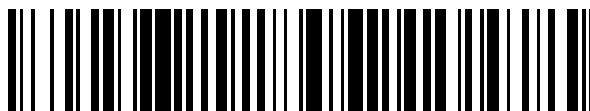


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 833**

51 Int. Cl.:

C07D 239/46 (2006.01)

C07D 239/47 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.10.2006 E 06825836 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 1948620**

54 Título: **Sal de dihidrógeno-fosfato de un antagonista del receptor D2 de prostaglandina.**

30 Prioridad:

13.10.2005 US 726290 P

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

28.06.2013

73 Titular/es:

**AVENTIS PHARMACEUTICALS INC. (100.0%)
300 SOMERSET CORPORATE BOULEVARD
BRIDGEWATER, NEW JERSEY 08807-, US**

72 Inventor/es:

**LANGVIN, BEVERLY;
ORTON, EDWARD y
SHERER, DANIEL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 409 833 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

Sal de dihidrógeno-fosfato de un antagonista del receptor D2 de prostaglandina.

Campo de la invención

5 La fabricación a gran escala de una composición farmacéutica puede plantear muchos retos al químico y al ingeniero químico. Aunque muchos de estos retos se refieren al manejo de grandes cantidades de reactivos y al control de reacciones a gran escala, el manejo del producto final plantea retos especiales asociados a la naturaleza del propio producto activo final. No solamente debe el producto ser preparado con un rendimiento elevado, ser estable y capaz de un fácil aislamiento, sino que el producto debe poseer propiedades que sean adecuadas para los tipos de preparaciones farmacéuticas en las que probablemente va a ser finalmente usado. La estabilidad del ingrediente activo de la preparación farmacéutica debe ser considerada durante cada etapa del procedimiento de fabricación, que incluye la síntesis, aislamiento, almacenamiento masivo, formulación farmacéutica y formulación a largo plazo. Cada una de estas etapas puede verse afectada por diversas condiciones medioambientales de temperatura y humedad.

15 La sustancia farmacéuticamente activa usada para preparar las composiciones farmacéuticas debe ser tan pura como sea posible y su estabilidad química en almacenamiento a largo plazo debe estar garantizada bajo diversas condiciones medioambientales. Esto es absolutamente esencial para evitar la aparición de productos de degradación no deseables en composiciones farmacéuticas. Estos productos de degradación pueden ser potencialmente tóxicos o dar lugar a simplemente a una reducción de la potencia de la composición.

20 Una preocupación principal para la fabricación a gran escala de compuestos farmacéuticos es que la sustancia activa debe mantener una estabilidad polimórfica durante su manejo para asegurar parámetros de tratamiento congruentes y calidad farmacéutica. Dependiendo de las características de estabilidad de un compuesto farmacéutico, puede ser sometido a experimentar cambios durante la fabricación y/o el almacenamiento, dando lugar potencialmente a problemas de control de calidad y aspectos de la formulación. Este cambio puede afectar al carácter reproducible del procedimiento de fabricación y, por tanto conducir a formulaciones finales que no cumplan los requisitos de alta calidad y de rigurosidad dispuestos por las agencias reguladoras sobre las formulaciones de composiciones farmacéuticas. Teniendo en cuenta lo que antecede, se debe considerar generalmente que al menos la selección de un compuesto farmacéutico que tenga características de estabilidad física mejorada puede proporcionar ventajas significativas sobre las formas menos estables del mismo compuesto.

30 La presente invención se dirige a la sal de dihidrógeno-fosfato de un antagonista de receptor D2 de prostaglandina farmacológicamente activo que tiene propiedades físicas altamente preferidas. El compuesto es útil como un antagonista D2 para tratar un paciente que padece o está sometido a estados (enfermedades) patológicos mediados por PGD2 que incluyen, pero sin limitación enfermedad alérgica (como rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial y alergia a alimentos), mastocitosis sistémica, trastornos acompañados de activación sistémica de mastocitos, choque anafiláctico, broncoconstricción, bronquitis, urticaria, eccema, enfermedades acompañadas de picores, (como dermatitis atópica y urticaria), enfermedades como cataratas, desprendimiento de retina, inflamación, infección y trastornos del sueño) que son generadas secundariamente como consecuencia del comportamiento acompañado de picor (como rasguños y picaduras), inflamación, inflamaciones de obstrucción pulmonar crónica, herida de reperfusión isquémica, accidente cardiovascular, artritis reumatoide crónica, pleuresía, colitis ulcerativa y similares.

40 Antecedentes de la invención

La estimulación de alergia local en pacientes con rinitis alérgica, asma bronquial, conjuntivitis alérgica y dermatitis atópica se ha mostrado que da lugar a una rápida elevación de los niveles de prostaglandina D2 "(PGD2)" en los fluidos de emanaciones nasales y bronquiales, lágrimas y fluidos de la cámara cutánea. La PGD2 tiene muchas acciones inflamatorias, como aumentar la permeabilidad vascular en el tejido conjuntivo y la piel, aumento de la resistencia de las vías aéreas nasales, estrechamiento de las vías aéreas e infiltración de eosinófilos en el tejido conjuntivo y la tráquea.

50 La PGD2 es un producto de ciclo-oxigenasa principal de ácido araquidónico producido a partir de mastocitos en tras una estimulación inmunológica [Lewis, RA, Soter NA, Diamond PT, Austen KF, Oates JA, Roberts LJ II, Prostaglandin D2 generation after activation of rat and human mast cells with anti-IgE, J. Immunol. 129, 1627-1631, 1982]. Los mastocitos activados, una fuente principal de PGD2, son uno de los factores claves para controlar la

respuesta alérgica en estados como asma, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis alérgica y otras enfermedades [Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, Wardlaw AJ, New Insights into the role of the mast cell in asthma, Clin. Exp. Allergy 33, 550-556, 2003].

5 Muchas de las acciones de la PGD2 están mediadas a través de su acción sobre el receptor de prostaglandina de tipo D ("DP"), un receptor acoplado a proteína G expresado en el epitelio y músculos lisos. En el asma, el epitelio respiratorio ha sido reconocido hace tiempo como una fuente clave de citoquinas inflamatorias y quimioquinas que controlan el progreso de la enfermedad [Holgate S, Lackie P, Wilson S, Roche W, Davies D, Bronchial Epithelium as a Key Regulator of Airway Allergen Sensitization and Remodelling in Asthma, Am J Respir CrU Care Med. 162, 113-117, 2000]. En un modelo experimental de ratón de asma, el receptor de DP está enormemente sobrerregulado en el epitelio de las vías aéreas tras una estimulación con antígeno [Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Ushikubi F, Aze Y, Eguchi N, Urade Y, Yoshida N, Kimura K, Mizoguchi A, Honda Y, Nagai H, Narumiya S, prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma, Science 287, 2013-2017, 2000]. En ratones con el sistema inmunológico inactivado, que carecen del receptor de DP, hay una reducción considerable en la hiperactividad de las vías aéreas y la inflamación crónica, dos de las características cardinales del asma humano [Matsuoka T, Hirata M, Tanaka H, Takahashi Y, Murata T, Kabashima K, Sugimoto Y, Kobayashi T, Ushikubi F, Aze Y, Eguchi N, Urade Y, Yoshida N, Kimura K, Mizoguchi A, Honda Y, Nagai H, Narumiya S, Prostaglandin D2 as a mediator of allergic asthma, Science 287, 2013-2017, 2000].

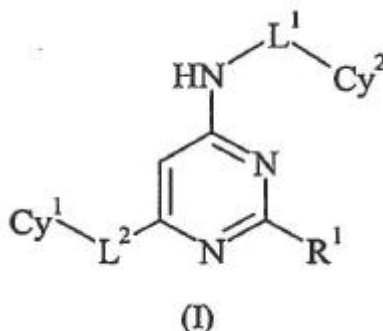
20 El receptor de DP se cree también que está involucrado en la rinitis alérgica humana, una enfermedad alérgica frecuente que se caracteriza por los síntomas de estornudos, picores, rinorrea y congestión nasal. La administración local de PGD2 a la nariz provoca un aumento dependiente de la dosis de la congestión nasal [Doyle WJ, Boehm S, Skoner DP, Physiologic responses to intranasal dose-response challenges with histamine, methacholine, bradykinin, and prostaglandin in adult volunteers with and without nasal allergy, J Allergy Clin Immunol. 86(6 Pt 1), 924-35, 1990].

25 Los antagonistas del receptor de DP se ha mostrado que reducen la inflamación de las vías aéreas en un modelo de asma experimental con cobayas [Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, Ohtani M, Arita H, Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751, J Pharmacol Exp Ther. 298(2), 411-9, 2001]. Por lo tanto la PGD2 parece que actúa sobre el receptor de DP y desempeña una función importante en la activación de ciertas características claves del asma alérgico.

30 Los antagonistas de DP se ha mostrado que son eficaces para aliviar los síntomas de la rinitis alérgica en múltiples especies y, más específicamente, se ha mostrado que inhiben la congestión nasal inducida por antígenos, el síntoma más manifiesto de la rinitis alérgica [Jones, T. R., Savoie, C, Robichaud, A., Sturino, C, Scheigetz, J., Lachance, N., Roy, B., Boyd, M., Abraham, W., Studies with a DP receptor antagonist in sheep and guinea pig models of allergic rhinitis, Am. J. Resp. Crit. Care Med. 167, A218, 2003; and Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, Ohtani M, Arita H, Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751. J. Pharmacol. Exp. Ther. 298(2), 411-9, 2001].

40 Los antagonistas de DP son también eficaces en modelos experimentales de conjuntivitis alérgicas y dermatitis alérgica [Arimura A, Yasui K, Kishino J, Asanuma F, Hasegawa H, Kakudo S, Ohtani M, Arita H, Prevention of allergic inflammation by a novel prostaglandin receptor antagonist, S-5751. J. Pharmacol. Exp. Ther. 298(2), 411-9, 2001; and Torisu K, Kobayashi K, Iwahashi M, Nakai Y, Onoda T, Nagase T, Sugimoto I, Okada Y, Matsumoto R, Nanbu F, Ohuchida S, Nakai H, Toda M, Discovery of a new class of potent, selective, and orally active prostaglandin D2 receptor antagonists, Bioorg. & Med. Chem. 12, 5361-5378, 2004].

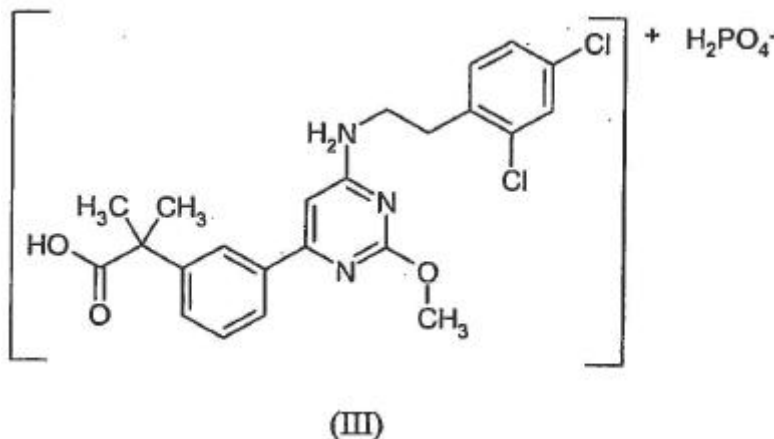
45 La solicitud de patente Wo 2006044732 (en lo sucesivo la publicación 732), incorporada como referencia a la presente memoria descriptiva describe pirimidinas que tienen propiedades farmacéuticas útiles que incluyen, en particular, la capacidad de asociarse y regular el receptor de DP. La publicación 732 describe pirimidinas de fórmula (I)



su preparación, composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y su uso farmacéutico en el tratamiento de estados de enfermedad capaces de ser modulados por la inhibición del receptor D2 de prostaglandina. Además, la publicación 732 describe y reivindica específicamente el ácido 2-(3-{6-[2-(2,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-metoxi-pirimidin-4-il]-fenil)-2-metil-propiónico (en lo sucesivo la "forma libre"). La publicación 732 proporciona también una descripción general de una amplia diversidad de sales por adición de ácidos y sales por adición de bases de compuestos según la invención y los ejemplos de trabajo escogidos limitados a la preparación de sales de ácido clorhídrico y sales de sodio. Más específicamente, sales de hidrocloruro y sales de sodio. Más específicamente, se describen la sal de hidrocloruro y la sal de sodio de ácido 2-(3-{6-[2-(2,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-metoxi-pirimidin-4-il]-fenil)-2-metil-propiónico. Sin embargo, la publicación 732 no describe específicamente una sal de hidrógeno-fosfato de ácido 2-(3-{6-[2-(2,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-metoxi-pirimidin-4-il]-fenil)-2-metil-propiónico.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige a la sal de dihidrógeno-fosfato de ácido 2-(3-{6-[2-(2,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-metoxi-pirimidin-4-il]-fenil)-2-metil-propiónico de fórmula (III) (en lo sucesivo "la sal de dihidrógeno-fosfato").



Otro aspecto de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de la sal de dihidrógeno-fosfato.

Otro aspecto de la presente invención es un método para tratar un paciente que padece un trastorno mediado por PGD2 que incluye, pero sin limitación, enfermedad alérgica (como rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial y alergia a alimentos), mastocitosis sistémica, trastornos acompañados de activación de mastocitos sistémica, choque anafiláctico, broncoconstricción, bronquitis, urticaria, eccema, enfermedades acompañadas de picor (como dermatitis atópica y urticaria), enfermedades (como cataratas, desprendimiento de retina, inflamación, infección y trastornos del sueño) que son generadas secundariamente como consecuencia de un comportamiento acompañado de picor (como raspaduras y picaduras), inflamación, enfermedades de obstrucción pulmonar crónica, herida de reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular, artritis reumatoide crónica, pleuresía, colitis ulcerativa y similares, administrando al paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de la sal de

dihidrógeno-fosfato de ácido 2-(3-{6-[2-(2,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-metoxi-pirimidin-4-il]-fenil)-2-metil-propiónico.

La presente invención se expone más en detalle por medio de las siguientes figuras y la descripción detallada que sigue.

Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 es un modelo de difracción de polvos por rayos X (XRPD) de la sal de dihidrógeno-fosfato.

La Figura es la correspondiente Tabla de separaciones d de XRPD y las intensidades relativas para el difractograma de rayos X de polvos en la Figura 1 de la sal de dihidrógeno-fosfato.

10 La Figura 3 es un termograma de un analizador gravimétrico colorímetro-térmico de exploración diferencial (DSC-TGA) de la sal de dihidrógeno-fosfato. Los datos de TGA muestran una pérdida total de peso de aproximadamente 0,4% desde temperatura ambiente hasta 175°C. La DSC contiene solamente la fusión de la fase cristalina. La descomposición de la molécula comienza a la temperatura de fusión.

La Figura 4 es un termograma de DSC de la sal de dihidrógeno-fosfato. La Fusión es el único acontecimiento térmico observado en el termograma que aparece a 219°C.

15 La Figura 5 es un gráfico isoterma de higroscopicidad de un analizador de absorción de vapor dinámico (DVS) de la sal de dihidrógeno-fosfato y la correspondiente tabla del perfil de absorción de agua. Los datos muestran una ganancia de peso durante la absorción de ~ 0,9% a 94% de humedad relativa (HR) con poca histéresis, sugiriendo una absorción de agua superficial escasamente unida.

20 La Figura 6 muestra los modelos de XRPD de la sal de dihidrógeno-fosfato antes y después de la DVS. La muestra se prepara y el análisis comienza dentro de los dos minutos de la separación de la DVS en el que se han dejado en reposo a 0% de HR durante ~ 12 horas. Los datos muestran pocos cambios en la intensidad y la separación d como resultado del experimento de DVS, indicando que no se produjeron cambios detectables en la estructura cristalina.

La Figura 7 muestra la fotomicrografía de la sal de dihidrógeno-fosfato. El conjunto consiste principalmente en partículas en forma de varillas y agujas de hasta 30 micrómetros de longitud.

25 La Figura 8 muestra fotomicrografías previas y posteriores a la trituración de la sal dihidrógeno-fosfato y la distribución cuantitativa del tamaño de partículas, mostrando una buena reducción del tamaño de partículas sin cambio en las propiedades fisicoquímicas. La fotomicrografía posterior a la trituración de la sal de dihidrógeno-fosfato muestra un material cristalino bien micronizado sin partículas de más de 10 micrómetros de longitud durante una búsqueda de ~30 campos a un aumento de 100 x. La distribución del tamaño de partículas de la sal de dihidrógeno-fosfato micronizada se determina que es una curva de modo único. La mediana $[x(50)]$ es de 2,0 micrómetros y un 0% de las partículas tienen 4,7 micrómetros o menos. El procedimiento de micronización reduce tanto la mediana (5,8 micrómetros con anterioridad) como el tamaño $x(90)$ (~16 micrómetros con anterioridad). Los valores de XRPD, es decir, intensidades picos, ubicación (separación d) y resolución de la sal de dihidrógeno-fosfato, antes y después de la micronización, son iguales.

30

35 La Figura 9 es una isoterma de higroscopicidad de DVS de la sal de dihidrógeno-fosfato después de la micronización que no muestra amorfización.

La Figura 10 muestra un espectro de infrarrojos de la transformada de Fourier (FT-IR) para la sal de dihidrógeno-fosfato y la correspondiente tabla de picos de FT-IR.

40 La Figura 11 muestra una superposición de los modelos de XRPD de dos preparaciones separadas, tanda 1 y tanda 2, de la sal de sodio. La tanda 1 de la sal de sodio es recristalizada en etanol:acetato de etilo. La Tanda 2 de la sal de sodio es recristalizada en metanol:acetato de etilo.

La Figura 12 muestra una superposición de los modelos de XRPD de dos preparaciones separadas, tanda 1 y tanda 2 de la sal de hidrócloruro recristalizada en acetona.

Descripción detallada de la invención

Definiciones y abreviaturas

Como se usaron con anterioridad, y en toda la descripción de la invención, las siguientes abreviaturas, salvo que se indique otra cosa debe entenderse que tienen los siguientes significados:

DMSO	Dimetil-sulfóxido
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
SPA	Ensayo de proximidad de centello
ATTC	Colección de cultivo de tipo americano
MEM	Medio esencial mínimo
FBS	Suero bovino Fetal
CPM	Recuentos por minuto

- 5 Como se expuso anteriormente, y en toda la descripción de la invención, los siguientes términos, salvo que se indique otra cosa, debe entenderse que tienen los siguientes significados.

10 “Tratar” o “Tratamiento” significa prevención, alivio parcial o curación de la enfermedad. El compuesto y la composición de esta invención son útiles para tratar un trastorno mediado por PGD2 que incluye pero sin limitación una enfermedad alérgica como rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial y alergia a alimentos), mastocitosis sistémica, trastornos acompañados de activación de mastocitos sistémica, choque anafiláctico, bronconstricción, bronquitis, urticaria, eccema, enfermedades acompañadas de picor (como dermatitis atópica y urticaria), enfermedades como cataratas, desprendimiento de retina, inflamación, infección y trastornos del sueño) que son generadas secundariamente como resultado de un comportamiento acompañado de picores (como raspaduras y picaduras), inflamación, enfermedades de obstrucción pulmonar crónica, lesión de 15 reperusión isquémica, accidente cerebrovascular, artritis reumatoide crónica, pleuresía, colitis ulcerativa y similares, administrando a dicho paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto de fórmula (III).

“Paciente” incluye seres humanos y otros mamíferos.

“Cantidad farmacéuticamente eficaz” está destinada a describir una cantidad de un compuesto, composición, medicamento u otro ingrediente activo eficaz para producir el efecto terapéutico deseado.

- 20 Realizaciones particulares de la invención

Una realización particular de la invención es un compuesto de fórmula de (III) en una forma cristalina.

El compuesto de la invención exhibe una actividad antagonista de reflector D2 de prostaglandina y es un agente de actuación farmacológica útil. Consecuentemente, es incorporado en composiciones farmacéuticas y usado en el tratamiento de pacientes que padecen ciertos trastornos médicos.

- 25 El compuesto de la invención es un antagonista del receptor D2 de prostaglandina, según ensayos descritos en la bibliografía y descritos en la sección de ensayos farmacológicos con posterioridad, y los resultados de estos ensayos se cree que se correlacionan con una actividad farmacológica en seres humanos y otros mamíferos. Por tanto, en una realización adicional, la presente invención proporciona el compuesto de la invención y composiciones que contienen el compuesto de la invención para ser usados en el tratamiento de un paciente que padece o está 30 sometido a estados que pueden ser mejorados mediante la administración de un antagonista de PGD2. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención podría ser útil por lo tanto en el tratamiento de una diversidad de trastornos mediados por PGD2 que incluyen, pero sin limitación una enfermedad alérgica (como rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica, asma bronquial y alergia a alimentos) mastocitosis sistémica, trastornos acompañados

- de una activación de mastocitos sistémica, choque anafiláctico, broncoconstricción, bronquitis, urticaria, eccema, enfermedades acompañadas de picores (como dermatitis atópica y urticaria), enfermedades (como cataratas, desprendimiento de retina, inflamación, infección y trastornos de sueño) que son generadas secundariamente como resultado de un comportamiento acompañado de picores (como raspaduras y picaduras), inflamación, enfermedades de obstrucción pulmonar crónica, herida de reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular, artritis reumatoide crónica, pleuresía, colitis ulcerativa y similares.
- 5 Una realización particular de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de rinitis alérgica.
- Otra realización particular de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de asma bronquial.
- Otra realización particular de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de COPD.
- 10 Otra realización particular de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de conjuntivitis alérgica.
- Otra realización particular de los métodos terapéuticos de la presente invención es el tratamiento de dermatitis alérgica.
- 15 Las referencias de la presente memoria descriptiva a un tratamiento debe entenderse que incluyen una terapia profiláctica así como el tratamiento de los estados establecidos.
- El compuesto de la presente invención es útil adicionalmente en tratamientos que incluyen una terapia de combinación con al menos uno de:
- (i) antihistaminas como fexofenadina, desloratadina, loratadina y citiricina, para el tratamiento de rinitis alérgica;
- (ii) antagonistas de leucotrieno como montelukast y zafirlukast, para el tratamiento de rinitis alérgica, COPD, dermatitis alérgica, conjuntivitis alérgica, etc, se debe hacer referencia específicamente a las reivindicaciones del documento WO 01/78697 a 2;
- (iii) agonistas beta, como albuterol, salbuterol y perbutalina, para el tratamiento del asma, COPD, dermatitis alérgica, conjuntivitis alérgica, etc;
- (iv) antihistaminas como fexofenadina, loratadina y citiricina, para el tratamiento del asma, COPD, dermatitis alérgica, conjuntivitis alérgica, etc;
- 25 (v) inhibidores de PDE4 (fosfodiesterasa 4), como roflumilast y cilomilast, para el tratamiento del asma, COPD, dermatitis alérgica, conjuntivitis alérgica, etc., o
- (vi) con TP (receptor A2 de tromboxano) o antagonistas de CrTh2 (molécula homóloga receptora quimiotáctica expresada en células Th2) como ramatrobran (BAY-u3405), para el tratamiento de COPD, dermatitis alérgica, conjuntivitis alérgica, etc.
- 30 La presente invención incluye también dentro de su alcance una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto de la invención mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 En la práctica, el compuesto de la presente invención puede ser administrado en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable para seres humanos y otros mamíferos mediante una administración tópica o sistémica, que incluye la oral, inhalatoria, rectal, nasal, bucal, sublingual, vaginal, colónica, parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intratecal y epidural), intracisternal e intraperitoneal. Se apreciará que la vía particular puede variar, por ejemplo, con el estado fisiológico del receptor.
- 40 "Formas de dosificación farmacéuticamente aceptables" se refieren a formas de dosificación del compuesto de la invención e incluyen, por ejemplo, comprimidos, grageas, polvos, elixires, jarabes, preparaciones líquidas que incluyen suspensiones, pulverizaciones, comprimidos inhaladores, pastillas, emulsiones, soluciones, gránulos, cápsulas y supositorios así como preparaciones líquidas para inyecciones que incluyen preparaciones de liposomas. Las técnicas y formulaciones se pueden encontrar generalmente en la publicación Remington's Pharmaceutical

Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

Un aspecto particular de la invención proporciona el compuesto de la invención para ser administrado en la forma de una composición farmacéutica.

5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen al menos un componente seleccionado entre el grupo que comprende vehículos farmacéuticamente aceptables, diluyentes, revestimientos, adyuvantes, excipientes o materiales portadores como agentes conservantes, materiales de carga, agentes disgregantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes estabilizantes de emulsión, agentes suspensores, agentes isotónicos, agentes edulcorantes, agentes para dar sabores, agentes perfumantes, agentes colorantes, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos, otros agentes terapéuticos, agentes lubricantes, agentes retardantes o favorecedores de la adsorción, y agentes de suministro, dependiendo de la naturaleza del modo de administración y las formas de dosificación.

Ejemplos de agentes suspensores incluyen alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietileno-sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias.

15 Ejemplos de agentes antibacterianos y antifúngicos para la prevención de la acción de microorganismos incluyen parabenes, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares.

Ejemplos de agentes isotónicos incluyen azúcares, cloruro de sodio y similares.

Ejemplos de agentes retardantes de la adsorción para prolongar la adsorción a la combinación incluyen monoestearato de aluminio y gelatina.

20 Ejemplos de agentes favorecedores de la adsorción para mejorar la absorción incluyen dimetil-sulfóxido y análogos relacionados.

25 Ejemplos de diluyentes, disolventes, vehículos, agentes solubilizantes, emulsionantes y estabilizadores de la emulsión incluyen agua, cloroformo, sacarosa, etanol, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcoholbencílico, alcohol tetrahidrofurfurílico, benzoato de bencilo, polioles, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, glicerol, polietilenglicoles, dimetilformamida, Tween® 60, Span® 60, alcohol fetoestearílico, alcoholmiristílico, mono-estearato de glicerilo y lauril-sulfato de sodio, ésteres de ácidos grasos de sorbitán, aceites vegetales (como aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de risino y aceite de sésamo) y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo y similares, o mezclas adecuadas de estas sustancias.

Ejemplos de excipientes incluyen lactosa, azúcar de leche, citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de dicalcio.

30 Ejemplos de agentes disgregantes incluyen almidón, ácidos algínicos y ciertos silicatos compuestos.

Ejemplos de lubricantes incluyen estearato de magnesio, lauril-sulfato de sodio, talco, así como polietilenglicoles de peso molecular elevado.

35 La elección de un vehículo farmacéutico aceptable está determinada generalmente de acuerdo con las propiedades químicas del compuesto activo como la solubilidad, el modo particular de administración y las provisiones que deben ser observadas en la práctica farmacéutica.

40 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para una administración oral se pueden presentar en unidades discretas como una forma de dosificación sólida como capsulas, sellos o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo o como un polvo o gránulos; como una forma de dosificación líquida como una solución o suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo se puede presentar también como un bolo, electuario o pasta.

45 Una "forma de dosificación sólida" significa que la forma de dosificación del compuesto de la invención está en forma sólida, por ejemplo, cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, grajeas o gránulos. En estas formas de dosificación sólidas, el compuesto de la invención se mezcla con al menos un excipiente (o vehículo) habitual inerte como citrato de sodio o fosfato de dicalcio o: (a) materiales de carga o aditivos como, por ejemplo, almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, (b) aglutinantes, como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina,

5 polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábica, (c) humectantes como, por ejemplo, glicerol, (d) agentes disgregantes como, por ejemplo agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos complejos y carbonato de sodio (e) retardantes de solución, por ejemplo parafina, (f) aceleradores de la absorción como, por ejemplo, compuestos de amonio cuaternario, (g) agentes humectantes como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, (h) adsorbentes como, por ejemplo caolín y bentonita, (i) lubricantes como, por ejemplo, talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril-sulfato de sodio, (j) agentes de opacidad (k) agentes tamponantes y agentes que liberen el compuesto de la invención en una cierta parte del tracto intestinal de una manera retardada.

10 Un comprimido se puede preparar mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos por compresión pueden ser preparados comprimiendo en una máquina adecuada el ingrediente activo en una forma de flujo libre como un polvo o gránulos, opcionalmente mezclados con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, agente tensioactivo o dispersante. Pueden ser combinados excipientes como lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato de dicalcio y agentes disgregantes como almidón, ácido alginicos y ciertos silicatos complejos combinados con lubricantes como estearato de magnesio, lauril-sulfato de sodio y talco. Una mezcla de los compuestos en polvo humedecidos con un diluyente líquido inerte puede ser moldeada en una máquina adecuada para preparar comprimidos moldeados. Los comprimidos pueden ser opcionalmente revestidos o marcados y pueden ser formulados con el fin de proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en los mismos.

15 Pueden ser empleadas también composiciones sólidas como materiales de carga en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes como lactosa o azúcar de leche como polietilenglicoles de peso molecular elevado y similares.

20 Si se desea, y para una distribución más eficaz, el compuesto puede ser microencapsulado en sistemas de suministros de liberación lenta o dirigida a diana, o unido a los mismos, como matrices polímeras biodegradable y biocompatibles (por ejemplo, poli(d,l-láctido-co-glicólido)), liposomas y microesferas y por vía subcutánea o intramuscular inyectado mediante una técnica denominada depósito subcutánea o intramuscular para proporcionar una liberación lenta continua del (o de los) compuesto(s) durante un período de dos semanas o más. Los compuestos pueden ser esterilizados, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias o incorporando agentes esterilizantes en la forma de composiciones sólidas esterilizadas que pueden ser disueltas en agua esterilizada o algún otro medio inyectable esterilizado inmediatamente antes de su uso.

25 “forma de dosificación líquida” significa que la dosis del compuesto activo que va a ser administrado al paciente está en forma líquida, por ejemplo, emulsiones soluciones, suspensiones farmacéuticamente aceptables, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del compuesto activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica como disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes.

30 Cuando son usadas suspensiones acuosas, pueden contener agentes emulsionantes o agentes que faciliten la suspensión.

35 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para una administración tópica significa que las formulaciones están en una forma adecuada para ser administrada por vía tópica a un paciente. La formulación puede ser presentada como un ungüento tópico, pomadas, polvos, pulverizaciones e inhaladores, geles (basados en agua o alcohol), cremas, como es generalmente conocido en la técnica, o ser incorporadas en una base de matriz para una aplicación en un parche, que podría permitir una liberación controlada del compuesto a través de la barrera transdermal. Cuando se formulan en un ungüento, los ingredientes activos pueden ser empleados con una base de ungüentos parafínica o miscible con agua. Alternativamente, los ingredientes activos pueden ser formulados en una crema con una base para cremas de aceite en agua. Las formulaciones adecuadas para una administración tópica en los ojos incluyen gotas oculares en las que el ingrediente activo es disuelto o puesto en suspensión en un vehículo adecuado, especialmente un disolvente acuoso para el ingrediente activo. Las formulaciones adecuadas para una administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base con sabor, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte como gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábica y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

40 La fase aceitosa de la composición farmacéutica en emulsión puede estar constituida a partir de ingredientes conocidos, de una manera conocida. Aunque la fase puede comprender meramente un emulsionante (conocido también como emulgente) deseablemente comprende una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con ambos de una grasa y un aceite. En una realización particular, un emulsionante hidrófilo es incluido

conjuntamente con un emulsionante lipófilo para que actúe como estabilizador. Conjuntamente, el (o los) emulsionante(s) con o sin estabilizador(es) constituye la crema emulsionante(s) y conjuntamente con el aceite y la grasa constituye la base de ungüento emulsionante que forma la fase dispersada aceitosa de las formulaciones de cremas.

- 5 Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir, por ejemplo al menos 30% p/p de un alcohol polihidroxilado, es decir, un alcohol que tiene dos o más grupos hidroxilos como propilenglicol, butano-1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluido PEG 400) y sus mezclas. Las formulaciones tópicas pueden incluir deseablemente un compuesto que mejore la absorción o la penetración del ingrediente activo a través de la piel, u otras zonas afectadas.
- 10 La elección de aceites o grasas adecuados para una composición está basada en conseguir las propiedades deseadas. Por tanto, una crema debe ser particularmente un producto no graso, que no manche y lavable con una consistencia adecuada para evitar pérdidas de los tubos u otros recipientes. Pueden ser usados ésteres alquílicos mono- o di-básicos de cadena lineal o ramificada como miristato de diisopropilo, oleato de decilo, palmitato de isopropilo, estearato de butilo, palmitato de 2-etilhexilo o una combinación de ésteres ramificados conocidos como Crodamol CAP. Estos pueden ser usados solos o en combinación dependiendo de las propiedades necesarias. Alternativamente, pueden ser usados lípidos de punto de fusión elevado como parafina blanda blanca y/o parafina líquida u otros aceites minerales.
- 15

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administraciones rectales o vaginales significan formulaciones que están en una forma adecuada para ser administrada por vía rectal o vaginal a un paciente y que contienen al menos un compuesto de la invención. Los supositorios son una forma particular de estas formulaciones que pueden ser preparados mezclando los compuestos de esta invención con excipientes o vehículos adecuados no irritantes como manteca de cacao, polietilenglicol o cera para supositorios, que son sólidos a temperaturas ordinarias pero líquidos a la temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el cavidad del recto o la vagina y liberan el componente activo.

20

25 La composición farmacéutica administrada por inyección puede ser una inyección intermuscular, intravenosa, intraperitoneal y/o subcutánea. Las composiciones de la presente invención se formulan en soluciones líquidas, en particular en tampones fisiológicamente compatibles como solución de Hank o solución de Ringer. Además, las composiciones pueden ser formuladas en formas sólidas y vueltas a disolver puestas en suspensión inmediatamente antes de su uso. Están incluidas también las formas liofilizadas. Las formulaciones están esterilizadas e incluyen emulsiones, suspensiones, soluciones para inyección acuosas y no acuosas, que pueden contener agentes suspensores y agentes espesantes y antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hagan la formulación isotónica y que tengan un pH adecuadamente ajustado con la sangre del receptor previsto.

30

La composición farmacéutica de la presente invención adecuada para una administración nasal o por inhalación significa composiciones que están en una forma adecuada para ser administradas por vía nasal o por inhalación por un paciente. La composición puede contener un vehículo, en una forma de polvo, que tenga un tamaño de partículas, por ejemplo, en el intervalo de 1 a 500 micrómetros (incluidos tamaños de partículas en un intervalo entre 20 y 500 micrómetros en aumentos de 5 micrómetros como 30 micrómetros, 35 micrómetros, etc.). Las composiciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido para una administración, por ejemplo, una pulverización nasal o como gotas nasales incluyen soluciones acuosas o aceitosas del ingrediente activo. Las composiciones adecuadas para una administración por aerosol pueden ser preparadas según métodos convencionales y pueden ser suministradas con otros agentes terapéuticos. La terapia de inhalación es fácilmente administrada mediante inhaladores de dosis medidas o cualquier inhalador de polvos secos adecuados, como los dispositivos Eclipse, Spinhaler®; o Ultrahale® como se describe en la solicitud de patente W02004/026380, y en la patente de EE.UU. nº 5.176.132.

35

40

45 Los niveles de dosificaciones reales de ingrediente (s) activo(s) en las composiciones de la invención pueden ser variados con el fin de obtener una cantidad de ingrediente(s) activo(s) que sea(n) eficaz para obtener una respuesta terapéutica deseada para una composición y un método de administración particulares para un paciente. Un nivel de dosificación seleccionado para cualquier paciente particular depende por lo tanto de una diversidad de factores que incluyen el efecto terapéutico deseado, la vía de administración, la duración deseada del tratamiento, la etiología y la gravedad de la enfermedad, el estado del paciente, peso, sexo, dieta y edad, el tipo y la potencia de cada ingrediente activo, velocidades de absorción, metabolismo y excreción y otros factores.

50

La dosis diaria del compuesto de esta invención, administrado a un paciente en dosis única o divididas, puede estar en cantidades, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal al día y, particularmente, 0,01 a 10 mg/kg/día. Por ejemplo, en un adulto, las dosis son generalmente de aproximadamente

- 0,01 a aproximadamente 100, particularmente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día mediante inhalación de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100, particularmente 0,1 a 70, más especialmente 0,5 a 10 mg/kg de peso corporal mediante administración oral y de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50, particularmente 0,01 a 10 mg/kg de peso corporal por día mediante administración intravenosa. El porcentaje de ingrediente activo en una composición se puede variar, aunque debe constituir una proporción tal que se obtenga una dosificación adecuada. Las composiciones de dosificaciones unitarias pueden contener cantidades como sus submúltiplos que pueden ser usadas para constituir la dosis diaria. Obviamente, pueden ser administradas varias formas de dosificación unitaria aproximadamente al mismo tiempo. Una dosificación puede ser administrada tan frecuentemente como sea necesario con el fin de obtener el efecto terapéutico deseado. Algunos pacientes pueden responder rápidamente a una dosis superior o inferior y pueden encontrar adecuadas dosis de mantenimiento muy inferiores. Para otros pacientes, puede ser necesario tener tratamientos a largo plazo a la velocidad de 1 a 10 dosis por día, de acuerdo con los requisitos fisiológicos de cada paciente particular. No hace falta decir que, para otros pacientes, será necesario recetar más de una o dos dosis por día.
- 15 Las formulaciones pueden ser preparadas en forma de dosificación unitaria mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Estos métodos incluyen la etapa de poner en asociación el ingrediente farmacéuticamente activo con el vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan llevando en asociación de forma uniforme e íntima el ingrediente activo con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos y seguidamente si es necesario se le da forma al producto.
- 20 Las formulaciones pueden ser presentadas en recipientes de dosis unitarias o dosis múltiples, por ejemplo, ampollas selladas y viales con tapones elastómeros y pueden ser almacenadas en un estado liofilizado que solo requiere la adición del vehículo líquido esterilizado, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden ser preparadas soluciones y suspensiones para inyecciones extemporáneas a partir de polvos esterilizados, gránulos y comprimidos del tipo anteriormente descritos.
- 25 El compuesto de la invención es analizado mediante los siguientes métodos analíticos.

Cromatografía líquida a presión elevada -espectrometría de masas (LCMS)

- Los experimentos de LCMS para determinar los tiempos de retención (R_T) y los iones de masas asociados se realizan usando el siguiente método. Los espectros de masas (MS) se registran usando un espectrómetro de masas Micromass LCT. El método es de ionización por electropulverización positiva, masa de exploración M/Z de 100 a 1.000. La cromatografía líquida se realiza en un dispositivo Hewlett Packard 1100 Series Binary Pump & Degasser; fase estacionaria: columna de 20 x 4,0 mm Synergi 2 μ Hidro-RP, fase móvil: A= ácido fórmico (FA) al 0,1 en agua, B= FA al 0,1% en acetonitrilo. Volumen de inyección de 5 μ l mediante un sistema PAL analítico de CTC. El caudal es de 1 ml/minuto. El gradiente es de 10% de B a 90% de B en 3 minutos y 90% de B a 100% de B en 2 minutos. Los detectores auxiliares son: detector UV Hewlett Packard 1100 Series UV, longitud de onda= 220 nm y detector Sedere SEDEX 75 Evaporative Light Scattering (ELS), temperatura = 46°C, presión de nitrógeno = 4 bares.
- 30
- 35

Espectros de resonancia magnética nuclear ^1H (RMN)

- Los ^1H RMN a 300 MHz se registran a temperatura ambiente usando un espectrómetro Varian Mercury (300 MHz) con una sonda de 5 mm ASW. En la RMN los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con relación a tetrametilcilano. Los desplazamientos químicos están indicados en partes por millón (ppm) con referencia a tetrametilsilano (TMS) como patrón interno.
- 40

Difractometría de polvos por rayos X (XRPD)

- La XRPD se realiza en un difractómetro Siemens-Broker D5000, usando la geometría de paraenfoque Bragg-Brentano (teta- dos -theta). La sal de dihidrógeno-fosfato es depositada en una lámina de silicio de cristal único, cortada según la orientación cristalográfica (510). La radiación K-alfa de cobre (1,54056 angstroms) que es emitida desde un tubo anticátodo de cobre (45 kV/40 mA) es usada como la fuente de rayos X, siendo filtrada la radiación K-beta de Cu usando un monocromador de haz reflejado. Se usa un contador de centelleo para la detección. Se usan una ranura de divergencia de 0,6 mm, una ranura de anti-dispersador de 0,6 mm, una ranura del monocromador de 0,1 mm y una ranura detectora de 0,6 mm. El modelo de difracción se obtiene usando las siguientes condiciones: exploración de 2 a 40° en ángulo 2-theta, tiempo de recuento de 1 segundo por etapa, tamaño de las etapas de 0,02°, bajo condiciones ambientales de presión, temperatura y humedad relativa.
- 45
- 50

Estado de solvatación/hidratación mediante análisis gravimétrico térmico

5 El análisis térmico se realiza usando un calorímetro de exploración diferencial simultánea TA Instruments Model Q-600/analizador gravimétrico térmico (DSC/TGA) bajo una atmósfera de nitrógeno. La temperatura del TGA es calibrada usando un patrón de indio. La sal de dihidrógeno-fosfato es transferida a una bandeja de aluminio (TA Instruments parte número 900793.901). El termograma se adquiere a una velocidad de calentamiento lineal de 10°C por minuto.

Calorimetría de exploración diferencial (DSC)

10 La DSC se realiza usando un dispositivo TA Instruments Model Q-1000 DSC equipado con un sistema de enfriamiento refrigerado bajo una atmósfera de nitrógeno. La DSC es calibrada usando un patrón de indio. La sal de dihidrógeno-fosfato es transferida a una bandeja de aluminio y una tapadera con orificios perforados con láser (TA Instruments partes números 900793.901 y 900860.901, respectivamente) es soldada en frío a la bandeja. El termograma de DSC es adquirido a una velocidad de calentamiento lineal de 10°C por minuto.

Fotomicrografía

15 Las fotomicrografías son adquiridas usando un microscopio, Olympus BX-41 equipado con polarizaciones cruzadas. La muestra se prepara dispersándola en aceite mineral.

Distribución de los tamaños de partículas

20 Las distribuciones de los tamaños de partículas se mide usando un analizador de tamaños de partículas por difracción láser Sympatec HELOS-BF con lentes de medición R3, suministrador en seco RODOS y láser fijado a 632,8 nm. El sistema es calibrado usando patrones de carburo de silicio. El polvo es dispersado usando la unión de dispersión seca RODOS con una presión primaria de 3,0 bares y se maximiza la depresión. La distribución de tamaños de partículas basada en volumen se calcula usando el método de Fraunhofer mediante el programa de ordenador Sympatec Windox (Versión 4.0).

Absorción de vapor de agua dinámica (DVS)

25 El perfil de absorción de agua se determina usando un analizador de absorción de vapor SMS Instruments Dynamic Vapor Sorption Analyzer Mode la DVS-1 o un analizador de absorción de vapor dinámico VTI Instruments Model SGA-100. La HR y el peso se calibraron usando patrones. La sal de dihidrógeno-fosfato es introducida y secada a \leq 1% de HR durante 2,5 horas antes de comenzar el experimento. La RH es escalonada desde aproximadamente 0 hasta 95% HR. El peso de la muestra se considera constante en cada etapa cuando el porcentaje de cambio de peso es de menos de 0,005% sobre un intervalo de 5 minutos con un tiempo de equilibrio absoluto mínimo de 15 minutos.

Transformada de Fourier-espectroscopía infrarrojos (FT-IR)

El espectro FT-IR se obtiene usando un espectrómetro Nicolet Magna-IR 55 unido a un microscopio Nicolet NicPlan FT-IR. Se analiza una muestra sólida en un disco de KBr. El espectro se obtiene después de 32 exploraciones a partir de 4.000-400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} .

35 La preparación y las propiedades del compuesto de la invención se describen en la siguiente sección experimental.

Ejemplo

Sal de dihidrógeno-fosfato de 2-(3-{6-[2-(2,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-metoxi-pirimidin-4-il]-fenil)-2-metil-propiónico

40 Etapa 1. Una solución de 4,6-dicloro-2-metoxipirimidina (0,7 g), 2,4-diclorofeniletilamina (0,82g) y bicarbonato de sodio (0,88 g) en etanol (825 ml) se calienta a 80°C durante tres horas y se vierte en agua (400 ml). El sólido resultante se filtra y se seca con aire para suministrar (6-cloro-2-metoxi-pirimidin-4-il)-[2-(2,4-diclorofenil)-etil]-amina.

Etapa 2. A una solución de diisopropilamida de litio en tetrahidrofurano/n-heptano/etilbenceno (1,8 M, 17 ml) a 0°C se añade una solución de ácido 2-(3-bromofenil)-propiónico (3g, 13,9 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) gota a gota durante 15 minutos. La mezcla se agita durante 1 hora, seguidamente se añade yoduro de metilo (4,93 g, 34,8

mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) gota a gota durante 10 minutos. La mezcla de reacción se agita durante 15 horas, se inactiva con HCl 2 N, se concentra a vacío y se diluye con éter (150 ml). La capa de éter se lava con HCl 2 N, se extrae tres veces con NaOH 2N (50 ml). Las capas combinadas de NaOH se acidifican con HCl 6 N a pH = 1 y se extraen tres veces con éter (75 ml). Las capas orgánicas combinadas se lavan con salmuera, se secan sobre sulfato de sodio y se concentran para obtener ácido 2-(3-bromofenil)-2-metil-propiónico en forma de un sólido (3,08 g, 91%), que se usa sin purificación adicional. LC/MS: 243 (M+H).

Etapa 3. Una solución de ácido 2-(3-bromofenil)-2-metil-propiónico (2,18 mmol) en éter anhidro (20 ml) es añadida a terc-butil-litio (1,7 M en pentano 5,4 ml, 9,16 mmol) gota a gota a -78°C y esta mezcla se agita durante 30 minutos y se trata con borato de tributilo (2,34 ml, 8,72 mmol). La mezcla de reacción se deja calentar a temperatura ambiente, se agita durante 15 horas, se diluye con éter y se inactiva con H₃PO₄ 1 M. Después de agitar durante 30 minutos, la capa de éter se separa y se extrae tres veces con NaOH 2N (20 ml). Los extractos de NaOH combinados se acidifican con HCl 6N a pH = 1 y se extraen tres veces con éter (50 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavan con salmuera, se secan sobre sulfato de sodio y se concentran para proporcionar ácido 3-(1-carboxi-1-metiletil)-fenil-borónico, que se usa sin purificación adicional. MS: 209 (M + H).

Etapa 4. Una solución de (6-cloro-2-metoxi-pirimidin-4-il)-[2-(2,4-diclorofenil)-etil]-amina (0,51 mmol) y ácido 3-(1-carboxi-1-metiletil)-fenil-borónico (0,61 mmol) en acetonitrilo (2,5 ml) y solución acuosa de bicarbonato de sodio (0,4 M, 2,5 ml) se desgasifica con nitrógeno durante 5 minutos antes de la adición de tetrakis-trifenilfosfina-paladio (0) (29,5 mg, 5% en moles). El recipiente de la reacción se sella y se calienta bajo microondas a 130°C durante 30 minutos. A la mezcla de reacción se añaden 2 ml de agua, el pH se ajusta a aproximadamente 7 usando HCl acuoso 2N y esta mezcla se extrae tres veces con acetato de etilo (30 ml). Los extractos combinados se lavan con salmuera, se secan sobre sulfato de sodio y se concentran. El residuo se somete a cromatografía de gel sobre sílice para proporcionar ácido 2-(3-{6-[2-(2,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-metoxi-pirimidin-4-il]-fenil}-2-metil-propiónico en forma de un sólido (205 mg, 75%). LC/MS: R_T=2,39 minutos, MS: 460 (M + H); ¹H RMN [300 MHz, (CD₃)₂SO]: δ 12,38 (1H, s), 7,36-8,00 (7H, m), 6,58 (1H, s), 3,84 (3H, s), 3,58 (2H, m), 2,98 (2H, m), 1,54 (6H, s).

Etapa 5. Se añade ácido fosfórico (3,21 ml), solución acuosa 1,49 N a una solución de ácido 2-(3-{6-[2-(2,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-metoxi-pirimidin-4-il]-fenil}-2-metil-propiónico (2,1 g, 4,56 mmol) en tetrahidrofurano (45 ml) y la mezcla se agita durante 10 minutos. Se añade agua gota a gota en intervalos hasta que la mezcla se convierte en una solución clara y se continúa la agitación durante 1,5 horas a temperatura ambiente. La mezcla se concentra a vacío y el residuo se recristaliza en acetona para proporcionar sal de dihidrógeno-fosfato de ácido 2-(3-{6-[2-(2,4-dicloro-fenil)-etilamino]-2-metoxi-pirimidin-4-il]-fenil}-2-metil-propiónico en forma de un polvo (2,4 g, 94%). LCMS: R_T= 2,41 minutos; MS: 462 (M + H); ¹H RMN [300 MHz, (CD₃SO)₂SO]: δ 7,95 (1H, b), 7,8 (1H, b), 7,6 (2H, b), 7,45 (2H, d, J=2Hz), 7,35 (2H, s), 6,55 (1H, s), 3,85 (3H, s), 3,55 (2H, b), 2,95 (2H, t, J=2Hz), 1,5 (6H, s).

Ensayo farmacológico

Los efectos inhibidores del compuesto según la invención se valoran en un ensayo funcional DP humano. Se emplea un ensayo de cAMP usando la línea celular humana LS174T que expresa el receptor de DP endógeno. El protocolo es análogo al anteriormente descrito (Wright DH, Ford- Hutchinson AW, Chadee K, Metters KM, The human prostanoid DP receptor stimulates mucin secretion in LS 174T cells, Br J Pharmacol. 131 (8): 1537-45 (2000)).

Protocolo para ensayo de SPA cAMP en células LS174T humanas

Materiales

- 40 • PGD2 (Cayman Chemical Cat nº12010)
- IBMX (Sigma Cat nº 5879)
- Sistema de ensayo de selección directa de cAMP SPA (Amersham code RPA 559)
- Placas de células de 96 pocillos (Wallac Cat Nº 1450-516)
- Contador de centelleo Wallac 1450 Microplate Trilux (perkinElmer)
- 45 • Selladores de placas

ES 2 409 833 T3

- Tubos Eppendorf
 - Solución salina tamponada fosfato de Dulbeco (PBS) (Invitrogen Cat nº14040-133)
 - Agua destilada
 - Dispositivo vorticial
- 5 • Agitador magnético y barras agitadoras

Preparación de reactivos:

Se debe permitir que todos los reactivos se equilibren a temperatura ambiente antes de la reconstitución.

Tampón de ensayo 1X

- 10 Se transfieren los contenidos de la botella a un cilindro graduado de 500 ml mediante lavado repetido con agua destilada. Se ajusta el volumen final hasta 500 ml con agua destilada y se mezcla a fondo.

Reactivo de Lisis 1 y 2

Se disuelven cada uno de los reactivos de lisis 1 y 2 en 200 ml de tampón del ensayo, respectivamente. Se deja a temperatura ambiente durante 20 minutos para disolver.

Gránulos anti-conejos de SPA

- 15 Se añaden 30 ml de tampón 2 de lisis a la botella. Se agita suavemente la botella durante 5 minutos.

Antisuero

Se añaden 15 ml de tampón 2 de lisis a cada vial y se mezcla suavemente hasta que el contenido se disuelve completamente.

Trazador (I^{125} -cAMP)

- 20 Se añaden 14 ml de tampón 2 de lisis a cada vial y se mezcla suavemente hasta que el contenido se disuelve completamente.

Preparación de inmuno-reactivo

1) se añaden volúmenes iguales de trazados, antisuero y reactivo anti-conejo de SPA a una botella asegurándose de que se prepara un volumen suficiente de esta mezcla para el número de pocillos deseado (150 μ l/pocillo.

- 25 2) se mezcla a fondo.

3) Esta solución de inmuno-reactivo debe estar recientemente preparada antes de cada ensayo y no ser reutilizada.

Patrón

1) se añade 1 ml de tampón 1 de lisis y se mezcla suavemente hasta que el contenido se disuelve completamente.

2) la solución final contiene cAMP a una concentración de 512 PMOL/ML.

- 30 3) Se marcan 7 tubos de polipropileno o poliestireno, 0,2 pmol, 0,4 pmol, 0,8 pmol, 1,6 pmol, 3,2 pmol, 6,4 pmol y 12,8 pmol.

4) se pipetea 500 μ l de tampón 1 de lisis en todos los tubos

ES 2 409 833 T3

5) En el tubo de 12,8 pmol se pipetea 500 μ l de patrón madre (512 pmol/ml) y se mezcla a fondo. Se transfieren 500 μ l del tubo de 12,8 pmol al tubo de 6,4 pmol y se mezcla a fondo. Se repite esta dilución duplicada sucesivamente con los tubos restantes.

5 6) partes alícuotas de 50 μ l por duplicado de cada dilución en serie y el patrón madre darán lugar a 8 niveles de patrones de cAMP que varían en el intervalo de 0,2-25,6 pmol de patrón.

Tampón de dilución del compuesto

Se añaden 50 μ l de IBMX 1mM a 100 ml de PBS para constituir una concentración final de 100 μ M y se somete a sonicación a 30°C durante 20 minutos.

Preparación de PGD2

10 Se disuelve 1 mg de PGD2 (FW, 352,5) en 284 μ l de DMSO para preparar solución madre 100 mM y se almacena a 20°C. Antes de cada ensayo, se prepara de forma reciente. Se añaden tres μ l de solución madre 10 mM a 20 ml de DMSO, se mezcla a fondo y se transfiere a 10 ml a 40 ml de PBS.

Dilución del compuesto

15 Varias tandas del compuesto de la invención son ensayadas en una placa de 96 pocillos. Cada tanda del compuesto ocupa una hilera de la placa de 96 pocillos.

La dilución del compuesto se lleva a cabo en un dispositivo Biomex 2000 (Beckman) usando el método 1 de cAMP DP de 11 puntos

20 Se transfieren 5 μ l de cada compuesto de las placas del compuesto madre 10 mM a los pocillos de la placa de 96 pocillos respectivamente como sigue.

ES 2 409 833 T3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1											
B	2											
C	3											
D	4											
E	5											
F	6											
G	7											
H	referencia											

Se rellena la placa con 45 µl de DMSO excepto que la columna 7 se rellena con 28 µl de DMSO. Se pipetea la columna 1 a fondo y se transfieren 12 µl a la columna 7 paralela. Se realiza una dilución en serie 1:10 desde la columna 1 a la columna 7 y desde la columna 7 hasta la columna 11 mediante transferencia de 5 µl a 45 µl de DMSO para constituir las siguientes concentraciones:

5

Primera placa	Concentración final
Columna 12	0
Columna 11	0,03 µM
Columna 10	0,3 µM
Columna 9	3 µM
Columna 8	0,03 µM
Columna 7	0,3 µM
Columna 6	0,01 µM
Columna 5	0,1 µM
Columna 4	1 µM
Columna 3	0,01 µM
Columna 2	0,1 µM
Columna 1	1 µM

Se rellena una nueva placa de 96 pocillos con 247,5 µl de tampón de dilución del compuesto. Se transfieren 2,5 µl de compuestos diluidos en serie de la placa anterior a la nueva placa (dilución 1:100) como sigue:

ES 2 409 833 T3

Primera placa	Segunda placa	Concentración final
Columna 12	Columna 1	0
Columna 11	Columna 2	0,1 nM
Columna 10	Columna 3	0,3 nM
Columna 9	Columna 4	1 nM
Columna 8	Columna 5	3 nM
Columna 7	Columna 6	0,01 μ M
Columna 6	Columna 7	0,03 μ M
Columna 5	Columna 8	0,1 μ M
Columna 4	Columna 9	0,3 μ M
Columna 3	Columna 10	1 μ M
Columna 2	Columna 11	3 μ M
Columna 1	Columna12	10 μ M

Crecimiento celular

1. Las LS174T se hacen crecer siempre en MEN (ATCC Cat nº 30-2003), 10% de FBS (ATCC cat nº 300-2020) y L-glutamina 2 mM adicional, a 37°C y 5% de CO₂.

5 2. Se calienta 0,05% de tripsina y versina (Invitrogen Cat nº 25300-054) a 37°C en un baño de agua.

3. Se separa medio de crecimiento de las células. Las células en el matraz T165 se lavan dos veces con 4 ml de tripsina seguido de incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 3 minutos.

Se añaden 10 ml de medio y se pipetea a fondo para separar las células y contar las células.

10 5. Se lleva la densidad celular a $2,25 \times 10^5$ célula/ml y se siembran 200 μ l de células/pocillo (45.000 células/pocillo) en placas de 96 pocillos un día antes del ensayo.

Procedimiento de ensayo

Día 1

Se siembran 45.000 células/pocillo en 200 μ l de medio en placas de p6 pocillos. Se incuba la placa celular a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante una noche.

15 Día 2

1. Se realiza la dilución del compuesto.

2. Se prepara tampón del ensayo, tampón 1 y 2 de lisis, PGD₂ y patrón.

3. Se aspiran los medios de las células y se añaden 100 μ l de solución del compuesto usando el protocolo de

Zymark Sciclone-ALH/FD de cAMP DP.

4. SE incuban las células 37° C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 15 minutos.

5. Se añaden 5 µl de PGD2 30 nM (20 X concentración final 15 nM) en cada pocillo usando protocolo de Zymark de cAMP DP PGD2 y se incuban las células a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad durante 15 minutos adicionales.

5 6. Se aspiran los medios de las células y se añaden 50 µl de tampón 1 de lisis usando el protocolo de Zymark de lisis de cAMP DP y se incuban a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos.

7. Se añaden 150 µl de inmuno-reactivo a todos los pocillos (un volumen total de 200 µl/pocillo)

8. Se sellan las placas y se agita durante dos minutos, se ponen en la cámara del contador de centelleo µ de la placa de microtitulación Wallac durante 16 horas.

10 Día 3

Se cuenta la cantidad de [¹²⁵I] cAMP durante 2 minutos en un contador de centelleo 1450 Trilux.

Tratamiento de datos

Ajuste de curva estándar de cAMP frente a CMP

Tabla 1. Datos de ensayo típico para patrón

15

cAMP (pmol/ml)	CPM		CPM medio
0,2	15725	15769	15530
0,4	15367	5259	6317
0,8	14695	14796	6507
1,6	14251	14178	6581
13,2	13434	13429	6601
6,4	12758	12716	6711
12,8	12094	12054	6680
25,6	1531	1573	6653

Las concentraciones de cAMP (pmol/ml) de las muestras desconocidas se calculan a partir de una curva estándar de % de inhibición de cAMP frente a CPM usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{pmol de testigo} - \text{pmol de muestra}) \times 100}{\text{pmol de testigo (células + PGD2 solo)}}$$

Resultados

20 La sal de dihidrógeno-fosfato produce una inhibición de 50% en el ensayo de SPA cAMP en células LS174 T

humanas a concentraciones 0,3 nanomolares.

5 La sal de dihidrofosfato tiene una solubilidad acuosa aumentada sobre la forma libre y la sal de hidrocloreuro. El siguiente gráfico recoge las solubilidades de la forma libre, la sal de hidrocloreuro y la sal de dihidrógeno-fosfato a 25°C en tampón de fosfato (PBS pH 7,4, una mezcla de 19% de una solución de fosfato de sodio monobásico 0,1 M y 81% de una solución de fosfato de sodio dibásico 0,1 M) y las solubilidades de la forma libre y la sal de dihidrógeno-fosfato a 37°C en un fluido intestinal simulado bajo condiciones de ayunas ("FaSSiF", preparado según Dressman J.B., Amidon G.L., Reppas C. and Shah V.P., Dissolution ensayando como una herramienta de pronóstico para la absorción oral de fármaco: formas de dosificación de liberación inmediata, Pharmaceutical Research: 1998, Vol. 15, No. 1, 11-22).

10

	Solubilidad (PBS pH 7,4, 25°C, µg/ml)	Solubilidad en en FaSSiF (37°C, µg/ml)
Forma libre	<1	14
Sal de hidrocloreuro	5	
Sal de dihidrógeno-fosfato	15	266

15

La sal de dihidrógeno-fosfato tiene también propiedades inesperadas que son útiles para la fabricación a gran escala y la formulación farmacéutica. En primer lugar, la sal de dihidrógeno-fosfato tiene muy buena cristalinidad. El XRPD de la sal de dihidrógeno-fosfato mostrado en la Figura 1 contiene picos con intensidades y resolución moderadas. La ausencia de un halo en la región media de dos thetas sugiere poca o ninguna fase amorfa. Además, las fotomicrografías previas y posteriores a la trituración de la sal de dihidrógeno-fosfato mostradas en la Figura 8 ponen de manifiesto una buena reducción en el tamaño de partículas sin cambios en las propiedades físicoquímicas.

20

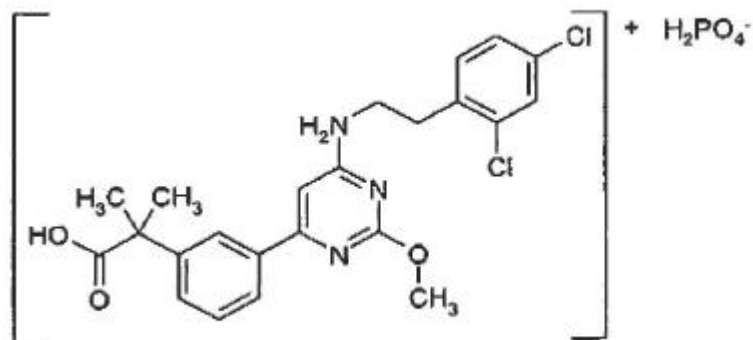
Sin embargo, la sal de sodio tiene una baja cristalinidad. Como se muestra en la Figura 11, el XRPD de la tanda 2 de la sal de sodio contiene picos anchos con bajas intensidades indicando una baja cristalinidad. El XRPD de la tanda 1 de la sal de sodio muestra que el material es mayoritariamente amorfo. Además, la presencia de un halo en la región media de dos teta del XRPD de ambas tanda sugiere una cristalinidad muy escasa del material.

25

Además, la sal de dihidrógeno-fosfato se ha mostrado actualmente que existe solamente en una forma polimórfica. Sin embargo, la sal de hidrocloreuro se ha mostrado actualmente que existe en 3 formas polimórficas, que pueden estar sometidas a una interconversión bajo ciertas condiciones. Una de las formas polimórficas de la sal de hidrocloreuro, la tanda 2 de la Figura 12, tiene una baja cristalinidad ya que el XRPD contiene picos anchos con bajas intensidades. Otras de las formas polimórficas de la sal de hidrocloreuro, tanda 1 en la Figura 12 tiene una buena cristalinidad.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (III)



(III)

2. El compuesto según la reivindicación 1, en una forma cristalina.

5 3. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto según la reivindicación 1 mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 4. Uso del compuesto según la reivindicación 1, para la elaboración de un medicamento para tratar una enfermedad alérgica, mastocitosis sistémica, un trastorno acompañado de activación sistémica de mastocitos, choque anafiláctico, broncoconstricción, bronquitis, urticaria, eccema, enfermedades acompañadas de picores, una enfermedad que es generada secundariamente como resultado de un comportamiento acompañado de picores, inflamación, enfermedades de obstrucción pulmonar crónica, herida de reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular, artritis reumatoide crónica, pleuresía o colitis ulcerativa.

15 5. Uso según la reivindicación 4, en el que la enfermedad que es generada secundariamente como resultado de un comportamiento acompañado de picores es cataratas, desprendimiento de retina, inflamación, infección o trastornos del sueño.

6. Uso según la reivindicación 4, en el que la enfermedad acompañada de picores es dermatitis alérgica o urticaria.

7. Uso según la reivindicación 4, para tratar una enfermedad alérgica.

8. Uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad alérgica es asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica, conjuntivitis alérgica o alergia a alimentos.

20 9. Uso según la reivindicación 4, para tratar una enfermedad de obstrucción pulmonar crónica.

25 10. El compuesto según la reivindicación 1, para ser usado en el tratamiento de una enfermedad alérgica, mastocitosis sistémica, un trastorno acompañado de una activación sistémica de mastocitos, choque anafiláctico, broncoconstricción, bronquitis, urticaria, eccema, una enfermedad acompañada de picores, una enfermedad que es generada secundariamente como resultado de un comportamiento acompañado de picores, inflamación, enfermedades de obstrucción pulmonar crónica, herida de reperfusión isquémica, accidente cerebrovascular, artritis reumatoide crónica, pleuresía o colitis ulcerativa.

11. El compuesto según la reivindicación 10, en el que la enfermedad que es generada secundariamente como resultado de un comportamiento acompañado de picores es cataratas, desprendimiento de retina, inflamación, infección o trastornos del sueño.

12. El compuesto según la reivindicación 10, en el que la enfermedad acompañada de picores es dermatitis alérgica o urticaria.

13. El compuesto según la reivindicación 10, para tratar una enfermedad alérgica.

5 14. El compuesto según la reivindicación 13, en el que la enfermedad alérgica es asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis alérgica, conjuntivitis alérgica o alergia a alimentos.

15. El compuesto según la reivindicación 10, para tratar una enfermedad de obstrucción pulmonar crónica.

10 16. Una composición farmacéutica, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto según la reivindicación 1 y un compuesto seleccionado entre el grupo que consiste en una antihistamina, un antagonista de leucotrieno, un agonista beta, un inhibidor de PDE4, un antagonista de TP y un antagonista de CrTh2, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17. La composición farmacéutica según la reivindicación 16, en la que la antihistamina es fexofenadina, desloratadina, loratadina o citirizina, el antagonista de leucotrieno es montelukast o zafirulast, el agonista beta es albuterol, salbuterol o terbutalina, el inhibidor de PDE4 es roflumilast o cilomilast, el antagonista de TP es Ramatrobran y el antagonista de CrTh2 es Ramatrobran.

FIGURA 1

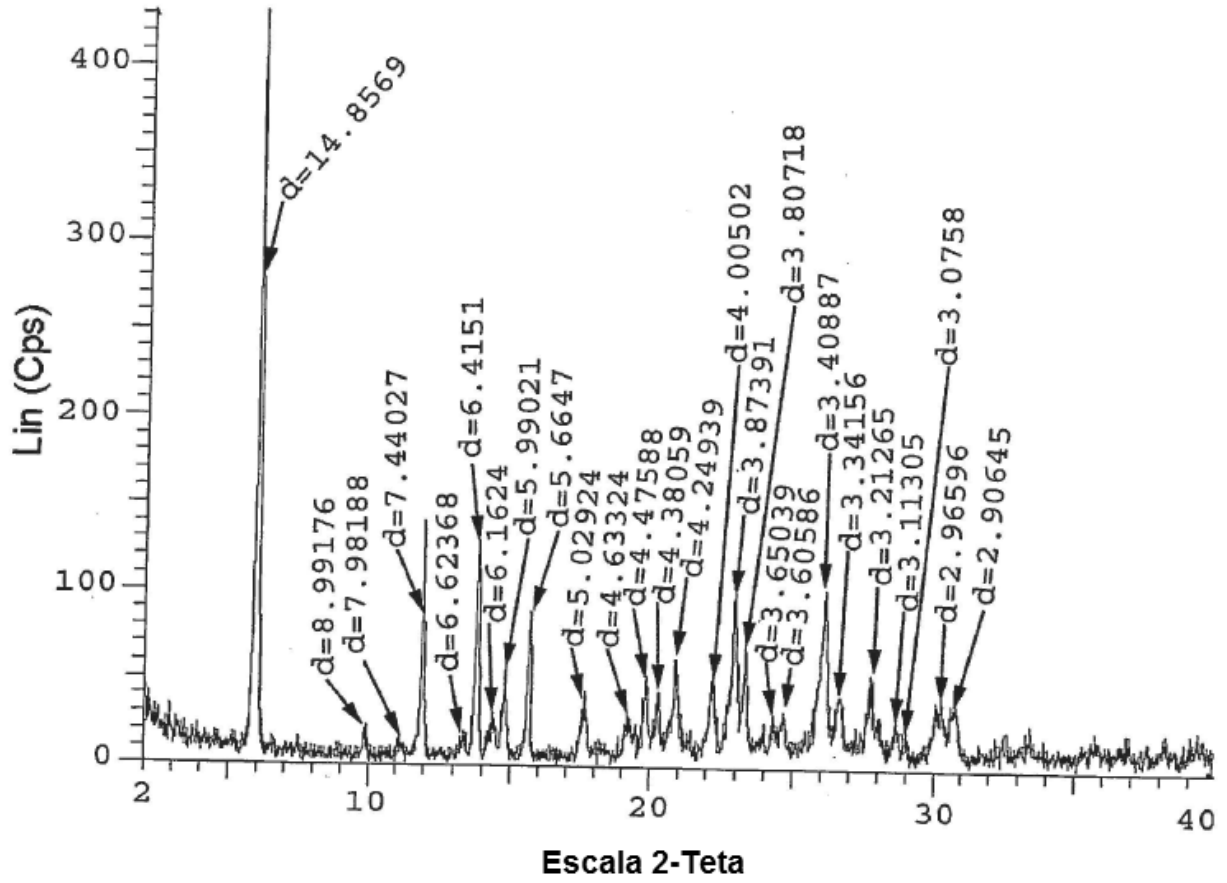
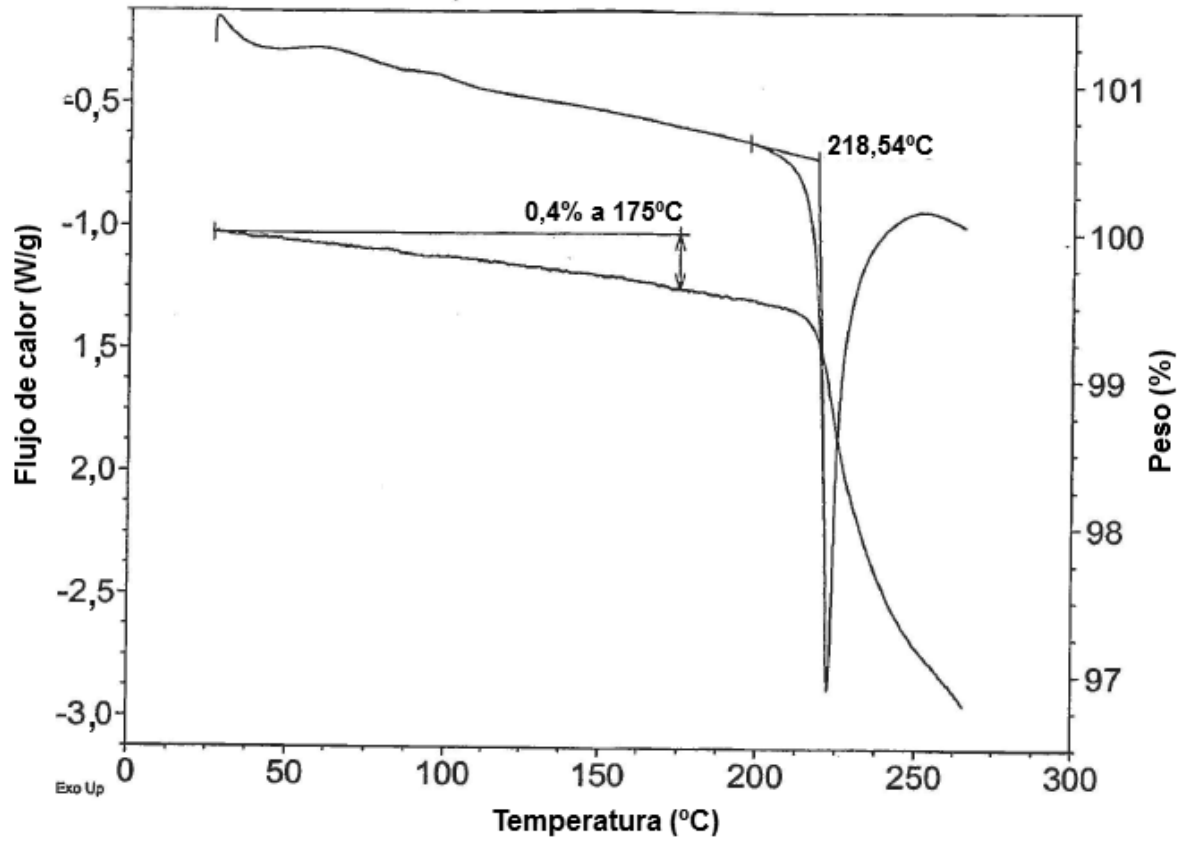


FIGURA 2

Valor de d Anstrom	Intensidad Recuentos por segundo	Intensidad %
14,8569	432	100
8,99176	20	4,6
7,98188	26	3,7
7,44027	140	32,4
6,62368	16	3,7
6,4151	129	29,9
6,1624	30	6,9
5,99021	56	13
5,66647	88	20,4
5,02924	43	10
4,63324	33	7,6
4,47588	52	12
4,38059	43	10
4,24939	62	14,4
4,00502	54	12,5
3,87391	97	22,5
3,80718	71	16,4
3,65039	31	7,2
3,60586	32	7,4
3,40887	102	23,6
3,34156	41	9,5
3,21265	54	12,5
3,11305	29	6,7
3,0758	22,6	5,2
2,96596	36	8,3
2,09645	35	8,1

FIGURA 3



Acontecimiento térmico	La sal de dihidrógeno-fosfato
Punto de fusión	218°C

FIGURA 4

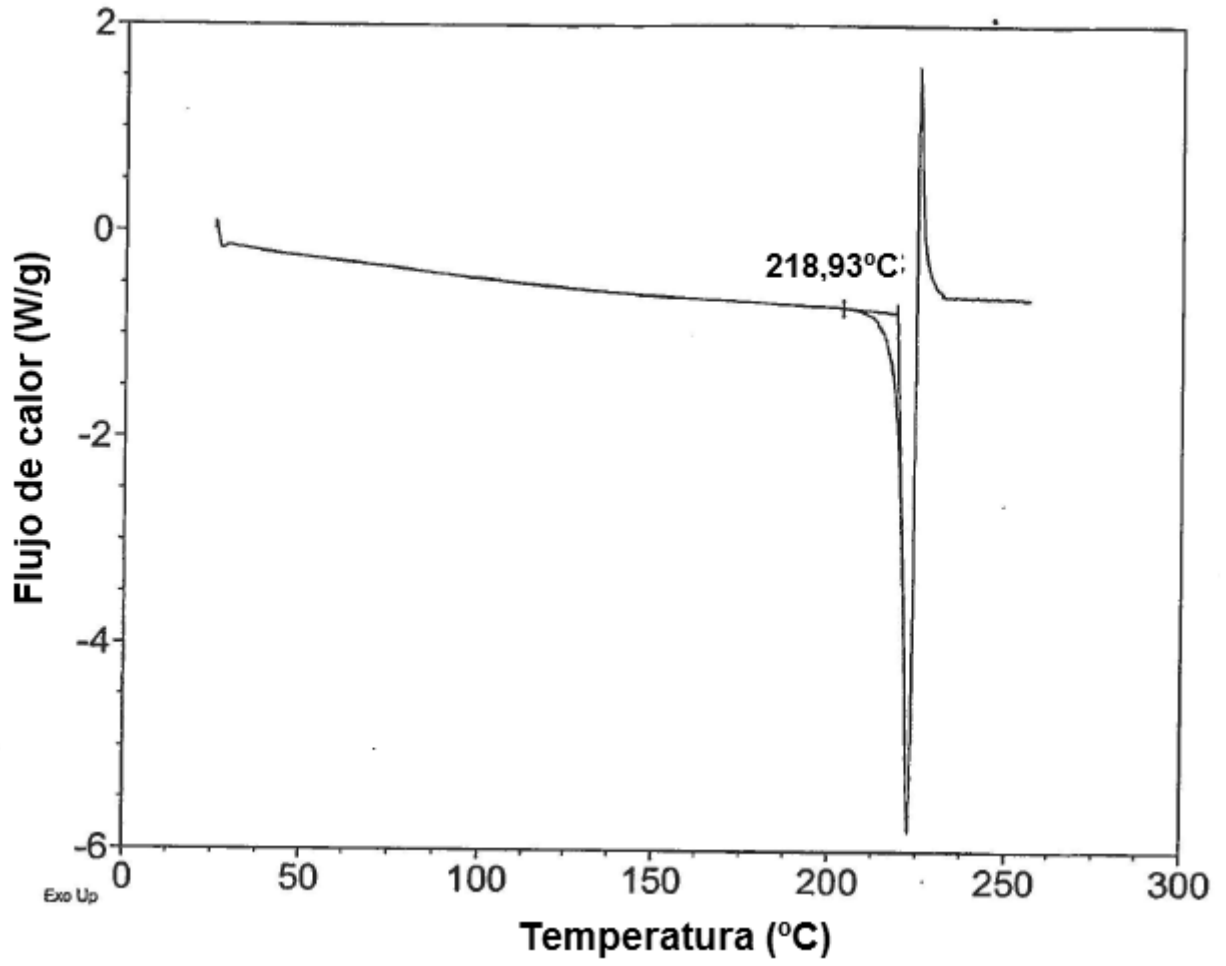
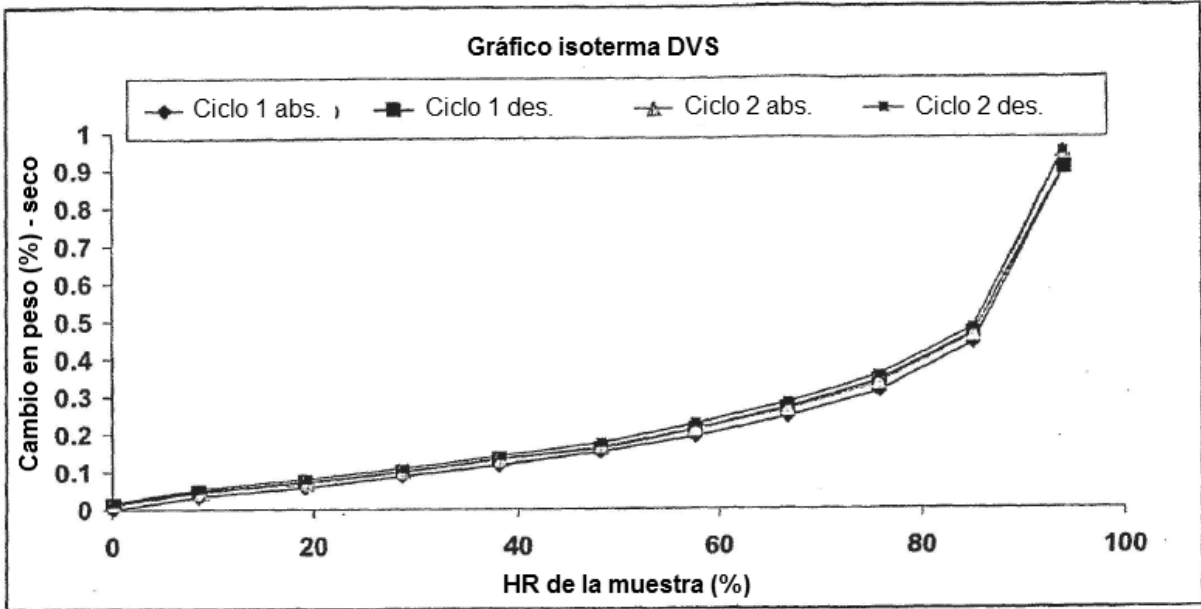


FIGURA 5



	HR de la muestra (%)	Cambio en peso (%)		
		Absorción	Desorción	Histéresis
Ciclo 1	0,1	0,0000	0,0133	
	8,6	0,0340	0,0464	0,0124
	19,2	0,0472	0,0730	0,0158
	28,7	0,0879	0,1004	0,0124
	38,2	0,1169	0,1335	0,0166
	48,3	0,1518	0,1609	0,0091
	57,7	0,1932	0,2123	0,0191
	66,9	0,2447	0,2679	0,0232
	75,9	0,3118	0,3400	0,0282
	85,2	0,4404	0,4644	0,0241
	94,1	0,9040	0,9040	
Ciclo 2	0,1	0,0133	0,0182	
	8,9	0,0440	0,0531	0,0091
	19,4	0,0672	0,0804	0,0133
	28,8	0,0995	0,1086	0,0091
	28,4	0,1310	0,1410	0,0100
	48,4	0,1659	0,1758	0,0100
	57,8	0,2123	0,2272	0,0149
	66,9	0,2629	0,2828	0,0199
	75,8	0,3326	0,3541	0,0216
	85,2	0,4611	0,4802	0,0191
	94,0	0,9463	0,9463	

FIGURA 6

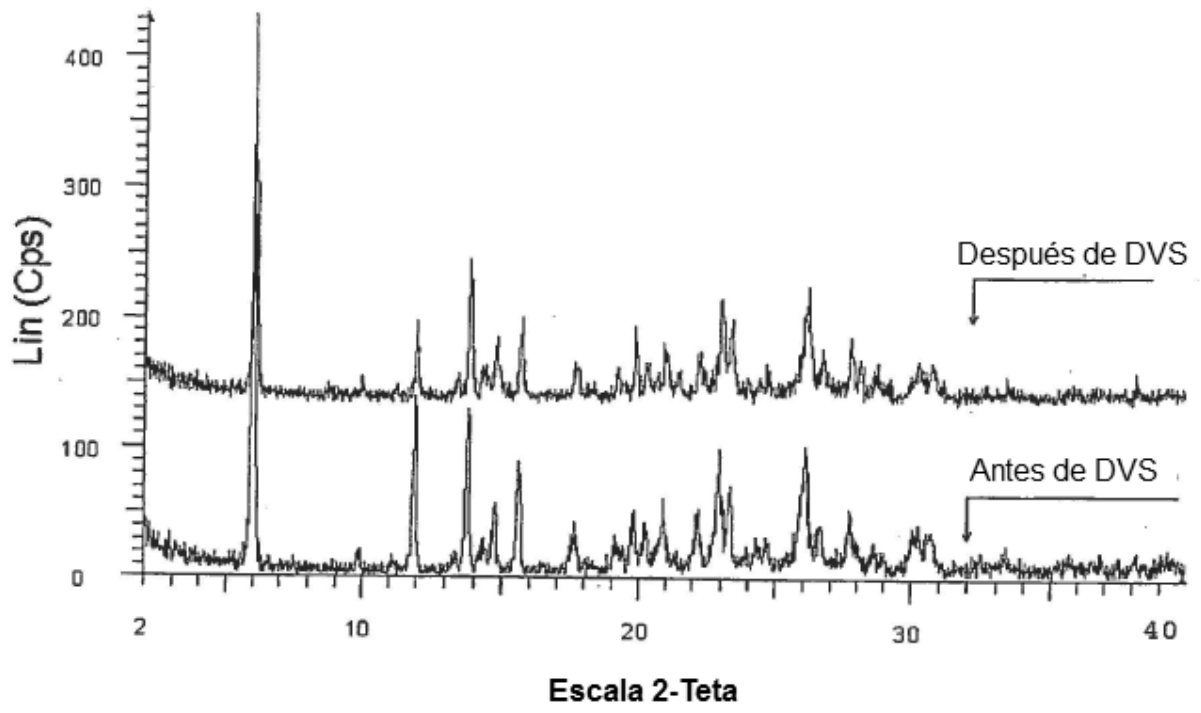


FIGURA 7



FIGURA 8

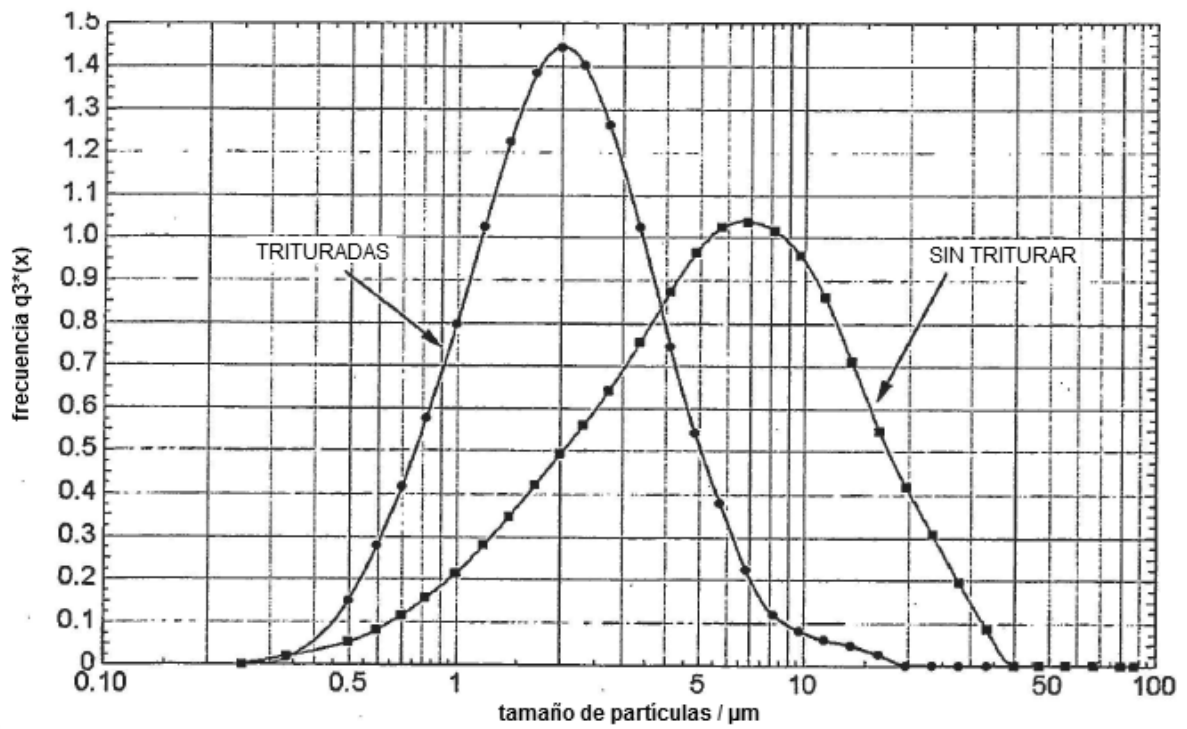
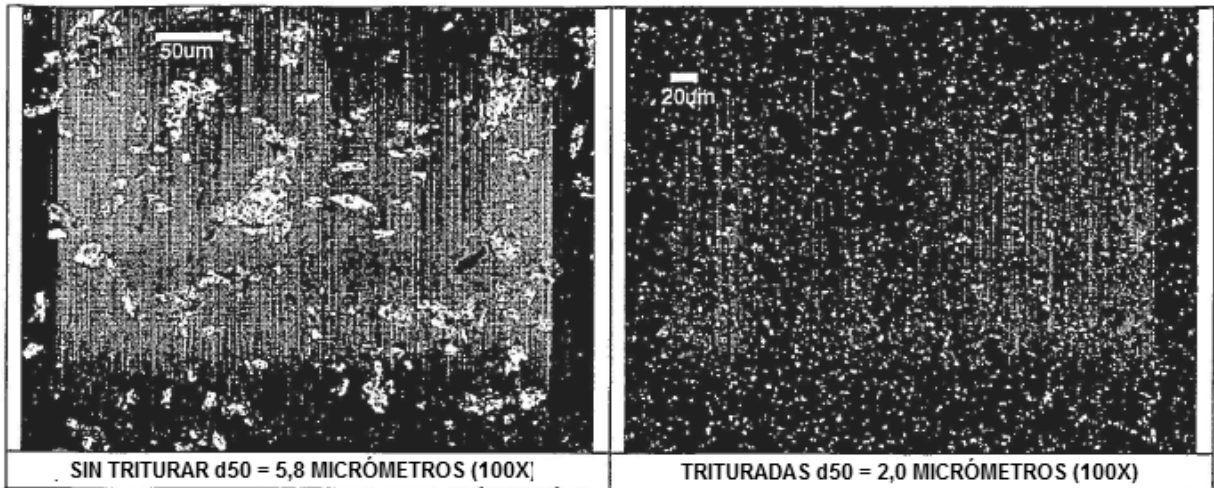
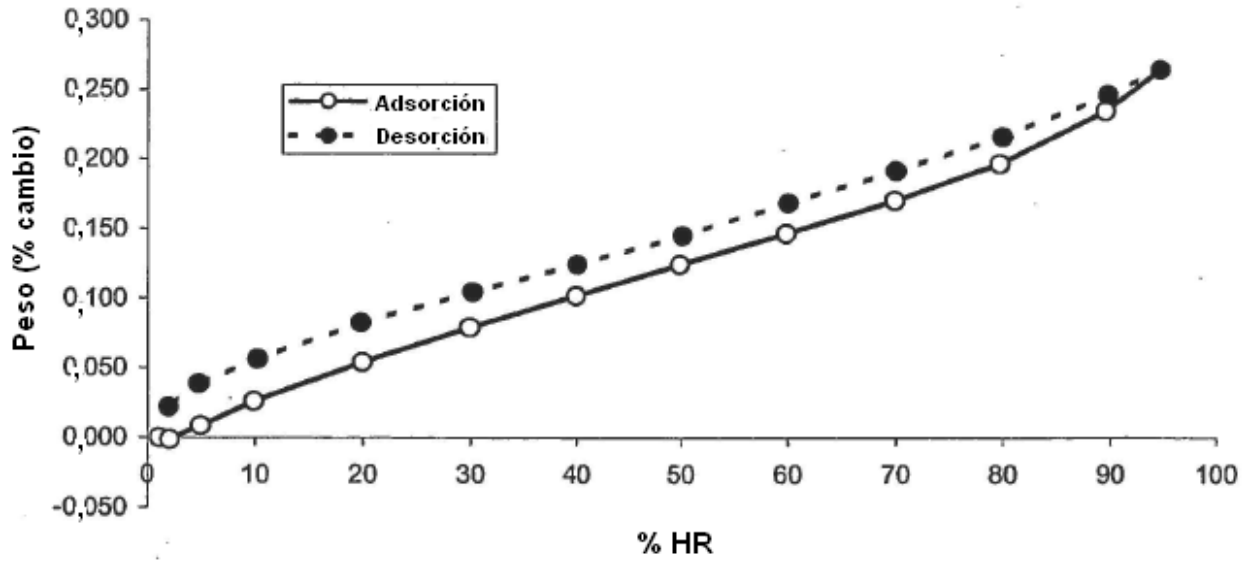
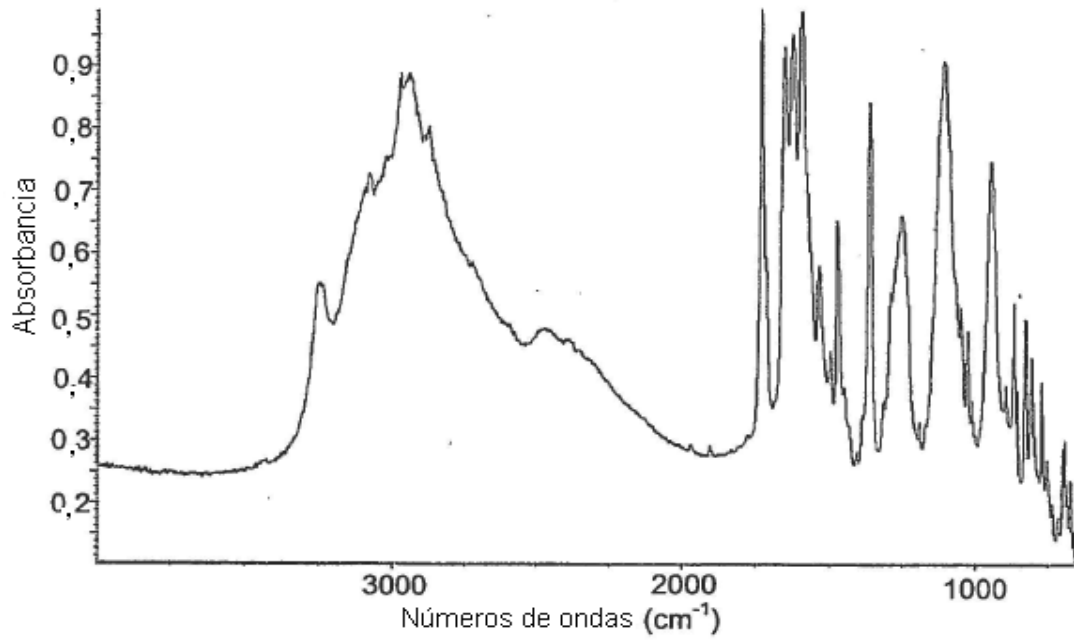


FIGURA 9



Cambio en peso	HR de muestra
0,000	1,14
-0,001	2,17
0,008	5,05
0,026	9,90
0,054	19,94
0,079	29,92
0,102	39,92
0,124	49,86
0,146	59,83
0,170	69,89
0,196	79,69
0,234	89,51
0,263	94,72
0,245	89,77
0,215	79,96
0,191	70,01
0,168	60,03
0,145	50,15
0,124	40,04
0,104	30,17
0,083	19,81
0,056	10,26
0,039	4,87
0,022	2,07

FIGURA 10



Posición de los picos (cm ⁻¹)
3246,33
2943,13
1729,41
1654,53
1625,97
1595,66
1535,18
1494,85
1471,73
1362,52
1251,90
1107,05
1051,19
1027,20
945,09
892,45
864,26
852,33
823,94
803,36
768,17
749,19
695,68
687,27
668,53

FIGURA 11

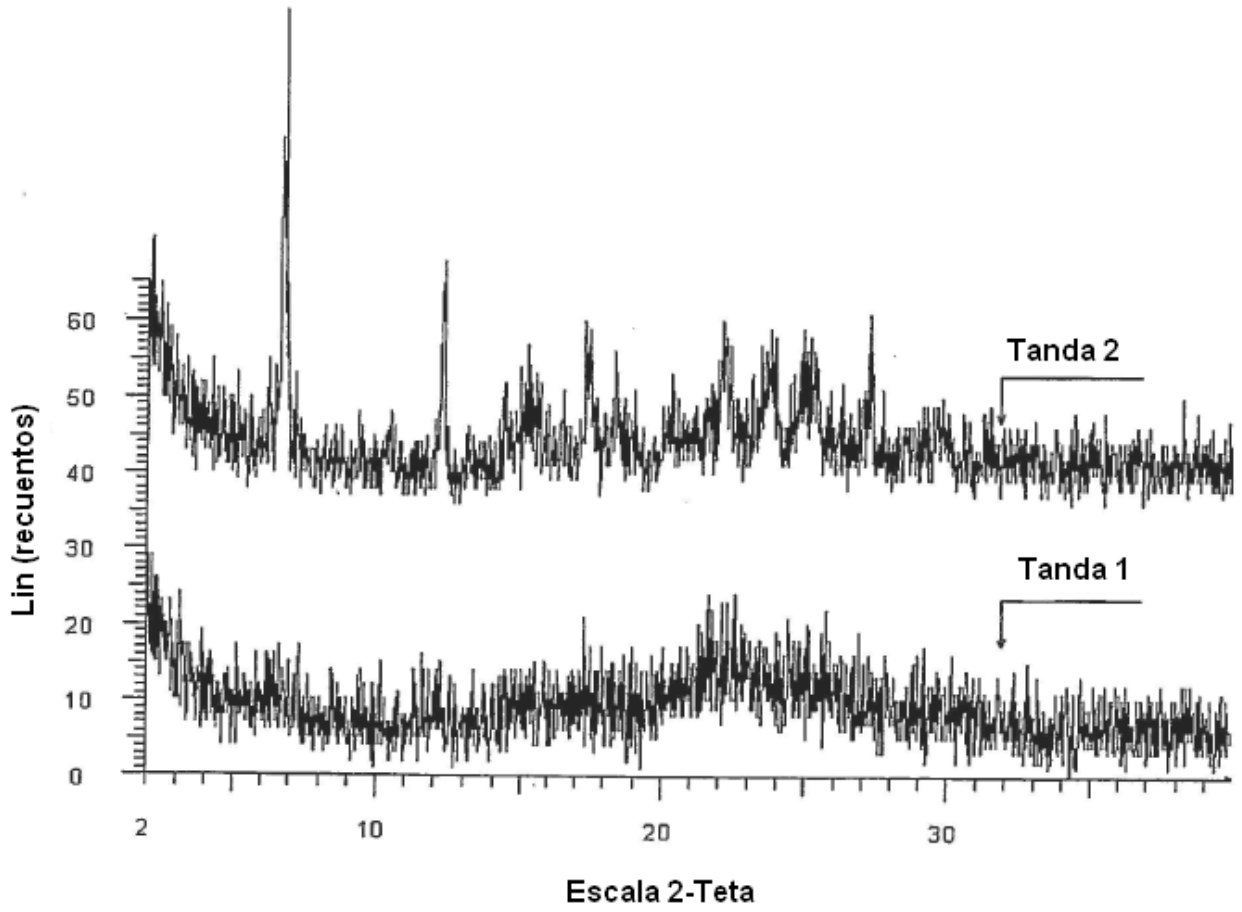


FIGURA 12

