

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 361**

51 Int. Cl.:

C07D 215/56 (2006.01)

A61K 31/4704 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2009 E 09744286 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 2358680**

54 Título: **Formas sólidas de la N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida**

30 Prioridad:

23.10.2008 US 107813 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

06.06.2013

73 Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED
(100.0%)
130 Waverly Street
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**ZHANG, BEILI;
KRAWIEC, MARIUSZ;
BOTFIELD, MARTYN;
GROOTENHUIS, PETER, D. J. y
VAN GOOR, FREDRICK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 406 361 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formas sólidas de la N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere a formas en estado sólido, por ejemplo, formas cristalinas de la N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida, que es un modulador del regulador de la conductancia transmembrana en la fibrosis quística ("CFTR"). La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que incluyen las formas cristalinas de la N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(difluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida y a procedimientos que las utilizan.

Antecedente de la invención

- 15 Los transportadores del casete de ATP son una familia de proteínas transportadoras de membrana que regulan el transporte de una amplia variedad de agentes farmacológicos, fármacos potencialmente tóxicos y xenobióticos, así como aniones. Existen proteínas de membrana homólogas que se unen y utilizan el adenosina trifosfato (ATP) celular para sus actividades específicas. Algunos de estos transportadores se descubrieron como proteínas de resistencia a multifármacos (como la glicoproteína MDR1-P, o la proteína de resistencia a multifármacos, MDR1), que defienden a las células cancerígenas malignas contra los agentes quimioterapéuticos. Hasta la fecha, se han identificado 48 de estos transportadores y se han agrupado en siete familias en base a su identidad de secuencia y su función.

- 20 Un miembro de la familia de transportadores del casete de ATP habitualmente asociado a enfermedades es el canal aniónico mediado por AMPc/ATP, el CFTR. El CFTR se expresa en diversos tipos celulares, incluyendo las células epiteliales absorptivas y secretoras, en donde regula el flujo de aniones a través de la membrana, así como la actividad de otros canales iónicos y proteínas. En las células epiteliales, el funcionamiento normal del CFTR es crítico para el mantenimiento del transporte de electrolitos por todo el cuerpo, incluyendo el tejido respiratorio y digestivo. El CFTR está compuesto de aproximadamente 1480 aminoácidos que codifican una proteína formada de una repetición en tándem de dominios transmembrana, cada una que contiene seis hélices transmembrana y un dominio de unión a nucleótidos. Los dos dominios transmembrana están unidos por un gran dominio regulador (R) polar con múltiples sitios de fosforilación que regulan la actividad de los canales y el tráfico celular.

- 30 El gen que codifica el CFTR ha sido identificado y secuenciado (véase, Gregory, R. J. y col. (1990) Nature 347:382-386; Rich, D. P. y col. (1990) Nature 347:358-362; Riordan, J. R. y col. (1989) Science 245:1056-1073). Un defecto en este gen provoca mutaciones en el CFTR que da como resultado fibrosis quística ("FQ"), la enfermedad genética fatal más habitual en seres humanos. La fibrosis quística afecta aproximadamente a uno de cada 2500 niños en Estados Unidos. En la población general de Estados Unidos, hasta 10 millones de personas portan una única copia del gen defectuoso sin efectos patológicos aparentes. En contraste, los individuos con dos copias del gen asociado a la FQ padecen los efectos debilitantes y fatales de la FQ, incluyendo enfermedad pulmonar crónica.

- 35 En pacientes con fibrosis quística, las mutaciones en el CFTR expresado de forma endógena en el epitelio respiratorio dan lugar a una secreción aniónica apical reducida que provoca un desequilibrio en el transporte iónico y de fluidos. La disminución resultante en el transporte aniónico contribuye a aumentar la acumulación de moco en el pulmón y las infecciones microbianas acompañantes que en último término provocan la muerte en pacientes con FQ. Además de la enfermedad respiratoria, los pacientes con FQ normalmente sufren problemas gastrointestinales e insuficiencia pancreática que, si se dejan sin tratar, producen la muerte. Además, la mayoría de hombres con fibrosis quística son estériles y la fertilidad entre mujeres con fibrosis quística se ve reducida. En contraste con los graves efectos de las dos copias del gen asociado a la FQ, los individuos con una sola copia del gen asociado a la FQ presentan una mayor resistencia al cólera y a la deshidratación como resultado de la diarrea -que quizás explica la elevada frecuencia relativa del gen de la FQ en la población.

- 40 El análisis de la secuencia del gen CFTR de los cromosomas de la FQ ha revelado una variedad de mutaciones que provocan enfermedad (Cutting, G. R. y col. (1990) Nature 346:366-369; Dean, M. y col. (1990) Cell 61:863-870; Kerem, B-S. y col. (1989) Science 245:1073-1080; y Kerem, B-S y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8447-8451). Hasta la fecha, se han identificado más de 1000 mutaciones que provocan enfermedades en el gen de la FQ (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>). La mutación más prevalente es una eliminación de la fenilalanina en posición 508 de la secuencia de aminoácidos del CFTR y que habitualmente se denomina $\Delta F508$ -CFTR. Esta mutación se produce en aproximadamente el 70 % de los casos de fibrosis quística y está asociada a enfermedad grave.

- 45 La eliminación del residuo 508 en $\Delta F508$ -CFTR impide que la proteína nascente se pliegue correctamente. Esto da como resultado la incapacidad de la proteína mutante para abandonar el retículo endoplasmático y ser transportada a la membrana plasmática. Como resultado, el número de canales presentes en la membrana es muy inferior al observado en células que expresan el CFTR de tipo silvestre. Además de un tráfico alterado, la mutación produce un funcionamiento defectuoso de los canales. Conjuntamente, el número reducido de canales en la membrana y el funcionamiento defectuoso dan lugar a un transporte iónico reducido a través del epitelio, lo que conduce a un

transporte defectuoso de aniones y de fluidos. (Quinton, P. M. (1990), FASEB J. 4: 2709-2727). No obstante los estudios han demostrado que el número reducido de $\Delta F508$ -CFTR en la membrana son funcionales, aunque menos que el CFTR de tipo silvestre. (Dolmans y col. (1991), Nature Lond. 354: 526-528 y col., supra; Pasyk y Foscett (1995), J. Cell. Biochem. 270: 12347-50). Además del $\Delta F508$ -CFTR R117HCFTR y G551D-CFTR, otras mutaciones

A pesar de que el CFTR transporta una variedad de moléculas además de aniones, está claro que su papel (el transporte de aniones, cloruro y bicarbonato) representa un elemento en un mecanismo importante de transporte de iones y agua a través del epitelio. Los otros elementos incluyen el canal de Na^+ epitelial, ENaC, el co-transportador de $\text{Na}^+/2\text{Cl}^-/\text{K}^+$, la bomba Na^+-K^+ -ATPasa y los canales de K^+ de la membrana basolateral, que son responsables de la captación de cloruro hacia la célula.

Estos elementos funcionan juntos para conseguir el transporte direccional a través del epitelio por medio de su expresión y localización selectiva dentro de la célula. La absorción de cloruro tiene lugar mediante la actividad coordinada del ENaC y el CFTR presentes en la membrana apical de la bomba Na^+-K^+ -ATPasa y los canales de Cl expresados en la superficie basolateral de la célula. El transporte activo secundario de cloruro desde la cara luminal da lugar a la acumulación de cloruro intracelular, que a continuación puede abandonar pasivamente la célula a través de los canales de iones Cl^- , dando como resultado un transporte vectorial. La disposición del co-transportador de $\text{Na}^+/2\text{Cl}^-/\text{K}^+$, la bomba Na^+-K^+ -ATPasa y los canales de K^+ de la membrana basolateral sobre la superficie basolateral y del CFTR sobre la cara luminal coordina la secreción de cloruro a través del CFTR sobre la cara luminal. Debido a que probablemente el agua nunca es ella misma transportada activamente, su flujo a través del epitelio depende de pequeños gradientes osmóticos transepiteliales generados por el flujo neto de sodio y cloruro.

Se ha propuesto la hipótesis de que el transporte defectuoso del bicarbonato debido a mutaciones en el CFTR provoca defectos en ciertas funciones secretoras. Véase, por ejemplo, "Cystic fibrosis: impaired bicarbonate secretion and mucoviscidosis," Paul M. Quinton, Lancet 2008; 372: 415-417.

Las mutaciones en el CFTR que están asociadas a una disfunción moderada del CFTR también son evidentes en pacientes con dolencias que comparten ciertas manifestaciones patológicas con la FQ pero que no cumplen los criterios diagnósticos para la FQ. Estas incluyen la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes, la pancreatitis idiopática crónica, bronquitis crónica y rinosinusitis crónica. Otras enfermedades en las que se cree que el CFTR es un factor de riesgo junto con genes modificadores o factores ambientales incluyen la colangitis esclerosante primaria, aspergilosis broncopulmonar alérgica y asma.

También se ha demostrado que el humo del tabaco, la hipoxia y factores medioambientales que inducen una señalización hipóxica perjudican la función del CFTR y pueden contribuir a ciertas formas de enfermedades respiratorias, tal como bronquitis crónica. Las enfermedades que pueden ser debidas a una función defectuosa del CFTR pero que no cumplen los criterios diagnósticos para la FQ se caracterizan como enfermedades relacionadas con el CFTR.

Además de la fibrosis quística, la modulación de la actividad del CFTR puede ser beneficiosa para otras enfermedades no directamente provocadas por mutaciones en el CFTR, tales como enfermedades secretoras y otras enfermedades en el plegamiento de proteínas mediadas por el CFTR. El CFTR regula el flujo de cloruro y bicarbonato a través del epitelio de muchas células para controlar el movimiento de fluidos, la solubilización de proteínas, la viscosidad del moco y la actividad enzimática. Los defectos en el CFTR pueden provocar el bloqueo de las vías respiratorias o los conductos de muchos órganos, incluyendo el hígado y el páncreas. Los potenciadores son compuestos que mejoran la actividad del funcionamiento de los canales del CFTR presentes en la membrana celular. Cualquier enfermedad que suponga la densificación del moco, una regulación alterada de los fluidos, un aclaramiento alterado del moco, o conductos bloqueados que producen la inflamación y la destrucción tisular podría ser un candidato para los potenciadores.

Estos incluyen, pero no están limitados a, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma, EPOC inducida por el tabaco, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, enfermedad de ojo seco, y síndrome de Sjögren, enfermedad de reflujo gastro-esofágico, cálculos biliares, prolapso rectal y enfermedad inflamatoria del intestino. La EPOC se caracteriza por una limitación del flujo de aire que es progresiva y no totalmente reversible. La limitación del flujo de aire se debe a la hipersecreción de moco, enfisema y bronquiolitis. Los activadores del CFTR mutante o de tipo silvestre ofrecen un tratamiento potencial de la hipersecreción de moco y el aclaramiento mucociliar alterado que es habitual en la EPOC. Específicamente, aumentar la secreción de aniones a través del CFTR puede facilitar el transporte de fluidos hacia el líquido de la superficie de las vías respiratorias para hidratar la mucosidad y optimizar la viscosidad del fluido periciliar. Esto conduciría a una mayor aclaramiento mucociliar y una reducción en los síntomas asociados a la EPOC. Además, mediante la prevención de la infección y la inflamación en curso debido a una mejor limpieza de las vías respiratorias, los moduladores del CFTR pueden prevenir o retrasar la destrucción del parénquima de las vías respiratorias que caracteriza al enfisema y reducir o revertir el aumento en el número y tamaño de las células secretoras de moco que infra-lisan la hipersecreción de moco en las enfermedades de las vías respiratorias. La enfermedad de ojo seco se caracteriza por una disminución en la producción acuosa de la lágrima y

perfiles anormales de lípidos, proteínas y mucinas de la película lagrimal. Hay muchas causas para el ojo seco, algunas de las cuales incluyen la edad, la cirugía ocular con LASIK, artritis, medicamentos, quemaduras químicas/térmicas, alergias y enfermedades, como la fibrosis quística y el síndrome de Sjögren. El aumento de la secreción de aniones a través del CFTR aumentaría transporte de fluidos desde las células endoteliales de la córnea y las glándulas secretoras que rodean al ojo para aumentar la hidratación de la córnea. Esto ayudaría a aliviar los síntomas asociados a la enfermedad del ojo seco. El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmunitaria en la que el sistema inmunitario ataca las glándulas productoras de fluidos en todo el cuerpo, incluyendo el ojo, la boca, la piel, el tejido respiratorio, el hígado, la vagina y el intestino. Los síntomas incluyen, ojo, boca y vagina secos, así como enfermedad pulmonar. La enfermedad también está asociada a la artritis reumatoide, lupus sistémico, esclerosis sistémica y polimiositis/dermatomiositis. Se cree que el tráfico defectuoso de proteínas provoca la enfermedad, cuyas opciones de tratamiento son limitadas. Los moduladores de la actividad del CFTR pueden hidratar los distintos órganos afectados por la enfermedad y pueden ayudar a aliviar los síntomas asociados. Los individuos con fibrosis quística pueden tener episodios recurrentes de obstrucción intestinal y una mayor incidencia de prolapso rectal, cálculos biliares, enfermedad de reflujo gastro-esofágico, cánceres gastrointestinales y enfermedad inflamatoria del intestino, lo que indica que la función del CFTR puede desempeñar un papel importante en la prevención de dichas enfermedades.

Como se ha descrito anteriormente, se cree que la eliminación del resto 508 en el $\Delta F508$ -CFTR impide que la proteína naciente se pliegue correctamente, dando como resultado la incapacidad de esta proteína mutante para abandonar el retículo endoplasmático y ser transportada a la membrana plasmática. Como consecuencia, hay presentes cantidades insuficientes de la proteína madura en la membrana plasmática y el transporte de cloruro dentro de los tejidos epiteliales se ve significativamente reducido. De hecho, este fenómeno celular del procesamiento defectuoso en el retículo endoplasmático del CFTR por la maquinaria del retículo endoplasmático, se ha demostrado que es la base subyacente no sólo para la enfermedad de la FQ, sino para un amplio espectro de otras enfermedades aisladas y hereditarias. Las dos formas por las que la maquinaria del retículo endoplasmático puede funcionar mal es por la pérdida de acoplamiento al exportador de las proteínas en el retículo endoplasmático que da lugar a la degradación, o por la acumulación en el retículo endoplasmático de estas proteínas defectuosas/mal plegadas [Aridor M, y col., *Nature Med.*, 5(7), pp 745- 751 (1999); Shastry, B.S., y col., *Neurochem. International*, 43, pp 1-7 (2003); Rutishauser, J., y col., *Swiss Med Wkly*, 132, pp 211-222 (2002); Morello, JP y col., *TIPS*, 21, pp. 466- 469 (2000); Bross P., y col., *Human Mut.*, 14, pp. 186-198 (1999)]. Las enfermedades asociadas a la primera clase de mal funcionamiento del retículo endoplasmático son la fibrosis quística (debido al $\Delta F508$ -CFTR mal plegado, como se ha descrito anteriormente), enfisema hereditario (debido a al-antitripsina; variantes no Piz), hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de Tipo 1, deficiencias en el procesamiento de lípidos, como la hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia Tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades del almacenamiento lisosómico, tales como la enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis (debida a enzimas de procesamiento lisosómicos), Sandhof/Tay-Sachs (debido a la β -hexosaminidasa), Crigler-Najjar tipo II (debido a la UDP-glucuroniltransferasa), poliendocrinopatía/hiperinsulemia, diabetes mellitus (debido al receptor de insulina), enanismo de Laron (debido al receptor de la hormona del crecimiento), deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario (debido a la hormona preparatiroides), melanoma (debido a tirosinasa). Las enfermedades asociadas a esta última clase de mal funcionamiento del retículo endoplasmático son la glicanosis CDG tipo 1, enfisema hereditario (debido a al-antitripsina (variante Piz)), hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta (debido al procolágeno Tipo I, II, IV), hipofibrinogenemia hereditaria (debido al fibrinógeno), deficiencia de ACT (debido a la $\alpha 1$ -antiquimotripsina), diabetes insípida (DI), DI central (debido a la hormona vasopresina/receptor V2), DI nefrogénica (debido a la acuaporina II). El síndrome de Charcot-Marie-Tooth (debido a la proteína de mielina periférica 22), enfermedad de Perlizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (debido a la β APP y presenilinas), enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, diversos trastornos neurológicos de la poliglutamina como la enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelar tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, palidoluisiana dentatorubal y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob hereditaria (debido a un defecto en el procesamiento de proteínas priónicas), la enfermedad de Fabry (debido a la α -galactosidasa A lisosómica), el síndrome de Straussler-Scheinker (debido a un defecto en el procesamiento de Prp), infertilidad por pancreatitis, insuficiencia pancreática, osteoporosis, osteopenia, síndrome de Gorham, canalopatías de cloruro, miotonía congénita (formas de Thomson y Becker), síndrome de Bartter de tipo III, enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento lisosómico, síndrome de Angelman, discinesia ciliar primaria (DCP), DCP con situs inversus (también conocido como síndrome de Kartagener), DCP sin situs inversus y aplasia ciliar y enfermedad hepática.

Otras enfermedades implicadas debidas a una mutación en el CFTR incluyen infertilidad masculina provocada por la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (ABCCD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática y aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA). Véase, "CFIR-opathies: disease phenotypes associated with cystic fibrosis transmembrane regulator gene mutations," Peader G. Noone y Michael R. Knowles, *Respir. Res.* 2001, 2: 328-332 (incorporado en el presente documento por referencia).

Además de la regulación en exceso de la actividad del CFTR, la reducción de la secreción aniónica por parte de los moduladores CFTR puede ser beneficiosa para el tratamiento de diarreas secretoras, en las que el transporte de

agua epitelial está drásticamente incrementado como resultado del transporte secretagogo activado de cloruro. El mecanismo supone el aumento de AMPc y la estimulación del CFTR.

A pesar de que existen muchas causas para la diarrea, las consecuencias principales de las enfermedades diarreicas, como resultado del transporte excesivo de cloruro son comunes a todas e incluyen deshidratación, acidosis, crecimiento alterado y muerte. Las diarreas agudas y crónicas representan un problema médico importante en muchas partes del mundo. La diarrea es tanto un factor significativo en la malnutrición como la primera causa de muerte (5 millones de muertes/año) en niños menores de cinco años.

Las diarreas secretoras también son una dolencia peligrosa en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) y la enfermedad crónica inflamatoria del intestino (EII). 16 millones de viajeros procedentes de naciones industrializadas a países en vías de desarrollo sufren diarrea cada año, con una gravedad y un número de casos de diarrea que varían dependiendo del país y la zona visitada.

Por consiguiente, existe la necesidad de potenciadores del CFTR potentes y selectivos de las formas silvestres y mutantes del CFTR humano. Estas formas mutantes del CFTR, incluyen, pero no están limitadas a, $\Delta F508$ del, G551D, R117H, 2789+5G->A.

También existe la necesidad de moduladores de la actividad del CFTR, y sus composiciones, que se puedan utilizar para modular la actividad del CFTR en la membrana celular de un mamífero.

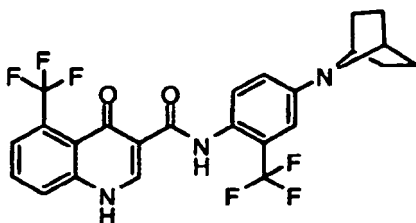
Existe la necesidad de procedimientos para el tratamiento de enfermedades provocadas por la mutación en el CFTR utilizando dichos moduladores de la actividad del CFTR.

Existe la necesidad de procedimientos de modulación de la actividad del CFTR en una membrana celular *ex vivo* de un mamífero.

Además, existe la necesidad de formas sólidas estables de dicho compuesto que se puedan utilizar fácilmente en composiciones farmacéuticas adecuadas para su utilización como agentes terapéuticos.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a formas sólidas de la N-(4-(7-azabicyclo(2.2.1)heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (en lo sucesivo "Compuesto 1") que tiene la estructura siguiente:



Compuesto 1

El Compuesto 1 y sus composiciones farmacéuticamente aceptables son útiles para el tratamiento o la disminución de la gravedad de una serie de enfermedades, trastornos, o dolencias, que incluyen, pero no están limitadas a, fibrosis quística, pancreatitis, sinusitis, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de Tipo 1, deficiencias en el procesamiento de lípidos, como la hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia Tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades del almacenamiento lisosómico, tales como la enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicosidosis CDG tipo 1, enfisema hereditario, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI central, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Perlizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, diversos trastornos neurológicos de la poliglutamina como la enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelar tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, palidoluisiana dentatorubal y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob hereditaria, enfermedad de Fabry, síndrome de Straussler-Scheinker, EPOC, ojo seco, insuficiencia pancreática, osteoporosis, osteopenia, síndrome de Gorham, canalopatías de cloruro, miotonía congénita (formas de Thomson y Becker), síndrome de Bartter de tipo III, enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento lisosómico, síndrome de Angelman, discinesia ciliar primaria (DCP), DCP con situs inversus (también conocido como síndrome de Kartagener), DCP sin situs inversus y aplasia ciliar y síndrome de Sjögren.

En un aspecto, el Compuesto 1 está en una forma libre, pura y sustancialmente cristalina.

Los procesos descritos en el presente documento pueden usarse para preparar las composiciones de la presente invención que comprenden la Forma A. Las cantidades y características de los componentes utilizados en los procedimientos son como se describen en el presente documento.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La **Figura 1** es un patrón de difracción de rayos X de polvo de la Forma A.

La **Figura 2** es una imagen conformacional de la Forma A basada en un análisis de rayos X de un monocristal.

La **Figura 3** proporciona un espectro FTIR de la Forma A.

Descripción detallada de la invención

10 Definiciones

Como se utiliza en el presente documento, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se indique otra cosa.

El término "transportador ABC" como se utiliza en el presente documento significa una proteína transportadora ABC o un fragmento de la misma que comprende al menos un dominio de unión, en el que dicha proteína o uno de sus fragmentos está presente *in vivo* o *in vitro*. El término "dominio de unión" como se utiliza en el presente documento significa un dominio sobre el transportador ABC que se puede unir a un modulador. Véase, por ejemplo, Hwang, TC y col., J. Gen. Physiol. (1998): 111 (3), 477-90.

El término "CFTR" como se utiliza en el presente documento significa un regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística o una de sus mutaciones capaz de regular la actividad de, incluyendo, pero no limitado a, $\Delta F508$ CFTR, R117H CFTR y G551D CFTR (véase, por ejemplo, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, para las mutaciones del CFTR).

El término "modular" como se utiliza en el presente documento significa incrementar o reducir en una cantidad medible.

El término "CFTR normal" o "función normal del CFTR" como se utiliza en el presente documento significa un CFTR de tipo silvestre sin ninguna alteración debido a factores ambientales tales como el tabaco, la contaminación, o cualquier cosa que produzca inflamación en los pulmones.

El término "CFTR reducido" o "función reducida del CFTR" como se utiliza en el presente documento significa un CFTR por debajo de lo normal o una función del CFTR por debajo de lo normal.

Como se utiliza en el presente documento "cristalino" se refiere a compuestos o composiciones en las que las unidades estructurales están dispuestas en patrones o redes geométricas fijas, de forma que los sólidos cristalinos tienen un orden rígido de largo alcance. Las unidades estructurales que constituyen la estructura cristalina pueden ser átomos, moléculas, o iones. Los sólidos cristalinos presentan puntos de fusión definidos.

Como se utiliza en el presente documento, la frase "sustancialmente cristalino", significa un material sólido que está dispuesto en patrones o redes geométricas fijas que tienen un orden rígido de largo alcance. Por ejemplo, los materiales sustancialmente cristalinos tienen una cristalinidad superior al 85 % aproximadamente (por ejemplo, una cristalinidad superior al 90 % aproximadamente o una cristalinidad superior al 95 % aproximadamente). También debe tenerse en cuenta que el término "sustancialmente cristalino" incluye al descriptor "cristalino", que se define en el párrafo anterior.

En un aspecto, la invención incluye una forma de la N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida caracterizada como Forma A.

En algunas realizaciones, la Forma A se caracteriza por uno o más picos: entre aproximadamente 7,7 y aproximadamente 8,1 grados, por ejemplo, aproximadamente 7,9 grados; entre aproximadamente 11,7 y aproximadamente 12,1 grados, por ejemplo, aproximadamente 11,9 grados; entre aproximadamente 14,2 y aproximadamente 14,6 grados, por ejemplo, aproximadamente 14,4 grados; y aproximadamente 15,6 y aproximadamente 16,0 grados, por ejemplo, aproximadamente 15,8 grados; en difracción de rayos X de polvo obtenido utilizando radiación alfa de CuK.

En algunas realizaciones, la Forma A se caracteriza por uno o más picos: entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,0 grados, por ejemplo, aproximadamente 7,9 grados; entre aproximadamente 11,8 y aproximadamente 12,0 grados, por ejemplo, aproximadamente 11,9 grados; entre aproximadamente 14,3 y aproximadamente 14,5 grados, por ejemplo, aproximadamente 14,4 grados; y aproximadamente 15,7 y aproximadamente 15,9 grados, por ejemplo, aproximadamente 15,8 grados; en difracción de rayos X de polvo

obtenido utilizando radiación alfa de CuK.

En otras realizaciones, la Forma A se caracteriza por uno o más picos entre aproximadamente: 7,7 y aproximadamente 8,1 grados, por ejemplo, aproximadamente 7,9 grados; entre aproximadamente 21,6 y aproximadamente 22,0 grados, por ejemplo, aproximadamente 21,8 grados; y aproximadamente 23,6 y aproximadamente 24,0 grados, por ejemplo, aproximadamente 23,8 grados; en difracción de rayos X de polvo obtenido utilizando radiación alfa de CuK.

En aún otras realizaciones, la Forma A se caracteriza por uno o más picos entre aproximadamente: 7,8 y aproximadamente 8,0 grados, por ejemplo, aproximadamente 7,9 grados; entre aproximadamente 21,7 y aproximadamente 21,9 grados, por ejemplo, aproximadamente 21,8 grados; y aproximadamente 23,7 y aproximadamente 23,9 grados, por ejemplo, aproximadamente 23,8 grados; en difracción de rayos X de polvo obtenido utilizando radiación alfa de CuK.

En algunas realizaciones, la Forma A se caracteriza por uno o más de los siguientes picos medidos en grados en un patrón de difracción de rayos X de polvo: un pico entre aproximadamente 7,7 y aproximadamente 8,1 grados (por ejemplo, aproximadamente 7,9 grados); un pico entre aproximadamente 9,1 y aproximadamente 9,5 grados, (por ejemplo, aproximadamente 9,3 grados); un pico entre aproximadamente 11,7 y aproximadamente 12,1 grados, (por ejemplo, aproximadamente 11,9 grados); un pico entre aproximadamente 14,2 y aproximadamente 14,6 grados, (por ejemplo, aproximadamente 14,4 grados); un pico entre aproximadamente 14,9 y aproximadamente 15,3 grados, (por ejemplo, aproximadamente 15,1 grados); un pico entre aproximadamente 15,6 y aproximadamente 16,0 grados, (por ejemplo, aproximadamente 15,8 grados); un pico entre aproximadamente 16,8 y aproximadamente 17,2 grados, (por ejemplo, aproximadamente 17,0 grados); un pico entre aproximadamente 17,5 y aproximadamente 17,9 grados, (por ejemplo, aproximadamente 17,7 grados); un pico entre aproximadamente 19,1 y aproximadamente 19,5 grados, (por ejemplo, aproximadamente 19,3 grados); un pico entre aproximadamente 19,9 y aproximadamente 20,3 grados, (por ejemplo, aproximadamente 20,1 grados); un pico entre aproximadamente 21,2 y aproximadamente 21,6 grados, (por ejemplo, aproximadamente 21,4 grados); un pico entre aproximadamente 21,6 y aproximadamente 22,0 grados, (por ejemplo, aproximadamente 21,8 grados); un pico entre aproximadamente 23,2 y aproximadamente 23,6 grados, (por ejemplo, aproximadamente 23,4 grados); un pico entre aproximadamente 23,6 y aproximadamente 24,0 grados, (por ejemplo, aproximadamente 23,8 grados); un pico entre aproximadamente 25,4 y aproximadamente 25,8 grados, (por ejemplo, aproximadamente 25,6 grados); un pico entre aproximadamente 26,6 y aproximadamente 27,0 grados, (por ejemplo, aproximadamente 26,8 grados); un pico entre aproximadamente 29,2 y aproximadamente 29,6 grados, (por ejemplo, aproximadamente 29,4 grados); un pico entre aproximadamente 29,5 y aproximadamente 29,9 grados, (por ejemplo, aproximadamente 29,7 grados); un pico entre aproximadamente 29,9 y aproximadamente 30,3 grados, (por ejemplo, aproximadamente 30,1 grados); y un pico entre aproximadamente 31,0 y aproximadamente 31,4 grados, (por ejemplo, aproximadamente 31,2 grados).

En algunas realizaciones, la Forma A se caracteriza por uno o más de los siguientes picos medidos en grados en un patrón de difracción de rayos X de polvo: un pico entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,0 grados (por ejemplo, aproximadamente 7,9 grados); un pico entre aproximadamente 9,2 y aproximadamente 9,4 grados, (por ejemplo, aproximadamente 9,3 grados); un pico entre aproximadamente 11,8 y aproximadamente 12,0 grados, (por ejemplo, aproximadamente 11,9 grados); un pico entre aproximadamente 14,3 y aproximadamente 14,5 grados, (por ejemplo, aproximadamente 14,4 grados); un pico entre aproximadamente 15,0 y aproximadamente 15,2 grados, (por ejemplo, aproximadamente 15,1 grados); un pico entre aproximadamente 15,7 y aproximadamente 15,9 grados, (por ejemplo, aproximadamente 15,8 grados); un pico entre aproximadamente 16,9 y aproximadamente 17,1 grados, (por ejemplo, aproximadamente 17,0 grados); un pico entre aproximadamente 17,6 y aproximadamente 17,8 grados, (por ejemplo, aproximadamente 17,7 grados); un pico entre aproximadamente 19,2 y aproximadamente 19,4 grados, (por ejemplo, aproximadamente 19,3 grados); un pico entre aproximadamente 20,0 y aproximadamente 20,2 grados, (por ejemplo, aproximadamente 20,1 grados); un pico entre aproximadamente 21,3 y aproximadamente 21,5 grados, (por ejemplo, aproximadamente 21,4 grados); un pico entre aproximadamente 21,7 y aproximadamente 21,9 grados, (por ejemplo, aproximadamente 21,8 grados); un pico entre aproximadamente 23,3 y aproximadamente 23,5 grados, (por ejemplo, aproximadamente 23,4 grados); un pico entre aproximadamente 23,7 y aproximadamente 23,9 grados, (por ejemplo, aproximadamente 23,8 grados); un pico entre aproximadamente 25,5 y aproximadamente 25,7 grados, (por ejemplo, aproximadamente 25,6 grados); un pico entre aproximadamente 26,7 y aproximadamente 26,9 grados, (por ejemplo, aproximadamente 26,8 grados); un pico entre aproximadamente 29,3 y aproximadamente 29,5 grados, (por ejemplo, aproximadamente 29,4 grados); un pico entre aproximadamente 29,6 y aproximadamente 29,8 grados, (por ejemplo, aproximadamente 29,7 grados); un pico entre aproximadamente 30,0 y aproximadamente 30,2 grados, (por ejemplo, aproximadamente 30,1 grados); y un pico entre aproximadamente 31,1 y aproximadamente 31,3 grados, (por ejemplo, aproximadamente 31,2 grados).

En algunas realizaciones, la Forma A se caracteriza por un patrón de difracción como el suministrado en la Figura 1.

En un aspecto, la invención incluye una composición farmacéutica que comprende la Forma A y un vehículo o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la presente invención incluye la Forma A para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad mediada por el CFTR en un ser humano.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende la administración de un agente terapéutico adicional.

En algunas realizaciones, la enfermedad se selecciona entre fibrosis quística, pancreatitis, sinusitis, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de Tipo 1, deficiencias en el procesamiento de lípidos, como la hipercolesterolemia familiar, quilomiconemia Tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades del almacenamiento lisosómico, tales como la enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo 1, enfisema hereditario, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI central, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Perlizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, diversos trastornos neurológicos de la poliglutamina como la enfermedad de Huntington, ataxia espino-cerebelar tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, palidoluisiana dentatorubal y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob hereditaria, enfermedad de Fabry, síndrome de Straussler-Scheinker, EPOC, ojo seco, insuficiencia pancreática, osteoporosis, osteopenia, síndrome de Gorham, canalopatías de cloruro, mionía congénita (formas de Thomson y Becker), síndrome de Bartter de tipo III, enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento lisosómico, síndrome de Angelman, discinesia ciliar primaria (DCP), DCP con situs inversus (también conocido como síndrome de Kartagener), DCP sin situs inversus y aplasia ciliar y síndrome de Sjögren.

En una realización, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de la Forma A para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de la fibrosis quística en un ser humano.

En un aspecto, la presente invención incluye un paquete o kit farmacéutico que comprende la Forma A y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención incluye una forma cristalina de la N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida que tiene unas dimensiones de la celda unitaria: $a = 19,1670$ (4) Å, $b = 19,1670$ (4) Å, $c = 33,6572$ (12) Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$.

En una realización, la presente invención proporciona una forma cristalina de la N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida que tiene unas dimensiones de la celda unitaria: $a = 19,1670$ (4) Å, $b = 19,1670$ (4) Å, $c = 33,6572$ (12) Å.

Usos, formulación y administración

Composiciones farmacéuticamente aceptables

En un aspecto de la presente invención se proporcionan composiciones farmacéuticamente aceptables, en las que estas composiciones comprenden la Forma A como se describe en el presente documento y opcionalmente comprenden un vehículo, adyuvante o portador farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, estas composiciones además comprenden opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Como se ha descrito anteriormente, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención además comprenden un vehículo, adyuvante, o portador farmacéuticamente aceptable que, como se utiliza en el presente documento, incluye cualquiera o todos de disolventes, diluyentes, u otros vehículos líquidos, ayudantes para la dispersión o suspensión, agentes de superficie activa, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea conveniente para la forma de dosificación particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) describe diversos vehículos utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para su preparación. Excepto en la medida en que cualquier medio portador convencional sea incompatible con los compuestos de la invención, tal como por producir cualquier efecto biológico no deseado o que interaccione de otra manera de una forma deletérea con cualquier otro componente(s) de la composición farmacéuticamente aceptable, se contempla que su utilización esté dentro del alcance de esta invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como soroalbúmina humana, sustancias tamponantes tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico o sorbato potásico, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato disódico, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, grasa de lana, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios, aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón; aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tales como propilenglicol o polietilenglicol; ésteres tales

como oleato de etilo y laurato de etilo; agar, agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica, solución de Ringer, alcohol etílico y soluciones de tampón fosfato, así como otros lubricantes no tóxicos compatibles tales como laurilsulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, según el criterio del formulador.

Usos de compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables

En otro aspecto más, la presente invención prevé la utilización en un procedimiento de tratamiento o la disminución de la gravedad de una dolencia, enfermedad, o trastorno en el que está implicada una mutación del CFTR. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un procedimiento para el tratamiento de una dolencia, enfermedad, o trastorno en el que está implicada una deficiencia de la actividad del CFTR.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona la Forma A del Compuesto 1 para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades asociadas a una función reducida del CFTR debidas a mutaciones en el gen que codifica el CFTR o a factores ambientales (por ejemplo, el tabaco). Estas enfermedades incluyen, fibrosis quística, bronquitis crónica, bronquitis recurrente, bronquitis aguda, infertilidad masculina causada por la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (ABCCD), infertilidad femenina causada por la ausencia congénita del útero y la vagina (ACUV), pancreatitis idiopática crónica (PIC), pancreatitis idiopática recurrente, pancreatitis idiopática aguda, rinosinusitis crónica, colangitis esclerosante primaria, aspergilosis broncopulmonar alérgica, diabetes, ojo seco, estreñimiento, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedades óseas (por ejemplo, osteoporosis) y asma.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona la Forma A del Compuesto 1 para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades asociadas a una función normal del CFTR. Estas enfermedades incluyen, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis crónica, bronquitis recurrente, bronquitis aguda, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis incluyendo pancreatitis crónica, pancreatitis recurrente y pancreatitis aguda, insuficiencia pancreática, infertilidad masculina causada por la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (ABCCD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática, enfermedad hepática, enfisema hereditario, cálculos biliares, enfermedad de reflujo gastro-esofágico, cánceres gastrointestinales, enfermedad inflamatoria del intestino, estreñimiento, diabetes, artritis, osteoporosis y osteopenia.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona la Forma A del Compuesto 1 para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de enfermedades asociadas a una función normal del CFTR que incluyen hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de Tipo 1, deficiencias en el procesamiento de lípidos, como la hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia Tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades del almacenamiento lisosómico, tales como la enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glicanosis CDG tipo 1, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI central, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Perlizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, diversos trastornos neurológicos de la poliglutamina como la enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelar tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, palidoluisiana dentatorubal y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob hereditaria (debido a un defecto en el procesamiento de las proteínas priónicas), enfermedad de Fabry, síndrome de Straussler-Scheinker, síndrome de Gorham, canalopatías de cloruro, miotonía congénita (formas de Thomson y Becker), síndrome de Bartter de tipo III, enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento lisosómico, síndrome de Angelman, discinesia ciliar primaria (DCP), DCP con situs inversus (también conocido como síndrome de Kartagener), DCP sin situs inversus y aplasia ciliar o enfermedad de Sjögren.

De acuerdo con una realización preferida alternativa, la presente invención proporciona una composición que comprende la Forma A para su utilización en un procedimiento para el tratamiento de la fibrosis quística.

De acuerdo con la invención, una "cantidad eficaz" de la Forma A o de una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables es aquella cantidad eficaz para el tratamiento o la disminución de la gravedad de una o más de las enfermedades, trastornos o dolencias mencionadas anteriormente.

La Forma A o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables se puede administrar utilizando cualquier cantidad o cualquier vía de administración eficaz para el tratamiento o la disminución de la gravedad de una o más de las enfermedades, trastornos o dolencias mencionadas anteriormente.

En ciertas realizaciones, la Forma A o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables es útil para el tratamiento o la disminución de la gravedad de la fibrosis quística en pacientes que presentan actividad residual del CFTR en la membrana apical del epitelio respiratorio y no respiratorio. La presencia de actividad residual del CFTR

en la superficie epitelial se puede detectar fácilmente utilizando procedimientos conocidos en la materia, por ejemplo, técnicas electrofisiológicas, bioquímicas, o histoquímicas convencionales. Dichos procedimientos identifican la actividad del CFTR utilizando técnicas electrofisiológicas *in vivo* o *ex vivo*, la medición de la concentración de Cl⁻ en sudor o saliva, o técnicas bioquímicas o histoquímicas *ex vivo* para controlar la densidad de la superficie celular. Utilizando dichos procedimientos, la actividad residual del CFTR se puede detectar fácilmente en pacientes heterocigóticos u homocigóticos para una variedad de diferentes mutaciones, incluyendo pacientes homocigóticos o heterocigóticos para la mutación más habitual, $\Delta F508$.

En otra realización, la Forma A descrita en el presente documento o en una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables es útil para el tratamiento o la disminución de la gravedad de la fibrosis quística en pacientes que tienen actividad residual del CFTR inducida o aumentada utilizando procedimientos farmacológicos o terapia génica. Dichos procedimientos incrementan la cantidad de CFTR presente en la superficie celular, induciendo así una actividad del CFTR ausente hasta ese momento en un paciente o aumentando el nivel existente de actividad residual del CFTR en un paciente.

En una realización, la Forma A descrita en el presente documento o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables es útil para el tratamiento o la disminución de la gravedad de la fibrosis quística en pacientes con ciertos genotipos que presentan actividad residual del CFTR, por ejemplo, mutaciones de clase III (regulación o funcionamiento alterados de los canales), mutaciones de clase IV (conductancia alterada), o mutaciones de clase V (síntesis reducida) (Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6:521 - 529. 2000). Otros genotipos de pacientes que presentan actividad residual del CFTR incluyen pacientes homocigóticos para una de estas clases o heterocigóticos con cualquier otra clase de mutaciones, incluyendo las mutaciones de clase I, mutaciones de clase II, o una mutación que carezca de clasificación.

En una realización, la Forma A descrita en el presente documento o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables es útil para el tratamiento o la disminución de la gravedad de la fibrosis quística en pacientes con ciertos fenotipos clínicos, por ejemplo, un fenotipo clínico de moderado a leve que normalmente está relacionado con la cantidad de actividad residual del CFTR en la membrana apical del epitelio. Dichos fenotipos incluyen pacientes que presentan insuficiencia pancreática o pacientes diagnosticados con pancreatitis idiopática y ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes, o enfermedad pulmonar leve.

La cantidad exacta necesaria variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la infección, el agente particular, su modo de administración y similares. Los compuestos de la invención preferentemente se formulan en una forma de dosificación unitaria para comodidad de la administración y uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de dosificación unitaria" como se utiliza en el presente documento se refiere a una unidad físicamente discreta del agente adecuado para el paciente a tratar. No obstante, se entenderá que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decisión del facultativo que atiende dentro del alcance de un buen criterio médico. El nivel de dosis eficaz específico para cualquier paciente u organismo particular dependerá de una serie de factores que incluyen el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el periodo de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o simultáneamente con el compuesto específico empleado y factores similares muy conocidos en la práctica médica. El término "paciente", como se utiliza en el presente documento, significa un animal, preferentemente un mamífero y lo más preferentemente un ser humano.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención se pueden administrar a seres humanos y otros animales por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas, gotas o parches), bucal, en forma de pulverizador oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la infección a tratar. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral o parenteral a niveles de dosificación de 0,01 mg/kg aproximadamente a 50 mg/kg aproximadamente y preferentemente de 0,5 mg/kg aproximadamente a 25 mg/kg aproximadamente, de peso corporal del sujeto al día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

Las formas de dosificación líquidas para la administración por vía oral incluyen, pero no están limitadas a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados habitualmente en la materia tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como etilenglicol, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y sus mezclas. Aparte de diluyentes inertes, las composiciones por vía oral también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, emulsionantes y agentes suspensores, edulcorantes, aromatizantes y perfumes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas estériles inyectables se pueden formular de acuerdo con lo conocido en la materia utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación estéril inyectable también puede ser una solución, suspensión o emulsión estéril inyectable en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, en forma de solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de los inyectables se utilizan ácidos grasos tales como ácido oleico.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene las bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Con el fin de prolongar el efecto de un compuesto de la presente invención, a menudo es deseable retrasar la absorción del compuesto procedente de una inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede conseguir mediante la utilización de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con una mala solubilidad en agua. La velocidad de absorción del compuesto depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de la forma de un compuesto administrada parenteralmente se consigue disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo oleoso. Las formas de depósitos inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas del compuesto en polímeros biodegradables tales como poliláctido-policáctido. Dependiendo de la relación de compuesto a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del compuesto. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones en depósito inyectable también se preparan atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las composiciones para la administración por vía rectal o vaginal preferentemente son supositorios que se pueden preparar mezclando los compuestos de esta invención con excipientes o vehículos no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera para supositorios que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y por tanto se funden en el recto o en la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

Las formas de dosificación sólidas para la administración por vía oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En dichas formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte farmacéuticamente aceptable, tal como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o a) cargas o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato sódico, e) agentes retardantes de la solución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico y sus mezclas. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en materia de formulación farmacéutica. Opcionalmente pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberen el principio(s) activo(s) única, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Ejemplos de composiciones embebidas que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras, utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se ha indicado anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos para el control de la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en materia de formulación farmacéutica. En tales formas de dosificación sólida el compuesto activo se puede mezclar con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Dichas formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para la formación de comprimidos y otros ayudantes para la formación de comprimidos tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes

tamponantes. Opcionalmente pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberen el principio(s) activo(s) única, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Ejemplos de composiciones embebidas que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

- 5 Las formas de dosificación para administración por vía tópica o transdérmica de un compuesto de esta invención incluyen pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizadores, inhaladores o parches. El componente activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y los conservantes o tampones necesarios que puedan ser necesarios. La formulación oftálmica, las gotas para los oídos y las gotas para los ojos también se contempla que estén dentro del alcance de esta invención. Además, la presente
- 10 invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja añadida de proporcionar una liberación controlada de un compuesto en el cuerpo. Dichas formas de dosificación se preparan disolviendo o dispersando el compuesto en el medio apropiado. También se pueden utilizar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad se puede controlar proporcionando una membrana que controle la velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.
- 15 También se apreciará que la Forma A descrita en el presente documento o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables se pueden emplear en terapias de combinación, es decir, la Forma A descrita en el presente documento o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables se pueden administrar simultáneamente con, antes de, o después de, uno o más de otros agentes terapéuticos o procedimientos médicos
- 20 deseados. La combinación particular de terapias (agentes terapéuticos o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los agentes terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado a conseguir. También se apreciará que las terapias empleadas pueden conseguir un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto de la invención se puede administrar simultáneamente con otro agente usado para tratar el mismo trastorno), o pueden conseguir efectos diferentes (por ejemplo, el control de cualquier efecto adverso). Como se utiliza en el presente documento, agentes terapéuticos
- 25 adicionales que se administran normalmente para tratar o prevenir una enfermedad particular, o dolencia, son conocidos como "apropiados para la enfermedad, o dolencia, que se está tratando".

En una realización, el agente adicional se selecciona entre un agente mucolítico, un broncodilatador, un antibiótico, un agente anti-infeccioso, un agente anti-inflamatorio, un modulador del CFTR distinto de un compuesto de la presente invención, o un agente nutricional.

- 30 En una realización, el agente adicional es un antibiótico. Ejemplos de antibióticos útiles en este documento incluyen tobramicina, incluyendo polvo de tobramicina inhalada (TIP), azitromicina, aztreonam, incluyendo la forma en aerosol de aztreonam, amikacina, incluyendo sus formulaciones liposómicas, ciprofloxacina, incluyendo sus formulaciones adecuadas para la administración por inhalación, levofloxacina, incluyendo sus formulaciones en aerosol y combinaciones de dos antibióticos, por ejemplo, fosfomicina y tobramicina.
- 35 En otra realización, el agente adicional es un mucolítico. Ejemplos de mucolíticos útiles en el presente documento incluyen Pulmozyme®.

En otra realización, el agente adicional es un broncodilatador. Broncodilatadores ejemplares incluyen albuterol, sulfato de metaprotenerol, acetato de pirbuterol, salmeterol, o sulfato de tetrabulina.

- 40 En otra realización, el agente adicional es eficaz en la restauración del líquido de la superficie de las vías respiratorias del pulmón. Tales agentes mejoran la circulación de sales dentro y fuera de las células, permitiendo que el moco de las vías respiratorias del pulmón esté más hidratado y, que por tanto, se elimine más fácilmente. Ejemplos de dichos agentes incluyen solución salina hipertónica, denufosol tetrasódico ([[(3S, 5R)-5-{4-amino-2-oxopirimidin-1-il)-3-hidroxioxolan-2-il]metoxi-hidroxifosforil] [(2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioxopirimidin-1-il)-3, 4-
- 45 dihidroxioxolan-2-il]metoxi-hidroxifosforil]oxi-hidroxifosforil] hidrogenofosfato), o bronquitol (formulación inhalada de manitol).

En otra realización, el agente adicional es un agente anti-inflamatorio, es decir, un agente que puede reducir la inflamación en los pulmones. Ejemplos de agentes útiles en el presente documento incluyen ibuprofeno, ácido docosahexanoico (DHA), sildenafil, glutatión inhalado, pioglitazona, hidroxiclороquina, o simvastatina.

- 50 En otra realización, el agente adicional reduce la actividad del bloqueante del canal de sodio epitelial (ENaC) ya sea directamente por el bloqueo del canal o indirectamente mediante la modulación de las proteasas que dan lugar a un aumento en la actividad del ENaC (por ejemplo, serinproteasas, proteasas que activan el canal). Ejemplos de dichos agentes incluyen camostat (un inhibidor de proteasas de tipo tripsina), QAU145, 552-02, GS-9411, INO-4995, Aerolytic y amilorida. Agentes adicionales que reducen la actividad del bloqueante del canal de sodio epitelial (ENaC) se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación PCT N° WO2009/074575, cuyo contenido completo se
- 55 incorpora en su totalidad en el presente documento.

Entre otras enfermedades descritas en el presente documento, las combinaciones de moduladores del CFTR, tales como la Forma A, y agentes que reducen la actividad del ENaC se utilizan para tratar el síndrome de Liddle, una dolencia inflamatoria o alérgica incluyendo fibrosis quística, discinesia ciliar primaria, bronquitis crónica, enfermedad

pulmonar obstructiva crónica, asma, infecciones del tracto respiratorio, carcinoma pulmonar, xerostomía y queratoconjuntivitis infecciosa, infecciones del tracto respiratorio (agudas y crónicas; víricas y bacterianas) y carcinoma pulmonar.

Las combinaciones de moduladores del CFTR, tales como la Forma A, y agentes que reducen la actividad del ENaC también son útiles para tratar enfermedades mediadas por el bloqueo del canal de sodio epitelial y también incluyen enfermedades distintas a las enfermedades respiratorias que están asociadas a la regulación anormal del fluido a través de un epitelio, lo que supone quizás una fisiología anormal de los líquidos de la superficie protectora sobre su superficie, por ejemplo, xerostomía (boca seca) o queratoconjuntivitis infecciosa (ojo seco). Además, el bloqueo del canal de sodio epitelial en el riñón se podría utilizar para promover la diuresis y con ello inducir un efecto hipotensor.

El asma incluye tanto asma intrínseca (no alérgica) como asma extrínseca (alérgica), asma leve, asma moderada, asma grave, asma bronquítica, asma inducida por el ejercicio, asma ocupacional y asma inducida después de una infección bacteriana. El tratamiento del asma también se debe entender que abarca el tratamiento de sujetos, por ejemplo, de menos de 4 o 5 años de edad, que presenten síntomas de sibilancia y diagnosticados o diagnosticables como "niños con sibilancias", una categoría de pacientes establecida de preocupación médica importante y ahora identificada con frecuencia como asmáticos incipientes o en fase temprana. (Por conveniencia, esta dolencia asmática particular se denomina "síndrome del niño sibilante"). La eficacia profiláctica en el tratamiento del asma se pondrá de manifiesto por la frecuencia reducida o la gravedad del ataque sintomático, por ejemplo, del ataque asmático agudo o broncoconstrictor, la mejora en la función pulmonar o la mejora en la hiperreactividad de las vías respiratorias. Además se puede poner de manifiesto por un menor requerimiento de otra terapia sintomática, es decir, terapia para o destinada a restringir o abortar un ataque sintomático cuando se produce, por ejemplo, anti-inflamatoria (por ejemplo, cortico-esteroides) o broncodilatadora. El beneficio profiláctico en el asma puede ser evidente, en particular, en sujetos propensos a "exacerbación matutina". La "exacerbación matutina" es un síndrome asmático reconocido, habitual en un porcentaje sustancial de asmáticos y caracterizado por ataques de asma, por ejemplo, entre las 4-6 AM aproximadamente, es decir, en un momento de forma habitual sustancialmente distante de cualquier terapia de asma sintomática administrada previamente.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica incluye bronquitis crónica o disnea asociada a ella, enfisema, así como exacerbación de la hiperreactividad de las vías respiratorias como consecuencia de otra terapia con fármacos, en particular, otra terapia con un fármaco inhalado. En algunas realizaciones, las combinaciones de moduladores del CFTR, tales como la Forma A, y agentes que reducen la actividad del ENaC son útiles para el tratamiento de bronquitis de cualquier tipo o la génesis incluyendo, por ejemplo, bronquitis aguda, araquídica, catarral, crupal, crónica o bronquitis fitinoide.

En otra realización, el agente adicional es un modulador del CFTR distinto de la Forma A del Compuesto 1, es decir, un agente que tiene el efecto de modular la actividad del CFTR. Ejemplos de dichos agentes incluyen ataluren ("PTC124[®]"; ácido 3-[5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]benzoico), sinapultide, lancovutide, depelestat (un inhibidor recombinante de elastasa de neutrófilos humanos), cobiprostona (ácido (7-((2R, 4aR, 5R, 7aR)-2-[(3S)-1,1-difluoro-3-metilpentil]-2-hidroxi-6-oxooctahidrociclopenta[bipiran-5-il]heptanoico), o ácido (3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico. En otra forma de realización, el agente adicional es ácido (3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico.

En otra realización, el agente adicional es un agente nutricional. Ejemplos de dichos agentes incluyen pancrelipasa (sustitutivo de enzimas pancreáticas), incluyendo Pancrease[®], Pancreacarb[®], Ultrase[®] o Creon[®], Liprotomase[®] (anteriormente Trizyte[®]), Aquadeks[®] o inhalación de glutatión. En una realización, el agente nutricional adicional es pancrelipasa.

En una realización, el agente adicional es un modulador del CFTR distinto de un compuesto de la presente invención.

La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de esta invención no será superior a la cantidad que normalmente se administra en una composición que comprende ese agente terapéutico como único agente activo. Preferentemente, la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones descritas en el presente documento oscilará entre el 50 % aproximadamente y el 100 % de la cantidad normalmente presente en una composición que comprende ese agente como único agente terapéuticamente activo.

La Forma A descrita en el presente documento o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables también se puede incorporar en composiciones para el recubrimiento de un dispositivo médico implantable, tales como prótesis, válvulas artificiales, injertos vasculares, derivaciones y catéteres. Por consiguiente, en otro aspecto la presente invención incluye una composición para recubrir un dispositivo implantable que comprende un compuesto de la presente invención como se ha descrito de forma general anteriormente y en clases y subclases en el presente documento y un vehículo adecuado para recubrir dicho dispositivo implantable. En todavía otro aspecto, la presente invención incluye un dispositivo implantable recubierto con una composición que comprende un compuesto de la presente invención como se ha descrito de forma general anteriormente, y en clases y subclases en el presente documento, y un vehículo adecuado para el recubrimiento de dicho dispositivo implantable. Recubrimientos

adecuados y la preparación general de dispositivos implantables recubiertos se describen en las patentes de EE.UU. 6.099.562; 5.886.026 y 5.304.121. Los recubrimientos normalmente son materiales poliméricos biocompatibles tales como un polímero de hidrogel, polimetildisiloxano, policaprolactona, polietilenglicol, ácido poliláctico, acetato de etilenvinilo y sus mezclas. Los recubrimientos además pueden estar cubiertos por un recubrimiento superior adecuado de fluorosilicona, polisacáridos, polietilenglicol, fosfolípidos o sus combinaciones para conferir características de liberación controlada a la composición.

Otro aspecto de la invención se refiere a la actividad de modulación del CFTR en una muestra biológica o un paciente (por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*), procedimiento que comprende la administración al paciente, o la puesta en contacto de dicha muestra biológica con la Forma A descrita en el presente documento o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables. El término "muestra biológica", como se utiliza en el presente documento, incluye, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos; material de biopsia obtenido de un mamífero o extractos del mismo, y sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas u otros fluidos corporales o extractos de los mismos.

La modulación del CFTR en una muestra biológica es útil para una variedad de propósitos que son conocidos para un experto en la materia. Ejemplos de dichos propósitos incluyen, pero no están limitados a, el estudio del CFTR en fenómenos biológicos y patológicos y la evaluación comparativa de nuevos moduladores de CFTR.

En aún otra realización, se proporciona un procedimiento para modular *in vitro* o *in vivo* la actividad de un canal de aniones, que comprende la etapa de poner en contacto dicho canal con la Forma A descrita en el presente documento o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables. En realizaciones preferidas, el canal de aniones es un canal de cloruro o un canal de bicarbonato. En otras realizaciones preferidas, el canal de aniones es un canal de cloruro.

De acuerdo con una realización alternativa, la presente invención proporciona un procedimiento para incrementar el número de CFTR funcionales en una membrana de una célula, que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con la Forma A descrita en el presente documento o una de sus composiciones farmacéuticamente aceptables.

De acuerdo con otra realización preferida, la actividad del CFTR se mide midiendo el potencial de voltaje transmembrana. Los medios para medir el potencial de voltaje a través de una membrana en la muestra biológica pueden emplear cualquiera de los procedimientos conocidos en la materia, tales como el ensayo óptico del potencial de membrana u otros procedimientos electrofisiológicos.

El ensayo óptico del potencial de membrana utiliza sensores FRET de detección del voltaje descritos por González y Tsien (véase, González, J. E. y R. Y. Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells." *Biophys J* 69(4): 1272-80 González, J. E. y R. Y. Tsien (1997); "Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer" *Chem Biol* 4(4): 269-77) junto con la instrumentación para medir los cambios en la fluorescencia tales como el lector de sondas de voltaje/iones (VIPR) (véase, González, J. E., K. Oades, y col. (1999) "Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets" *Drug Discov Today* 4(9): 431-439)

Estos ensayos de detección del voltaje se basan en el cambio en la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre el colorante soluble en la membrana y de detección del voltaje, DiSBAC₂ (3) y un fosfolípido fluorescente, CC2-DMPE, que está unido a la cara externa de la membrana plasmática y actúa como un donante de FRET. Los cambios en el potencial de membrana (V_m) provocan que el DiSBAC₂ (3) cargado negativamente se redistribuya a través de la membrana plasmática y la cantidad de transferencia de energía procedente de CC2-DMPE cambia en consecuencia. Los cambios en la emisión de fluorescencia se pueden controlar usando VIPR™ II, que es un controlador de líquidos y un detector de fluorescencia integrado diseñado para realizar selecciones basadas en células en placas de microtitulación de 96 o de 384 pocillos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para su uso en la medición de la actividad del CFTR o de uno de sus fragmentos en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*, que comprende (i) una composición que comprende la Forma A o cualquiera de las realizaciones anteriores; y (ii) instrucciones para a) poner en contacto la composición con la muestra biológica y b) medir la actividad de dicho CFTR o de uno de sus fragmentos. En una forma de realización, el kit comprende además instrucciones para a) poner en contacto una composición adicional con la muestra biológica; b) medir la actividad de dicho CFTR o de uno de sus fragmentos en presencia de dicho compuesto adicional, y c) comparar la actividad del CFTR en presencia del compuesto adicional con la densidad del CFTR en presencia de la Forma A descrita en el presente documento. En realizaciones preferidas, el kit se usa para medir la densidad del CFTR.

Para que la invención descrita en el presente documento se pueda entender con mayor profundidad, se exponen los siguientes ejemplos. Se debe entender que estos ejemplos solo tienen propósitos ilustrativos y no se deben interpretar en ningún caso como una limitación de esta invención.

Ejemplos

Métodos y materiales

XRPD (Difracción de rayos X de polvo)

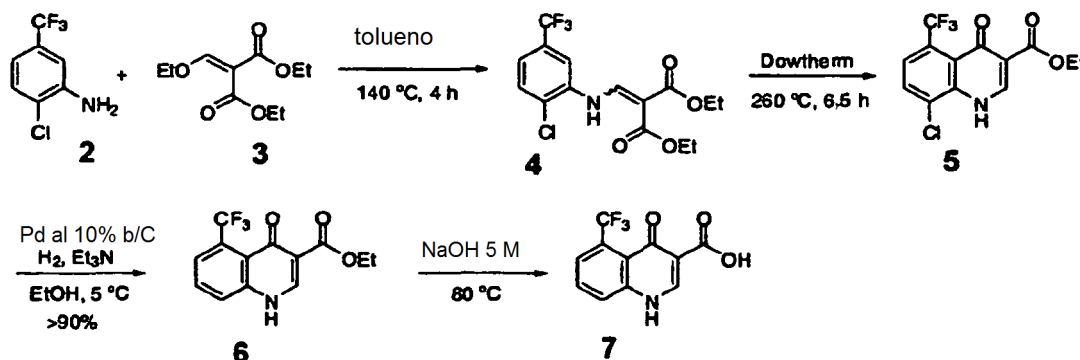
Los datos de la difracción de rayos X de polvo (XRPD) se registraron a temperatura ambiente usando un difractómetro de rayos X de polvo de sobremesa Rigaku/MSD MiniFlex Desktop Powder X-ray Diffractometer (Rigaku, The Woodlands, TX). Los rayos X se generaron utilizando un tubo de Cu operado a 30 kV y 15 mA con un filtro de supresión K β . La ranura de divergencia era variable con las ranuras de dispersión y de recepción fijadas a 4,2 grados y una ranura de 0,3 mm, respectivamente. El modo de barrido fue de tiempo fijo (FT) con una anchura de paso de 0,02 grados y un tiempo de recuento de 2,0 segundos. El difractómetro de rayos X de polvo se calibró utilizando patrones de referencia: 75 % de Sodalita (Na₃Al₄Si₄O₁₂Cl) y 25 % de silicio (Rigaku, Cat # 2100/ALS). La fase de seis muestras se utilizó con los soportes de muestra y el fondo a cero (SH-LBSL511-RNDB). La muestra de polvo se colocó en la zona indentada y aplanada con el portaobjetos de vidrio.

Espectroscopía FTIR (transformada de Fourier en el infrarrojo)

Los espectros de FTIR se obtuvieron en un espectrómetro Thermo Scientific, 6700 Nicolet FT-IR, con compartimento de muestras Smart Orbit, ventana de diamante y utilizando el *software*: Omnic, 7.4. La muestra de polvo se colocó directamente en el cristal de diamante y se añadió presión para conformar la superficie de la muestra a la superficie del cristal de diamante. Se recogió el espectro de fondo y a continuación se recogió el espectro de la muestra. Los parámetros de la recolección fueron los siguientes:

Detector: DTGS KBr;
Divisor del haz: KBr;
Fuente: IR;
Intervalo de barrido: 4000 - 400 cm⁻¹;
Ganancia: 8,0;
Velocidad óptica: 0,6329 cm/s;
Apertura: 100;
Número de barridos: 32, y
Resolución: 4 cm⁻¹.

Ejemplo 1: Preparación de ácido 4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (7)



Se combinaron 2-cloro-5-(trifluorometil)anilina 2 (200 g, 1,023 mol), 2-(etoximetilen)malonato de dietilo 3 (276 g, 1,3 mol) y tolueno (100 ml) en atmósfera de nitrógeno en matraz de fondo redondo de 1 l y tres bocas equipado con un condensador Dean-Stark. La solución se calentó con agitación a 140 °C y la temperatura se mantuvo durante 4 h. La mezcla de reacción se enfrió a 70 °C y se añadió lentamente hexano (600 ml). La suspensión resultante se agitó y se dejó calentar a temperatura ambiente. El sólido se recogió por filtración, se lavó con el 10 % de acetato de etilo en hexano (2 x 400 ml) y a continuación se secó al vacío para proporcionar un sólido blanco (350 g, 94 % de rendimiento) como producto de condensación deseado 2-((2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)metilen)malonato de dietilo 4. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,28 (d, J = 13,0 Hz, 1H), 8,63 (d, J = 13,0 Hz, 1H), 8,10 (s, 1H), 7,80 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,50 (dd, J = 1,5, 8,4 Hz, 1H), 4,24 (c, J = 7,1 Hz, 2H), 4,17 (c, J = 7,1 Hz, 2H), 1,27 (m, 6H).

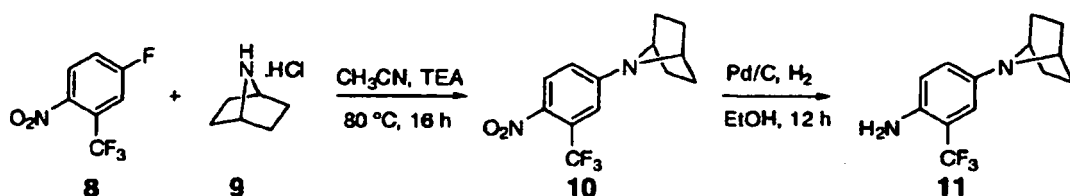
Preparación de 8-cloro-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxilato de etilo (5). Un matraz de 1 l y 3 bocas se cargó con Dowtherm[®] (200 ml, 8 ml/g), que se desgasificó a 200 °C durante 1 h. El disolvente se calentó a 260 °C y se cargó en porciones durante 10 min con 2-((2-cloro-5-(trifluorometil)fenil)metilen)malonato de dietilo 4 (25 g, 0,07 mol). La mezcla resultante se agitó a 260 °C durante 6,5 horas (h) y el subproducto de etanol resultante se retiró por destilación. La mezcla se dejó enfriar lentamente a 80 °C. Se añadió hexano (150 ml) lentamente durante 30 minutos (min), seguido por 200 ml más de hexano añadidos en una porción. La suspensión se agitó hasta que se hubo alcanzado la temperatura ambiente. El sólido se filtró, se lavó con hexano (3 x 150 ml) y a continuación se

secó al vacío para proporcionar 8-cloro-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxilato de etilo 5 en forma de sólido de color tostado (13,9 g, 65 % de rendimiento). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,91 (s, 1H), 8,39 (s, 1H), 8,06 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,81 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 4,24 (c, J = 7,1 Hz, 2H), 1,29 (t, J = 7,1 Hz, 3H).

Preparación de 4-oxo-5-(trifluorometil)-1H-quinolin-3-carboxilato de etilo (6). Un matraz de 5 l y 3 bocas se cargó con 8-cloro-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxilato de etilo 5 (100 g, 0,3 mol), etanol (1250 ml, 12,5 ml/g) y trietilamina (220 ml, 1,6 mol). El recipiente se cargó a continuación con 10 g de Pd/C al 10 % (50 % húmedo) a 5 °C. La reacción se agitó vigorosamente en atmósfera de hidrógeno durante 20 horas a 5 °C, tras las cuales la mezcla de reacción se concentró hasta un volumen de aproximadamente 150 ml. El producto, 4-oxo-5-(trifluorometil)-1H-quinolin-3-carboxilato de etilo 6, en forma de suspensión con Pd/C, se obtuvo directamente en el paso siguiente.

Preparación de ácido 4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico (7). Se suspendió 4-oxo-5-(trifluorometil)-1H-quinolin-3-carboxilato de etilo 6 (58 g, 0,2 mol, suspensión de la reacción en bruto que contiene Pd/C) en NaOH (814 ml de 5 M, 4,1 mol) en un matraz de 1 l con un condensador de reflujo y se calentó a 80 °C durante 18 h, seguido de calentamiento adicional a 100 °C durante 5 h. La reacción se filtró en caliente a través de Celite empaquetado para retirar el Pd/C y el Celite se lavó con NaOH 1 H. El filtrado se acidificó a un pH de 1 aproximadamente para obtener un precipitado espeso y blanco. El precipitado se filtró y a continuación se enjuagó con agua y acetonitrilo frío. El sólido se secó al vacío para proporcionar ácido 4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico 7 en forma de sólido blanco (48 g, 92 % de rendimiento). RMN ¹H (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 15,26 (s, 1H), 13,66 (s, 1H), 8,98 (s, 1H), 8,13 (dd, J = 1,6, 7,8 Hz, 1H), 8,06-7,99 (m, 2H).

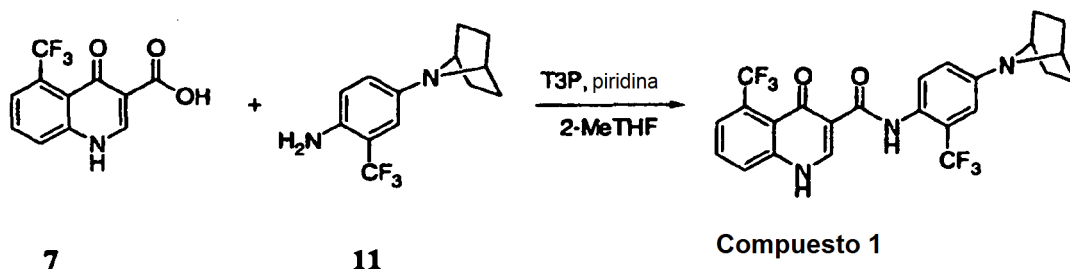
Ejemplo 2: Preparación de 4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)anilina



Preparación de 7-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]-7-azabicyclo[2.2.1]heptano (20). A un matraz que contiene 7-azabicyclo[2.2.1]heptano 9 (4,6 g, 34,43 mmol), obtenido en atmósfera de nitrógeno se le añadió una solución de 4-fluoro-1-nitro-2-(trifluorometil)benceno 8 (6,0 g, 28,69 mmol) y trietilamina (8,7 g, 12,00 ml, 86,07 mmol) en acetonitrilo (50 ml). El matraz de reacción se calentó a 80 °C en atmósfera de nitrógeno durante 16 h. La mezcla de reacción se dejó enfriar y a continuación se repartió entre agua y diclorometano. La fase orgánica se lavó con HCl 1 M, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró hasta sequedad. La purificación por cromatografía en gel de sílice (0-10 % de acetato de etilo en hexanos) proporcionó 7-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]-7-azabicyclo[2.2.1]heptano 10 (7,2 g, 88 % de rendimiento) en forma de sólido de color amarillo. RMN ¹H (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 8,03 (d, J = 9,1 Hz, 1H), 7,31 (d, J = 2,4 Hz, 1H), 7,25 (dd, J = 2,6, 9,1 Hz, 1H), 4,59 (s, 2H), 1,69 - 1,67 (m, 4H), 1,50 (d, J = 7,0 Hz, 4H).

Preparación de 4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)anilina (11). Un matraz cargado con 7-[4-nitro-3-(trifluorometil)fenil]-7-azabicyclo[2.2.1]heptano 10 (7,07 g, 24,70 mmol) y Pd/C al 10 % (0,71 g, 6,64 mmol) se evacuó y a continuación se purgó con nitrógeno. Se añadió etanol (22 ml) y el matraz de reacción se equipó con un balón de hidrógeno. Después de agitar vigorosamente durante 12 h, la mezcla de reacción se purgó con nitrógeno y el Pd/C se retiró por filtración. El filtrado se concentró a presión reducida hasta un aceite oscuro y el residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (0-15 % de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar 4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)anilina 11 en forma de sólido morado (5,76 g, 91 % de rendimiento). RMN ¹H (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 6,95 (dd, J = 2,3, 8,8 Hz, 1H), 6,79 (d, J = 2,6 Hz, 1H), 6,72 (d, J = 8,8 Hz, 1H), 4,89 (s, 2H), 4,09 (s, 2H), 1,61 - 1,59 (m, 4H) y 1,35 (d, J = 6,8 Hz, 4H).

Ejemplo 3: Preparación de N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (Compuesto 1).



A una solución de ácido 4-oxo-5-(trifluorometil)-1H-quinolin-3-carboxílico 7 (9,1 g, 35,39 mmol) y 4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)anilina 11 (9,2 g, 35,74 mmol) en 2-metiltetrahidrofurano (91,00 ml) se le añadió anhídrido cíclico del ácido propilfosfónico (solución al 50 % en acetato de etilo, 52,68 ml, 88,48 mmol) y piridina (5,6 g, 5,73 ml, 70,78 mmol) a temperatura ambiente. El matraz de reacción se calentó a 65 °C durante 10 h en atmósfera de nitrógeno. Después de enfriar a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se inactivó con una solución saturada de Na₂CO₃ (50 ml). Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo dos veces más con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron hasta un sólido de color tostado. El producto sólido en bruto se suspendió en acetato de etilo/dietiléter (2:1), se recogió por filtración al vacío y se lavó dos veces más con acetato de etilo/dietiléter (2:1) para proporcionar el producto como un polvo cristalino de color amarillo. El polvo se disolvió en acetato de etilo caliente y se absorbió sobre Celite. La purificación por cromatografía en gel de sílice (0-50 % de acetato de etilo en diclorometano) proporcionó N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (Compuesto 1) en forma de sólido blanco cristalino (Forma A) (13,5 g, 76 % de rendimiento). LC/MS m/z 496,0 [M + H]⁺, tiempo de retención 1,48 min (RP-C₁₈, 10-99 % de CH₃CN/0,05 % de TFA durante 3 min). RMN ¹H (400,0 MHz, DMSO-d₆) δ 13,08 (s, 1H), 12,16 (s, 1H), 8,88 (s, 1H), 8,04 (dd, J = 2,1, 7,4 Hz, 1H), 7,95 - 7,88 (m, 3H), 7,22 (dd, 2,5, 8,9 Hz, 1H), 7,16 (d, J = 2,5 Hz, 1H), 4,33 (s, 2H), 1,67 (d, J = 6,9 Hz, 4H), 1,44 (d, J = 6,9 Hz, 4H).

El difractograma en polvo de la Forma A se muestra en la Figura 1.

La Tabla 1, a continuación proporciona picos de XRPD representativos de la Forma A.

Tabla 1. Picos de XRPD de la Forma A

2 Theta (grados)	Intensidad (%)
7,90	100,0
9,28	10,8
11,90	12,8
14,38	35,2
15,08	12,6
15,80	34,1
16,96	25,2
17,66	13,8
19,28	39,4
20,06	20,2
21,36	14,5
21,80	94,2
23,40	30,0
23,80	92,0
25,64	8,9
26,82	6,4
29,36	8,1
29,72	18,1
30,14	14,2
31,20	9,9

Las imágenes conformacionales de la Forma A basada en un análisis de rayos X de un monocristal se muestran en la Figura 2. Los datos de difracción se adquirieron en un difractómetro Bruker Apex II equipado con una fuente alfa de CuK en un tubo sellado y un detector CCD Apex II. La estructura se resolvió y se refinó usando el programa SHELX (Sheldrick, GM, Acta Cryst A64, pp.112-122 (2008)). Basándose en las intensidades, las estadísticas y la simetría, la estructura se resolvió y se refinó en un sistema cristalino trigonal y un grupo espacial R-3. La Forma A tiene las siguientes dimensiones de la celda unitaria: a = 19,1670 (4) Å, b = 19,1670 (4) Å, c = 33,6572 (12) Å, α = 90°, β = 90°, y γ = 120°.

En la Figura 3 se proporciona un espectro FTIR de la Forma A.

La Tabla 2, a continuación proporciona picos representativos de FTIR de la Forma A.

Tabla 2. Picos FTIR de la Forma A

Posición (cm ⁻¹)	Intensidad
407,4	46,07
436,7	72,55
471,5	61,17
497,8	63,61
505,7	60,34
532,9	61,14
567,8	54,31
590,7	55,23
614,4	64,01
649,7	50,74
661,0	49,82
686,8	51,43
726,1	53,80
751,4	35,60
798,1	48,21
808,8	48,47
824,8	42,25
875,5	52,89
898,6	71,77
918,7	68,93
977,7	42,31
1008,1	64,09
1047,3	35,70
1072,5	53,76
1091,2	43,79
1113,4	28,46
1131,4	30,00
1153,0	34,61
1168,3	40,13
1199,3	74,26
1221,8	48,07
1253,1	47,84
1277,6	36,67
1291,7	48,07
1310,8	55,99
1329,1	63,21
1352,8	42,30
1433,2	42,45
1463,0	63,68
1526,0	35,86
1574,0	60,60
1607,5	60,30
1662,6	55,12
1740,9	86,74

2870,0	81,63
2947,7	75,12
2963,8	75,30
3092,7	84,58

Ensayos para la detección y medición de las propiedades de potenciación de $\Delta F508$ -CFTR de los compuestos

Procedimientos ópticos para el potencial de membrana con el fin de someter a ensayo las propiedades de modulación de $\Delta F508$ -CFTR de los compuestos

- 5 El ensayo utiliza colorantes fluorescentes de detección del voltaje para medir los cambios en el potencial de membrana utilizando un lector de placas fluorescentes (por ejemplo, FLIPR III, Molecular Devices, Inc.) como lectura para el incremento en $\Delta F508$ -CFTR funcional en células NIH 3T3. La fuerza impulsora para la respuesta es la creación de un gradiente de iones cloruro junto con la activación del canal mediante una etapa de adición de un solo líquido después de que las células hayan sido tratadas previamente con los compuestos y posteriormente cargadas con un colorante de detección del voltaje.

Identificación de compuestos potenciadores

- 15 Para identificar los potenciadores de $\Delta F508$ -CFTR, se desarrolló un formato de ensayo HTS de doble adición. Este ensayo HTS utiliza colorantes fluorescentes de detección del voltaje para medir cambios en el potencial de membrana en el FLEPR III como medida del incremento en el funcionamiento de los canales (conductancia) de $\Delta F508$ -CFTR en células NIH 3T3 $\Delta F508$ -CFTR con la temperatura corregida. La fuerza impulsora para la respuesta es un gradiente de iones Cl^- junto con la activación del canal con forskolina en una etapa de adición de un solo líquido utilizando un lector de placas fluorescentes tal como FLIPR III después de que las células hayan sido tratadas previamente con compuestos potenciadores (o vehículo control DMSO) y posteriormente cargadas con un colorante de redistribución.

20 Soluciones

Solución de baño # 1: (en mM) NaCl 160, KCl 4,5, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 1, HEPES 10, pH 7,4 con NaOH.

Solución de baño sin cloruro: las sales de cloruro en la solución de baño # 1 se sustituyen con sales de gluconato.

Cultivo celular

- 25 Fibroblastos NIH 3T3 de ratón que expresan $\Delta F508$ -CFTR de manera estable se utilizaron para las mediciones ópticas del potencial de membrana. Las células se mantuvieron a 37 °C en CO_2 al 5 % y el 90 % de humedad en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, 10 % de suero fetal bovino, 1 X NEAA, β -ME, 1 X pen/strep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm². Para todos los ensayos ópticos, las células se sembraron a ~20.000/pocillo en placas recubiertas con matrigel de 384 pocillos y se cultivaron durante 2 horas a 37 °C antes de cultivar a 27 °C durante 24 horas para el ensayo de potenciador. Para los ensayos de corrección, las células se cultivaron a 27 °C o 37 °C con y sin compuestos durante 16 - 24 horas. Ensayos electrofisiológicos para someter a ensayo las propiedades de modulación de $\Delta F508$ -CFTR de los compuestos.

Ensayo de la cámara de Ussing

- 35 Se realizaron experimentos en la cámara de Ussing sobre células epiteliales de las vías respiratorias polarizadas que expresan $\Delta F508$ -CFTR para caracterizar con mayor profundidad los moduladores de $\Delta F508$ -CFTR identificados en los ensayos ópticos. Se aislaron epitelios de las vías respiratorias FQ y no FQ a partir de tejido bronquial, se cultivaron como se ha descrito previamente (Galletta, L.J.V., Lantero, S., Gazzolo, A., Sacco, O., Romano, L., Rossi, G.A., & Zegarra-Moran, O. (1998) *In vitro* Cell Dev. Biol. 34, 478-481) y se pusieron en placa sobre filtros Costar® Snapwell™ que se habían recubierto previamente con medio acondicionado con NIH 3T3. Después de cuatro días el medio apical se retiró y las células se cultivaron en una interfase aire-líquido durante >14 días antes de su uso. Esto resultó en una monocapa de células columnares completamente diferenciadas que eran ciliadas, rasgos que son característicos de los epitelios de las vías respiratorias. Se aislaron HBE no FQ de no fumadores que no tenían ninguna enfermedad pulmonar conocida. Se aislaron HBE FQ de pacientes homocigóticos para $\Delta F508$ -CFTR.

- 45 HBE cultivadas en insertos de cultivos celulares Costar® Snapwell™ se montaron en una cámara de Ussing (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA) y se midió la resistencia transepitelial y la corriente de cortocircuito en presencia de un gradiente de Cl^- de la solución basolateral a la solución apical (I_{sc}) usando un sistema de fijación de voltaje (Departamento de Bioingeniería, Universidad de Iowa, IA). Brevemente, las HBE se examinaron en condiciones de registro de fijación de voltaje ($V_{hold} = 0$ mV) a 37 °C. La solución basolateral contenía (en mM) NaCl 145, K_2HPO_4 0,83, KH_2PO_4 3,3, $MgCl_2$ 1,2, $CaCl_2$ 1,2, glucosa 10, HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con NaOH) y la solución apical contenía (en mM) Gluconato de Na 145, $MgCl_2$ 1,2, $CaCl_2$ 1,2, glucosa 10, HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con NaOH).

Identificación de compuestos potenciadores

- El protocolo típico utiliza un gradiente de concentración de Cl^- desde la membrana basolateral a la membrana apical. Para establecer este gradiente, se utilizó una solución de Ringer normal en la membrana basolateral, mientras que el NaCl apical se sustituyó por gluconato sódico equimolar (valorado a pH 7,4 con NaOH) para dar un gran gradiente de concentración de Cl^- a través del epitelio. Se añadieron forskolina (10 μM) y todos los compuestos de prueba a la cara apical de los insertos del cultivo celular. La eficacia de los potenciadores putativos de $\Delta\text{F508-CFTR}$ se comparó con la del potenciador conocido, la genisteína.

Registros de la fijación de membranas

- Se controló la corriente de Cl^- total en células $\Delta\text{F508-NIH 3T3}$ usando la configuración de registro de parches perforados como se ha descrito previamente (Rae, J., Cooper, K., Gates, P., & Watsky, M. (1991) J. Neurosci. Methods 37, 15-26). Los registros de la fijación del voltaje se realizaron a 22 °C utilizando un amplificador de pinzamiento de membranas Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). La solución de la pipeta contenía (en mM) N-metil-D-glucamina (NMDG)- Cl 150, MgCl_2 2, CaCl_2 2, EGTA 10, HEPES 10 y 240 $\mu\text{g/ml}$ de anfotericina-B (pH ajustado a 7,35 con HCl). El medio extracelular contenía (en mM) NMDG- Cl 150, MgCl_2 2, CaCl_2 2, HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con HCl). La generación de pulsos, la adquisición de datos y el análisis se realizaron usando un PC equipado con una interfaz Digidata 1320 A/D junto con Clampex 8 (Axon Instruments Inc.). Para activar $\Delta\text{F508-CFTR}$, se añadieron forskolina 10 μM y genisteína 20 μM al baño y la relación corriente-voltaje se controló cada 30 segundos.

Identificación de compuestos potenciadores

- También se investigó la capacidad de los potenciadores de $\Delta\text{F508-CFTR}$ para aumentar la corriente macroscópica de Cl^- de $\Delta\text{F508-CFTR}$ ($I_{\Delta\text{F508}}$) en células NIH 3T3 que expresan $\Delta\text{F508-CFTR}$ de manera estable utilizando técnicas de registro de parches perforados. Los potenciadores identificados en los ensayos ópticos sugerían un incremento en $I_{\Delta\text{F508}}$ dependiente de la dosis con una potencia y eficacia similares a las observadas en los ensayos ópticos. En todas las células examinadas, el potencial inverso antes y durante la aplicación de potenciador fue de aproximadamente -30 mV, que es el E_{Cl} calculado (-28 mV).

Cultivo celular

- Se utilizan fibroblastos NIH 3T3 de ratón que expresan $\Delta\text{F508-CFTR}$ de manera estable para el registro del conjunto de células. Las células se mantuvieron a 37 °C en CO_2 al 5 % y el 90 % de humedad en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, 10 % de suero fetal bovino, 1 X NEAA, β -ME, 1 X pen/strep y HEPES 25 mM en matraces del cultivo de 175 cm^2 . Para el registro del conjunto de células, se sembraron 2500 - 5000 células en cubreobjetos de vidrio recubiertos de poli-lisina y se cultivaron durante 24 - 48 horas a 27 °C antes de su uso para probar la actividad de los potenciadores; y se incubaron con o sin el compuesto de corrección a 37 °C para medir la actividad de los correctores.

Registros en un único canal

- Se observó la actividad de funcionamiento de los canales del CFTR de tipo silvestre y de $\Delta\text{F508-CFTR}$ con la temperatura corregida expresado en células NIH 3T3 utilizando registros de parches de membrana extirpados de dentro a fuera como se ha descrito previamente (Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R.G., Pavirani, A., Lecocq, J-P., Lazdunski, M. (1991) Nature 354, 526 - 528) utilizando un amplificador de pinzamiento de parches Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.). La pipeta contenía (en mM) NMDG 150, ácido aspártico 150, CaCl_2 5, MgCl_2 2 y HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con base Tris). El baño contenía (en mM): NMDG- Cl 150, MgCl_2 2, EGTA 5, TES 10 y base Tris 14 (pH ajustado a 7,35 con HCl). Después de la extirpación, tanto el $\Delta\text{F508-CFTR}$ como el de tipo silvestre se activaron mediante la adición de Mg-ATP 1 mM, 75 nM de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA; Promega Corp. Madison, WI) y NaF 10 mM para inhibir las proteinfosfatasas, lo que impidió el deterioro de la corriente. El potencial de la pipeta se mantuvo a 80 mV. La actividad del canal se analizó a partir de parches de membrana que contienen ≤ 2 canales activos. El número máximo de aberturas simultáneas determinó el número de canales activos durante el transcurso de un experimento. Para determinar la amplitud de corriente de un solo canal, los datos registrados en 120 segundos de actividad de $\Delta\text{F508-CFTR}$ se filtraron "off-line" a 100 Hz y a continuación se utilizaron para construir histogramas de amplitud con todos los puntos que se ajustaron a funciones multigaussianas utilizando el *software* Bio-Patch Analysis (Bio-Logic Comp., Francia). La corriente microscópica total y la probabilidad de apertura (P_o) se determinaron a partir de 120 segundos de actividad del canal. La P_o se determinó utilizando el *software* Bio-Patch o a partir de la relación $P_o = I/i(N)$, en la que I = corriente media, i = amplitud de corriente de un solo canal y N = número de canales activos en el parche.

Cultivo celular

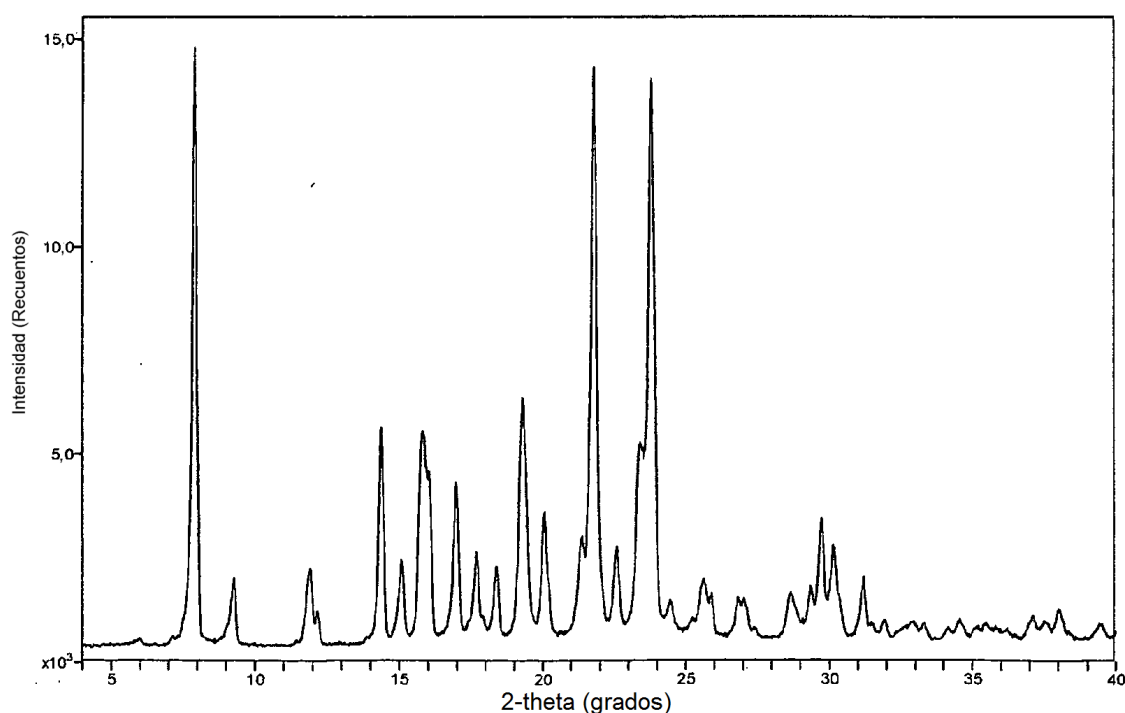
- Se utilizaron fibroblastos NIH 3T3 de ratón que expresan $\Delta\text{F508-CFTR}$ de forma estable para los registros de pinzamiento de parches de membranas extirpadas. Las células se mantuvieron a 37 °C en CO_2 al 5 % y el 90 % de humedad en medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, 10 % de suero fetal bovino, 1

X NEAA, β -ME, 1 X pen/strep y HEPES 25 mM en matraces del cultivo de 175 cm². Para el registro de un solo canal, se sembraron 2500 - 5000 células en cubreobjetos de vidrio recubiertos de poli-lisina y se cultivaron durante 24 - 48 horas a 27 °C antes de su uso.

- 5 La Forma A del Compuesto 1 es útil como un modulador de los transportadores del casete de unión a ATP. La CE₅₀ (µM) de la Forma A del Compuesto 1 se midió y resultó ser inferior a 2,0 µM. La eficacia de la Forma A del Compuesto 1 se calculó que estaba entre el 100 % y el 25 %. Cabe señalar que una eficacia del 100 % es la respuesta máxima obtenida con el 4-metil-2-(5-fenil-1H-pirazol-3-il)fenol.

REIVINDICACIONES

1. N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida como Forma A en la que la Forma A está **caracterizada por** uno o más picos en un patrón de difracción de rayos X de polvo seleccionado entre aproximadamente 7,9, aproximadamente 9,3, aproximadamente 11,9, aproximadamente 14,4, aproximadamente 15,1, aproximadamente 15,8, aproximadamente 17,0, aproximadamente 17,7, aproximadamente 19,3, aproximadamente 20,1, aproximadamente 21,4, aproximadamente 21,8, aproximadamente 23,4, aproximadamente 23,8, aproximadamente 25,6, aproximadamente 26,8, aproximadamente 29,4, aproximadamente 29,7, aproximadamente 30,1 o aproximadamente 31,2 grados.
2. Forma A de la reivindicación 1, en la que la Forma A está **caracterizada por** un pico a aproximadamente 7,9 grados, un pico a aproximadamente 11,9 grados, un pico a aproximadamente 14,4 grados y un pico a aproximadamente 15,8 grados en un patrón de difracción de rayos X de polvo.
3. Forma A de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que la Forma A está **caracterizada por** un patrón de difracción como se muestra en la siguiente Figura 1.



4. Una composición farmacéutica que comprende la Forma A de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptables.
5. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende además un agente adicional seleccionado entre un agente mucolítico, un broncodilatador, un antibiótico, un agente anti-infeccioso, un agente anti-inflamatorio, un modulador del CFTR distinto de la Forma A, o un agente nutricional.
6. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el agente adicional es un modulador del CFTR distinto de la Forma A.
7. Forma A de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica de la reivindicación 4 o 5 para su uso en el tratamiento o la disminución de la gravedad de una enfermedad en un paciente, en donde dicha enfermedad se selecciona entre fibrosis quística, asma, EPOC inducida por el tabaco, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, infertilidad masculina causada por la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (ABCCD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedad hepática, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de Tipo 1, deficiencias en el procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia Tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento lisosómico, tales como enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glucanosis

- CDG tipo 1, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI central, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina tales como la enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa de tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia palidoluisiana dentatorubral y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob hereditaria (debido a un defecto en el procesamiento de proteínas priónicas), enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (debido a un defecto en el procesamiento de PrP), infertilidad, osteoporosis, osteopenia, síndrome de Gorham, canalopatías de cloruro, miotonía congénita (formas de Thomson y Becker), síndrome de Bartter de tipo III, enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, enfermedad de almacenamiento lisosómico, síndrome de Angelman, discinesia ciliar primaria (DCP), DCP con situs inversus (también conocido como síndrome de Kartagener), DCP sin situs inversus y aplasia ciliar y enfermedad hepática, comprendiendo dicho uso la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de la Forma A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
8. Forma A o la composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que dicha enfermedad es fibrosis quística.
9. Forma A de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica de la reivindicación 4 o 5 para su uso en el tratamiento o la disminución de la gravedad de una enfermedad en un paciente, en donde dicha enfermedad está asociada con la reducción de la función del CFTR debido a mutaciones en el gen que codifica el CFTR o a factores ambientales, comprendiendo dicho uso la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de la Forma A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
10. Forma A o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la enfermedad es fibrosis quística, bronquitis crónica, bronquitis recurrente, bronquitis aguda, infertilidad masculina causada por la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (ABCCD), infertilidad femenina causada por la ausencia congénita de útero y vagina (ACUV), pancreatitis idiopática crónica (PIC), pancreatitis idiopática recurrente, pancreatitis idiopática aguda, rinosinusitis crónica, colangitis esclerosante primaria, aspergilosis broncopulmonar alérgica, diabetes, ojo seco, estreñimiento, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedades óseas y asma.
11. Forma A de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica de la reivindicación 4 o 5 para su uso en el tratamiento o la disminución de la gravedad de una enfermedad en un paciente, en donde dicha enfermedad está asociada con la función normal del CFTR, comprendiendo dicho uso la etapa de administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de la Forma A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
12. Forma A para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enfermedad es enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), bronquitis crónica, bronquitis recurrente, bronquitis aguda, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis crónica, pancreatitis recurrente, y pancreatitis aguda, insuficiencia pancreática, infertilidad masculina causada por ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (ABCCD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática, enfermedad hepática, enfisema hereditario, cálculos biliares, enfermedad de reflujo gastroesofágico, neoplasias gastrointestinales, enfermedad inflamatoria del intestino, estreñimiento, diabetes, artritis, osteoporosis y osteopenia.
13. Forma A para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enfermedad es hemocromatosis hereditaria, deficiencias de la coagulación-fibrinólisis, tales como deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de Tipo 1, deficiencias en el procesamiento de lípidos, tales como hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia Tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento lisosómico, tales como la enfermedad de células 1/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glucanosis CDG tipo 1, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), DI central, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, parálisis supranuclear progresiva, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina tales como la enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, atrofia palidoluisiana dentatorubral y distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, tales como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob hereditaria (debido a un defecto en el procesamiento de las proteínas priónicas), enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker, síndrome de Gorham, canalopatías de cloruro, miotonía congénita (formas de Thomson y Becker), síndrome de Bartter de tipo III, enfermedad de Dent, epilepsia, hiperekplexia, enfermedades de almacenamiento lisosómico, síndrome de Angelman, discinesia ciliar primaria (DCP), DCP con situs inversus (también conocido como síndrome de Kartagener), DCP sin situs inversus y aplasia ciliar, o la enfermedad de Sjögren.
14. Un kit para su uso en la medición de la actividad del CFTR o de uno de sus fragmentos en una muestra biológica *in vitro* o *in vivo*, que comprende:

- (i) una composición que comprende la Forma A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3;
- (ii) instrucciones para:

- a) poner en contacto la composición con la muestra biológica; y
- b) medir la actividad de dicho CFTR o de uno de sus fragmentos.

5 15. El kit de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende además instrucciones para:

- a) poner en contacto un compuesto adicional con la muestra biológica;
- b) medir la actividad de dicho CFTR o de uno de sus fragmentos en presencia de dicho compuesto adicional; y
- c) comparar la actividad del CFTR o de uno de sus fragmentos en presencia del compuesto adicional con la actividad del CFTR o de uno de sus fragmentos en presencia de la Forma A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

10

16. El kit de la reivindicación 15, en el que la etapa de comparar la actividad de dicho CFTR o de uno de sus fragmentos proporciona una medida de la densidad de dicho CFTR o de uno de sus fragmentos.

17. Un procedimiento *in vitro* para modular la actividad del CFTR en una muestra biológica que comprende la etapa de poner en contacto dicho CFTR con la Forma A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

15 18. Forma A de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene las siguientes dimensiones de la celda unitaria:

- a = 19,2 Å;
- b = 19,2 Å, y
- c = 33,7 Å.

20 19. Una forma cristalina de la N-(4-(7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)-2-(trifluorometil)fenil)-4-oxo-5-(trifluorometil)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida que tiene un sistema cristalino trigonal, un grupo espacial R-3 y las siguientes dimensiones de la celda unitaria:

25

- a = 19,2 Å;
- b = 19,2 Å;
- c = 33,7 Å;
- a = 90°;
- β = 90°, y
- γ = 120°.

Figura 1

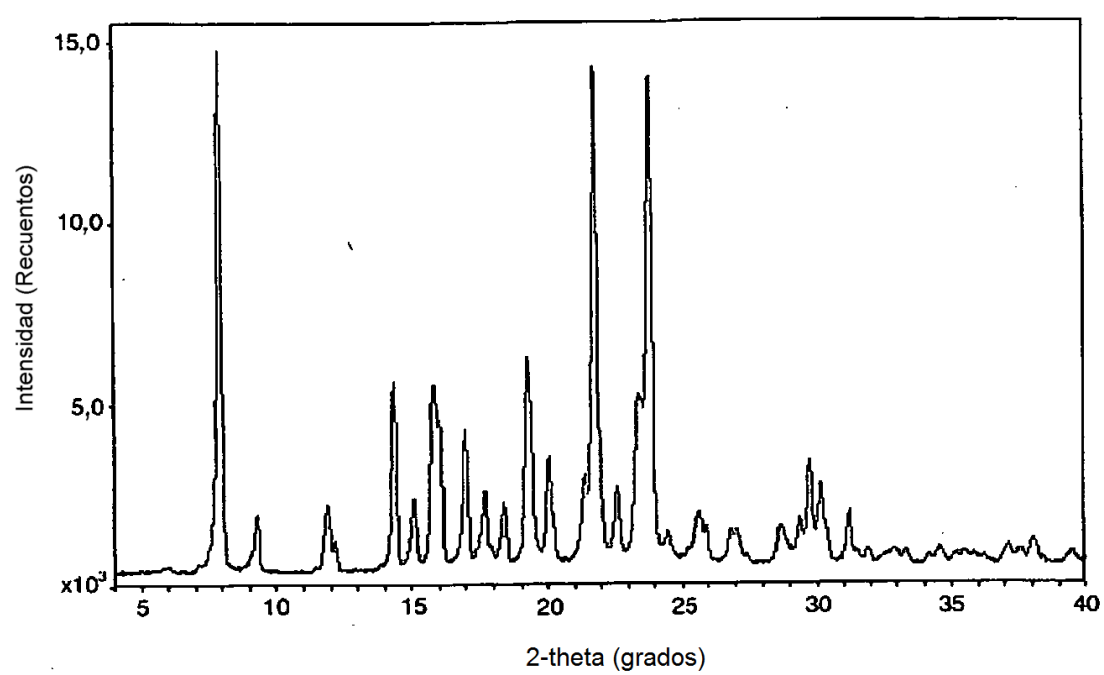


Figura 2

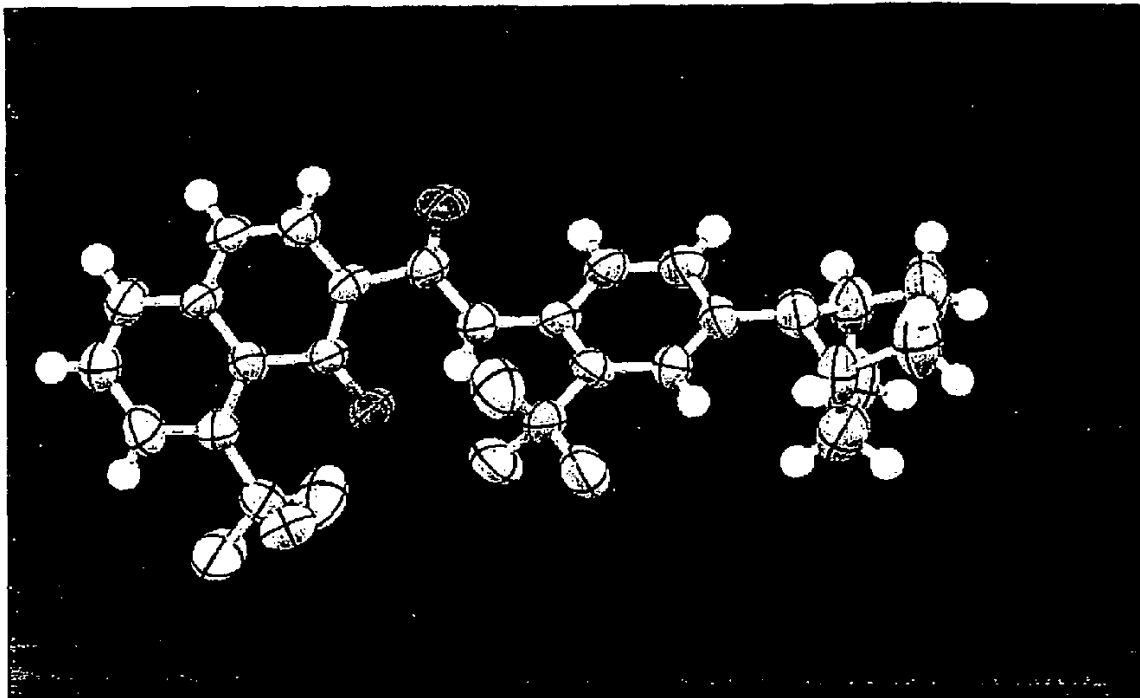
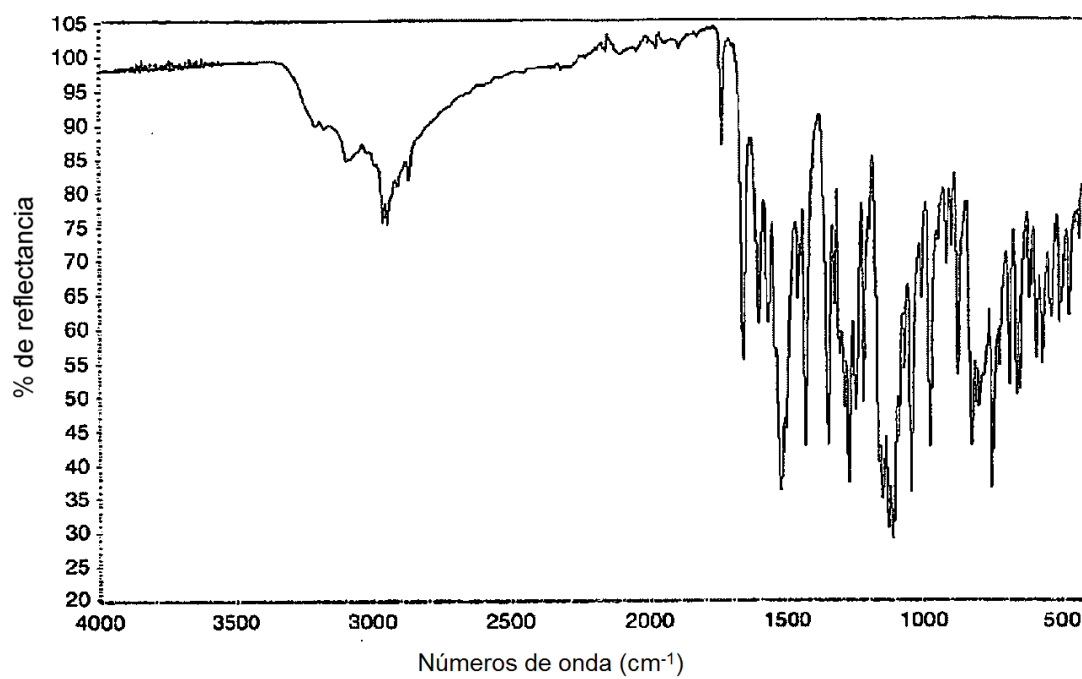


Figura 3



KALAMAZOO.44192.1