. Composto A Forma A secondo la rivendicazione 3, in cui la curva DSC è sostanzialmente come mostrata in Figura 2.
5. Composizione farmaceutica comprendente Composto A Forma A secondo la rivendicazione 1 e un eccipiente accettabile farmaceuticamente.
6. Composizione farmaceutica della rivendicazione 5, in cui almeno circa 85%, almeno circa 90%, almeno circa 95%, almeno circa 99%, almeno circa 99,5%, almeno circa 99,9%, o almeno circa 99,99% di Composto A nella composizione è in Forma A.
7. Composto A Forma A secondo la rivendicazione 1, per uso in un metodo per trattare, pretrattare o ritardare l'insorgenza o la progressione di una condizione mediata almeno in parte da fattore inducibile per ipossia (HIF).
8. Composto per l'uso della rivendicazione 7, in cui la condizione mediata almeno in parte da HIF è danno tissutale associato ad ischemia o ipossia.
9. Composto per l'uso della rivendicazione 8, in cui l'ischemia è associata ad un evento acuto scelto dal gruppo costituito da infarto miocardico, embolia polmonare, infarto intestinale, insufficienza renale cronica, ictus ischemico, e danno renale da ischemia-riperfusion.
10. Composto per l'uso della rivendicazione 8, in cui l'ischemia è associata ad un evento cronico scelto dal gruppo costituito da cirrosi cardiaca, attacco ischemico transitorio, degenerazione maculare, malattia delle arterie periferiche, e insufficienza cardiaca congestizia.

11. Composto A Forma A della rivendicazione 1 per uso in un metodo per trattare, pretrattare o ritardare l'insorgenza o la progressione di una condizione mediata almeno in parte da eritropoietina (EPO).

12. Composto A Forma A della rivendicazione 1 per l'uso in un metodo per trattare, pretrattare o ritardare l'insorgenza o la progressione di anemia.

13. Composto per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 7 a 12, in cui:

almeno circa 85%, almeno circa 90%, almeno circa 95%, almeno circa 99%, almeno circa 99,5%, almeno circa 99,9%, o almeno circa 99,99% del composto usato nel metodo è Composto A Forma A.

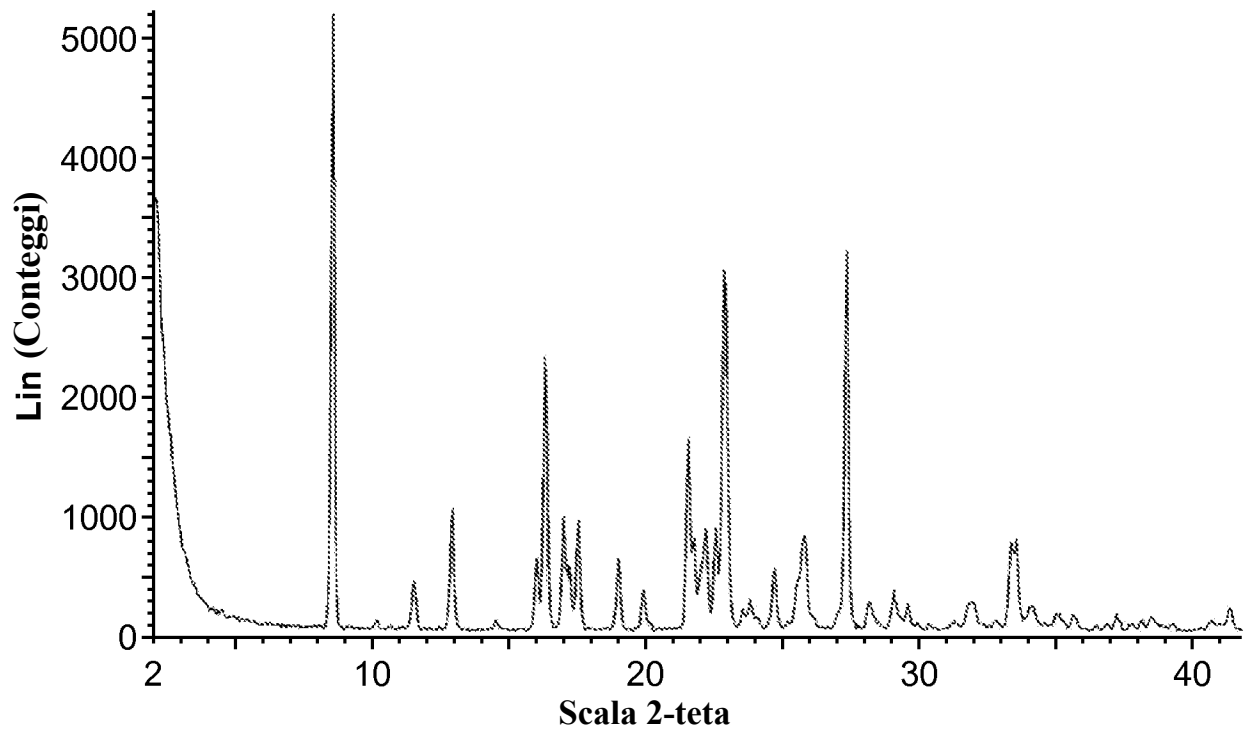


FIG. 1

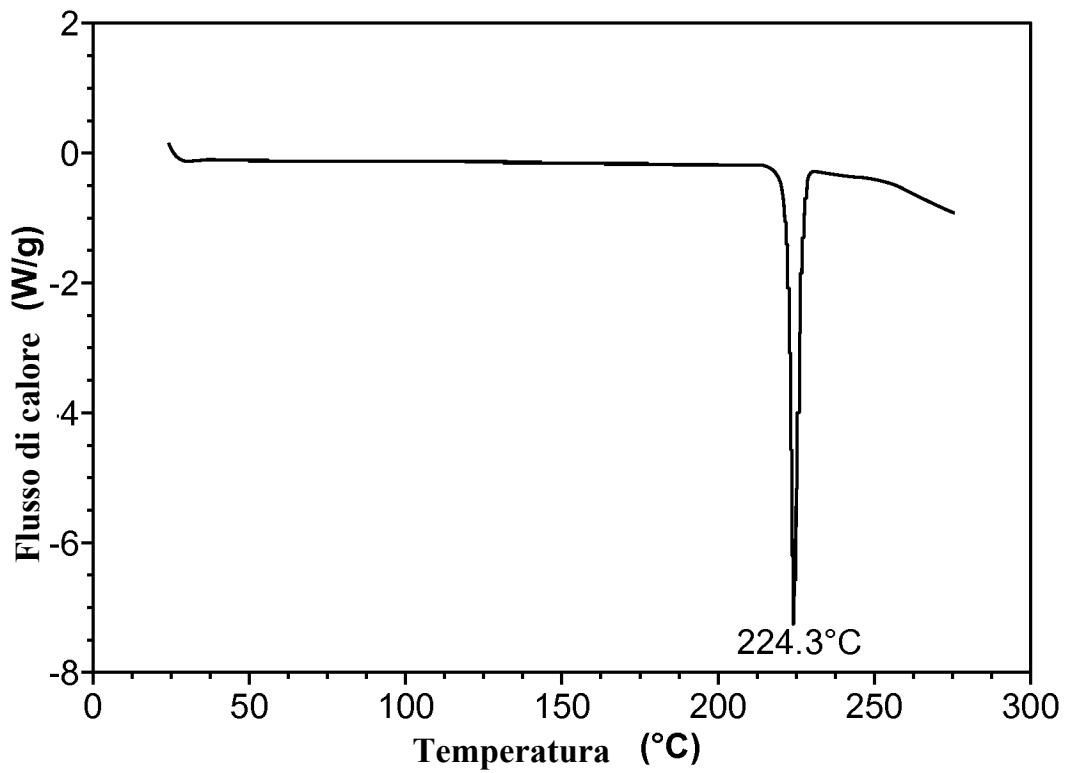


FIG. 2

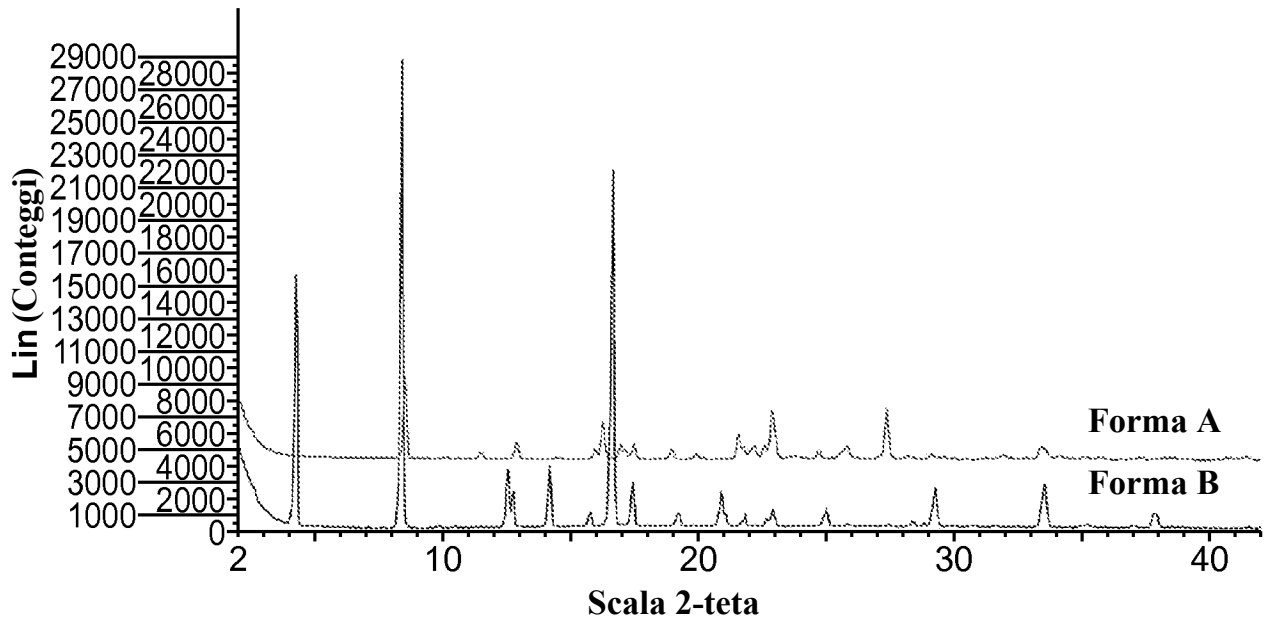


FIG. 3

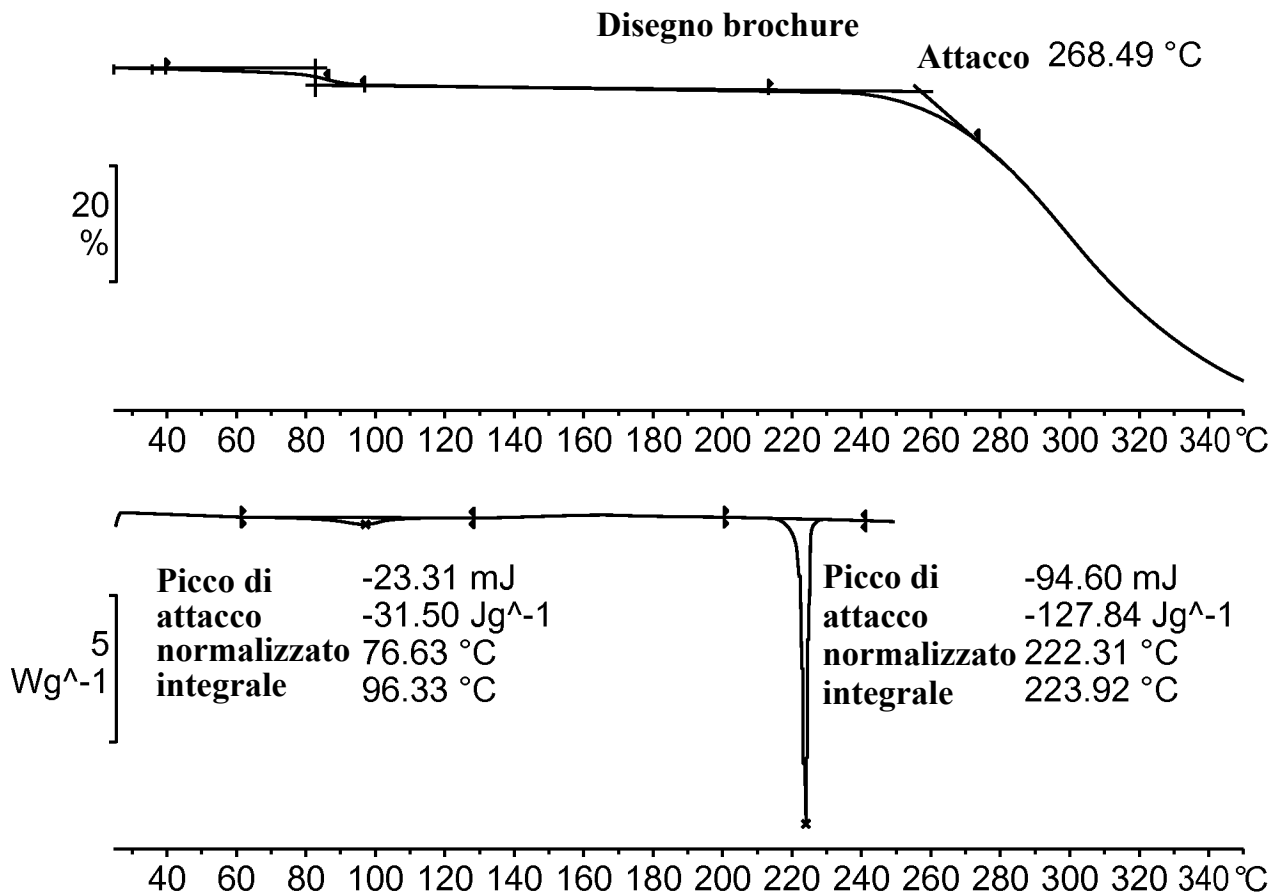


FIG. 4

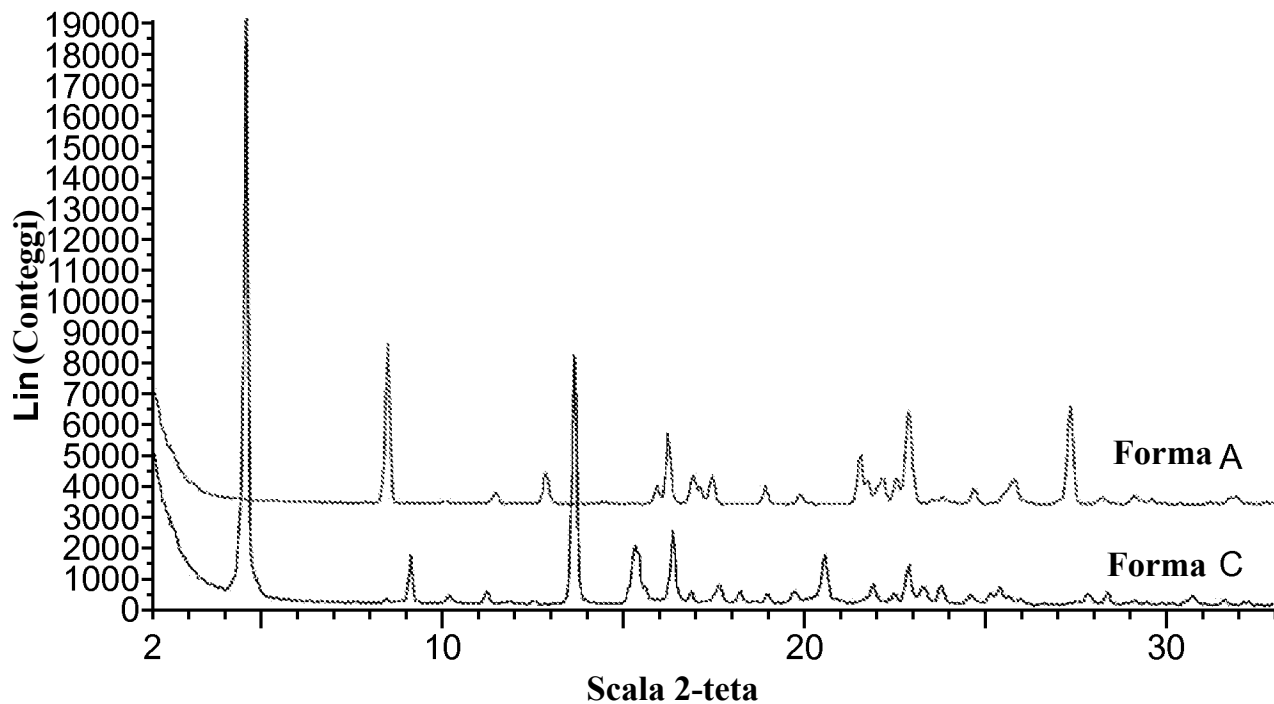


FIG. 5

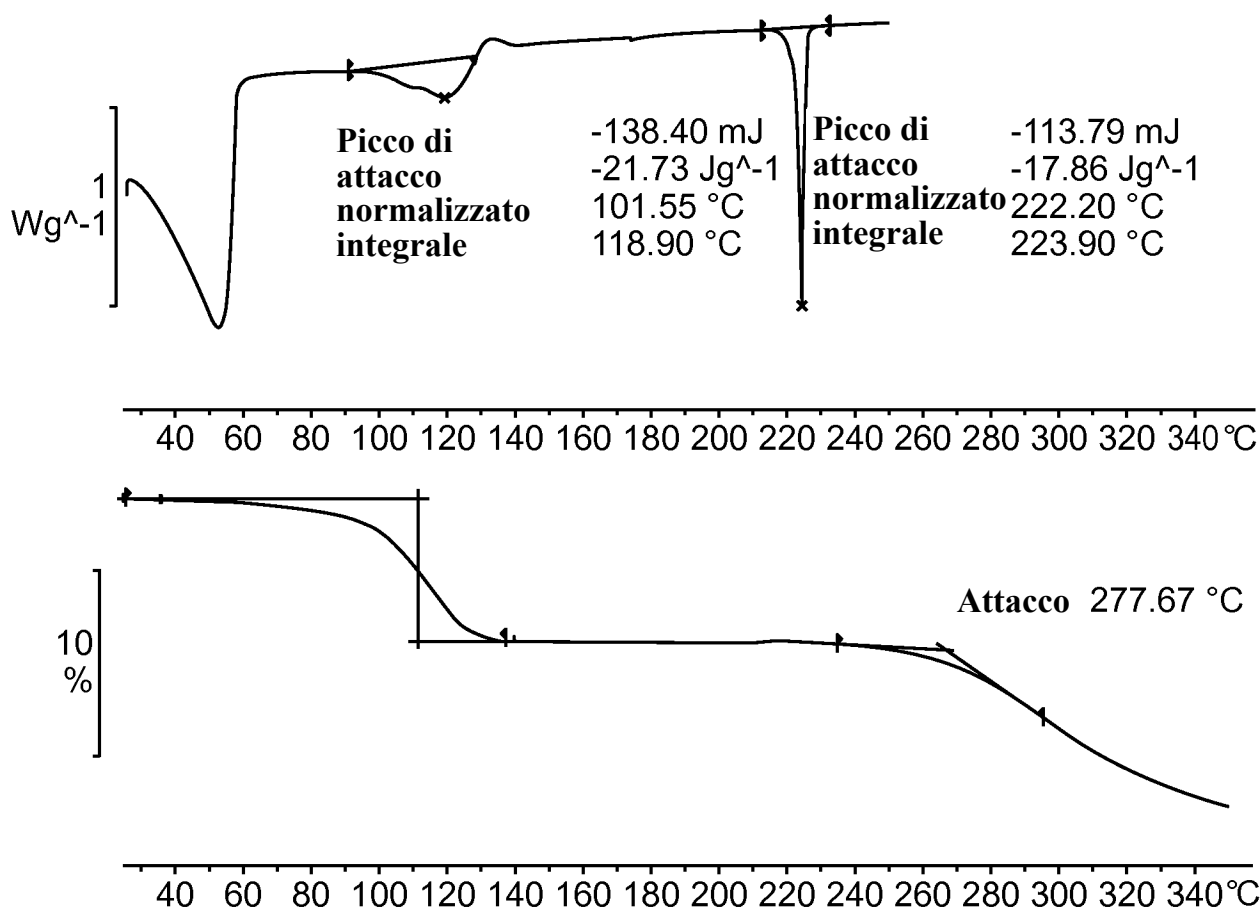


FIG. 6

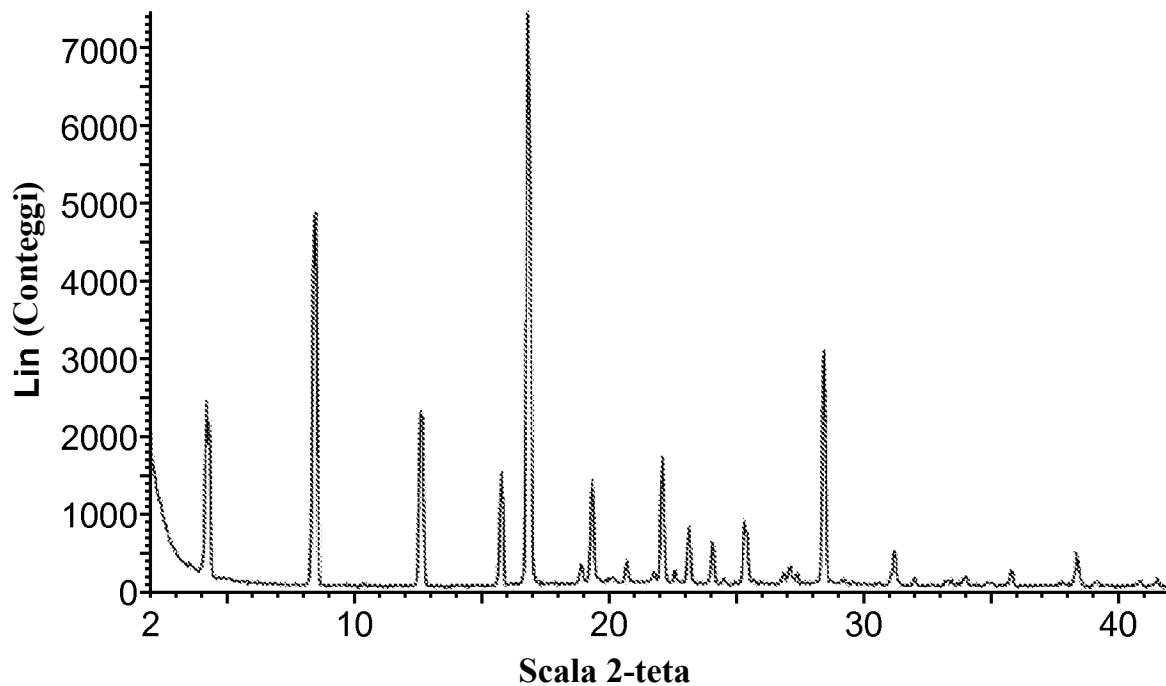


FIG. 7

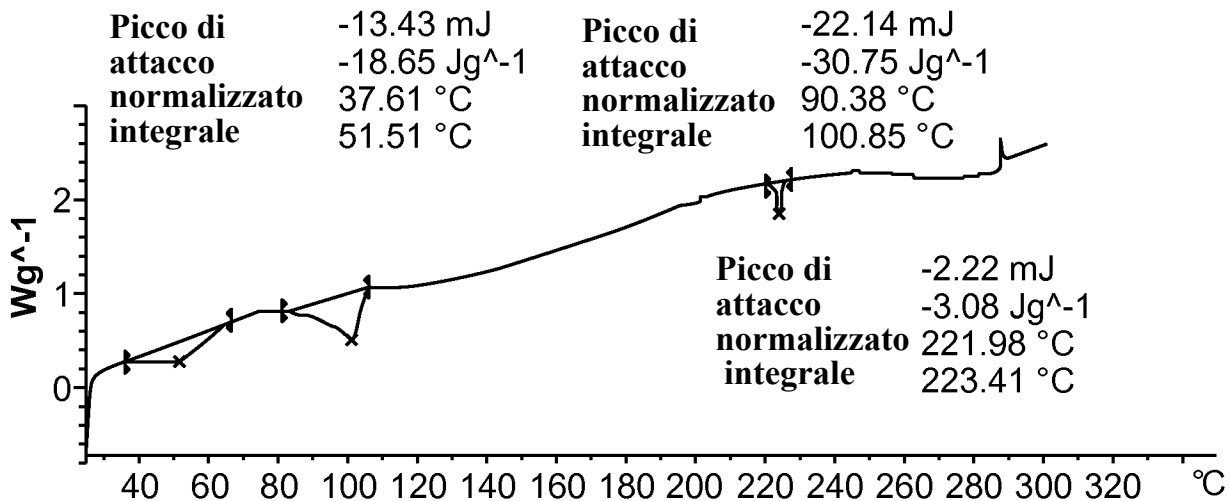
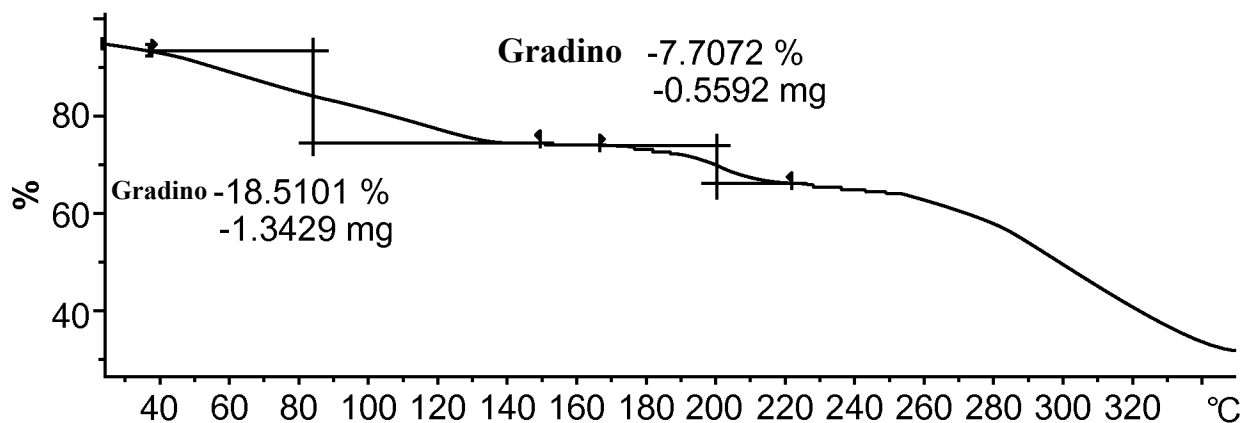


FIG. 8

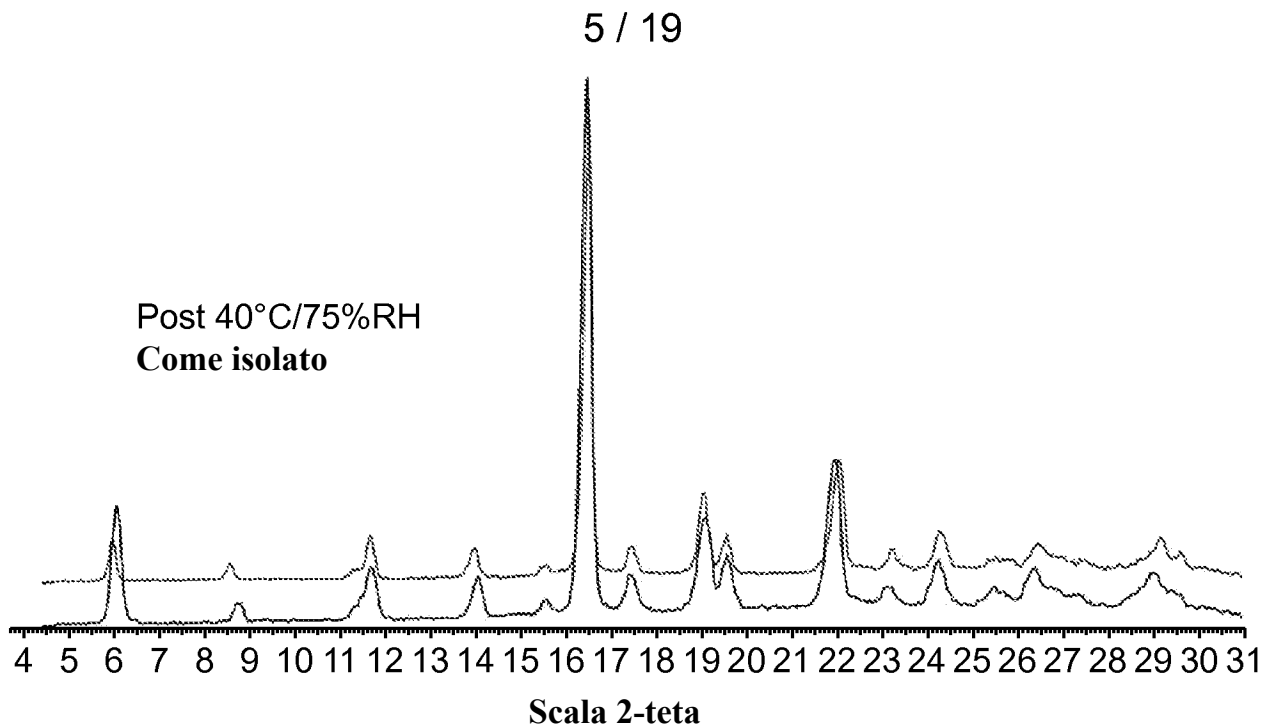


FIG. 9

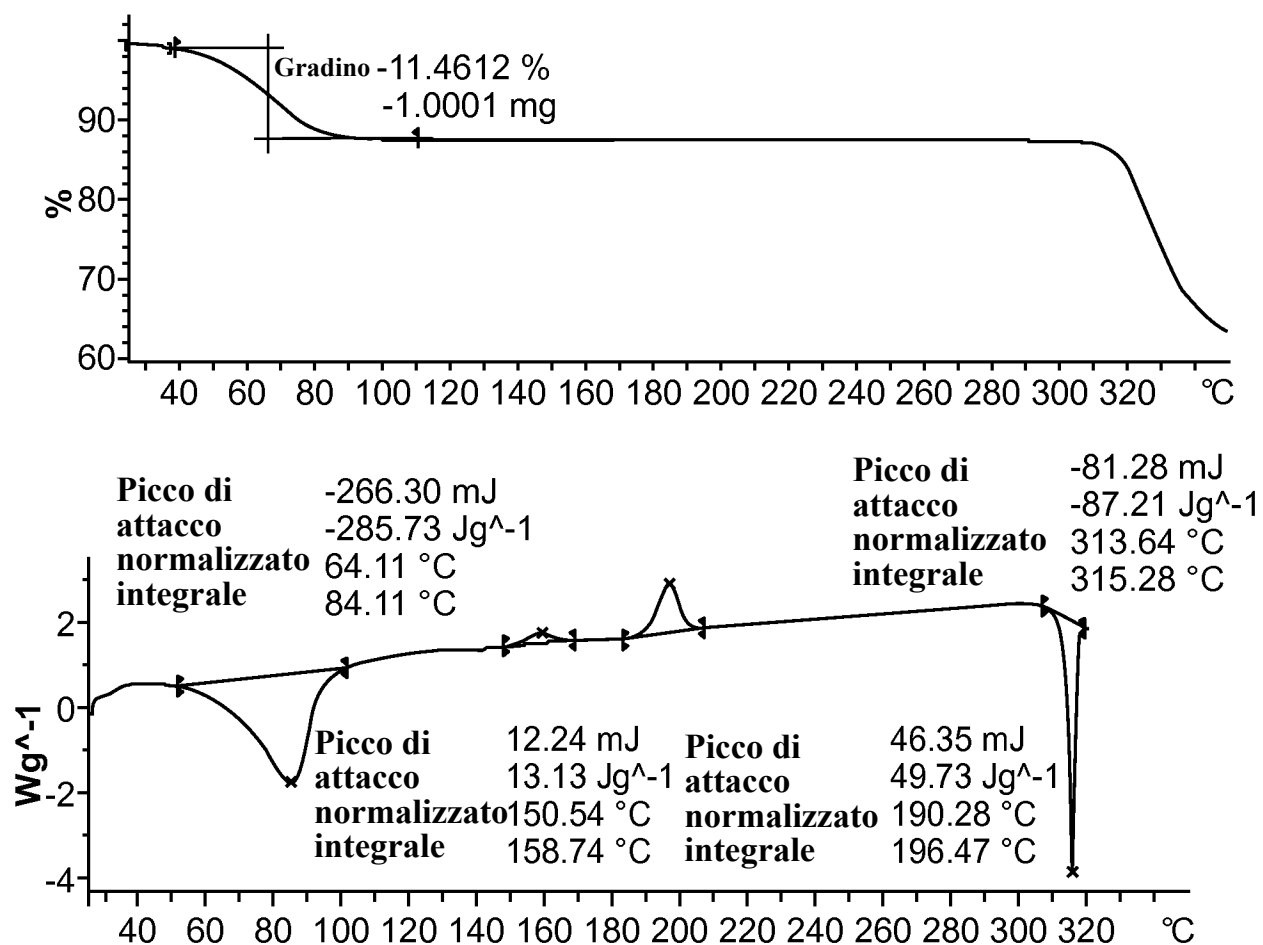


FIG. 10

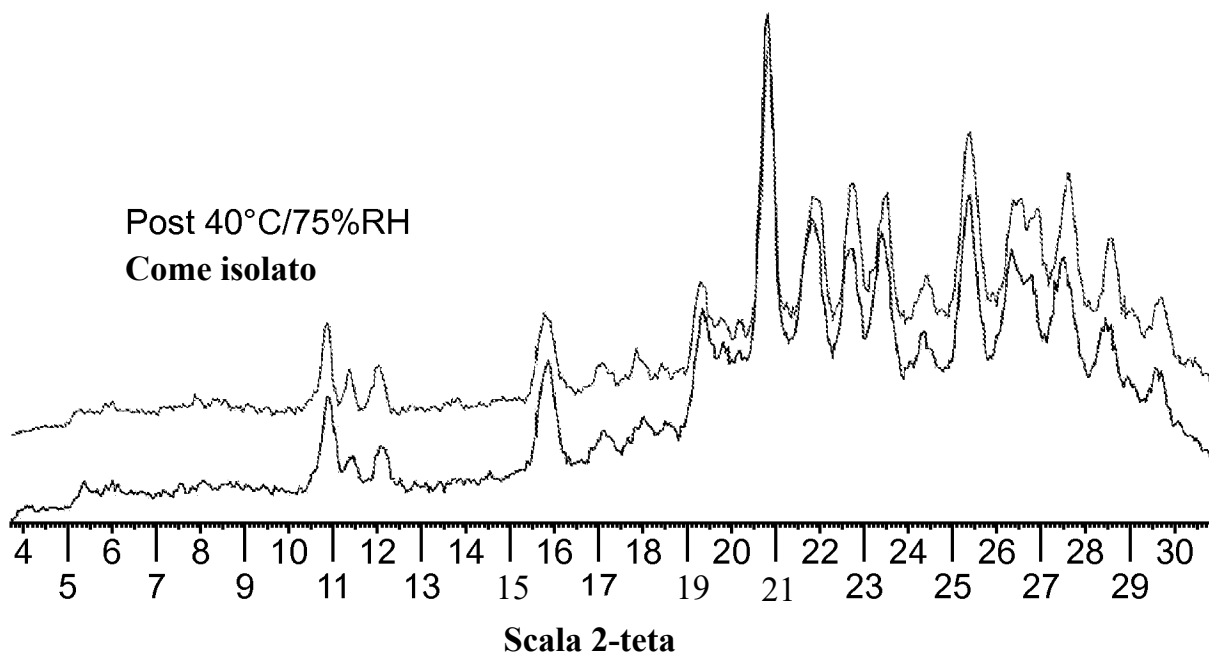


FIG. 11

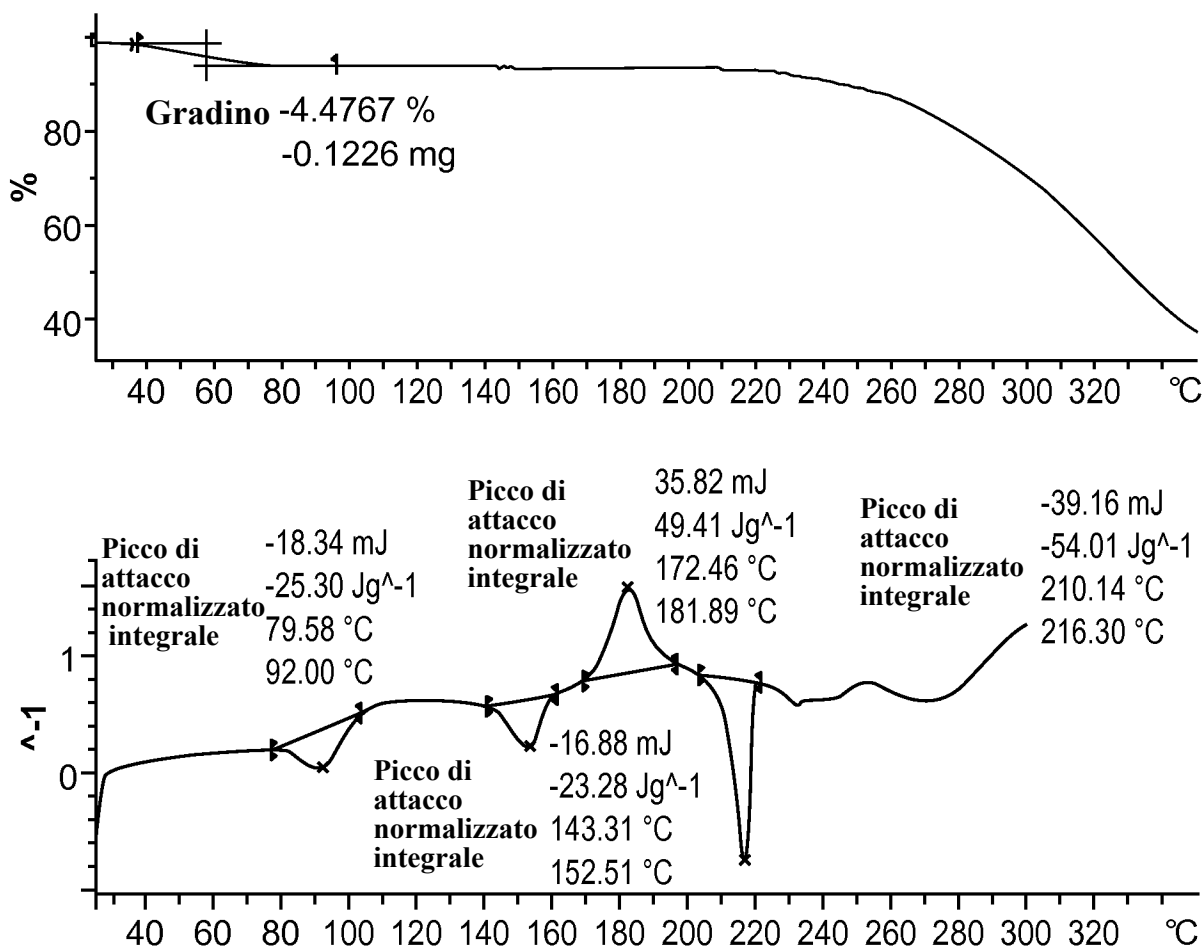


FIG. 12

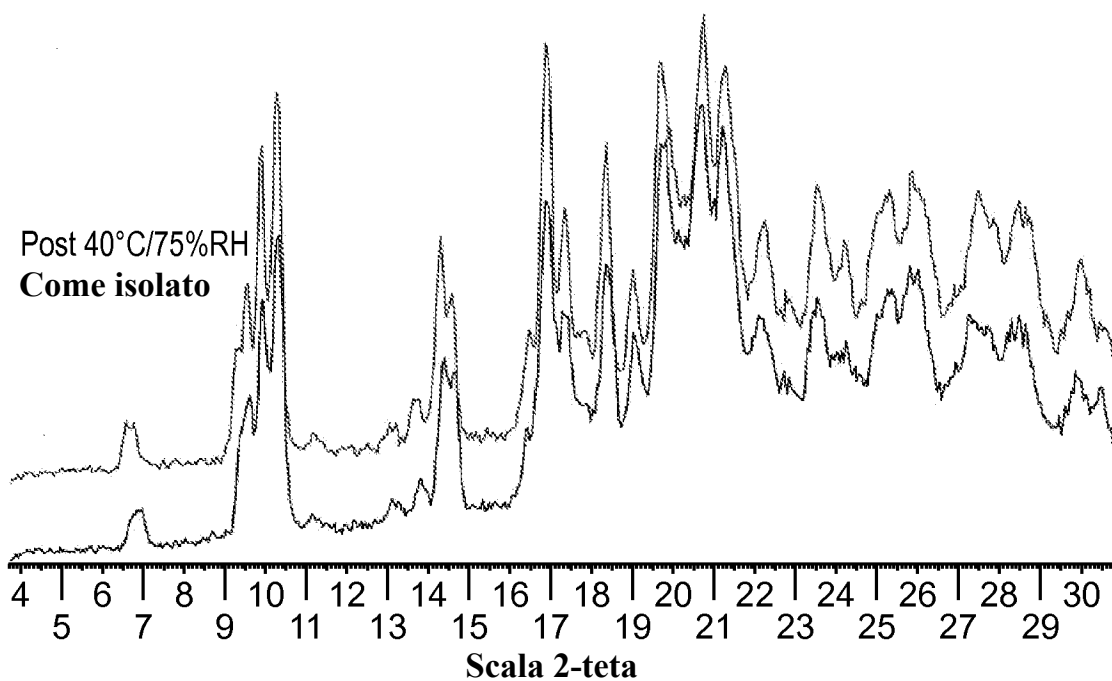


FIG. 13

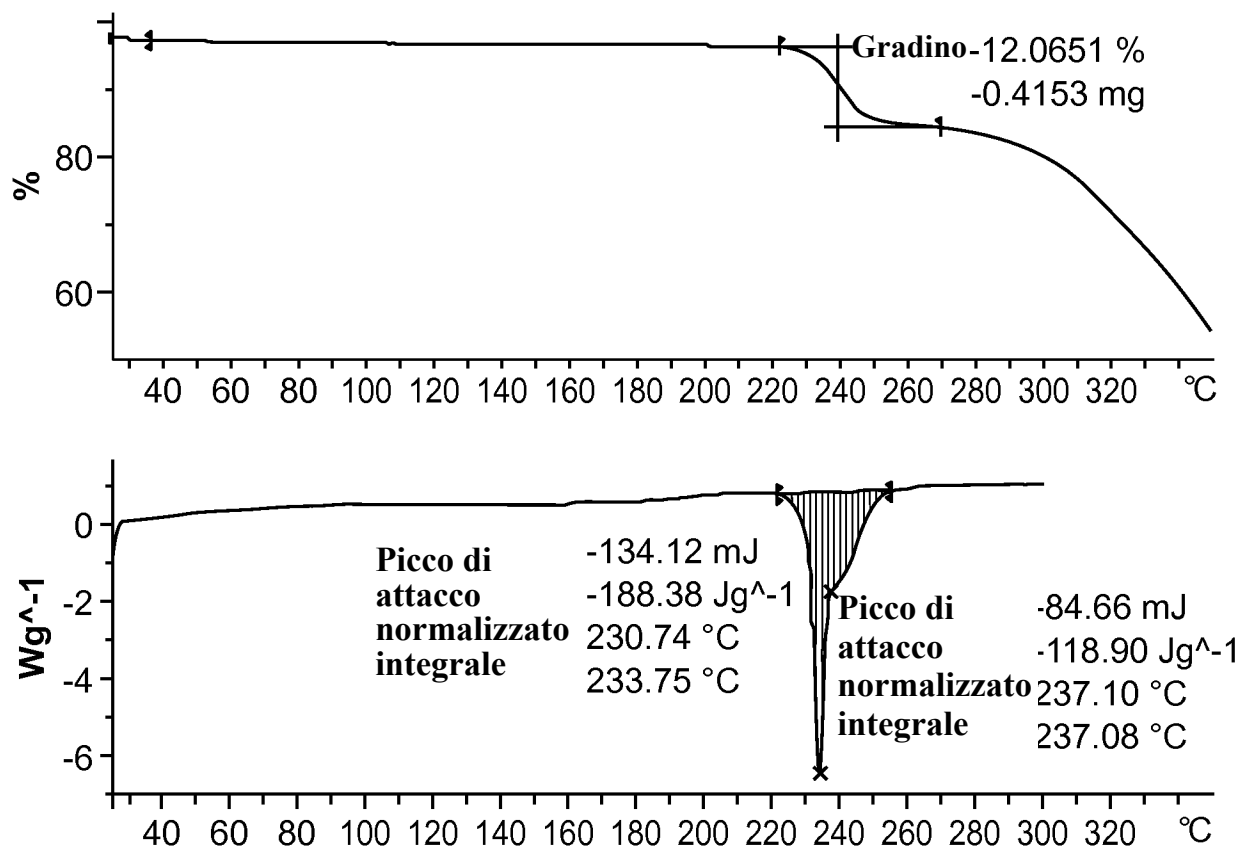


FIG. 14

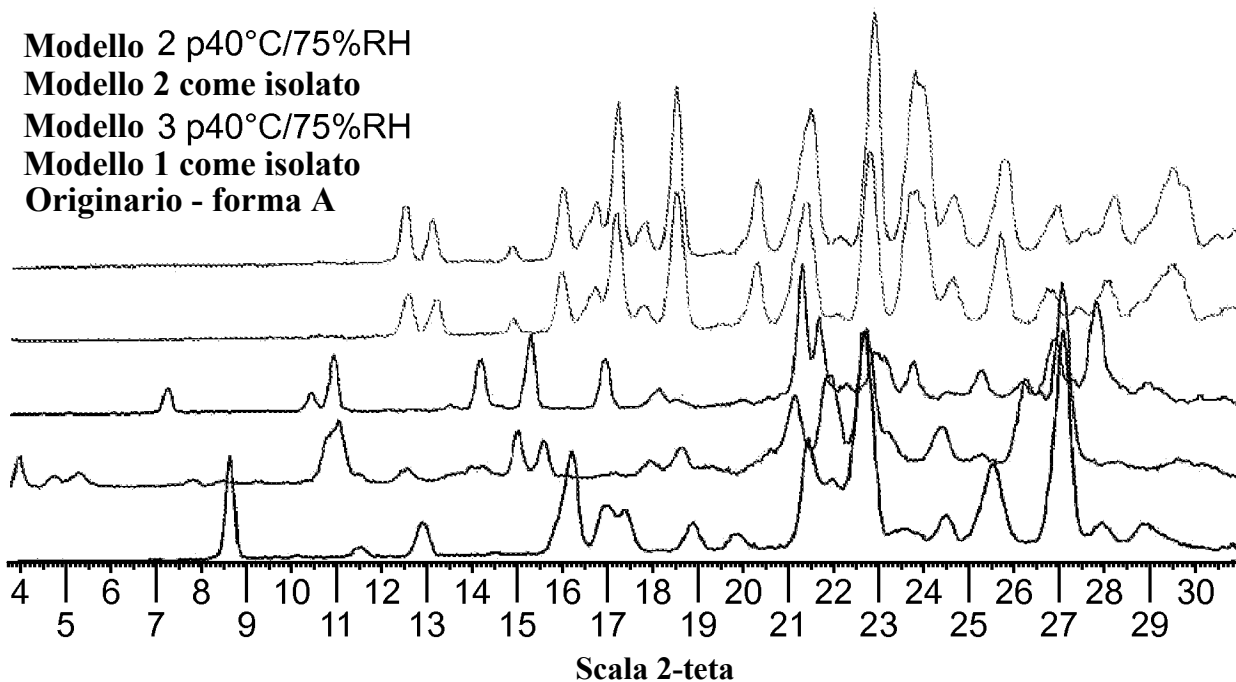


FIG. 15

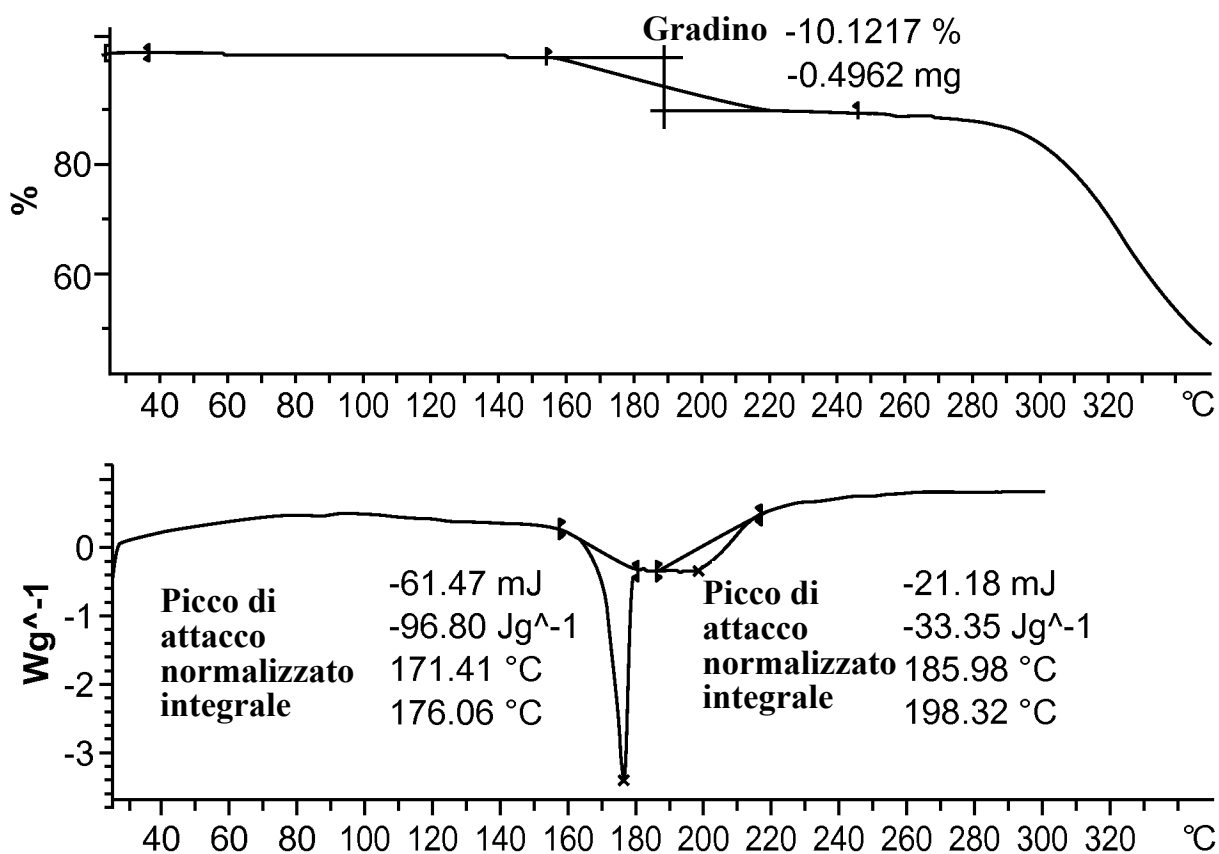


FIG. 16

Modello del sale 2 p40°/75%RH
 Modello del sale 1 – THF
 Modello del sale 1 – acetone
 Originario - forma A

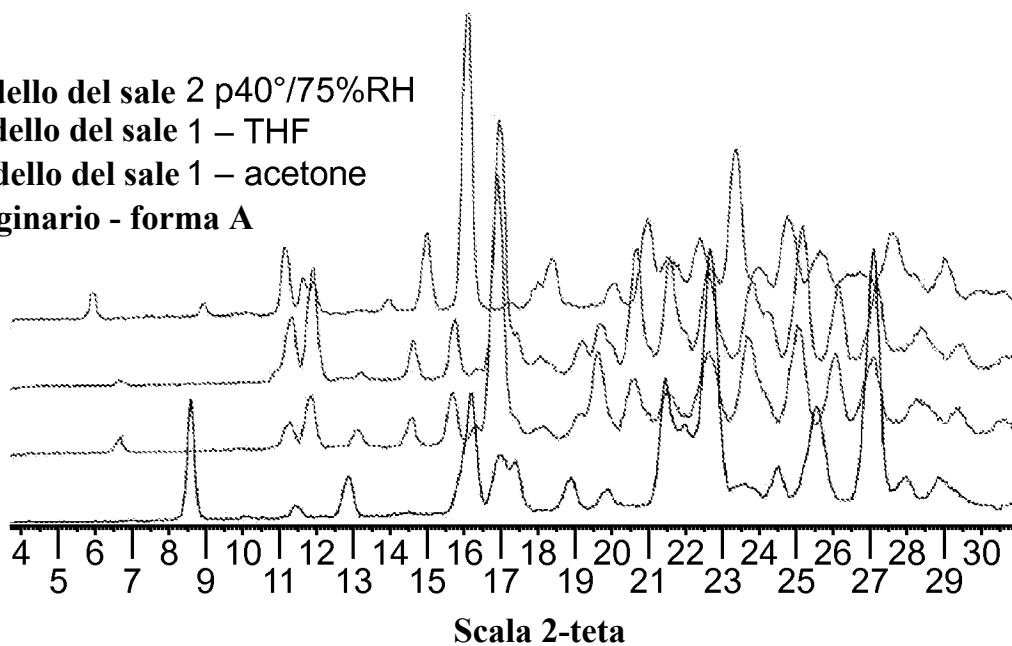


FIG. 17

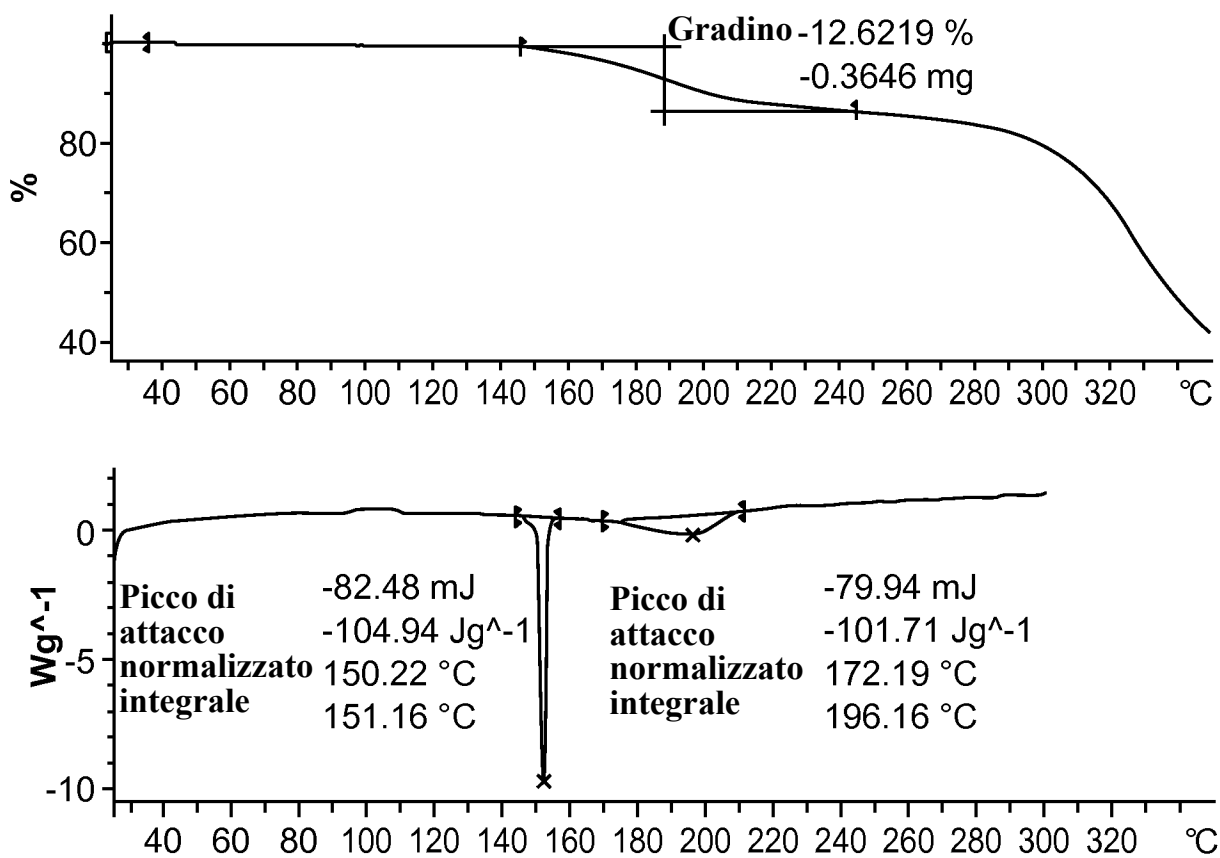


FIG. 18

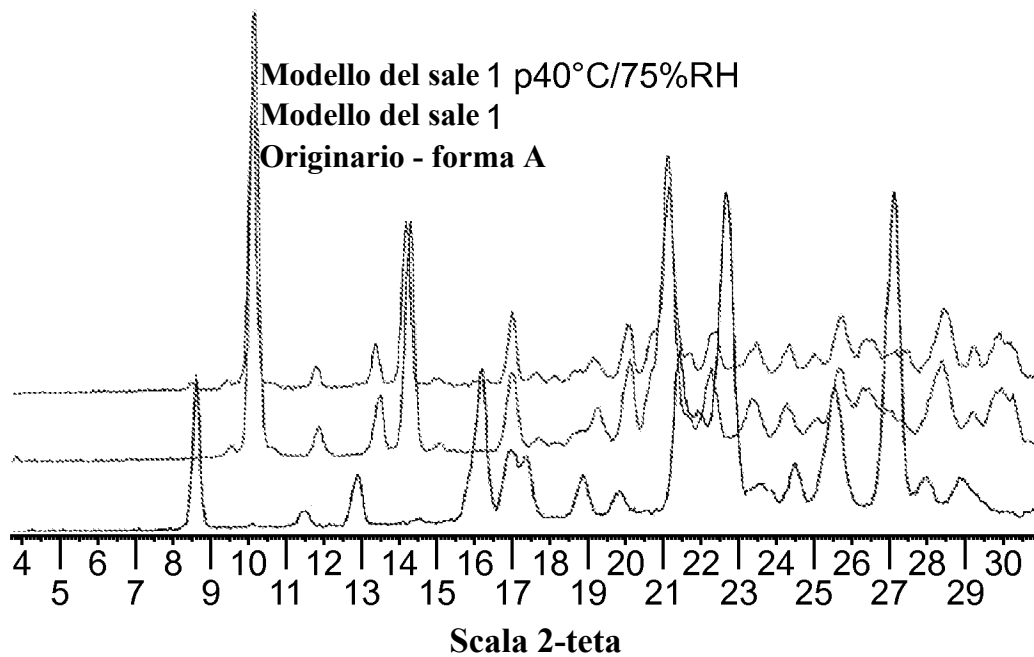


FIG. 19

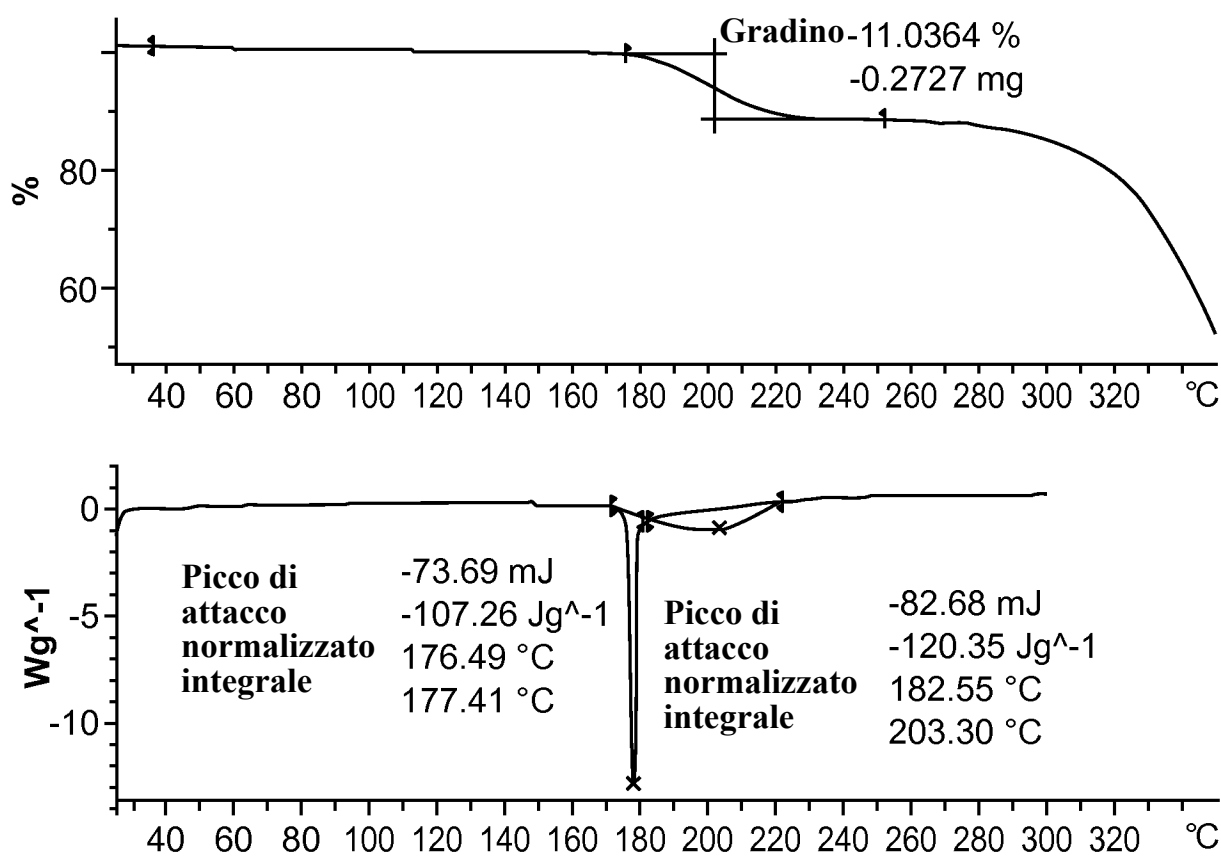


FIG. 20

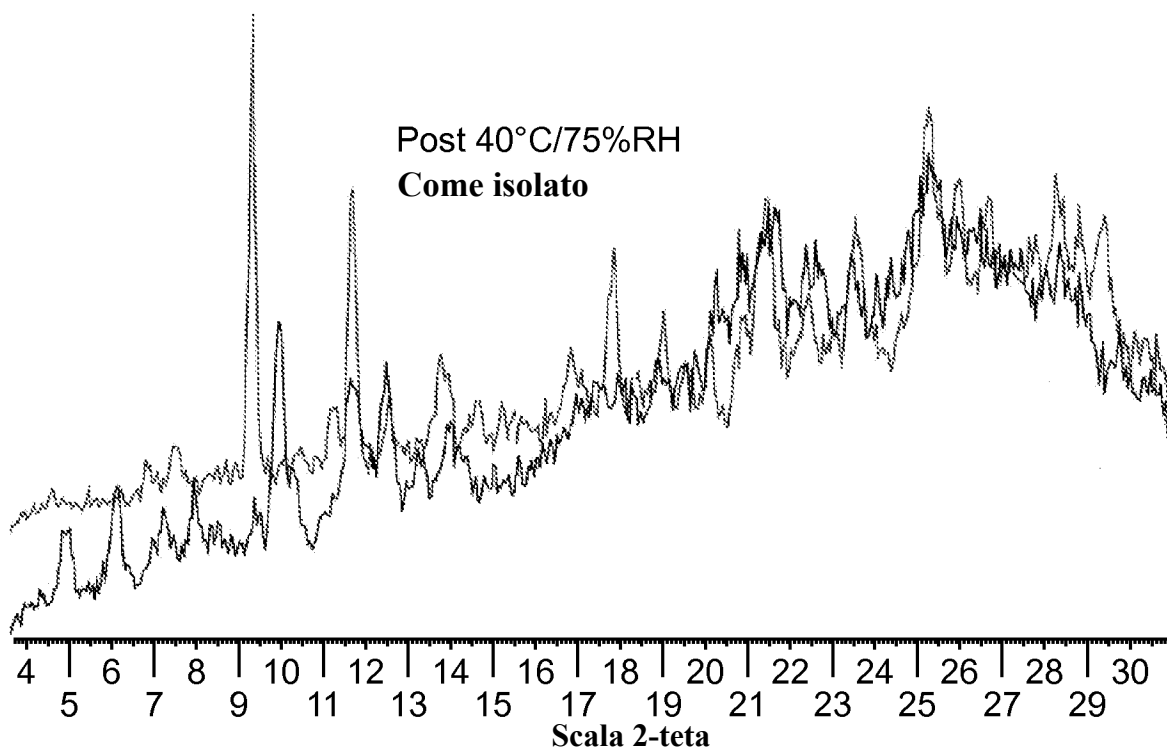


FIG. 21

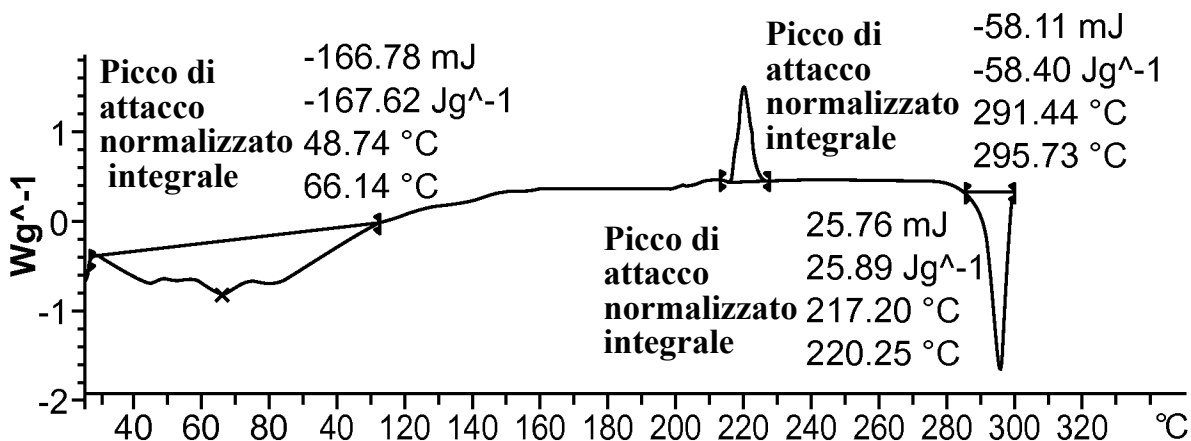
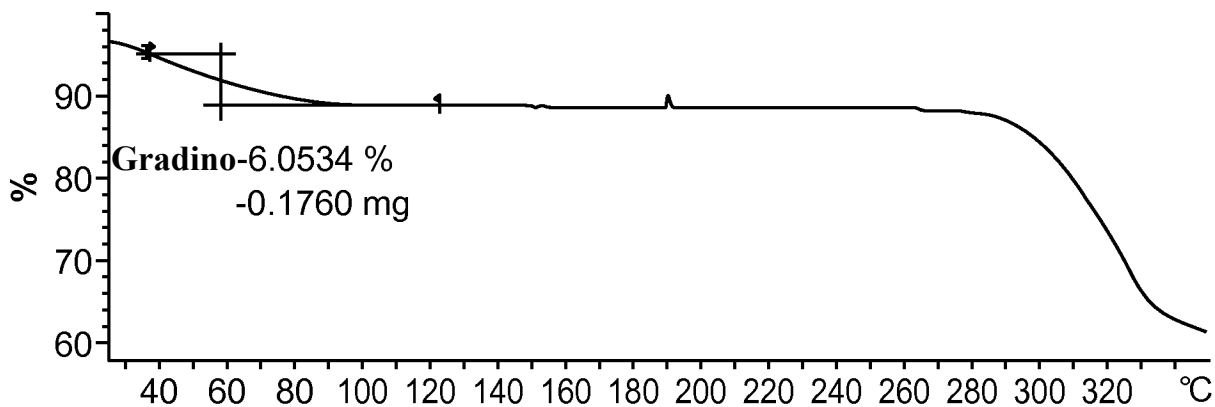


FIG. 22

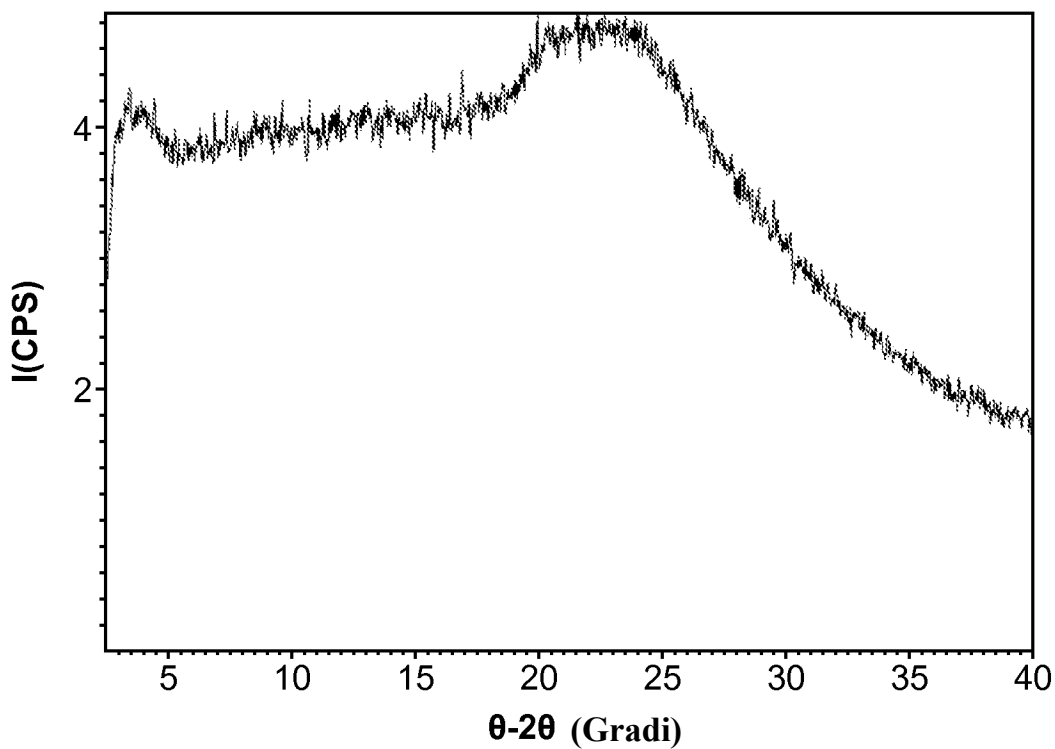


FIG. 23

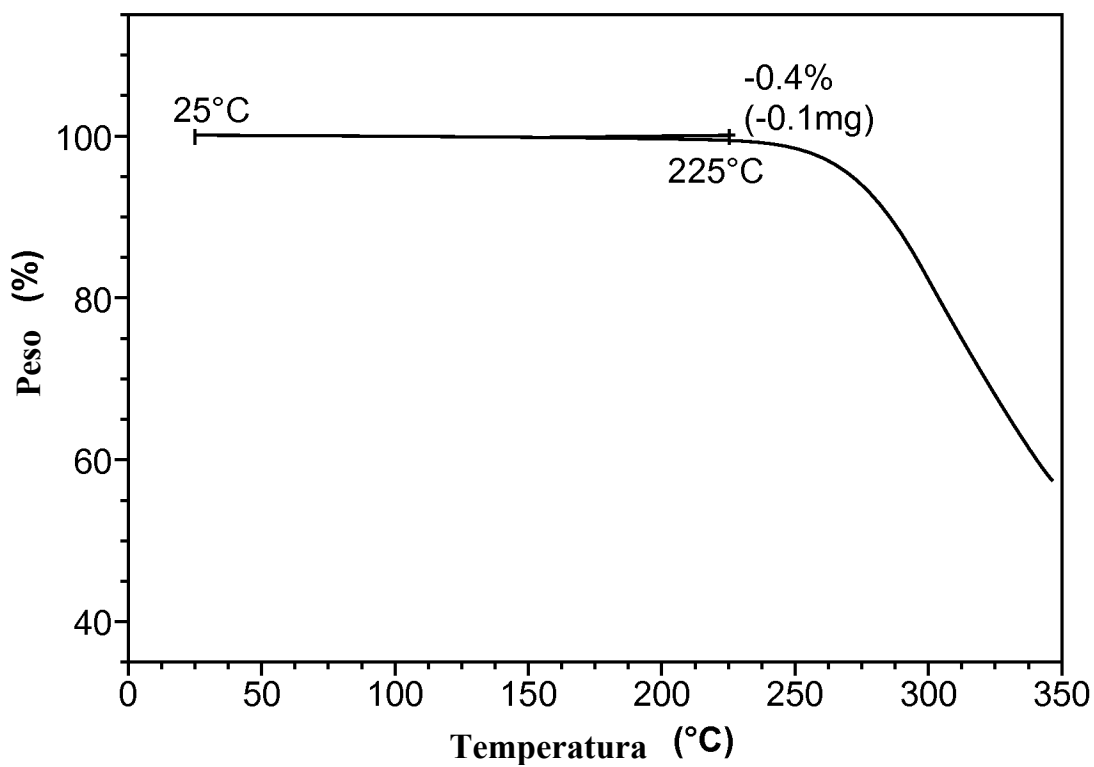


FIG. 24

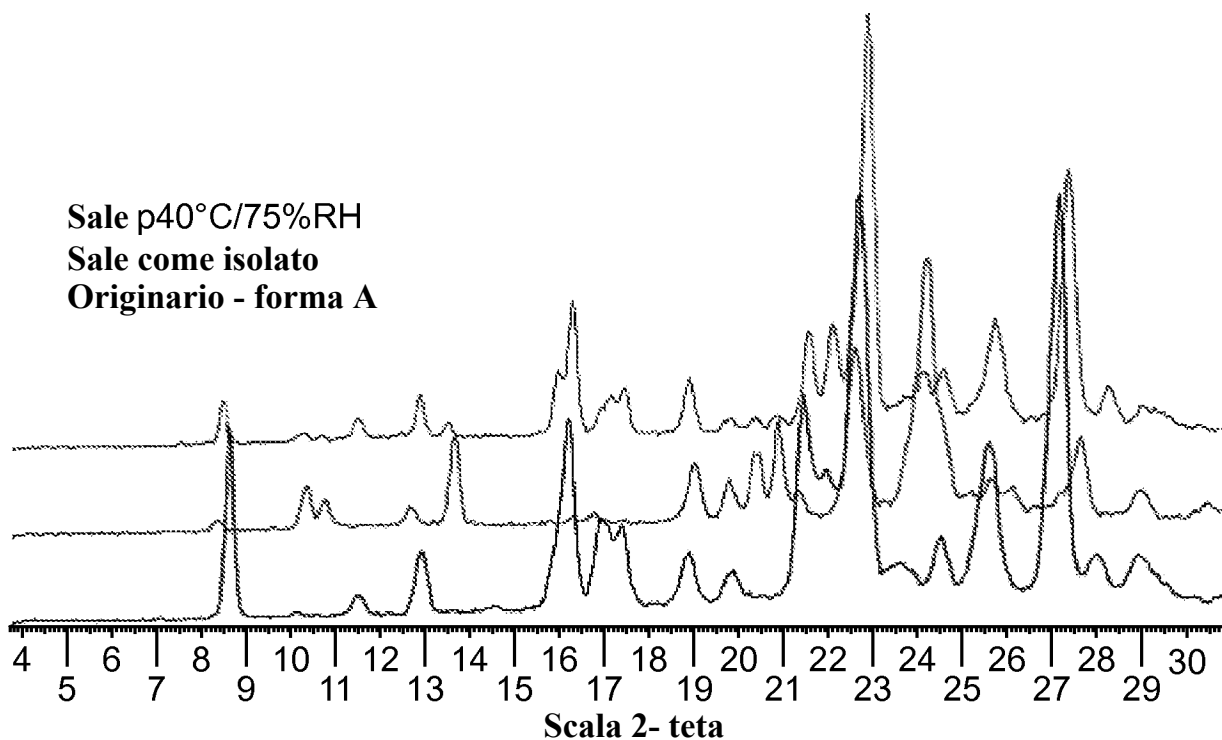


FIG. 25

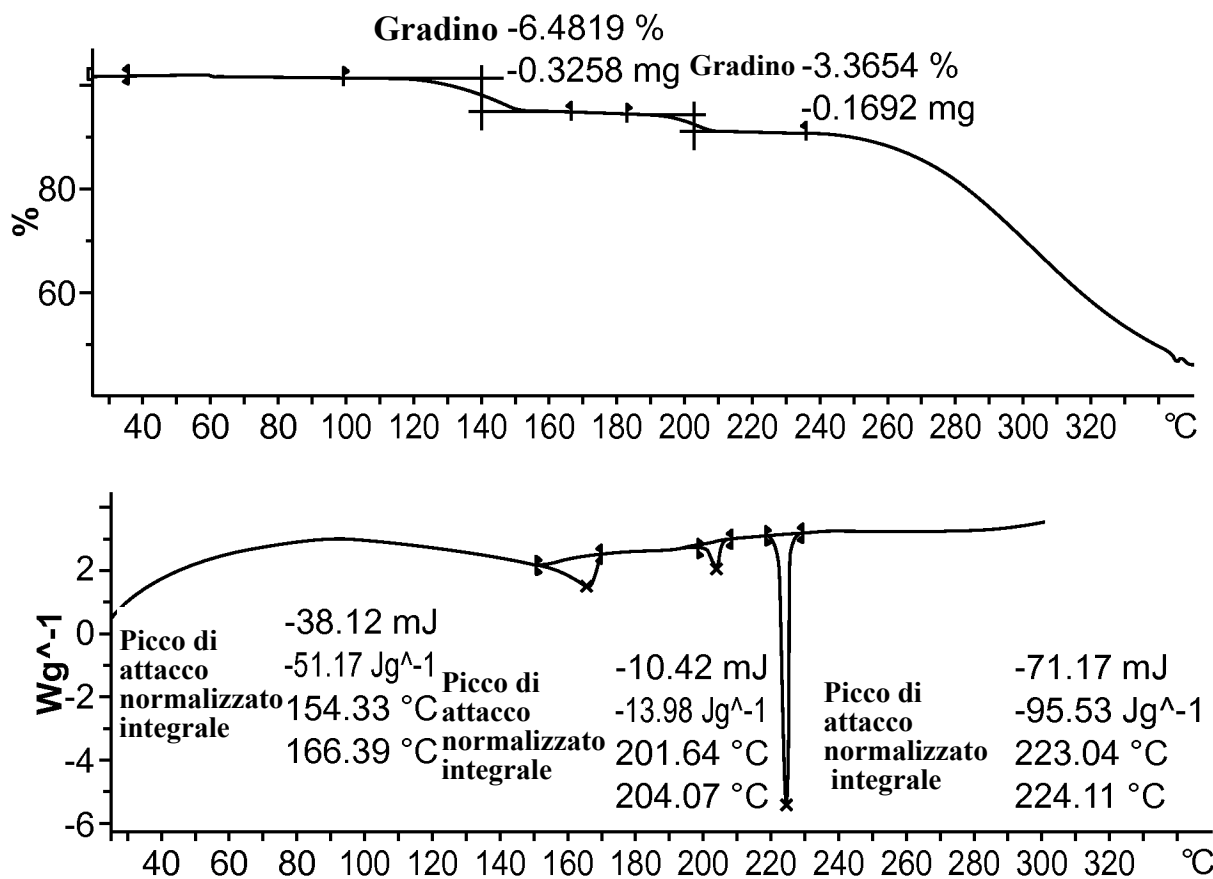


FIG. 26

Sale p40°C/75%RH
 Sale come isolato
 Originario - forma A

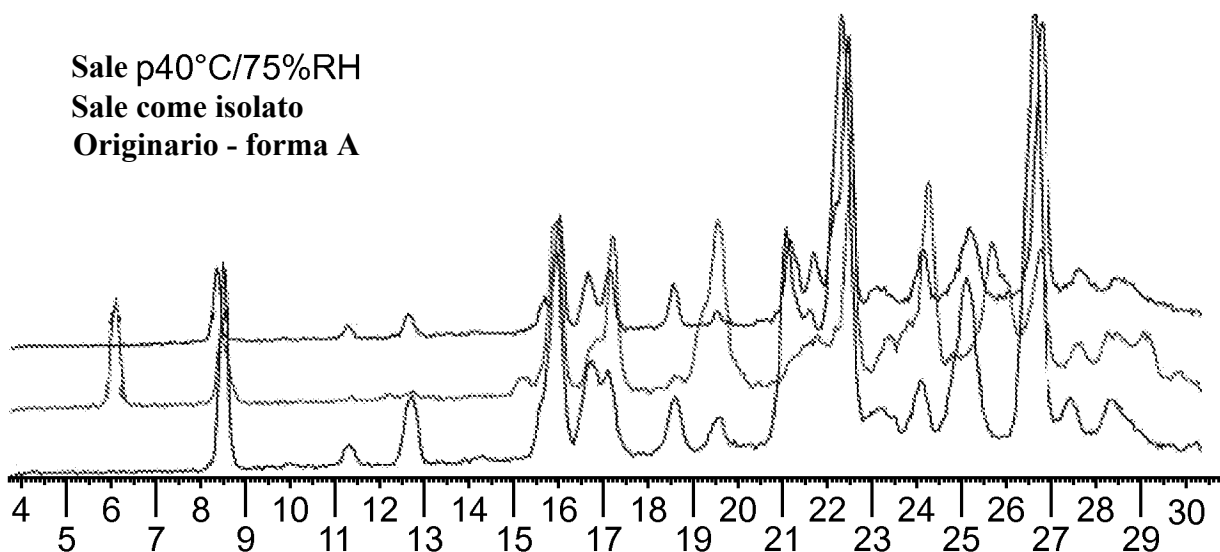


FIG. 27

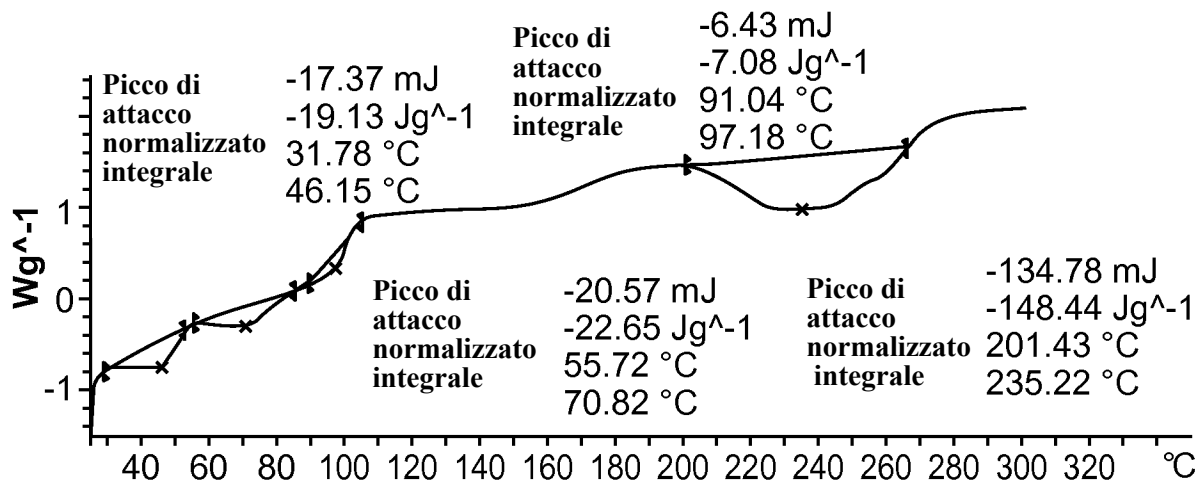
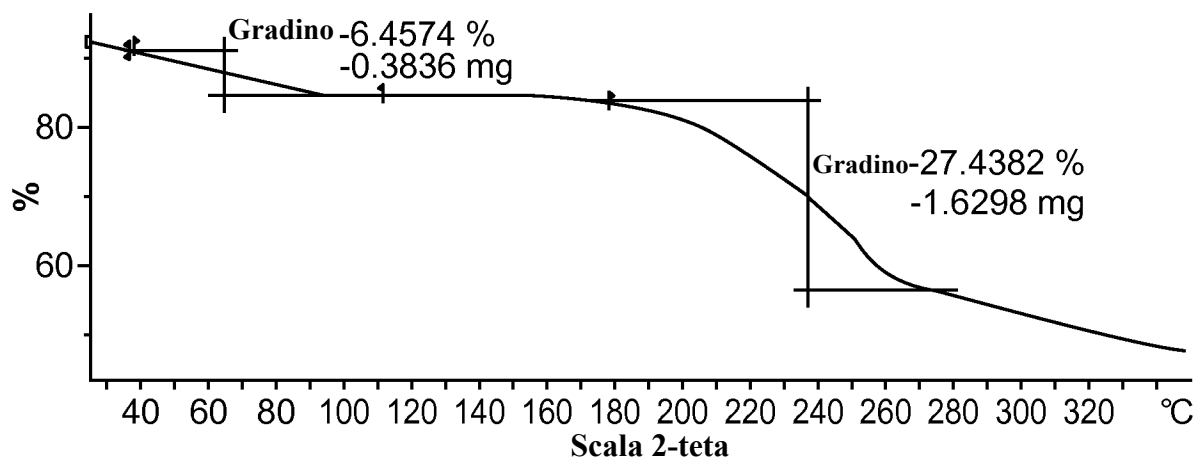


FIG. 28

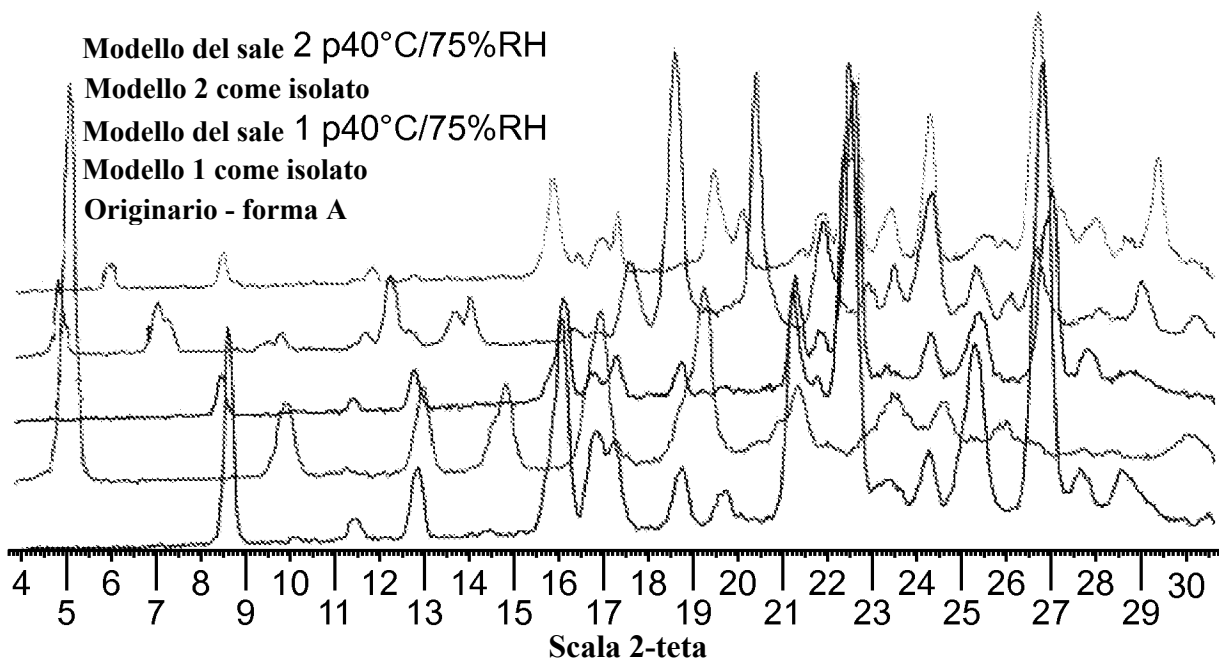


FIG. 29

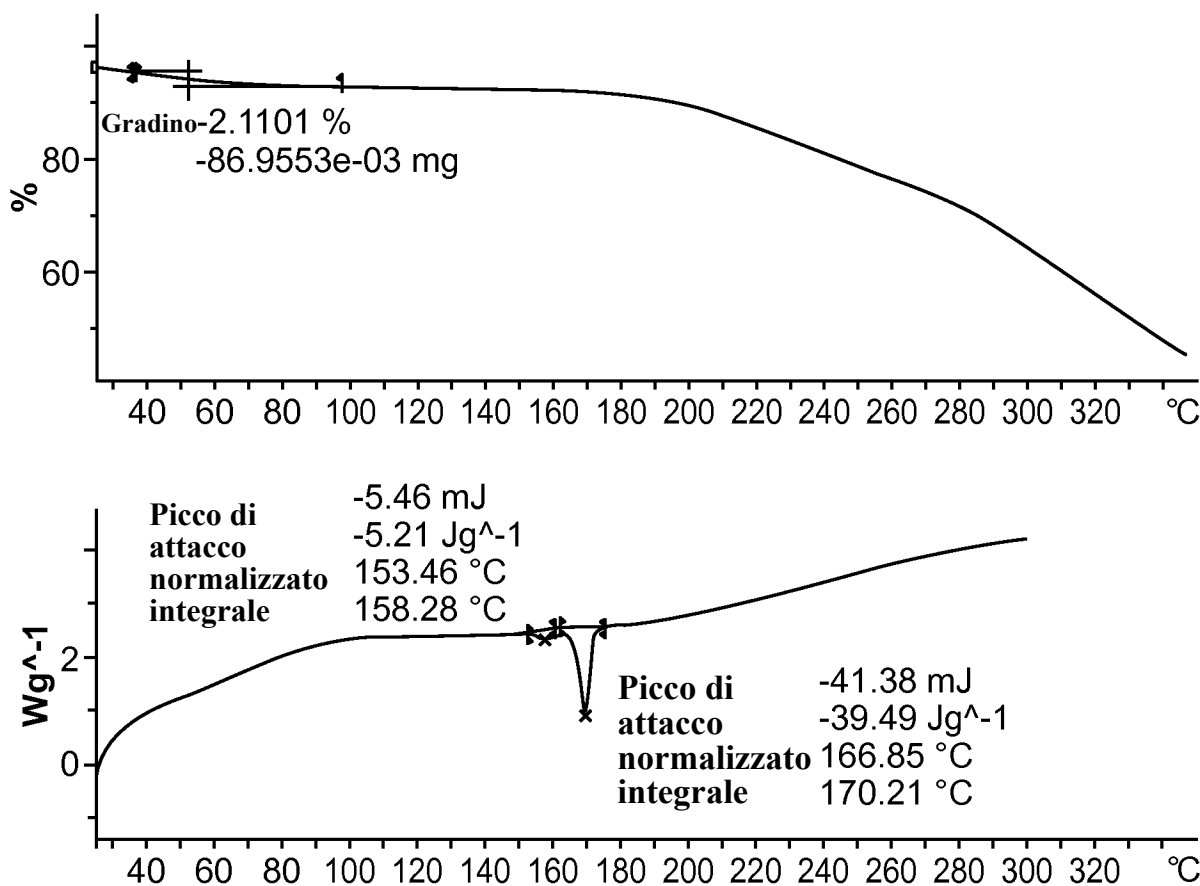


FIG. 30

Sale p40°C/75%RH
 Sale come isolato
 Originario - forma A

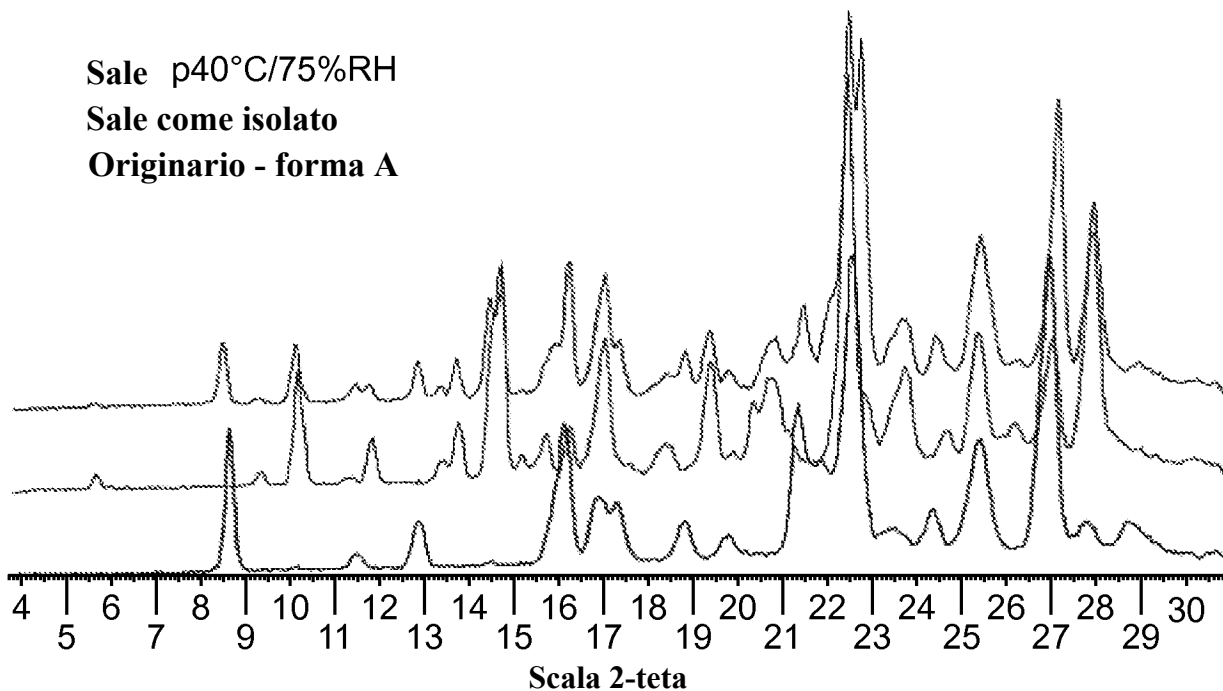


FIG. 31

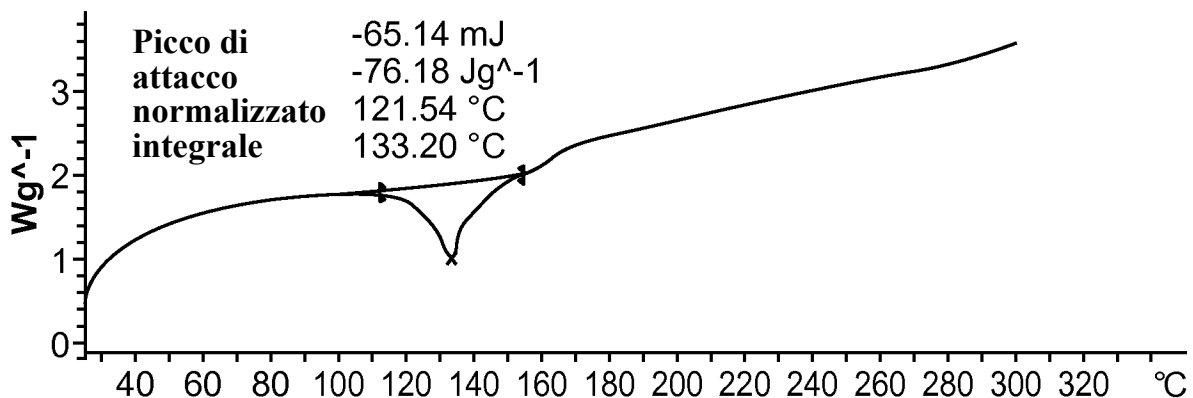
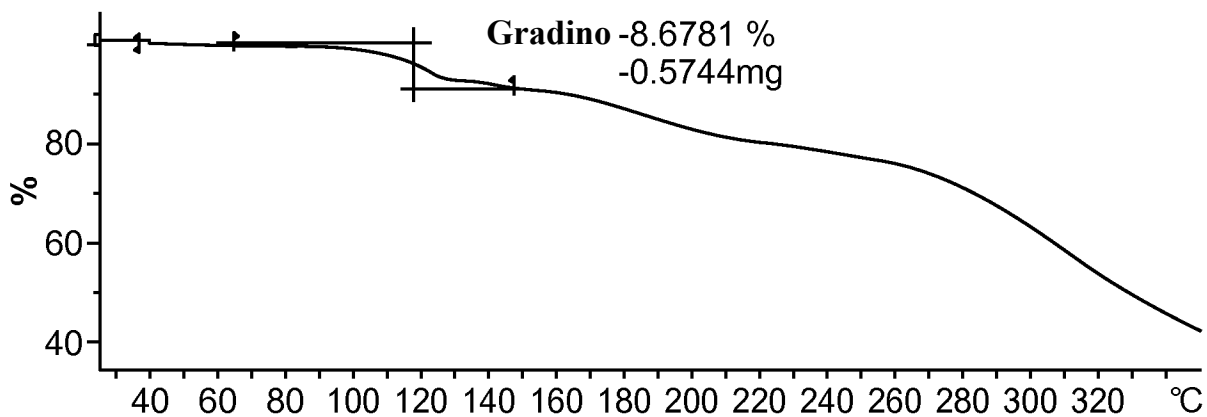


FIG. 32

Sale p40°C/75%RH - Modello 1
Originario - forma A

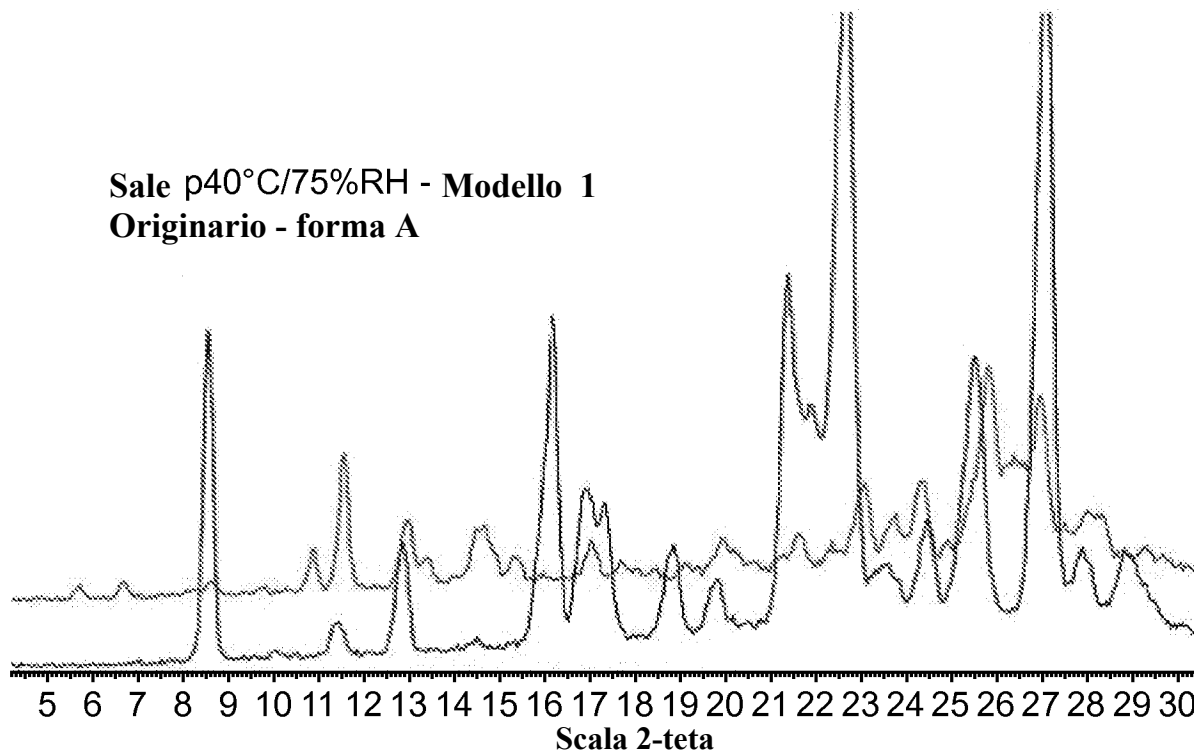


FIG. 33

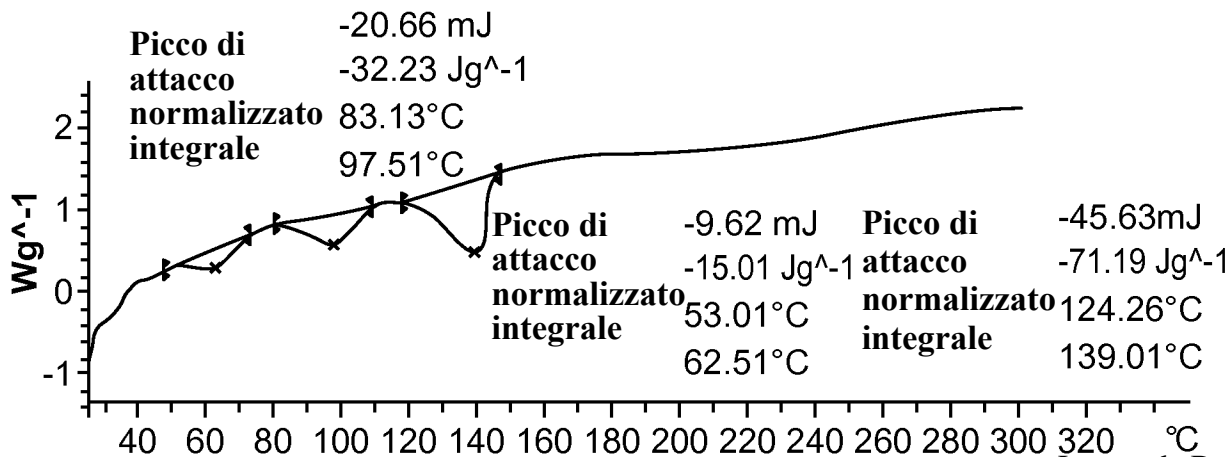
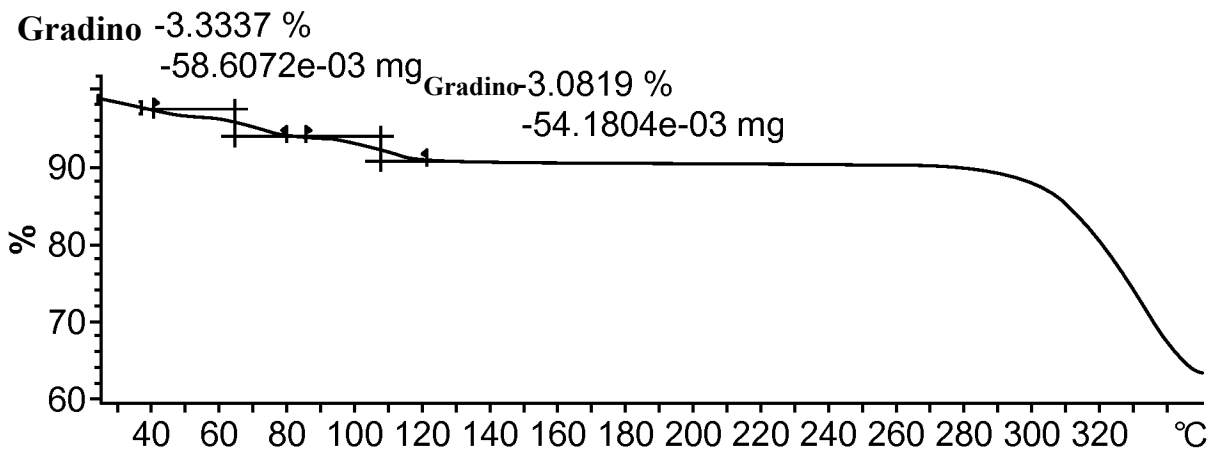


FIG. 34

Sale post 40°C/75%RH
 Originario - forma A

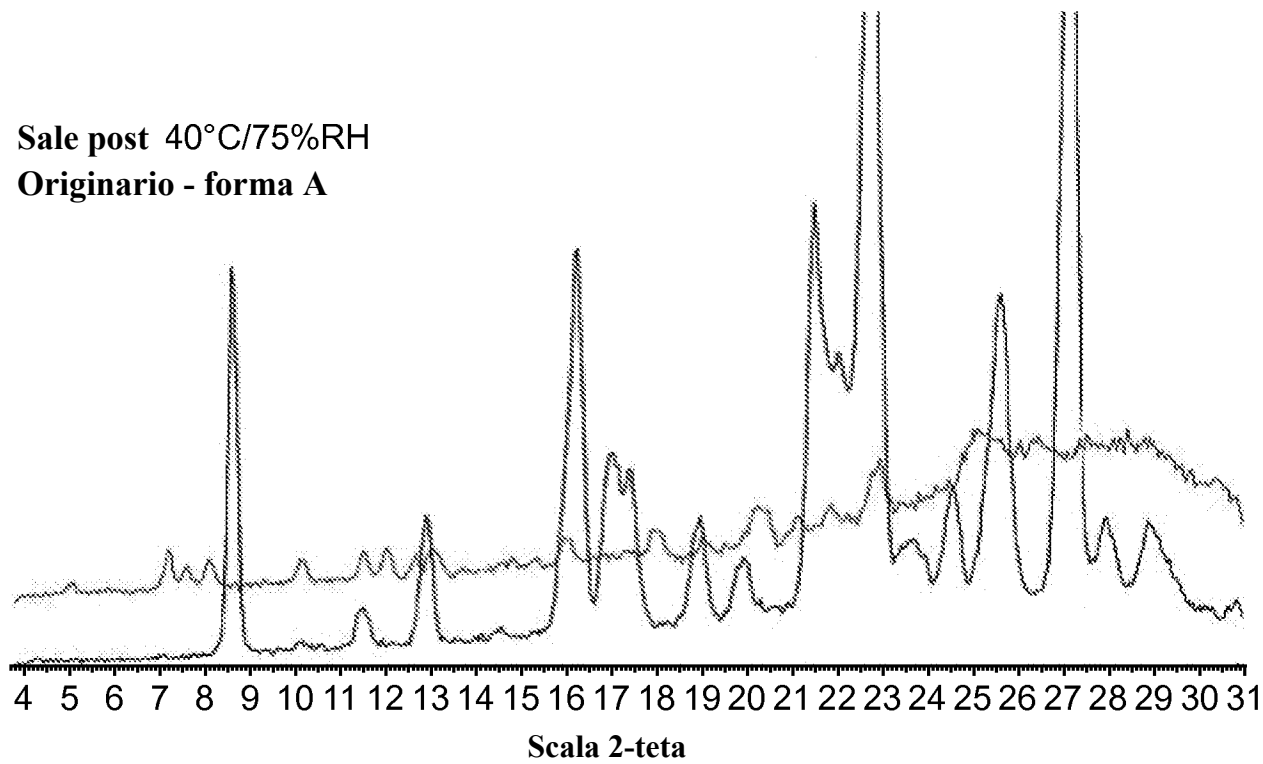


FIG. 35

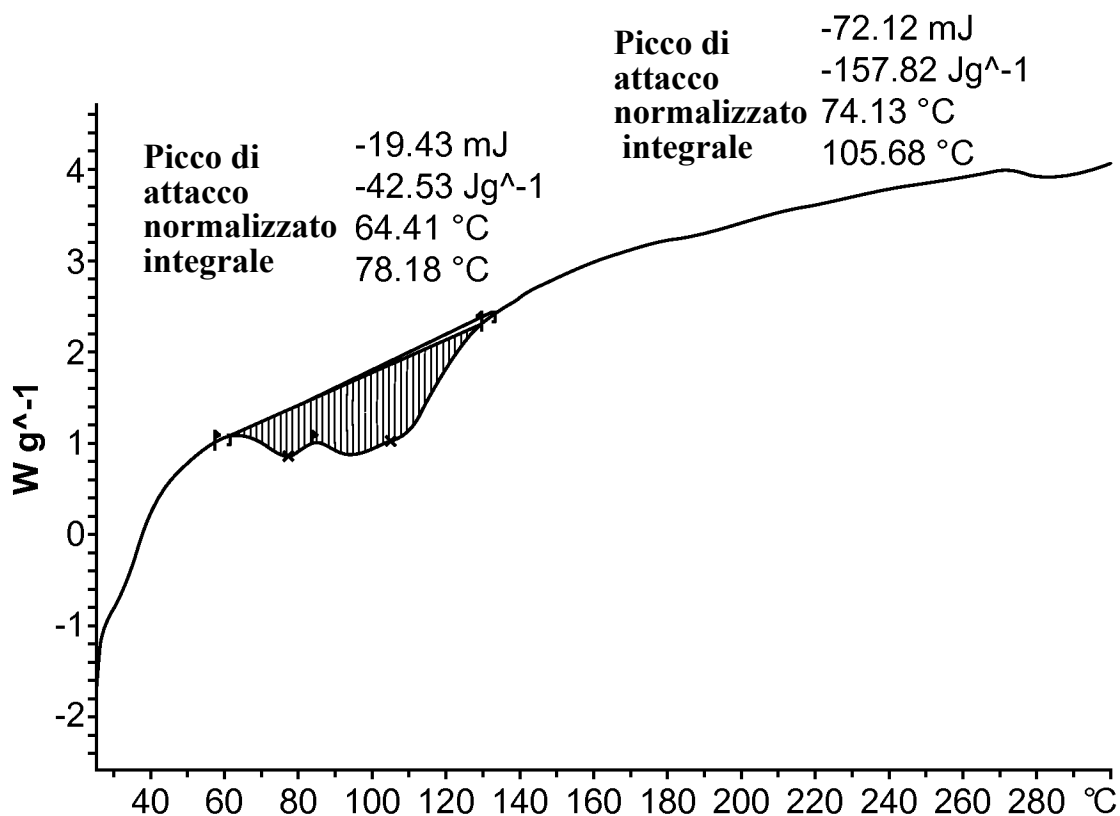


FIG. 36

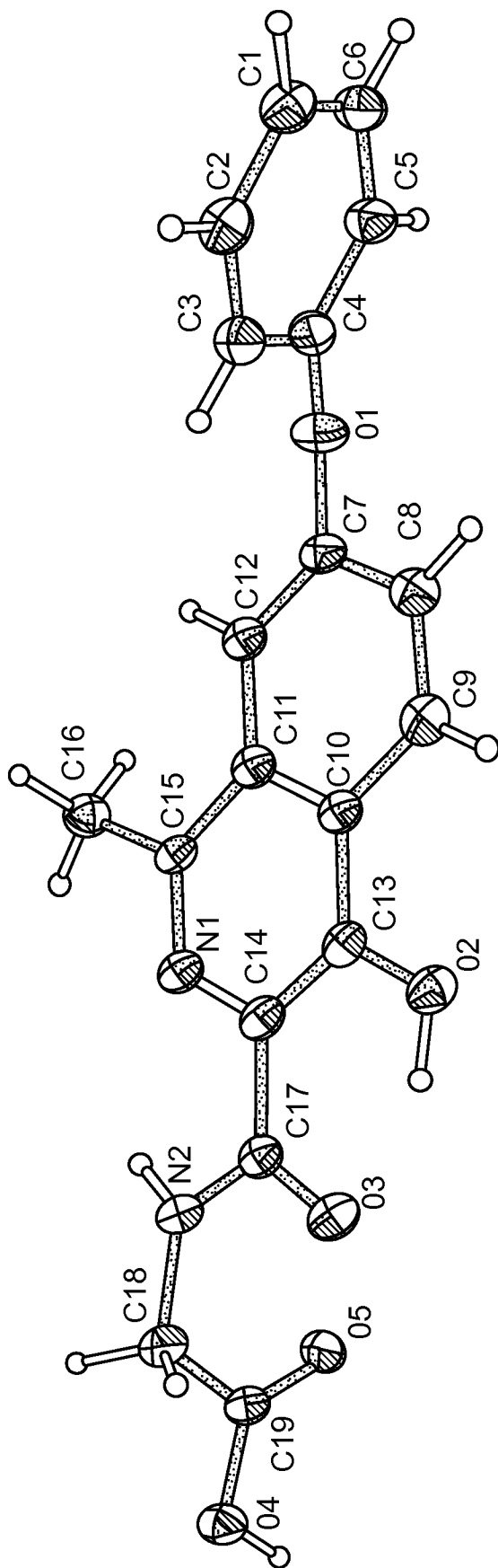


FIG. 37