

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 359**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4245 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2007 E 07852738 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2015 EP 2073805**

54 Título: **Métodos para administrar un 1,2,4-oxadiazol activo por vía oral para terapia de supresión de mutación sin sentido**

30 Prioridad:

12.10.2006 US 851450 P

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

19.06.2015

73 Titular/es:

**PTC THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
100 CORPORATE COURT, MIDDLESEX
BUSINESS CENTER
SOUTH PLAINFIELD, NJ 07080, US**

72 Inventor/es:

**HIRAWAT, SAMIT y
MILLER, LANGDON**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 538 359 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

Métodos para administrar un 1,2,4-oxadiazol activo por vía oral para terapia de supresión de mutación sin sentido

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. n° 60/851,450, presentada el 12 de octubre de 2006.

5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a dosis específicas de, y regímenes de administración para, uso de un compuesto de ácido 1,2,4-oxadiazolbenzoico en el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas con mutaciones sin sentido. En particular, la invención se refiere a dosis específicas y regímenes de administración para el uso de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico en mamíferos que padecen fibrosis quística o distrofia muscular de Duchenne.

10 2. Antecedentes de la invención

En la patente de EE.UU. n° 6,992,096 B1, expedida el 31 de enero de 2006 y titulada "1,2,4-Oxadiazole Benzoic Acid Compounds and Their Use For Nonsense Suppression and the Treatment of Disease" se describe una nueva clase de compuestos de 1,2,4-oxadiazol y su uso para tratar, prevenir o gestionar enfermedades que mejoran por la modulación de la terminación prematura de traducción o la degradación de ARNm mediada por sin sentido.

El documento WO 2004/091502 A2 describe nuevos compuestos de ácido 1,2,4-oxadiazolbenzoico y su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que mejora por la modulación de la terminación prematura de traducción o la degradación de ARNm mediada por sin sentido, o para mejorar uno o más síntomas asociados con la misma. El documento US 2006/0148863 A1 describe compuestos de ácido 1,2,4-oxadiazolbenzoico y su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad que mejora por la modulación de la terminación prematura de traducción o la degradación de ARNm mediada por sin sentido, o para mejorar uno o más síntomas asociados con la misma. El documento WO 2006/110483 A1 describe dosis específicas de, y regímenes de administración para, uso de un compuesto de ácido 1,2,4-oxadiazolbenzoico, en particular ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico, en el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas con mutaciones sin sentido.

Uno de tales compuestos es el ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico. Como ocurre con todos los medicamentos, las dosis y regímenes de administración adecuados para el tratamiento de pacientes que padecen enfermedades tales como fibrosis quística y distrofia muscular de Duchenne son esenciales para conseguir un efecto terapéutico deseado u óptimo sin efectos adversos o indeseados.

Por tanto, existe una necesidad de dosis y regímenes de administración seguros, eficaces y no tóxicos que prevengan o reduzcan cualesquiera efectos adversos o indeseados, o bien proporcionen un efecto terapéutico óptimo o ambas cosas, es decir, proporcionen un perfil terapéutico deseable.

30 3. Compendio de la invención

La invención se refiere a ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, para uso en un método para tratar, prevenir o gestionar una enfermedad asociada con una falta de expresión de un gen resultante de un codón de parada prematura, en donde dicha enfermedad es fibrosis quística o distrofia muscular de Duchenne, en donde dicho método comprende la administración en tres dosis diarias, en donde se administran una primera dosis, una segunda dosis y una tercera dosis en un período de 24 horas según la fórmula 1X, 1X, 2X, en donde X es 18-22 mg/kg, en donde cada dosis mantiene el nivel plasmático de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico por encima de 2 µg/ml durante al menos 2 horas.

Se describen en la presente memoria regímenes de administración en donde se administran a intervalos de tiempo específicos dosis específicas de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable para modular la terminación prematura de traducción o la degradación de ARNm mediada por sin sentido, o para mejorar uno o más síntomas asociados con las mismas, al tiempo que se reducen o evitan efectos adversos o efectos indeseados. Se describen además dosis específicas y presentaciones unitaria de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

Se describen en la presente memoria métodos para administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable una, dos o tres veces en el curso de un período de 24 horas. También se describen métodos para administrar a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable una, dos o tres veces en el curso de un período de 24 horas. La dosis en cada administración durante un período de 24 horas puede ser la misma o diferente. Tal como se describe en la presente memoria, cuando se administra tres veces en un período de 24 horas, la dosis en las dos primeras administraciones es la misma y la

tercera dosis es el doble de la primera dosis. Como alternativa, las tres dosis son la misma.

Se describen en la presente memoria métodos para tratar, prevenir o gestionar una enfermedad que mejora por la modulación de la terminación prematura de traducción o la degradación de ARNm mediada por sin sentido que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable una, dos o tres veces en el curso de un período de 24 horas. Preferiblemente, la administración se efectúa tres veces al día de forma continua, o con un período de descanso, durante varios días, semanas, meses o años.

Se describen en la presente memoria métodos para tratar, prevenir o gestionar una enfermedad que mejora por la modulación de la terminación prematura de traducción o la degradación de ARNm mediada por sin sentido que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable una, dos o tres veces en el curso de un período de 24 horas. Preferiblemente, la administración se efectúa tres veces al día de forma continua, o con un período de descanso, durante varios días, semanas, meses o años.

Se describe en la presente memoria un método para tratar, prevenir o reducir tos, que comprende administrar una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable a un paciente que lo necesite.

También se describe en la presente memoria un método para aumentar la expresión de distrofina en músculo, que comprende administrar una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable a un paciente que lo necesite.

También se describe en la presente memoria un método para administrar ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en donde se administra el agente activo a un paciente que lo necesite una, dos o tres veces en un período de 24 horas, en donde cada administración está separada preferiblemente por aproximadamente 4-14 horas. En una realización particular, se incrementa la dosis de agente activo de la primera a la tercera dosis.

También se describe en la presente memoria terapia continua en donde se administra ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable a un paciente que lo necesite durante un determinado período de tiempo (por ejemplo 5, 7, 10, 14, 20, 24, 28, 60 ó 120 días o más).

También se describe en la presente memoria la administración de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en dosis únicas o divididas (por ejemplo, tres veces al día) entre 0,1 mg/kg y 500 mg/kg, 1 mg/kg y 250 mg/kg, 1 mg/kg y 150 mg/kg, 1 mg/kg y 100 mg/kg, 1 mg/kg y 50 mg/kg, 1 mg/kg y 25 mg/kg, 1 mg/kg y 10 mg/kg o 2 mg/kg y 10 mg/kg a un paciente que lo necesite. En particular, se administra ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en una dosis de aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg o aproximadamente 20 mg/kg. Como alternativa, cualquier dosis del ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable descrita en la realización precedente se administra una, dos o tres veces en un período de 24 horas.

También se describen en la presente memoria formulaciones de dosis unitaria que comprenden entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 1.400 mg, aproximadamente 125 mg y aproximadamente 1.000 mg, aproximadamente 250 mg y aproximadamente 1.000 mg, o aproximadamente 500 mg y aproximadamente 1.000 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

También se describen en la presente memoria formulaciones de dosis unitaria que comprenden 35 mg, 50 mg, 70 mg, 100 mg, 125 mg, 140 mg, 175 mg, 200 mg, 250 mg, 280 mg, 350 mg, 500 mg, 560 mg, 700 mg, 750 mg, 1.000 mg o 1.400 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, se describen en la presente memoria formulaciones de dosis unitaria que comprenden 125 mg, 250 mg o 1.000 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, se describe en la presente memoria un método para mantener una concentración plasmática de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable superior a aproximadamente 0,1 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 25 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml o 500 µg/ml en un paciente durante al menos aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 12 o 24 horas o más, que comprende administrar una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable a un paciente que lo necesite.

4. Descripción detallada

4.1 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ofrece los perfiles de concentración plasmática-tiempo de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico y parámetros PK de 37 de 38 pacientes en estudio en fase II sobre distrofia muscular de Duchenne a niveles de dosis de 4, 4 y 8 mg/kg; 10, 10 y 20 mg/kg; y 20, 20 y 40 mg/kg. Los datos de un paciente han sido excluidos del análisis debido a la insuficiencia de datos.

La Figura 2 ofrece el efecto sobre la frecuencia media de tos durante 24 horas de la administración de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico a un sujeto. Estos datos indican que la administración de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico proporciona una mejora inicial en la frecuencia media de tos, seguida de un aumento temporal en la frecuencia media de tos, seguido de una mejora general en la frecuencia media de tos.

4.2 Definiciones

Tal como se utiliza en la presente memoria, "terminación prematura de traducción" se refiere al resultado de una mutación que cambia un codón correspondiente a un aminoácido a un codón de parada.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "degradación de ARNm mediada por sin sentido" se refiere a cualquier mecanismo que media en la degradación de los ARNm que contienen un codón de terminación prematura de traducción. En una realización particular, la degradación de ARNm mediada por sin sentido resulta de una mutación sin sentido de ADN.

Tal como se utiliza en la presente memoria, un "codón de terminación prematura" o "codón de parada prematura" se refiere a la aparición de un codón de parada donde debería estar un codón correspondiente a un aminoácido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "mutación sin sentido" es una mutación puntual que cambia un codón correspondiente a un aminoácido a un codón de parada. En una realización particular, la mutación sin sentido es una mutación que se produce en ADN y después es transcrita a ARNm.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "supresión de sin sentido" se refiere a la inhibición o supresión de la terminación prematura de traducción y/o la degradación de ARNm mediada por sin sentido. En una realización particular, la degradación de ARNm resulta de una mutación sin sentido de ADN.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "modulación de la terminación prematura de traducción y/o la degradación de ARNm mediada por sin sentido" se refiere a la regulación de la expresión génica mediante la alteración del nivel de supresión de sin sentido. Por ejemplo, si es deseable aumentar la producción de una proteína defectuosa codificada por un gen con un codón de parada prematura, es decir, permitir la lectura del codón de parada prematura del gen de enfermedad de manera que se pueda producir la traducción del gen, entonces la modulación de la terminación prematura de traducción y/o la degradación de ARNm mediada por sin sentido implica la regulación al alza de la supresión de sin sentido.

Tal como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "efecto adverso" o "efecto secundario" incluyen náuseas, vómitos, diarrea, dolor de cabeza, alanina aminotransferasa (ALT) sérica elevada, aspartato aminotransferasa (AST) sérica elevada, mareo, creatina cinasa (CK) sérica elevada, dolor abdominal, gases abdominales, dolor ocular, hinchazón ocular, ardor ocular, sensibilidad del pezón, sensibilidad en los senos, dolor torácico musculoesquelético, sarpullido, picazón, ganglios linfáticos submaxilares dolorosos, lactato deshidrogenasa (LDH) sérica elevada, aldolasa sérica elevada y triglicéridos séricos elevados.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos y expresiones "agente activo", "fármaco" y "sustancia farmacológica" se refieren a ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "dosis" significa una cantidad de agente activo que ha de administrarse de una vez.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "presentación unitaria" incluye comprimidos; comprimidos con forma de cápsula o "caplets"; cápsulas, tales como cápsulas de gelatina elástica blanda; sobres; sellos; trociscos; pastillas; dispersiones; polvos; soluciones; geles; presentaciones líquidas adecuadas para la administración por vía oral o mucosal a un paciente, entre ellas suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas), emulsiones (por ejemplo, emulsiones de aceite en agua, o una emulsión líquida de agua en aceite), soluciones y elixires; y sólidos (por ejemplo, sólidos cristalinos o amorfos) estériles que pueden reconstituirse para proporcionar presentaciones líquidas adecuadas para la administración por vía oral o parenteral a un paciente. La presentación unitaria no tiene necesariamente que ser administrada como una dosis única.

Tal como se utilizan en la presente memoria, la expresión "régimen de administración" y el término "dosis" significan la cantidad de agente activo dado por unidad de tiempo y la duración de la administración.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "paciente" significa un animal (por ejemplo vaca, caballo, oveja, cerdo, pollo, pavo, codorniz, gato, perro, ratón, rata, conejo, conejillo de indias, etc.), preferiblemente un mamífero tal como un no primate y un primate (por ejemplo, mono y ser humano), lo más preferiblemente un ser humano. Específicamente, el paciente es un feto, embrión, recién nacido, niño, adolescente o adulto.

5 Específicamente, se ha determinado a través de pre-selección que el paciente posee una mutación sin sentido. Más específicamente, se ha determinado a través de pre-selección cuál mutación sin sentido (es decir, UAA, UGA o UAG) tiene el paciente.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad eficaz" se refiere a aquella cantidad de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o gestión de la enfermedad o para retrasar o minimizar síntomas asociados con la enfermedad. En una realización, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable suficiente para conseguir un nivel plasmático deseado durante un cierto período de tiempo. En la presente memoria se describen específicamente cantidades eficaces preferidas.

15 Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "gestionar" y "gestión" se refieren a los efectos beneficiosos que un paciente obtiene de la administración de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, que no resulta en una cura de la enfermedad.

Tal como se utilizan en la presente memoria, los términos "prevenir" y "prevención" se refieren a la prevención de la aparición, recurrencia, difusión o empeoramiento de la enfermedad o de uno de sus síntomas en un paciente como consecuencia de la administración de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Puesto que las enfermedades asociadas con una mutación sin sentido pueden ser de origen genético, se puede someter a un paciente a un ensayo exploratorio en busca de la presencia de una mutación sin sentido. En caso de que se determine mediante el ensayo exploratorio que un paciente tiene una mutación sin sentido, se puede administrar al paciente una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable para prevenir la aparición, recurrencia, difusión o empeoramiento de la enfermedad o uno de sus síntomas.

25 Tal como se utiliza en la presente memoria, los términos "tratar" y "tratamiento" se refieren a la erradicación o mejora de la enfermedad o síntomas asociados con la enfermedad. Específicamente, tales términos se refieren a minimizar la difusión o el empeoramiento de la enfermedad como consecuencia de la administración de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable a un paciente con una enfermedad semejante.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales preparadas a partir de ácidos o bases no tóxicos, farmacéuticamente aceptables, que incluyen ácidos y bases inorgánicos y ácidos y bases orgánicos. Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables y adecuadas para el ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico incluyen sales metálicas hechas de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio y zinc o sales orgánicas hechas de lisina, N,N'-dibenciletildiamina, clorprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina) y procaína. Los ácidos no tóxicos adecuados incluyen ácidos inorgánicos y orgánicos tales como ácido acético, algínico, antranílico, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etenosulfónico, fórmico, fumárico, furoico, galacturónico, glucónico, glucurónico, glutámico, glicólico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, múico, nítrico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, propiónico, salicílico, esteárico, succínico, sulfanílico, sulfúrico, tartárico y p-toluenosulfónico. Ácidos no tóxicos específicos incluyen los ácidos clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, sulfúrico y metanosulfónico. Los ejemplos de sales específicas incluyen así sales de hidrocloreuro y de mesilato. Otros ejemplos de sales son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed., Mack Publishing, Easton PA (1990).

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "hidrato" significa ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de agua unida por fuerzas intermoleculares no covalentes.

40 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "solvato" significa ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable que incluye además una cantidad estequiométrica o no estequiométrica de un disolvente unido por fuerzas intermoleculares no covalentes.

4.3 Enfermedades asociadas con la terminación prematura de traducción

55 Se describen en la presente memoria métodos para tratar, prevenir o gestionar enfermedades o trastornos que mejoran por la supresión de la terminación prematura de traducción y/o la degradación de ARNm mediada por sin sentido en un paciente, que comprenden administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto biodisponible por vía oral (es decir, ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable) de acuerdo con las dosis y/o regímenes de administración descritos en la presente memoria.

También se describen en la presente memoria el tratamiento, prevención o gestión de cualquier enfermedad que esté asociada con un gen que presenta terminación prematura de traducción y/o degradación de ARNm mediada por sin sentido. Específicamente, la enfermedad es debida, en parte, a la falta de expresión del gen como resultado de un codón de parada prematura. En la solicitud de patente de EE.UU. nº 60/390,747, titulada: "Methods For Identifying Small Molecules That Modulate Premature Translation Termination And Nonsense Mediated mRNA Decay" y presentada el 21 de junio de 2002, se encuentran ejemplos específicos de genes que pueden presentar terminación prematura de traducción y/o degradación de ARNm mediada por sin sentido y las enfermedades asociadas con la terminación prematura de traducción y/o degradación de ARNm mediada por sin sentido.

Específicamente, los métodos, composiciones, dosis, presentaciones unitarias y regímenes de administración proporcionados en la presente memoria son útiles para el tratamiento, prevención o gestión de una enfermedad asociada con una mutación sin sentido en un gen en un embrión o feto que padece o está predispuesto o es susceptible a una enfermedad asociada con una mutación sin sentido en un gen, tales como las descritas en la presente memoria. A una hembra preñada se le administra una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable que pasa a través de la placenta al embrión o feto. En una realización particular, se administra por vía oral a la hembra preñada una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable.

Las enfermedades o trastornos asociados con o mejorados por la supresión de la terminación prematura de traducción y/o degradación de ARNm mediada por sin sentido incluyen: una enfermedad genética, cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad de la sangre, una enfermedad del colágeno, diabetes, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad proliferativa, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad pulmonar, una enfermedad inflamatoria o enfermedad del sistema nervioso central.

Enfermedades genéticas específicas dentro del alcance de los métodos de la invención incluyen neoplasia endocrina múltiple (tipos 1, 2 y 3), amiloidosis, mucopolisacaridosis (tipos I y III), hipoplasia suprarrenal congénita, poliposis adenomatosa del colon, enfermedad de Von Hippel-Landau, síndrome de Menkes, hemofilia A, hemofilia B, colágeno VII, síndrome de Alagille, síndrome de Townes-Brocks, tumor rabdoide, epidermólisis ampollosa, síndrome de Hurler, síndrome de Coffin-Lowry, aniridia, enfermedad de Charcot-Maria-Tooth, miopatía miotubular, miopatía miotubular ligada al cromosoma X, condrodysplasia ligada al cromosoma X, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, poliquistosis renal, atrofia muscular espinal, poliposis adenomatosa familiar, deficiencia de piruvato deshidrogenasa, fenilcetonuria, neurofibromatosis 1, neurofibromatosis 2, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Tay-Sachs, síndrome de Rett, síndrome de Hermansky-Pudlak, displasia ectodérmica/síndrome de fragilidad cutánea, discondrosteosis de Leri-Weill, raquitismo hipofosfatémico, adrenoleucodistrofia, atrofia girata, aterosclerosis, sordera neurosensorial, distonía, enfermedad de Dent, porfiria intermitente aguda, enfermedad de Cowden, epidermólisis ampollosa de Herlitz, enfermedad de Wilson, síndrome de Treacher-Collins, deficiencia de piruvato cinasa, gigantismo, enanismo, hipotiroidismo, hipertiroidismo, envejecimiento, obesidad, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Niemann-Pick C, fibrosis quística, distrofia muscular, enfermedad cardíaca, cálculos renales, ataxia-telangiectasia, hipercolesterolemia familiar, retinitis pigmentosa, enfermedad de depósito lisosomal, esclerosis tuberosa, distrofia muscular de Duchenne y síndrome de Marfan.

Específicamente, la enfermedad genética es una enfermedad autoinmunitaria. Preferiblemente, la enfermedad autoinmunitaria es artritis reumatoide o enfermedad de injerto contra huésped.

Como alternativa, la enfermedad genética es una enfermedad de la sangre. Preferiblemente, la enfermedad de la sangre es hemofilia A, enfermedad de Von Willebrand (tipo 3), ataxia-telangiectasia, b-talasemia o cálculos renales.

Como alternativa, la enfermedad genética es una enfermedad del colágeno. Preferiblemente, la enfermedad del colágeno es osteogénesis imperfecta o cirrosis.

Como alternativa, la enfermedad genética es diabetes.

Como alternativa, la enfermedad genética es una enfermedad inflamatoria. Preferiblemente, la enfermedad inflamatoria es artritis.

Como alternativa, la enfermedad genética es una enfermedad del sistema nervioso central. Preferiblemente, la enfermedad del sistema nervioso central es una enfermedad neurodegenerativa. Preferiblemente, la enfermedad del sistema nervioso central es esclerosis múltiple, distrofia muscular, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Tay-Sachs, ceroidolipofuscinosis neuronal (CLN) infantil tardía o enfermedad de Parkinson.

Como alternativa, la enfermedad genética es cáncer. Preferiblemente, el cáncer es de la cabeza y el cuello, ojo, piel, boca, garganta, esófago, pecho, hueso, pulmón, colon, sigmoide, recto, estómago, próstata, mama, ovarios, riñón, hígado, páncreas, cerebro, intestino, corazón o glándulas suprarrenales. El cáncer puede ser primario o metastásico. Los cánceres incluyen tumores sólidos, cánceres hematológicos y otras neoplasias.

Preferiblemente, el cáncer está asociado con genes supresores tumorales (véase, por ejemplo Garinis *et al.* 2002,

Hum Gen 111:115-117; Meyers *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:15587-15591; Kung *et al.*, 2000, Nature Medicine 6(12): 1335-1340. Tales genes supresores tumorales incluyen APC, ATM, BRAC1, BRAC2, MSH1, pTEN, Rb, CDKN2, NF1, NF2, WT1 y p53.

5 En particular, el gen supresor tumoral es el gen p53. Se han identificado mutaciones sin sentido en el gen p53 y han sido implicadas en el cáncer. Se han identificado diversas mutaciones sin sentido en el gen p53 (véase, por ejemplo, Masuda *et al.*, 2000, Tokai J Exp Clin Med. 25(2):69-77; Oh *et al.*, 2000, Mol Cells 10(3):275-80; Li *et al.*, 2000, Lab Invest. 80(4):493-9; Yang *et al.*, 1999, Zhonghua Zhong Liu Za Zhi 21(2):114-8; Finkelstein *et al.*, 1998, Mol Diagn. 3(1):37-41; Kajiyama *et al.*, 1998, Dis Esophagus 11(4): 279-83; Kawamura *et al.*, 1999, Leuk Res. 23(2):115-26; Radig *et al.*, 1998, Hum Pathol. 29(11):1310-6; Schuyer *et al.*, 1998, Int J Cancer 76(3):299-303; Wang-Gohrke *et al.*, 1998, Oncol Rep. 5(1):65-8; Fulop *et al.*, 1998, J Reprod Med. 43(2): 119-27; Ninomiya *et al.*, 1997, J Dermatol Sci. 14(3):173-8; Hsieh *et al.*, 1996, Cancer Lett. 100(1-2):107-13; Rail *et al.*, 1996, Pancreas. 12(1):10-7; Fukutomi *et al.*, 1995, Nippon Rinsho. 53(11):2764-8; Frebourg *et al.*, 1995, Am J Hum Genet. 56(3):608-15; Dove *et al.*, 1995, Cancer Surv. 25: 335-55; Adamson *et al.*, 1995, Br J Haematol. 89(1):61-6; Grayson *et al.*, 1994, Am J Pediatr Hematol Oncol. 16(4):341-7; Lepelley *et al.*, 1994, Leukemia. 8(8):1342-9; McIntyre *et al.*, 1994, J Clin Oncol. 12(5):925-30; Horio *et al.*, 1994, Oncogene. 9(4):1231-5; Nakamura *et al.*, 1992, Jpn J Cancer Res. 83(12):1293-8; Davidoff *et al.*, 1992, Oncogene. 7(1):127-33; e Ishioka *et al.*, 1991, Biochem Biophys Res Commun. 177(3):901-6.

15 Enfermedades a tratar, prevenir o gestionar mediante la administración a un paciente que lo necesite de una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable incluyen tumor sólido, sarcoma, carcinomas, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rabiomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándula sudorípara, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma de conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, sarcoma de Kaposi, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, retinoblastoma, un tumor de origen sanguíneo, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfoblástica de células B aguda, leucemia linfoblástica de células T aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia promielocítica aguda, leucemia monoblástica aguda, leucemia eritroleucémica aguda, leucemia megacarioblástica aguda, leucemia mielomonocítica aguda, leucemia no linfocítica aguda, leucemia indiferenciada aguda, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, o mieloma múltiple. Véase, por ejemplo, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, compilado por Eugene Braunwald *et al.*, páginas 491-762 (15ª ed., 2001).

20 Se describe en la presente memoria un método para tratar, prevenir o reducir tos, que comprende administrar una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable a un paciente que lo necesite. En particular, el paciente padece fibrosis quística. En otra realización, la tos es tos crónica. Como alternativa, se administra ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable como una presentación farmacéutica proporcionada en la presente memoria o según un régimen de administración proporcionado en la presente memoria.

25 También se describe en la presente memoria un método para aumentar la expresión de distrofina en músculo, que comprende administrar una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable a un paciente que lo necesite. También se describe en la presente memoria un método para aumentar la expresión de distrofina en células musculares, que comprende poner en contacto las células musculares con una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Específicamente, se ponen en contacto las células musculares *in vitro*. En una realización específica, el paciente padece distrofia muscular de Duchenne. Como alternativa, se administra ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable como una presentación farmacéutica proporcionada en la presente memoria o según un régimen de administración proporcionado en la presente memoria.

4.4 Dosis y regímenes de administración

30 En particular, se describen en la presente memoria dosis específicas y regímenes de administración para ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable que optimizan la supresión de la terminación prematura de traducción y/o la degradación de ARNm mediada por sin sentido. Preferiblemente, la degradación de ARNm mediada por sin sentido resulta de una mutación sin sentido de ADN.

35 También se describen en la presente memoria el tratamiento, prevención y gestión de enfermedades tratables o prevenibles mediante la supresión de la terminación prematura de traducción y/o la degradación de ARNm mediada

por sin sentido o sus síntomas, al tiempo que reducen o evitan efectos adversos o indeseados, por ejemplo toxicidades o efectos secundarios. La ruta preferida de administración para las dosis y regímenes de administración descritos en la presente memoria es la oral (es decir, la ingestión de una solución, una solución coloidal o una solución con agente activo adicional, por encima de la concentración de saturación de agente activo).

- 5 Se cree que las dosis y regímenes de administración descritos en la presente memoria son útiles debido a su capacidad de alcanzar y mantener una deseable concentración plasmática del agente activo. Se cree que conseguir y mantener una concentración plasmática relativamente constante de agente activo (tal como las descritas en la sección 4.4) a lo largo de, por ejemplo, un período de 24 horas o más largo, proporciona un efecto terapéutico beneficioso para el paciente. Las dosis y regímenes de administración descritos en la presente memoria son útiles para conseguir y mantener tales concentraciones plasmáticas terapéuticas de agente activo.

Se describe en la presente memoria un método para administrar ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en donde se administra el agente activo una vez en un período de 12 o 24 horas a un paciente que lo necesite.

- 15 También se describe en la presente memoria un método para administrar ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en donde se administra el agente activo dos veces en un período de 12 o 24 horas a un paciente que lo necesite, en donde cada administración está separada preferiblemente por aproximadamente 4-14 horas, en una realización 12 horas. Específicamente, se puede administrar el agente activo, por ejemplo, a la hora de las comidas, como el desayuno y la cena.

- 20 También se describe en la presente memoria un método para administrar ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en donde se administra el agente activo tres veces en un período de 12 o 24 horas a un paciente que lo necesite, en donde cada administración está separada preferiblemente por aproximadamente 4-14 horas. En particular, se administra el agente activo una vez por la mañana, otra al mediodía y otra por la noche. Los intervalos entre dosis preferidos incluyen 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 horas.

- 25 Específicamente, se incrementa la dosis de agente activo a lo largo de un período de 24 horas. Como alternativa, se incrementa (por ejemplo, se dobla) la segunda dosis administrada. Como alternativa, se mantienen constantes la primera y segunda dosis administradas y se incrementa (por ejemplo, se dobla) la tercera dosis administrada. En particular, las tres dosis de un período de 24 horas se administran de acuerdo con la fórmula: 1X, 1X, 2X, en donde X es una dosis inicial particular (por ejemplo 4 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 35 mg/kg, 40 mg/kg o 50 mg/kg). Como alternativa, se administra el agente activo dentro de (es decir, antes o después) de aproximadamente 10, 15, 30, 45 o 60 minutos de que el paciente haya ingerido alimento. Específicamente, se rocía sobre o se mezcla con el alimento una cantidad eficaz del agente activo. Como alternativa, se administra el agente activo sin alimento.

- 35 Un régimen de administración particularmente preferido consiste en que se administra a un paciente el agente activo dentro de 30 minutos después de una comida a intervalos de aproximadamente 6, 6 y 12 horas (por ejemplo, a las ~7:00 de la mañana después del desayuno, a la ~1:00 del mediodía después del almuerzo y a las ~7:00 de la tarde después de la cena).

- 40 Como alternativa, la invención se refiere a la administración de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en dosis únicas o divididas (por ejemplo, tres veces en un período de 24 horas) entre 0,1 mg/kg y 500 mg/kg, 1 mg/kg y 250 mg/kg, 1 mg/kg y 150 mg/kg, 1 mg/kg y 100 mg/kg, 1 mg/kg y 50 mg/kg, 1 mg/kg y 25 mg/kg, 1 mg/kg y 10 mg/kg o 2 mg/kg y 10 mg/kg a un paciente que lo necesite. En una realización particular se administra ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en una dosis de aproximadamente 2-6 mg/kg, aproximadamente 5-9 mg/kg, aproximadamente 6-10 mg/kg, aproximadamente 8-12 mg/kg, aproximadamente 12-16 mg/kg o aproximadamente 18-22 mg/kg. En particular, se administra ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en una dosis de aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 14 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 35 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg o aproximadamente 50 mg/kg. En otra realización, se administra cualquier dosis de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable descrita en la realización precedente tres veces en un período de 24 horas.

- 45 También se describe en la presente memoria terapia continua en donde se administra a un paciente que lo necesite ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, diariamente durante un determinado período de tiempo (por ejemplo 5, 7, 10, 14, 20, 24, 28, 60 o 120 días o más). Específicamente, el agente activo se administra de forma continua tres veces por período de 24 horas. Como alternativa, se administra el agente activo de forma continua diariamente, semanalmente, mensualmente o anualmente. Específicamente, se administra el agente activo de forma continua tres veces por período de 24 horas a dosis de aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg y aproximadamente 8 mg/kg durante días, semanas, meses o años. Específicamente, se administra el agente activo de forma continua tres veces por período de 24

- horas a dosis de aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg y aproximadamente 14 mg/kg durante días, semanas, meses o años. Específicamente, se administra el agente activo de forma continua tres veces por período de 24 horas a dosis de aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg durante días, semanas, meses o años. Específicamente, se administra el agente activo de forma continua tres veces por período de 24 horas a dosis de aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg y aproximadamente 60 mg/kg durante días, semanas, meses o años. Específicamente, se administra el agente activo de forma continua tres veces por período de 24 horas a dosis de aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg durante días, semanas, meses o años. Específicamente, se administra el agente activo de forma continua tres veces por período de 24 horas a dosis de aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 40 mg/kg y aproximadamente 80 mg/kg durante días, semanas, meses o años. En cada período de 24 horas en donde se administra el agente activo, se administra preferiblemente tres veces a intervalos de aproximadamente 6, 6 y 12 horas (por ejemplo, a las ~7:00 de la mañana después del desayuno, a la ~1:00 del mediodía después del almuerzo y a las ~7:00 de la tarde después de la cena). Se utiliza preferiblemente terapia continua para el tratamiento, prevención o gestión de la fibrosis quística y la distrofia muscular de Duchenne.
- Los períodos de tratamiento para un curso de terapia pueden abarcar una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, ocho semanas, nueve semanas, diez semanas, once semanas, doce semanas, trece semanas, catorce semanas, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, un año, dos años, tres años, cuatro años, cinco años o más tiempo. Los períodos de tratamiento pueden ser interrumpidos por períodos de descanso que pueden abarcar un día, una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas, seis semanas, siete semanas, ocho semanas, nueve semanas, diez semanas, once semanas, doce semanas, trece semanas, catorce semanas, cuatro meses, cinco meses, seis meses, siete meses, ocho meses, nueve meses, diez meses, once meses, un año, dos años, tres años, cuatro años, cinco años o más tiempo. Tales determinaciones las puede hacer un experto en la técnica (por ejemplo, un médico).
- En particular, el tratamiento es continuo durante 14 días, seguidos de ningún tratamiento durante 14 días, seguidos de tratamiento continuo durante 14 días adicionales. Específicamente, la dosis dada durante los segundos 14 días de tratamiento es mayor que la dada durante los primeros 14 días de tratamiento. A modo de ejemplo, se administran a un paciente que lo necesite tres dosis de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, 4 mg/kg, 4 mg/kg y 8 mg/kg) en un período de 24 horas durante 14 días consecutivos, seguidos de 14 días sin tratamiento, seguidos por la administración de tres dosis de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, 10 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg) en un período de 24 horas durante 14 días consecutivos adicionales.
- Específicamente, el tratamiento es continuo durante 28 días. El tratamiento continuo puede interrumpirse durante uno o más días, meses, semanas o años. El tratamiento continuo también puede ir seguido de un período de descanso que dure uno o más días, meses, semanas o años, reanudándose el tratamiento continuo después del período de descanso.
- Específicamente, se administra ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable según las dosis y esquemas de dosificación descritos en la presente memoria en combinación con un segundo agente activo (por ejemplo, de manera simultánea o secuencial). En particular, se administra ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable según las dosis y esquemas de dosificación descritos en la presente memoria en combinación con un aminoglucósido, un corticosteroide, una enzima pancreática, un antibiótico, insulina, un agente hipoglucémico, un ácido graso omega-3, un agente quimioterapéutico o una terapia de reemplazo enzimático. La administración del segundo agente activo puede realizarse por vía tópica, enteral (por ejemplo oral, duodenal, rectal), parenteral (por ejemplo intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intradérmica o interaperitoneal) o intratecal. Específicamente, se administra ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable según las dosis y esquemas de dosificación descritos en la presente memoria en combinación con terapia de radiación.
- Se entenderá que las cantidades de agente activo administradas a un paciente que lo necesite se calculan o se pueden calcular basándose en el peso real del paciente en cuestión o en el peso promedio de la población de pacientes en cuestión (por ejemplo, varones blancos, mujeres blancas, varones afroamericanos, mujeres afroamericanas, varones asiáticos o mujeres asiáticas, con inclusión de adultos y niños).

4.5 Concentraciones plasmáticas

- En una realización, la invención se refiere a un método para mantener una concentración plasmática de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable mayor de: aproximadamente 0,1 µg/ml, aproximadamente 0,5 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 25 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 150 µg/ml, aproximadamente 200 µg/ml, aproximadamente 250 µg/ml o aproximadamente 500 µg/ml en un paciente durante al menos

aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 12 o 24 horas o más tiempo, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, la administración se realiza por vía oral. Los niveles plasmáticos de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable se pueden medir, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC, por sus siglas en inglés).

En otra realización, la invención se refiere a un método para mantener una concentración plasmática de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 500 µg/ml o aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml en un paciente durante al menos aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 12 o 24 horas o más tiempo, que comprende administrar un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable una, dos o tres veces por día en la misma dosis o en dosis crecientes (por ejemplo, 1X, 1X, 2X tal como se ha descrito en la presente memoria). En una realización particular, la administración se realiza por vía oral.

En una realización particular, se mantiene el nivel plasmático de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable de un paciente por encima de aproximadamente 2 µg/ml durante al menos aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 12 o 24 horas o más tiempo mediante la administración del agente activo una, dos o tres veces por día a un paciente que lo necesite. En otra realización, se mantiene el nivel plasmático de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable de un paciente entre aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 10 µg/ml durante al menos aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 12 o 24 horas o más tiempo mediante la administración del agente activo una, dos o tres veces por día a un paciente que lo necesite. En una realización particular, se mantiene el nivel plasmático de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable de un paciente por encima de aproximadamente 10 µg/ml durante al menos aproximadamente 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 8, 12 o 24 horas o más tiempo mediante la administración del agente activo una, dos o tres veces por día a un paciente que lo necesite. En una realización particular, la administración se realiza por vía oral.

Se proporcionan en la presente memoria métodos para conseguir una $C_{m\acute{a}x}$ de 1 µg/mL a 1.000 µg/mL, 1 µg/mL a 750 µg/mL, 1 µg/mL a 500 µg/mL, 1 µg/mL a 400 µg/mL, 1 µg/mL a 300 µg/mL, 1 µg/mL a 250 µg/mL, 1 µg/mL a 200 µg/mL, 1 µg/mL a 150 µg/mL, 1 µg/mL a 100 µg/mL, 1 µg/mL a 50 µg/mL, 1 µg/mL a 40 µg/mL, 1 µg/mL a 30 µg/mL, 1 µg/mL a 20 µg/mL, 1 µg/mL a 10 µg/mL o bien 10 µg/mL a 30 µg/mL de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en un paciente que comprenden administrar una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable una, dos o tres veces por día a un paciente que lo necesite.

En particular, se proporcionan en la presente memoria métodos para conseguir una ABC_{0-24} (área bajo la curva) de 50 µg·hora/mL a 1.000 µg·hora/mL, 50 µg·hora/mL a 750 µg·hora/mL, 50 µg·hora/mL a 500 µg·hora/mL, 50 µg·hora/mL a 400 µg·hora/mL, 50 µg·hora/mL a 300 µg·hora/mL, 50 µg·hora/mL a 250 µg·hora/mL, 50 µg·hora/mL a 200 µg·hora/mL, 50 µg·hora/mL a 150 µg·hora/mL, o bien 50 µg·hora/mL a 100 µg·hora/mL de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en un paciente que comprenden administrar una cantidad eficaz de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable una, dos o tres veces por día a un paciente que lo necesite.

También se describe en la presente memoria un método para administrar a un paciente que lo necesite ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, que proporciona un perfil plasmático *in vivo* con un intervalo de confianza (IC) de 90% para una relación transformada a logaritmo natural dentro de 80% a 125%, 90% a 115% o bien 95% a 110% para al menos uno de los siguientes parámetros de biodisponibilidad de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable:

- (a) una ABC_{0-24} media de 87 µg·hora/mL en el día 1 de administración o bien 91 µg·hora/mL en el día 28 de administración;
- (b) una $C_{m\acute{a}x}$ media de 10 µg/mL en el día 1 de administración o bien 11 µg/mL en el día 28 de administración; y
- (c) una $C_{m\acute{i}n}$ media de 0,5 µg/mL en el día 1 de administración o bien 0,6 µg/mL en el día 28 de administración.

También se describe en la presente memoria un método para administrar a un paciente que lo necesite ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, que proporciona un perfil plasmático *in vivo* con un IC de 90% para una relación transformada a logaritmo natural dentro de 80% a 125%, 90% a 115% o bien 95% a 110% para al menos uno de los siguientes parámetros de biodisponibilidad de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable:

- (a) una ABC_{0-24} media de 291 µg·hora/mL en el día 1 de administración o bien 235 µg·hora/mL en el día 28 de administración;

- (b) una $C_{m\acute{a}x}$ media de 27 $\mu\text{g/mL}$ en el día 1 de administración o bien 22 $\mu\text{g/mL}$ en el día 28 de administración; y
 (c) una $C_{m\acute{i}n}$ media de 3,8 $\mu\text{g/mL}$ en el día 1 de administración o bien 3,4 $\mu\text{g/mL}$ en el día 28 de administración.

También se describe en la presente memoria un método para administrar a un paciente que lo necesite ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, que proporciona un perfil plasmático *in vivo* con un IC de 90% para una relación transformada a logaritmo natural dentro de 80% a 125%, 90% a 115% o bien 95% a 110% para al menos uno de los siguientes parámetros de biodisponibilidad de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable:

- 5 (a) una ABC_{0-24} media de 866 $\mu\text{g}\cdot\text{hora/mL}$ en el día 1 de administración o bien 490 $\mu\text{g}\cdot\text{hora/mL}$ en el día 28 de administración;
 10 (b) una $C_{m\acute{a}x}$ media de 76 $\mu\text{g/mL}$ en el día 1 de administración o bien 46 $\mu\text{g/mL}$ en el día 28 de administración; y
 (c) una $C_{m\acute{i}n}$ media de 9,6 $\mu\text{g/mL}$ en el día 1 de administración o bien 6,7 $\mu\text{g/mL}$ en el día 28 de administración.

4.6 Poblaciones de pacientes

- 15 Poblaciones particulares de pacientes para las cuales son útiles los métodos y composiciones descritos en la presente memoria incluyen adultos y niños que tienen o son susceptibles de tener (por ejemplo, debido a factores ambientales o genéticos) una enfermedad asociada con una mutación sin sentido, tales como las que se describen en la presente memoria.

Se ha determinado mediante ensayo exploratorio previo que el paciente o un familiar del paciente tiene una mutación sin sentido (es decir, UAA, UGA o UAG).

20 4.7 Composiciones farmacéuticas y presentaciones unitarias

También se describen en la presente memoria composiciones farmacéuticas y presentaciones unitarias individuales que comprenden ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Las presentaciones individuales descritas en la presente memoria pueden ser adecuadas para administración por vía oral, mucosal (que incluye sublingual, bucal, rectal, nasal o vaginal) o parenteral (que incluye subcutánea, intramuscular, inyección en bolo, intraarterial o intravenosa). Las composiciones farmacéuticas y presentaciones unitarias individuales preferidas son adecuadas para la administración por vía oral.

- 25 Tal como se describe en la presente memoria, la composición farmacéutica es una presentación oral sólida. Específicamente, la composición farmacéutica es una presentación oral líquida. También se describen en la presente memoria presentaciones unitarias y composiciones farmacéuticas en donde está biodisponible por vía oral
 30 ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Las ventajas de la administración por vía oral pueden incluir facilidad de administración, mayor cumplimiento del paciente con el régimen de administración, eficacia clínica, menos complicaciones, estancia hospitalaria más corta y un ahorro global de costes.

- 35 También se describen en la presente memoria presentaciones unitarias que comprenden entre aproximadamente 35 mg y aproximadamente 1.400 mg, aproximadamente 125 mg y aproximadamente 1.000 mg, aproximadamente 250 mg y aproximadamente 1.000 mg, o aproximadamente 500 mg y aproximadamente 1.000 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo. Específicamente, la formulación de dosis unitaria comprende ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable y uno o más vehículos o excipientes adecuados para suspensión en un disolvente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo agua, leche, una bebida carbonatada, zumo, jarabe de manzana, alimento infantil o leche infantil) en un frasco.
 40

- También se describen en la presente memoria presentaciones unitarias que comprenden 35 mg, 50 mg, 70 mg, 100 mg, 125 mg, 140 mg, 175 mg, 200 mg, 250 mg, 280 mg, 350 mg, 500 mg, 560 mg, 700 mg, 750 mg, 1.000 mg o 1.400 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal farmacéuticamente aceptable, solvato o hidrato del mismo. Las formulaciones de dosis unitaria preferidas comprenden aproximadamente 125 mg, aproximadamente 250 o aproximadamente 1.000 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Específicamente, la formulación de dosis unitaria comprende ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable y uno o más vehículos o excipientes adecuados para suspensión en un disolvente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo agua, leche, una bebida carbonatada, zumo, jarabe de manzana, alimento infantil o leche infantil) en un frasco. Las presentaciones unitarias preferidas son polvos y sobres.
 45
 50

- También se describe en la presente memoria una presentación sólida que comprende 250 mg, 500 mg, 750 mg o 1.000 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable que cuando es administrada a un paciente que lo necesite en tres dosis diarias de
 55 4 mg/kg, 4 mg/kg y 8 mg/kg, respectivamente, proporciona un perfil plasmático *in vivo* con un intervalo de confianza (IC) de 90% para una relación transformada a logaritmo natural dentro de 80% a 125%, 90% a 115% o bien 95% a 110% para al menos uno de los siguientes parámetros de biodisponibilidad de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable:

- (a) una ABC_{0-24} media de 87 $\mu\text{g}\cdot\text{hora}/\text{mL}$ en el día 1 de administración o bien 91 $\mu\text{g}\cdot\text{hora}/\text{mL}$ en el día 28 de administración;
 (b) una $C_{\text{máx}}$ media de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 1 de administración o bien 11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 28 de administración; y
 (c) una $C_{\text{mín}}$ media de 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 1 de administración o bien 0,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 28 de administración.

- 5 También se describe en la presente memoria una presentación sólida que comprende 250 mg, 500 mg, 750 mg o 1.000 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable que cuando es administrada a un paciente que lo necesite en tres dosis diarias de 10 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg, respectivamente, proporciona un perfil plasmático *in vivo* con un IC de 90% para una relación transformada a logaritmo natural dentro de 80% a 125%, 90% a 115% o bien 95% a 110% para al
 10 menos uno de los siguientes parámetros de biodisponibilidad de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable:
 (a) una ABC_{0-24} media de 291 $\mu\text{g}\cdot\text{hora}/\text{mL}$ en el día 1 de administración o bien 235 $\mu\text{g}\cdot\text{hora}/\text{mL}$ en el día 28 de administración;
 (b) una $C_{\text{máx}}$ media de 27 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 1 de administración o bien 22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 28 de administración; y
 15 (c) una $C_{\text{mín}}$ media de 3,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 1 de administración o bien 3,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 28 de administración.

- También se describe en la presente memoria una presentación sólida que comprende 250 mg, 500 mg, 750 mg o 1.000 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable que cuando es administrada a un paciente que lo necesite en tres dosis diarias de 20 mg/kg, 20 mg/kg y 40 mg/kg, respectivamente, proporciona un perfil plasmático *in vivo* con un IC de 90% para una relación transformada a logaritmo natural dentro de 80% a 125%, 90% a 115% o bien 95% a 110% para al
 20 menos uno de los siguientes parámetros de biodisponibilidad de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable:
 (a) una ABC_{0-24} media de 866 $\mu\text{g}\cdot\text{hora}/\text{mL}$ en el día 1 de administración o bien 490 $\mu\text{g}\cdot\text{hora}/\text{mL}$ en el día 28 de administración;
 25 (b) una $C_{\text{máx}}$ media de 76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 1 de administración o bien 46 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 28 de administración; y
 (c) una $C_{\text{mín}}$ media de 9,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 1 de administración o bien 6,7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en el día 28 de administración.

- Aunque se recomienda que las presentaciones unitarias descritas en la presente memoria se almacenen entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 8°C, las presentaciones unitarias se pueden almacenar a temperatura ambiente durante aproximadamente 48 horas antes de reconstituirlas. Específicamente, la reconstitución de una
 30 presentación unitaria de 250 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable se lleva a cabo mediante la adición de aproximadamente 10 mL de agua directamente a un frasco que contiene ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable para conseguir una concentración de aproximadamente 25 mg/mL en el volumen total de suspensión. Para una presentación unitaria de 1.000 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, se añaden
 35 aproximadamente 20 mL de agua directamente al frasco que contiene ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable para conseguir una concentración de aproximadamente 50 mg/mL en el volumen total de suspensión. Inmediatamente después haber añadido el agua, se tapa el frasco y se agita suavemente a mano durante al menos aproximadamente 30 segundos con el fin de lograr una suspensión homogénea. Aunque la suspensión reconstituida puede permanecer en el frasco de plástico original hasta 24 horas antes de ingerirla, se recomienda tomar el medicamento poco después de reconstituido. Si se produce un retraso de más de aproximadamente 15 minutos entre la reconstitución y la administración de la dosis, se recomienda volver a agitar suavemente el frasco a mano durante al menos aproximadamente 30 segundos. Se recomienda administrar la suspensión directamente desde el frasco. Si hay que administrar toda la presentación unitaria, se recomienda además enjuagar una vez con agua el frasco e ingerir este agua de enjuague para asegurar que no se deja en el frasco nada de polvo. Si hay que administrar una cantidad parcial de la presentación unitaria, se puede utilizar una cuchara o una jeringa para obtener la dosis apropiada.

- Las presentaciones unitarias individuales descritas en la presente memoria y adecuadas para administración por vía oral a un paciente incluyen: sobres; sellos; comprimidos; comprimidos con forma de cápsula o "caplets"; cápsulas, tales como cápsulas de gelatina elástica blanda; trociscos; pastillas; dispersiones; polvos; soluciones; presentaciones líquidas, que incluyen suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas); emulsiones (por ejemplo, emulsiones de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite); y elixires. También se describe en la presente memoria una solución coloidal o una solución con agente activo adicional, por encima de la concentración de saturación. Estas y otras maneras en las que diferirán entre sí presentaciones específicas serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª ed., Mack Publishing, Easton PA (1990).

- Se describen además en la presente memoria composiciones farmacéuticas y presentaciones anhidras que comprenden ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Se pueden preparar composiciones farmacéuticas y presentaciones anhidras según la invención utilizando ingredientes anhidros o que contienen escasa humedad, y condiciones de baja humedad.

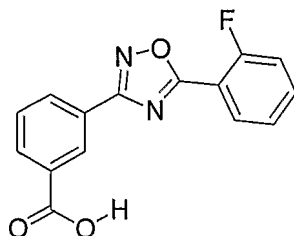
Las presentaciones orales típicas descritas en la presente memoria se preparan combinando el o los ingredientes

activos en mezcla íntima con al menos un vehículo o excipiente, según técnicas de formulación farmacéutica convencionales. Los excipientes pueden adoptar una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Por ejemplo, los excipientes adecuados para uso en presentaciones orales líquidas o en aerosol incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes (por ejemplo, extracto de vainilla), conservantes y agentes colorantes. Los ejemplos de excipientes adecuados para uso en presentaciones orales sólidas (por ejemplo, polvos, comprimidos, sobres, cápsulas y "caplets") incluyen almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes para granulación, lubricantes, aglutinantes y agentes disgregantes.

Son formulaciones de dosis unitaria particularmente preferidas las formulaciones en polvo que comprenden una cantidad eficaz del agente activo que son adecuadas para reconstitución en un disolvente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo agua, leche, una bebida carbonatada, zumo, jarabe de manzana, alimento infantil o leche infantil) y subsiguiente administración por vía oral. En particular, el polvo puede contener opcionalmente uno o más vehículos o excipientes en combinación con el agente activo. Como alternativa, se puede almacenar el polvo en un recipiente herméticamente cerrado antes de administrarlo o reconstituirlo. Como alternativa, se puede encapsular el polvo (por ejemplo, en una cápsula de gelatina).

5. Ejemplos

5.1 Ejemplo 1: Preparación de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico



En la patente de EE.UU. nº 6,992,096 B2, expedida el 31 de enero de 2006, y en la solicitud de patente de EE.UU. nº 11/899,813, presentada el 9 de septiembre de 2007 se describen procedimientos para preparar ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico. Se expone a continuación un ejemplo representativo de un procedimiento para preparar ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico.

Se añadió K_2CO_3 (62,19 g, 450 mmol) a una solución de ácido 3-cianobenzoico (44,14 g, 300 mmol) en DMF (0,6 L) y después se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se añadió a la suspensión yoduro de metilo (28 mL, 450 mmol) en el transcurso de 20 minutos, y se agitó la mezcla de reacción 4 horas más a temperatura ambiente. Se vertió la mezcla de reacción en 1,2 L de agua de hielo y se agitó durante 30 minutos, y se separó por filtración el precipitado. Se disolvió en metanol (70 mL) la torta blanca y luego se volvió a precipitar en agua fría. Se obtuvo el producto deseado en forma de un polvo blanco con rendimiento de 79% (38 g, 99% de pureza por CL/UV). 1H -RMN ($CDCl_3$) δ 8,85 (2H), 8,28 (1H), 8,02 (1H), 4,17 (3H).

Se añadió a temperatura ambiente hidroxilamina acuosa al 50% (41 mL, 620 mmol) a una solución de éster metílico de ácido 3-cianobenzoico (50 g, 310 mmol) en etanol (500 mL). Se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora a 100 °C y se eliminaron bajo presión reducida los disolventes. Se disolvió el residuo aceitoso en etanol/tolueno 20/80 (50 mL x 2) y después se concentró de nuevo. Se obtuvo el éster deseado (61 g, rendimiento cuant.) en forma de un polvo blanco con 98% de pureza (CL/UV). 1H -RMN ($CDCl_3$) δ 9,76 (1H), 8,24 (1H), 7,82 (2H), 7,51 (1H), 5,92 (2H), 3,82 (3H).

Se añadió a 5 °C diisopropiletilamina (75 mL, 434 mmol) a una solución de éster metílico de ácido 3-(N-hidroxycarbamimidoil)-benzoico (60 g, 310 mmol) en THF anhidro (200 mL), y luego se añadió a la mezcla cloruro de 2-fluorobenzoilo (48,1 mL, 403 mmol) en el transcurso de 20 minutos. Se agitó la mezcla de reacción durante 1 hora a temperatura ambiente. Se separó por filtración el precipitado y se concentró bajo presión reducida el filtrado. Se disolvió en acetato de etilo (400 mL) el residuo y después se lavó con agua (200 mL x 2). Se eliminó bajo presión reducida el disolvente y se cristalizó el producto deseado en 60% de acetato de etilo en hexano para proporcionar el producto deseado (81 g, rendimiento 83%) en forma de un sólido blanco. 1H -RMN ($CDCl_3$) δ 8,18 (1H), 8,03 (3H), 7,48 (2H), 7,18 (2H), 5,61 (2H), 3,82 (3H).

Se hicieron refluir durante 4 horas a 130 °C, utilizando un aparato Dean-Stark, 44 g de éster metílico de ácido 3-(N-2-fluorobenzoilcarbamimidoil)-benzoico en tolueno (500 mL). Se agitó la mezcla de reacción a 5 °C durante 18 horas. Se separó por filtración el precipitado blanco y se concentró el filtrado, y se cristalizó de nuevo en tolueno. Se obtuvo el oxadiazol deseado (38 g, rendimiento 92%) en forma de un sólido blanco con 99% de pureza (CL/UV). 1H -RMN ($CDCl_3$) δ 8,91 (1H), 8,38 (1H), 8,15 (2H), 7,62 (2H), 7,35 (2H), 3,95 (3H).

Se añadió NaOH acuoso 1,5 M (10 mL, 14 mmol) a una solución de éster metílico de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico (3,3 g, 11 mmol) en THF (40 mL). Se hizo refluir la mezcla de reacción durante 2 horas a 100 °C. Se eliminó el disolvente orgánico y se diluyó con agua (50 mL) la solución acuosa, y después se

acidificó con HCl acuoso. Se separó por filtración el precipitado blanco y se lavó con agua fría la torta blanca y luego se secó utilizando un liofilizador. Se obtuvo el ácido deseado (3,0 g, rendimiento 96%) en forma de un polvo blanco con 98% de pureza (CL/UV). Punto de fusión 242 °C; IR 3000 (C-H aromático), 1710 (C=O); ¹H-RMN (D₆-DMSO) δ 8,31 (1H), 8,18 (2H), 8,08 (1H), 7,88 (2H), 7,51 (2H); ¹³C-RMN (D₆-DMSO) δ 172,71, 167,38, 166,48, 161,25, 135,80, 132,24, 131,79, 131,79, 131,08, 130,91, 129,81, 127,76, 125,48, 117,38, 111,70; ¹⁹F-RMN (D₆-DMSO) δ 109,7.

Se pueden preparar sales farmacéuticamente aceptables de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico utilizando métodos conocidos para los expertos en la técnica. La sal de sodio se puede preparar como sigue. Se añadió NaOH acuoso 1,5 M (100 mL, 144 mmol) a una solución de éster metílico de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico (33 g, 111 mol) en THF (400 mL). Se hizo refluir la mezcla de reacción durante 2 horas a 100 °C. Se eliminó bajo presión reducida el disolvente orgánico y se agitó la solución acuosa durante 2 horas a 5 °C. Se separó por filtración el precipitado blanco y se concentró el filtrado y se precipitó de nuevo en agua. Se lavó con agua fría la torta blanca y luego se secó usando un liofilizador. Se obtuvo la sal deseada (33 g, rendimiento 96%) en forma de un polvo blanco con 98,6% de pureza (CL/UV).

5.2 Ejemplo 2: Tratamiento por vía oral de fibrosis quística mediada por mutación sin sentido

El presente ejemplo expone un régimen de administración ilustrativo útil para el tratamiento de fibrosis quística mediada por mutación sin sentido.

Se proporciona ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en forma de un polvo con sabor a vainilla para suspensión. El fármaco ha sido fabricado de acuerdo con las normas de correcta fabricación (NCF o GMP, por sus siglas en inglés) actuales (siglas inglesas: cGMP). La formulación puede incluir agentes aglutinantes y de suspensión, agentes tensioactivos y diversos excipientes secundarios que ayudan al proceso de fabricación. Se puede envasar la mezcla en frascos de plástico (polietileno de alta densidad [PEAD o HDPE, por sus siglas en inglés]) de 40 mL cerrados herméticamente con un cierre de lámina de aluminio y un tapón de plástico blanco, a prueba de niños. Cada frasco puede contener 125, 250 o 1.000 mg de la sustancia farmacológica, que constituye 25,0% del peso total de la formulación. Como alternativa, se puede proporcionar la mezcla en una formulación de sobre, tal como se expone en el Ejemplo 6. Los excipientes (y sus proporciones del peso total de la formulación) incluyen un agente de suspensión (Litesse® Ultra [polidextrosa refinada] - 25,7%), un agente aglutinante que también puede proporcionar enmascaramiento del sabor (manitol - 25,0%), agentes tensioactivos (polietilenglicol 3350 - 12,8% y Lutrol® micro F127 [poloxámero 407 en polvo] - 3,7%), un desintegrante (crospovidona - 5,0%), y pueden estar presentes otros excipientes, cada uno en menos de 2% (hidroxietilcelulosa, sabor a vainilla, estearato de magnesio [no bovino] y sílice coloidal). Las etiquetas del frasco indican la identidad de la sustancia farmacológica, el número de lote, la cantidad de la sustancia farmacológica y las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, temperatura ambiente o refrigerado a una temperatura de 5° a 8°C).

La administración de la dosis de la sustancia farmacológica se basa en miligramos de fármaco por kilogramo de peso corporal del paciente. Se puede redondear la dosis de la sustancia farmacológica para que sea consistente con los tamaños de frasco disponibles. El esquema de administración asegura que la dosis real total dada nunca está <50 mg por debajo o >250 mg por encima de la dosis prevista (es decir, está siempre a menos de 5 mg/kg del nivel de dosis asignado). Por ejemplo, a un paciente que pesa 40 kg que está siendo tratado con la dosis de 4 mg/kg le correspondería una dosis calculada de 160 mg. Este paciente recibiría un frasco de 250 mg (total 250 mg) o 6,25 mg/kg/dosis. Al mismo paciente, si fuese tratado con la dosis de 8 mg/kg por la noche, le correspondería una dosis calculada de 320 mg y recibiría dos frascos de 250 mg (total 500 mg) o 12,5 mg/kg. Al mismo paciente, tratado con la dosis de 10 mg/kg, le correspondería una dosis calculada de 400 mg y recibiría dos frascos de 250 mg (total 500 mg) o 12,5 mg/kg. Al mismo paciente, si fuera tratado con la dosis de 20 mg/kg por la noche, le correspondería una dosis calculada de 800 mg y recibiría un frasco de 1.000 mg (total 1.000 mg) o 25 mg/kg.

La reconstitución y administración de la dosis del producto farmacológico se realiza a temperatura ambiente. No se requiere calentamiento específico del producto farmacológico antes de reconstituirlo. Se puede reconstituir el producto farmacológico con cualquier disolvente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo agua, leche, una bebida carbonatada, zumo, jarabe de manzana, alimento infantil o leche infantil). Para cada frasco de 250 mg proporcionado se añaden ~10 mL de agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable a fin de conseguir una concentración de aproximadamente 25 mg/mL en el volumen total de suspensión. Para cada frasco de 1.000 mg proporcionado se añaden ~20 mL de agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable a fin de conseguir una concentración de aproximadamente 50 mg/mL en el volumen total de suspensión. Inmediatamente después de haber añadido agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable al medicamento de estudio en seco, se tapan el frasco o los frascos y se agitan vigorosamente a mano durante aproximadamente 60 segundos para conseguir la homogeneidad de la suspensión. Aunque la suspensión puede permanecer en el frasco de plástico original hasta 24 horas antes de ingerirla, se recomienda tomar el fármaco poco después de reconstituido. Si se produce un retraso de más de 15 minutos entre la reconstitución y la administración de la dosis, se debe agitar enérgicamente de nuevo el frasco a mano durante aproximadamente 60 segundos.

Se administra de forma continua el tratamiento durante el tiempo que sea necesario a un paciente que padezca o

sea susceptible de padecer fibrosis quística. La Tabla 1 expone regímenes ilustrativos de administración diaria de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, en donde la administración tiene lugar tres veces al día a intervalos de 6, 6 y 12 horas (por ejemplo, a las ~7:00 de la mañana, ~1:00 del mediodía y ~7:00 de la tarde) junto con alimento. En una realización particular, se administra al paciente ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable tal como se expone en la Tabla 1 de forma continua durante 14 días, seguidos de 14 días sin tratamiento, seguidos de 14 días adicionales de administración, seguidos de 14 días adicionales sin tratamiento. Como alternativa, se administra al paciente ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable tal como se expone en la Tabla 1 de forma continua durante 14 días a razón de tres dosis diarias de 4 mg/kg, 4 mg/kg y 8 mg/kg, seguidos de 14 días sin tratamiento, seguidos de 14 días adicionales de administración a razón de tres dosis diarias de 10 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg, seguidos de 14 días adicionales sin tratamiento. Como alternativa, se sigue cada día un único régimen de administración diaria indicado en la Tabla 1. Como alternativa, se pueden seguir en días distintos diferentes regímenes de administración establecidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Esquema de administración de dosis

	1 (referencia)	2 (referencia)	3 (referencia)	4
Régimen	administración t.i.d. con alimento	administración t.i.d. con alimento	administración t.i.d. con alimento	administración t.i.d. con alimento
Programa	administración diaria continua	administración diaria continua	administración diaria continua	administración diaria continua
Tiempo	Dosis			
~7:00 de la mañana	4 mg/kg	7 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
~1:00 del mediodía	4 mg/kg	7 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
~7:00 de la tarde	8 mg/kg	14 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg

Abreviaturas: t.i.d. = tres veces al día

Los pacientes toman preferiblemente el fármaco dentro de los 30 minutos después de una comida; idealmente se tomará el fármaco aproximadamente a intervalos de 6, 6 y 12 horas (por ejemplo, a las ~7:00 de la mañana, después del desayuno, a la ~1:00 del mediodía después del almuerzo y a las ~7:00 de la tarde después de la cena). Los pacientes ingieren el fármaco llenando cada frasco con la cantidad requerida de agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable, tapando y agitando cada frasco durante unos 60 segundos, y después ingiriendo el contenido del número y tamaño requeridos de frascos por dosis. Se debe tomar de una vez la dosis completa del medicamento reconstituido. Después de la ingestión, se llena hasta la mitad cada frasco dosificador con agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable, se tapa y se agita, y el paciente ingiere este agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable del frasco. Este procedimiento de enjuague se lleva a cabo una vez. Específicamente, el medicamento se proporciona en forma de un sobre. En particular, se puede pesar o medir la cantidad apropiada del medicamento y combinarla con un disolvente apropiado farmacéuticamente aceptable antes de administrarla.

5.3 Ejemplo 3: Tratamiento por vía oral de distrofia muscular de Duchenne mediada por mutación sin sentido

El presente ejemplo expone un régimen de administración ilustrativo útil para el tratamiento de distrofia muscular de Duchenne mediada por mutación sin sentido.

Se proporciona ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en forma de un polvo con sabor a vainilla para suspensión. El fármaco ha sido fabricado de acuerdo con las normas de correcta fabricación (NCF) actuales. La formulación puede incluir agentes aglutinantes y de suspensión, agentes tensioactivos y diversos excipientes secundarios que ayudan al proceso de fabricación. Se puede envasar la mezcla en frascos de plástico (polietileno de alta densidad [PEAD]) de 40 mL cerrados herméticamente con un cierre de lámina de aluminio y un tapón de plástico blanco, a prueba de niños. Cada frasco puede contener 125, 250 o 1.000 mg de la sustancia farmacológica, que constituye 25,0% del peso total de la formulación. Como alternativa, se puede proporcionar la mezcla en una formulación de sobre, tal como se expone en el Ejemplo 6. Los excipientes (y sus proporciones del peso total de la formulación) incluyen un agente de suspensión (Litesse[®] Ultra [polidextrosa refinada] - 25,7%), un agente aglutinante que también puede proporcionar enmascaramiento del sabor (manitol - 25,0%), agentes tensioactivos (polietilenglicol 3350 - 12,8% y Lutrol[®] micro F127 [poloxámero 407 en polvo] - 3,7%), un desintegrante (crospovidona - 5,0%), y pueden estar presentes otros excipientes, cada uno en menos de 2% (hidroxietilcelulosa, sabor a vainilla, estearato de magnesio [no bovino] y sílice coloidal). Las etiquetas del frasco indican la identidad de la sustancia farmacológica, el número de lote, la cantidad de la sustancia farmacológica y las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, temperatura ambiente o refrigerado a una temperatura de 5° a 8°C).

La administración de dosis del fármaco se basa en miligramos de fármaco por kilogramo de peso corporal del paciente. Se debe calcular el volumen total correspondiente a la cantidad total en miligramos de fármaco que hay

que administrar a un paciente. Por ejemplo, si un paciente de 30 kg debe recibir 4 mg/kg, la dosis a suministrar será $30 \times 4 = 120$ mg. A este paciente se le debe administrar la dosis con el frasco de dosis de 250 mg. Puesto que cada mL de suspensión del frasco de la dosis de 250 mg contiene $250/10 = 25$ mg del fármaco, este paciente debe recibir $120/25 = \sim 5$ mL de la suspensión para cada dosis de 4 mg/kg). Al mismo paciente, si fuera tratado con la dosis de 8 mg/kg por la noche, le correspondería una dosis calculada de 240 mg y recibiría un frasco de 250 mg (10 mL de suspensión). Estos volúmenes de suspensiones para las dosis respectivas deben ser extraídos del frasco de medicamento utilizando una jeringa dosificadora de plástico para administración vía oral. Para transferir volúmenes fraccionarios de <10 mL (para el frasco de 250 mg) o <20 mL (para el frasco de 1.000 mg), se debe extraer del frasco de medicación en estudio la cantidad deseada mediante una jeringa dosificadora de un tipo y tamaño apropiado (por ejemplo, una jeringa dosificadora de plástico para administración por vía oral calibrada, exenta de látex, Baxa Exacta-Med) y administrarla usando la misma jeringa. Durante las mismas 24 horas después de la reconstitución, se pueden tomar del mismo frasco de suspensión >1 dosis; sin embargo, el fármaco reconstituido no debe guardarse más allá de 24 horas con la intención de utilizar de nuevo este material para dosis múltiples en el mismo paciente. Si la cantidad total de fármaco que debe tomarse en 1 día supera los 10 mL (para el frasco de 250 mg) o 20 mL (para el frasco de 1.000 mg) del fármaco reconstituido, entonces se debe utilizar para cada administración de dosis un nuevo frasco de fármaco.

La reconstitución y la dosificación del producto farmacológico se realiza a temperatura ambiente. No se requiere calentamiento específico del producto farmacológico antes de reconstituirlo. Se puede reconstituir el producto farmacológico con cualquier disolvente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo agua, leche, una bebida carbonatada, zumo, jarabe de manzana, alimento infantil o leche infantil). Para cada frasco de 250 mg proporcionado se añaden ~ 10 mL de agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable a fin de conseguir una concentración de aproximadamente 25 mg/mL en el volumen total de suspensión. Para cada frasco de 1.000 mg proporcionado se añaden ~ 20 mL de agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable a fin de conseguir una concentración de aproximadamente 50 mg/mL en el volumen total de suspensión. Inmediatamente después de haber añadido agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable al medicamento de estudio en seco, se tapan el frasco o los frascos y se agitan vigorosamente a mano durante aproximadamente 60 segundos para conseguir la homogeneidad de la suspensión. Aunque la suspensión puede permanecer en el frasco de plástico original hasta 24 horas antes de ingerirla, se recomienda tomar el fármaco poco después de reconstituido. Si se produce un retraso de más de 15 minutos entre la reconstitución y la administración de la dosis, se debe agitar enérgicamente de nuevo el frasco a mano durante aproximadamente 60 segundos.

Se administra de forma continua el tratamiento durante el tiempo que sea necesario a un paciente que padezca o sea susceptible de padecer distrofia muscular de Duchenne. La Tabla 2 expone regímenes ilustrativos de administración diaria de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, en donde la administración tiene lugar tres veces al día a intervalos de 6, 6 y 12 horas (por ejemplo, a las $\sim 7:00$ de la mañana, $\sim 1:00$ del mediodía y $\sim 7:00$ de la tarde) junto con alimento. En una realización particular, se administra al paciente ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en uno de los regímenes de administración establecidos en la Tabla 2 de forma continua durante 28 días. En ciertas realizaciones, se sigue cada día un único régimen de administración diaria indicado en la Tabla 2. En otras realizaciones, se pueden seguir en días distintos diferentes regímenes de administración establecidos en la Tabla 2. En ciertas realizaciones, se proporciona el fármaco en un sobre. En estas realizaciones, se puede pesar o medir la cantidad apropiada del fármaco y combinarla con un disolvente apropiado farmacéuticamente aceptable antes de administrarla.

Tabla 2. Esquema de administración de dosis

	1 (referencia)	2 (referencia)	3 (referencia)	4
Régimen	administración t.i.d con alimento	administración t.i.d con alimento	administración t.i.d con alimento	administración t.i.d con alimento
Programa	administración diaria continua	administración diaria continua	administración diaria continua	administración diaria continua
Tiempo	Dosis			
$\sim 7:00$ de la mañana	4 mg/kg	7 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
$\sim 1:00$ del mediodía	4 mg/kg	7 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
$\sim 7:00$ de la tarde	8 mg/kg	14 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg

45 Abreviaturas: t.i.d. = tres veces al día

Se administra el fármaco a los pacientes dentro de los 30 minutos después de una comida; idealmente se tomará el fármaco aproximadamente a intervalos de 6, 6 y 12 horas (por ejemplo, a las $\sim 7:00$ de la mañana, después del desayuno, a la $\sim 1:00$ del mediodía después del almuerzo y a las $\sim 7:00$ de la tarde después de la cena). Los pacientes ingieren el fármaco llenando cada frasco con la cantidad requerida de agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable, tapando y agitando cada frasco durante unos 60 segundos, extrayendo la cantidad apropiada de volumen del frasco mediante una jeringa dosificadora para administración por vía oral e ingiriendo el

contenido directamente desde la jeringa dosificadora. Se debe tomar de una vez todo el volumen calculado del fármaco reconstituido correspondiente a la dosis. Después de la ingestión del fármaco, se debe llenar la jeringa dosificadora con el mismo volumen de agua u otro disolvente farmacéuticamente aceptable que el volumen de la dosis, y debe ser ingerido por el paciente. Este procedimiento de enjuague debe llevarse a cabo una vez.

- 5 La eficacia del tratamiento se puede determinar midiendo la variación desde el valor inicialmente medido de los niveles de distrofina en una biopsia del músculo del pie extensor corto de los dedos (nombre en latín: extensor digitorum brevis (EDB)).

5.4 Ejemplo 4: Preparación de presentaciones no saborizadas de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable (sólo para referencia)

- 10 Se proporciona ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en forma de un polvo para suspensión. El fármaco ha sido fabricado de acuerdo con las normas de correcta fabricación (NCF) actuales. Se puede mezclar íntimamente el fármaco con agentes aglutinantes y de suspensión, agentes tensioactivos y diversos excipientes secundarios que ayudan al proceso de fabricación. Se envasa la mezcla en un frasco de plástico (polietileno de alta densidad [PEAD]) de 40 mL cerrado herméticamente con un cierre de lámina de aluminio y un tapón de plástico blanco, a prueba de niños. Cada frasco puede contener aproximadamente 35 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 560 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 1.000 mg o aproximadamente 1.400 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Los excipientes (y sus proporciones del peso total de la formulación) incluyen opcionalmente un agente de suspensión (Litesse[®] Ultra [polidextrosa refinada] - 25,7%), un agente aglutinante que también puede proporcionar enmascaramiento del sabor (manitol - 25,0%), agentes tensioactivos (polietilenglicol 3350 - 12,8% y Lutrol[®] micro F 127 [poloxámero 407 en polvo] - 3,7%), un desintegrante (crospovidona - 5,0%), y pueden estar presentes otros excipientes, cada uno en menos de 2% (Cab-O-Sil, hidroxietilcelulosa, estearato de magnesio [no bovino] y sílice coloidal). Después se etiqueta el frasco para indicar la identidad de la sustancia farmacológica, el número de lote, la cantidad de la sustancia farmacológica y las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, refrigerado a una temperatura de 5° a 8°C). Antes de administrarlo, se reconstituye el producto farmacológico en un volumen apropiado de un disolvente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo agua, leche, una bebida carbonatada, zumo, jarabe de manzana, alimento infantil o leche infantil).

- 30 5.5 Ejemplo 5: Preparación de presentaciones saborizadas de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable (sólo para referencia)

- Se proporciona ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable en forma de un polvo para suspensión con sabor a vainilla (por ejemplo, por adición de extracto de vainilla). El fármaco ha sido fabricado de acuerdo con las normas de correcta fabricación (NCF) actuales. Se puede mezclar íntimamente el fármaco con agentes aglutinantes y de suspensión, agentes tensioactivos y diversos excipientes secundarios que ayudan al proceso de fabricación. Se envasa la mezcla en un frasco de plástico (polietileno de alta densidad [PEAD]) de 40 mL cerrado herméticamente con un cierre de lámina de aluminio y un tapón de plástico blanco, a prueba de niños. Cada frasco puede contener aproximadamente 35 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 560 mg, aproximadamente 700 mg, aproximadamente 1.000 mg o aproximadamente 1.400 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Los excipientes (y sus proporciones del peso total de la formulación) incluyen opcionalmente un agente de suspensión (Litesse[®] Ultra [polidextrosa refinada] - 25,7%), un agente aglutinante que también puede proporcionar enmascaramiento del sabor (manitol - 25,0%), agentes tensioactivos (polietilenglicol 3350 - 12,8% y Lutrol[®] micro F127 [poloxámero 407 en polvo] - 3,7%), un desintegrante (crospovidona - 5,0%), y pueden estar presentes otros excipientes, cada uno en menos de 2% (Cab-O-Sil, hidroxietilcelulosa, sabor a vainilla, estearato de magnesio [no bovino] y sílice coloidal). Después se etiqueta el frasco para indicar la identidad de la sustancia farmacológica, el número de lote, la cantidad de la sustancia farmacológica y las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, refrigerado a una temperatura de 2° a 8 C. Antes de administrarlo, se reconstituye el producto farmacológico en un volumen apropiado de un disolvente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo agua, leche, una bebida carbonatada, zumo, jarabe de manzana, alimento infantil o leche infantil). El producto farmacológico se puede conservar a temperatura ambiente durante 48 horas, como máximo, antes de reconstituirlo.

- 55 5.6 Ejemplo 6: Formulación en sobre de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable (sólo para referencia)

- Se envasa la mezcla usando una bolsa o sobre que se compone de múltiples capas estratificadas que pueden incluir una capa de papel, una capa de lámina de aluminio y una capa de Surllyn. Cada sobre puede contener aproximadamente 125 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 500 mg o aproximadamente 1.000 mg de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable. Los excipientes (y sus proporciones del peso total de la formulación) opcionalmente incluyen uno u otro

de lo que sigue tal como se expone en la Tabla 3 y en la Tabla 4.

Tabla 3. Formulación

Ingrediente	% en peso
ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable	25,0
Litesse [®] Ultra	24,75
polietilenglicol	12,8
Lutrol [®] Micro	3,7
manitol	25,0
hidroxietilcelulosa	1,5
sabor a vainilla	0,75
crospovidona	5,0
Cab-O-Sil	0,5
estearato de magnesio	0,5
talco	0,5

Tabla 4. Formulación

Ingrediente	% en peso
ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable	25,0
Litesse [®] Ultra	25,65
polietilenglicol	12,8
Lutrol [®] Micro	3,7
manitol	25,0
hidroxietilcelulosa	1,5
sabor a vainilla	0,75
crospovidona	5,0
Cab-O-Sil	0,1
estearato de magnesio	0,5

5

Después se etiqueta el sobre para indicar la identidad de la sustancia farmacológica, el número de lote, la cantidad de la sustancia farmacológica y las condiciones de almacenamiento (por ejemplo, refrigerado a una temperatura de 2° a 8°C). Antes de administrarlo, se reconstituye una cantidad apropiada del producto farmacológico en un volumen apropiado de un disolvente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo agua, leche, una bebida carbonatada, zumo, jarabe de manzana, alimento infantil o leche infantil). El producto farmacológico se puede conservar a temperatura ambiente durante 48 horas, como máximo, antes de reconstituirlo.

10

5.7 Ejemplo 7: Ensayo de diferencia de potencial transepitelial (DPTE) (sólo para referencia)

15

La medida de la diferencia de potencial transepitelial (DPTE o TEPD, por sus siglas en inglés), también conocida como diferencia de potencial nasal, proporciona una evaluación sensible del transporte de sodio y de cloruro directamente en las células epiteliales secretoras a través de la evaluación de las propiedades bioeléctricas transepiteliales (Knowles *et al.*, 1981, *N. Engl. J. Med.* 305 (25):1489-1495; Knowles *et al.*, 1995, *Hum. Gene Ther.* 6:445). Se determina la DPTE en cada fosa nasal usando técnicas estandarizadas (Standaert *et al.*, 2004, *Ped. Pulm.* 37:385-92). En el procedimiento se utiliza un pequeño catéter de plástico para evaluar las diferencias eléctricas a través de la membrana celular externa de las células de mucosa nasal de la fosa nasal. Los valores de DPTE se expresan en milivoltios, mV. Se considera en general que una conductancia de cloruro igual o más eléctricamente negativa que -5,0 mV está en el intervalo normal. Se realizan evaluaciones de DPTE en las células del epitelio nasal que revisten el cornete inferior ya que estas células son accesibles con más facilidad que las células epiteliales respiratorias que revisten las vías respiratorias inferiores, y se ha demostrado que tienen las mismas características de transporte iónico (Knowles *et al.*, 1981, *Am. Rev. Respir. Dis.* 124(4):484-90). También se pueden realizar evaluaciones de DPTE en células epiteliales rectales y células epiteliales de vías respiratorias inferiores. Debido al papel de la proteína CFTR en el transporte de iones cloruro a través de las membranas

25

celulares, y debido a la ausencia de esta proteína, los pacientes con fibrosis quística (FQ) tienen una conductancia de cloruro por DPTE anormal. Como criterio de valoración, la DPTE tiene la ventaja de que puede detectar cambios en el transporte de cloruro que son una integración cuantitativa de la presencia, actividad funcional y localización apical de la CFTR en las células de las vías respiratorias. Además, es una medida directa de la actividad de CFTR que no es probable que se vea afectada por los tratamientos de apoyo o paliativos de la FQ (con la posible excepción de antibióticos aminoglucósidos administrados por vía sistémica). Es importante la evidencia de que los valores de DPTE pueden correlacionarse con el grado de disfunción pulmonar y anomalía radiográfica (Ho *et al.*, 1997, *Eur. Respir. J.* 10(9):2018-22; Fajac *et al.*, 1998, *Eur. Respir. J.* 12(6):1295-300; Sermet-Gaudelus *et al.*, 2005, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171(9):1026-1031). En particular, la evaluación por DPTE de la actividad de cloruro de CFTR inducida por isoproterenol ha demostrado mejor valor predictivo que el genotipo para determinar el VEF₁ y la puntuación radiológica (Ho *et al.*, 1997, *Eur. Respir. J.* 10(9):2018-22). En condiciones iniciales, es muy poco probable que la actividad de canal de cloruro evaluada por DPTE se normalice de forma espontánea en pacientes con FQ; se espera que cualquier mejora observada en la actividad del canal de cloruro evaluada por DPTE indique específicamente la actividad farmacológica de terapias correctoras de CFTR. Por consiguiente, se ha convertido en el criterio principal de valoración en estudios farmacológicos y de recambio génico, en fases I-II, destinados a corregir la disfunción de CFTR (Peckham *et al.*, 1995, *J. Clin. Sci. (London)* 89(3):277-84; Wilschanski *et al.*, 2003, *N. Engl. J. Med.* 349(15):1433-1441).

5.8 Ejemplo 8: Inmunofluorescencia de CFTR (sólo para referencia)

La recogida y tratamiento del curetaje de mucosa nasal de cada fosa nasal de un paciente para medir la proteína CFTR mediante inmunofluorescencia y mediante cuantificación de ARNm de CFTR se realiza usando técnicas estandarizadas (Clancy *et al.*, 2001, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163(7):1683-92; Amaral *et al.*, 2004, *J. Cyst. Fibros.* 3 Suppl 2:17-23). La tinción por inmunofluorescencia de células epiteliales normales (por ejemplo, procedentes de raspados de la mucosa nasal) revela la presencia de la mayoría de la proteína CFTR en la superficie apical. En modelos animales de FQ mediada por mutación sin sentido o en pacientes con FQ mediada por mutación sin sentido, la tinción de CFTR está ausente (por ejemplo, en pacientes homocigotos para una mutación de parada prematura) o bien se observa principalmente en la región perinuclear (por ejemplo, en pacientes con una mutación $\Delta F508$ que impide el tráfico intracelular normal de CFTR). Tanto en modelos animales como en pacientes se ha asociado la producción satisfactoria de proteína CFTR funcional, de tipo natural o no natural, con la reaparición de proteína CFTR epitelial apical, determinada por inmunofluorescencia (Clancy *et al.*, 2001, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163(7):1683- 92; Wilschanski *et al.*, 2003, *N. Engl. J. Med.* 349(15):1433-41).

5.9 Ejemplo 9: Pruebas de función pulmonar (sólo para referencia)

Las pruebas de función pulmonar, que incluyen VEF₁, CVF y FME₂₅₋₇₅, se realizan utilizando procedimientos estándares de espirometría. Las evaluaciones de la función pulmonar (entre ellas FME₂₅₋₇₅, CVF y, en particular, VEF₁) han sido reconocidas como criterios de valoración clínicos definitivos en pacientes con FQ (Food and Drug Administration, 62nd Anti-Infective Drugs Advisory Committee. Discussion of NDA for tobramycin solution for inhalation (Tobi[®]) for the management of cystic fibrosis patients. Noviembre de 1997; Tiddens, 2002, *Pediatr. Pulmonol.* 34(3):228-31). Se ha demostrado que el VEF₁ y otras medidas de prueba de la función pulmonar se correlacionan con la gravedad de la enfermedad, predicen la morbilidad en términos de utilización de servicios sanitarios y uso de antibióticos por vía IV, e indican el riesgo de mortalidad relacionada con la FQ (Food and Drug Administration, 62nd Anti-Infective Drugs Advisory Committee. Discussion of NDA for tobramycin solution for inhalation (Tobi[®]) for the management of cystic fibrosis patients. Noviembre de 1997). Las pruebas de función pulmonar son fáciles de realizar (incluso en pacientes de edad tan corta como 7 años), y utiliza equipos y técnicas estandarizados que están ampliamente disponibles. La interpretación se realiza utilizando ecuaciones normativas bien establecidas que tienen en cuenta la edad, altura y sexo del paciente. Se ha reconocido que la mejora en el VEF₁ demuestra cuantitativamente una ventaja clínica significativa en la FQ, y ha servido como base para la aprobación regulatoria de domasa alfa y tobramicina inhalada (Food and Drug Administration, 62nd Anti-Infective Drugs Advisory Committee. Discussion of NDA for tobramycin solution for inhalation (Tobi[®]) for the management of cystic fibrosis patients. Noviembre de 1997).

5.10 Ejemplo 10: Estudio en fase II de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico como tratamiento oral para fibrosis quística mediada por mutación sin sentido

Los pacientes deben cumplir todos los requisitos siguientes para poder aceptar su inscripción en el estudio:

1. Diagnóstico de FQ basado en evidencia documentada de una prueba de sudor concluyentemente anormal (cloruro en sudor >60 mEq/litro por iontoforesis con pilocarpina (LeGrys, Sweat testing: Sample collection and quantitative analysis: Approved guidelines - Second edition. National Committee for Clinical Laboratory Standards 2000; vol. 20:14));
2. Secreción anormal de cloruro medida por DPTE (una evaluación por DPTE más positiva que -5 mV de la secreción de cloruro con amilorida exenta de cloruro e isoproterenol);
3. Presencia de una mutación sin sentido en uno de los alelos del gen *cftr*;

4. Documentación de que se ha realizado la secuenciación del gen *cftr*;
 5. Edad ≥ 18 años;
 6. Peso corporal ≥ 40 kg;
 7. $VEF_1 \geq 40\%$ del previsto para su edad, sexo y altura (normas Knudson) (Knudson, 1983, *Am. Rev. Respir. Dis.* 127:725-734);
 8. Saturación de oxígeno (medida por oximetría de pulso) $\geq 92\%$ en aire ambiente;
 9. Voluntad de los pacientes masculinos y femeninos, si no estuviesen esterilizados quirúrgicamente, a abstenerse de relaciones sexuales o bien emplear una barrera o método médico de anticoncepción durante la administración del fármaco en estudio y períodos de seguimiento;
 10. Prueba de embarazo negativa (para mujeres en edad fértil);
 11. Voluntad y capacidad de cumplir con las visitas programadas, el plan de administración de fármacos, los procedimientos del estudio (que incluyen mediciones de DPTE, pruebas de laboratorio clínico y muestreo de PK) y las restricciones del estudio;
 12. Capacidad para otorgar su consentimiento informado por escrito; y
 13. Evidencia de haber firmado y fechado personalmente el documento de consentimiento informado que indica que el paciente ha sido informado de todos los aspectos pertinentes de la prueba.
- La presencia de cualquiera de las siguientes situaciones excluye a un paciente de ser inscrito en el estudio:
1. Afección médica previa o en curso (por ejemplo enfermedad concomitante, enfermedad psiquiátrica, alcoholismo, abuso de drogas), historia clínica, exploración física, hallazgos de ECG o anomalía de laboratorio que, en opinión del investigador, podría afectar negativamente a la seguridad del paciente, hace improbable que se pueda completar el curso del tratamiento o seguimiento, o bien podría afectar a la evaluación de los resultados del estudio;
 2. Enfermedad aguda en curso, inclusive infecciones agudas de vías respiratorias superiores o inferiores dentro de las 2 semanas anteriores al inicio del tratamiento del estudio;
 3. Historia de complicaciones importantes de enfermedad pulmonar (inclusive hemoptisis masiva o neumotórax recientes) en los 2 meses anteriores al inicio del tratamiento del estudio;
 4. Anomalías en radiografías de pecho exploratorias que sugieran enfermedad pulmonar activa clínicamente significativa que no sea FQ, o nuevas alteraciones significativas tales como atelectasia o derrame pleural que pueden ser indicativas de afectación pulmonar activa clínicamente significativa secundaria a la FQ;
 5. Antígeno superficial de hepatitis B, prueba de anticuerpos de hepatitis C o prueba del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) positivos;
 6. Hemoglobina < 10 g/dL;
 7. Albúmina sérica $< 2,5$ g/dL;
 8. Función hepática anormal (bilirrubina total sérica $>$ el límite superior de la normalidad, o bien ALT, AST o GGT séricas $> 2,0$ veces el límite superior de la normalidad);
 9. Función renal anormal (creatinina sérica $> 1,5$ veces el límite superior de la normalidad);
 10. Embarazo o lactancia;
 11. Historia de trasplante de órgano sólido o hematológico;
 12. Exposición a otro fármaco en investigación en los 14 días anteriores al inicio del tratamiento del estudio;
 13. Participación en curso en cualquier otro ensayo clínico terapéutico;
 14. Uso actual de tiazolidindionas agonistas de receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ), por ejemplo rosiglitazona (Avandia[®] o equivalente) o pioglitazona (Actos[®] o equivalente);
 15. Cambio en medicamentos intranasales (inclusive el uso de corticosteroides, cromolina, bromuro de ipratropio, fenilefrina u oximetazolina) en los 14 días anteriores al inicio del tratamiento del estudio;
 16. Cambio en el tratamiento con corticosteroides sistémicos o inhalados en los 14 días anteriores al inicio del tratamiento del estudio;

17. Uso o necesidad de gentamicina o amikacina inhaladas en los 14 días anteriores al inicio del tratamiento del estudio o durante el tratamiento del estudio; o bien

18. Necesidad de antibióticos aminoglucósidos sistémicos en los 14 días anteriores al inicio del tratamiento del estudio.

5 Se proporcionó ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico en una formulación descrita en la presente memoria. A 15 pacientes (12 de un ensayo en fase II realizado en Israel y 3 de un ensayo en fase II realizado en EE.UU.; siete pacientes eran hombres y 8 eran mujeres; los pacientes tenían una edad media de 22 años; y todos los pacientes tenían múltiples signos y síntomas de fibrosis quística, inclusive algún grado de disfunción pulmonar) se les administró por vía oral ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico de acuerdo con el siguiente programa de 56 días: administración de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico tres veces al día (t.i.d.) a razón de 4 mg/kg, 4 mg/kg y 8 mg/kg durante 14 días, seguidos de ningún tratamiento durante 14 días (ciclo 1, que consta de 28 días), seguidos de la administración de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico ácido tres veces al día (t.i.d.) a razón de 10 mg/kg, 10 mg/kg y 20 mg/kg durante 14 días, seguidos de ningún tratamiento durante 14 días (ciclo 2, que consta de 28 días).

15 Se evaluaron los criterios clínicos de valoración utilizando los procedimientos antes expuestos. Se realizaron medidas de DPTE antes del tratamiento y en los días 14 y 28 del ciclo 1 y del ciclo 2. Se recogió curetaje de la mucosa nasal de las dos fosas nasales de cada paciente antes del tratamiento y en los días 14 y 28 del ciclo 1 y del ciclo 2. Se realizaron pruebas pulmonares, entre ellas VEF₁, CVF y FME₂₅₋₇₅, antes del tratamiento, en el día -1 del ciclo 2, en el día 13 o 14 del ciclo 1 y en el día 13 o 14 del ciclo 2 en el estudio realizado en Israel y se midieron los mismos parámetros antes del tratamiento y en el día 13 o 14 del ciclo 2 en el estudio realizado en EE.UU.

25 Variación media en la conductancia de cloruro por DPTE. Este es el promedio de las variaciones desde el inicio hasta el final del período de tratamiento en la conductancia de cloruro por DPTE para cada participante en el estudio. Por ejemplo, si las variaciones en la conductancia de cloruro por DPTE en tres participantes fueron respectivamente -7,0 mV, -2,0 mV y -9,0 mV, la variación media en la conductancia de cloruro por DPTE para estos participantes sería -6,0 mV.

30 Porcentaje de pacientes con una respuesta de conductancia de cloruro. Este es el porcentaje de pacientes que mostró una respuesta de conductancia de cloruro por DPTE al final del tratamiento con ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico. Para los fines de los ensayos, se define una respuesta de conductancia de cloruro como una mejora de la conductancia de cloruro por DPTE de al menos -5 mV. Por ejemplo, en un paciente con un valor de conductancia de cloruro por DPTE de +1,0 mV al inicio del estudio y un valor de conductancia de cloruro por DPTE de -6,0 mV al final del tratamiento, la mejora en la conductancia de cloruro por DPTE sería -7,0 mV, lo que representa una respuesta de conductancia de cloruro.

35 Porcentaje de pacientes con mejoría de valores de conductancia de cloruro por normalización de DPTE. Como se ha indicado antes, generalmente se considera que una conductancia de cloruro igual o más eléctricamente negativa que -5,0 mV está en el rango normal. Así, se consideraría que un paciente con un valor de conductancia de cloruro por DPTE de +1,0 mV al inicio del estudio tiene un valor anormal porque el valor es más eléctricamente positivo que -5,0 mV. Si, al final del tratamiento, el valor de conductancia de cloruro por DPTE de ese paciente ha mejorado hasta -6,0 mV, esto representaría una mejoría por entrar al rango normal porque el valor mejorado es más eléctricamente negativo que -5,0 mV.

40 Basándose en el sexo, edad y altura del paciente, el valor medio del VEF₁ al inicio del estudio era 66% del normal y el valor medio de CVF al inicio del estudio era 80% del normal. Catorce de los 15 pacientes incluidos en el análisis presentaban colonización de las vías respiratorias por *Pseudomonas aeruginosa*, una infección bacteriana común en pacientes de fibrosis quística que puede conducir a neumonía grave. Catorce de los 15 pacientes también tenían insuficiencia pancreática y requerían terapia de reemplazo crónica de enzimas pancreáticas. Los pacientes tenían bajo peso corporal, con un peso medio de 58,3 kg al inicio del estudio.

50 La Tabla 5 presenta los resultados de DPTE para los 5 pacientes. Para cada medida, los resultados se presentan en las formas de "mejor fosa nasal" y "media de las fosas nasales". Históricamente, los resultados de las pruebas de DPTE se han presentado típicamente en la forma de "mejor fosa nasal". Sin embargo, las recientes directrices establecidas por la Cystic Fibrosis Therapeutics Development Network (Red de desarrollo terapéutico de fibrosis quística) recomiendan que se presenten los resultados de DPTE de ambas maneras. Se observaron mejorías en la conductancia de cloruro por DPTE en pacientes con diferentes tipos de mutación sin sentido dentro del gen para CFTR.

Tabla 5

<u>Resultado de DPTE</u>	<u>Nivel inferior de dosis</u>		<u>Nivel superior de dosis</u>	
	<u>Resultado</u>	<u>Valor p</u>	<u>Resultado</u>	<u>Valor p</u>
Variación media en conductancia de cloruro por DPTE				
Mejor fosa nasal.....	-9,0 mV	<0,001	-6,4 mV	0,010
Media de las fosas nasales.....	-6,7 mV	<0,001	-4,4 mV	0,023
Número de pacientes con mejoría \geq -5 mV en conductancia de cloruro por DPTE				
Mejor fosa nasal.....	9/15 (60%)	<0,001	8/15 (53%)	<0,001
Media de las fosas nasales.....	6/15 (40%)	0,005	7/15 (47%)	<0,001
Número de pacientes con mejoría en conductancia de cloruro por normalización de DPTE				
Mejor fosa nasal.....	8/15 (53%)	0,008	8/15 (53%)	0,008
Media de las fosas nasales.....	6/15 (40%)	0,032	7/15 (47%)	0,016

5 Los efectos del tratamiento en los niveles inferior y superior de dosis de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico no fueron estadísticamente significativos, lo que sugiere que puede que no sea necesario mayor
10 incremento de la dosis y que incluso dosis inferiores de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico pueden ser eficaces para mejorar la conductancia de cloruro por DPTE. También se han observado resultados estadísticamente significativos y tendencias positivas para criterios de evaluación secundarios. En particular, aunque no se ha dotado a los ensayos de potencia para detectar variaciones estadísticamente significativas en criterios de valoración secundarios, se han observado mejoras estadísticamente significativas desde el inicio del estudio hasta el fin del ciclo de tratamiento con la dosis más alta en el VEF₁, la CVF y el peso medios de los pacientes. La Tabla 6 presenta los resultados. En cuanto a los cambios en la función pulmonar, no se ha incluido a un paciente porque no se había medido la función pulmonar de ese paciente al final del ciclo de tratamiento con la dosis más alta.

Tabla 6

<u>Criterio de valoración</u>	<u>Inicio del estudio</u>	<u>Fin del tratamiento con dosis más alta</u>	<u>Variación</u>	<u>Valor p</u>
Función pulmonar (expresada como porcentaje de lo normal para su sexo, edad y altura):				
VEF ₁ medio.....	65,8%	69,1%	3,3%	0,015
CVF media.....	80,2%	85,1%	4,9%	0,037
Peso	58,3 kg	59,0 kg	0,7 kg	0,012

15 Además, aunque no se midieron formalmente mediante el uso de un cuestionario de calidad de vida los cambios en los síntomas del paciente, se pidió a los investigadores del ensayo que preguntasen acerca de los cambios en los síntomas de la fibrosis quística de los pacientes. De los 15 pacientes incluidos en el análisis provisional, 6 comunicaron mejoras generales en el bienestar, 6 comunicaron disminución de la tos y 10 comunicaron
20 disminución de la viscosidad del moco y más fácil limpieza de la mucosidad.

20 5.11 Ejemplo 11: Expresión de distrofina, sarcoglicano y distroglicano por inmunofluorescencia y tinción tipo Western (sólo para referencia)

25 Se realiza biopsia del músculo EDB y la piel suprayacente, bajo anestesia local y sedación consciente (en algunos casos puede ser necesaria anestesia general), antes del tratamiento en un pie, y en el último día de tratamiento en el otro pie. El procedimiento de biopsia se realiza usando técnicas estandarizadas (Stedman, 2000, Human Gene Therapy 11: 777-90). En la intervención se retira (cuando es posible) todo el vientre muscular. En el momento de la
30 toma de la biopsia antes del tratamiento, se divide la muestra de músculo en al menos 3 fragmentos, y la muestra de biopsia tomada el último día del tratamiento se divide en al menos 2 fragmentos. Se coloca la muestra de biopsia sobre una esponja de gasa Telfa humedecida con solución salina de Ringer. Se observa la muestra de biopsia con pocos aumentos en un estereomicroscopio de disección para establecer la orientación de las fibras. Después se secciona el músculo, utilizando un escalpelo afilado, en la dirección de la sección transversal (perpendicular a la orientación de las fibras) siempre que sea posible y se deja reposar durante 2 minutos para permitir el cese del espasmo. Después se congela la muestra en isopentano enfriado con nitrógeno líquido, se transfiere a un depósito de nitrógeno líquido y se mantiene 2,5 cm (1 pulgada) por encima de la interfaz líquido/vapor durante 2 minutos de

enfriamiento lento y evaporación del isopentano antes de sumergirlo en el nitrógeno líquido, y se envuelve en lámina preenfriada (en líquido nitrógeno y conservada sobre hielo seco) marcada con el número de estudio, número de sede, número de paciente, fecha, iniciales del paciente y lateralidad del pie (pie derecho o pie izquierdo).

Se etiquetan claramente todos los recipientes de muestra de forma que se identifique el sujeto y la fecha de toma. Se fijan las etiquetas a los recipientes de muestra de una manera que impida que la etiqueta se desprenda. Inmediatamente después de realizado el procedimiento se envían las muestras para su análisis/cultivo/examen centralizado. Para la detección de distrofina se emplean 3 anticuerpos comercialmente disponibles que reconocen el extremo C-terminal, el extremo N-terminal y el dominio de varilla de la proteína. Para la detección del complejo de sarcoglicano y distroglicano, se utilizan cuando es posible anticuerpos comercialmente disponibles contra α -, β -, γ - y δ -sarcoglicano y β -distroglicano. En el análisis se utiliza microscopía de epifluorescencia; se capturan imágenes mediante una CCD, después de normalizar la intensidad de fluorescencia frente a un espécimen muscular normal. Se almacenan digitalmente las imágenes y se conservan para futura revisión y evaluación final al término del estudio. También se procesan los tejidos para detectar distrofina, los sarcoglicanos y β -distroglicano mediante tinción tipo Western utilizando los mismos anticuerpos. Se capturan imágenes microscópicas y se conservan para futura revisión y evaluación final al término del estudio. Las restantes muestras de tejido muscular se conservan para ensayos confirmatorios de ARNm y proteínas implicadas en la DMD. Se emplean inmunotinción y tinción tipo Western para la detección de proteínas.

Habitualmente se realizan biopsias musculares en los pacientes de DMD como elemento de diagnóstico y como medida del efecto terapéutico en el contexto de estudios de investigación. Se ha elegido el EDB porque no es un músculo esencial para las actividades diarias y por lo tanto el muestreo de este músculo no conlleva consecuencias funcionales adversas para el sujeto. Dado que se usa poco, es poco probable que el músculo EDB muestre sustancial sustitución fibrótica del músculo y, por lo tanto, proporciona un tejido apropiado para la detección de la producción de distrofina. El muestreo del músculo EDB ofrece ventajas prácticas adicionales, ya que es fácil de identificar, puede ser diseccionado bajo anestesia local y proporciona una cantidad suficiente de tejido para llevar a cabo los análisis necesarios. La inmunofluorescencia y la tinción tipo Western son pruebas de rutina realizadas sobre muestras de biopsia muscular para confirmar la presencia o ausencia de distrofina de longitud completa. La ausencia de distrofina es considerada como confirmatoria del diagnóstico de DMD. Se ha considerado que la restauración de la distrofina, con localización en la membrana muscular, es una medida directa de la actividad farmacodinámica preclínica y clínica (Barton-Davis, 1999, *J. Clin. Invest.* 104(4):313-81; Politano, 2003, *Acta Myol.* 22(1):15-21).

5.12 Ejemplo 12: Miometría de extremidades superiores e inferiores (sólo para referencia)

Se realiza miometría de extremidades superiores e inferiores utilizando un miómetro de mano siguiendo procedimientos estandarizados (Beenakker, 2001, *Neuromuscul. Disord.* 11(5):441-6; Hyde, 2001, *Neuromuscul. Disord.* 11(2):165-70). Se recomienda (dependiendo del estado funcional inicial del sujeto) que los grupos musculares evaluados incluyan los abductores de la cadera, extensores de la rodilla, flexores y extensores del codo y prensión de la mano. Se pueden realizar evaluaciones bilaterales, y se pueden registrar tres medidas para cada grupo muscular de ambos lados. Se determinan estos parámetros antes del tratamiento, en los días segundo a último del tratamiento, y durante un período de seguimiento después del tratamiento. Durante los períodos de pretratamiento y de tratamiento, los procedimientos de miometría se realizan antes de la biopsia muscular.

Las evaluaciones de miometría utilizando un dinamómetro de mano son una medida sensible y reproducible de la fuerza muscular en sujetos ambulatorios y no ambulatorios (Beenakker, 2001, *Neuromuscul. Disord.* 11(5):441-6; Hyde, 2001, *Neuromuscul. Disord.* 11(2):165-70). La fiabilidad entre calificadores para pacientes con distrofia muscular es alta (Stuberg, 1988, *Phys. Ther.* 1988 68(6):977-82; Hyde, 2001, *Neuromuscul. Disord.* 11(2):165-70). En comparación con las pruebas de fuerza muscular de la mano, la miometría es una medida más sensible y menos compleja de la función muscular (McDonald, 1995, *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* (5 Suppl):S70-92). La prueba puede ser realizada fácilmente por el evaluador (por ejemplo, un médico o fisioterapeuta).

5.13 Ejemplo 13: Pruebas funcionales cronometradas (sólo para referencia)

Las pruebas funcionales cronometradas incluyen el tiempo necesario para levantarse desde una posición supina, el tiempo requerido para caminar 10 metros y el tiempo requerido para subir 4 escalones de tamaño estándar (Mendell, 1989, *N. Engl. J. Med.* 320(24):1592-7; Griggs, 1991, *Arch. Neurol.* 48(4):383-8). Se determinan estos parámetros antes del tratamiento, en los días segundo a último del tratamiento y durante un período de seguimiento después del tratamiento. Durante los períodos de pretratamiento y de tratamiento, las pruebas funcionales cronometradas se realizan antes de la biopsia muscular.

Estas pruebas (tiempo necesario para levantarse desde una posición supina, tiempo requerido para caminar 10 metros y tiempo requerido para subir 4 escalones de tamaño estándar) proporcionan una medida adicional de la capacidad funcional en pacientes ambulatorios. Las pruebas son reproducibles, de uso corriente, fáciles de realizar, y se ha documentado la respuesta a la intervención terapéutica con esteroides (Mendell, 1989, *N. Engl. J. Med.* 320(24):1592-7; Griggs, 1991, *Arch. Neurol.* 48(4):383-8).

5.14 Ejemplo 14: Niveles séricos de CK (sólo para referencia)

Se evalúa la actividad de CK en suero mediante un ensayo cinético ligado a NADH, disponible comercialmente (Diagnostic Chemicals Ltd., Oxford, CT). Se miden los niveles séricos de CK antes del tratamiento, en el día 1 (antes de la primera dosis), el día 7, el día 14, el día 21 y el día 27 durante el período de tratamiento, y en el día 42 y el día 56 después del tratamiento. La CK sérica está elevada en la distrofia muscular de Duchenne y por tanto es un marcador diagnóstico de la enfermedad fácilmente medible y que puede servir como un biomarcador potencial de la actividad farmacológica del fármaco (Mendell *et al.*, 1989, *New Eng. J. Med.* 320(24):1592-97).

La CK sérica proporciona una medida de la integridad muscular en todo el cuerpo. Las concentraciones de esta enzima en el suero están incrementadas de 50 a 100 veces en sujetos con DMD, y la medida de sus niveles se utiliza para realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad (Worton, *The muscular dystrophies*, en: Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D. (compiladores), *The metabolic and molecular basis of inherited disease*. 8ª ed., vol. 4, Nueva York: McGraw-Hill, 2001:5493-523). Los niveles de CK sérica se miden para vigilar la progresión de la enfermedad y servir como un marcador del daño muscular. Aunque los cambios inducidos por el ejercicio introducen variabilidad (Politano, 2003, *Acta Myol.* 22(1):15-21), este marcador presenta ventajas porque puede ser evaluado fácilmente, en repetidas ocasiones y con frecuencia mediante una prueba ampliamente disponible y fiable. Estudios clínicos anteriores han mostrado disminuciones en CK sérica coincidentes con mejoras en la fuerza muscular durante el tratamiento con esteroides (Reitter, 1995, *Brain Dev.* 17 Suppl:39-43).

5.15 Ejemplo 15: Cultivo de fibroblastos dérmicos y células musculares (sólo para referencia)

Se realizan estudios sobre tejido muscular y piel de pacientes para determinar si la producción de distrofina en cultivos musculares primarios procedentes de los pacientes se corresponde con la producción de distrofina *in vivo*. Estos experimentos evalúan si los fibroblastos dérmicos de pacientes, cuando se diferencian en células musculares *in vitro* por transfección con un constructo de expresión productor de Myo-D (Wang, 2001, *Development* 128:4623-33), demuestran producción de distrofina en respuesta al tratamiento. La correlación de la respuesta de células cutáneas con la actividad clínica puede ofrecer un ensayo predictivo fácil de realizar para seleccionar futuros pacientes para terapia o para detectar nuevos agentes para el tratamiento de DMD. Las células se cultivan como sigue. Durante el transporte se conserva el material de la biopsia en medio de proliferación humano (o PBS) y sobre hielo durante períodos de tiempo más largos, en caso necesario. Si no se ha preparado el tejido en un plazo de 24 horas, se puede congelar el material en medio de proliferación humano que contenga 10% de DMSO y conservarlo en nitrógeno líquido (o hielo seco). En el momento de preparar el tejido para iniciar el cultivo de mioblastos, se lava en PBS el material de la biopsia. Se añade a una placa de cultivo PBS suficiente para mantener húmedo el tejido. Se desmenuza concienzudamente con cuchillas de afeitar el material de biopsia, hasta una suspensión casi homogénea. Se añaden aproximadamente 2 ml de solución de colagenasa/dispasa/CaCl₂ por gramo de tejido y se continúa el desmenuzamiento durante varios minutos (por ejemplo, para una biopsia muscular de 5 x 5 x 5 mm úsese 1 ml de solución de enzima). Se transfiere la suspensión a un tubo estéril y se incuba a 37°C en un baño de agua hasta que la mezcla es una suspensión fina (por ejemplo, alrededor de 20 a 30 minutos). Se homogeniza adicionalmente la suspensión pipeteando hacia arriba y hacia abajo varias veces durante la incubación. En caso necesario se pueden realizar ciclos adicionales de resuspensión pipeteando hacia arriba y hacia abajo con una jeringa. Se añaden a la suspensión ocho mL de medio de proliferación humano y se mezcla. Se centrifuga la mezcla durante 10 minutos a 1.200 rpm. Se resuspende el sedimento celular en 3 mL de medio de proliferación humano. Se siembran las células en un pocillo de una placa de 6 pocillos revestida con colágeno o bien, dependiendo de la cantidad de material, en un matraz T25 revestido de colágeno. Se cultivan las células durante 48 horas, a 37°C y 5% de CO₂. Se retiran las células no fijadas y se transfieren a otro pocillo revestido de colágeno (como reserva). Se añade medio de proliferación fresco (3 mL) al primer pocillo. Se cultivan las células desde el primer pocillo hasta la confluencia y hasta que se han obtenido dos matraces T75 confluentes. Para su almacenamiento, se pueden congelar las células de un matraz T75 en 4 criotubos con 1 mL de medio de congelación. El contenido de células miogénicas del cultivo se determina realizando una tinción con desmina. Se requiere sembrado previo en placas ("preplating") de los cultivos si el porcentaje de células positivas para desmina es demasiado bajo.

5.16 Ejemplo 16; 2 Estudio en fase II de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico como tratamiento por vía oral para la distrofia muscular de Duchenne

Los pacientes deben cumplir todos los requisitos siguientes para poder aceptar su inscripción en el estudio:

1. Diagnóstico de distrofia muscular de Duchenne (DMD) basado en un fenotipo clínico que se presente a la edad de 5 años, con un CK sérica incrementada y ausencia de distrofina en una biopsia muscular (tinción del sarcolema negativa con un anticuerpo para la porción C-terminal de la proteína distrofina);

2. Presencia de una mutación sin sentido en el gen para distrofina;

3. Documentación de que se ha realizado la secuenciación del gen para distrofina o bien, si aún no se ha realizado la secuenciación, de que se ha enviado una muestra de sangre para la secuenciación confirmatoria del gen para distrofina;

4. Examen físico o evidencia de imágenes radiográficas de los músculos EDB en ambos pies;
5. Capacidad para caminar;
6. Sexo masculino;
7. Edad ≥ 5 años;
- 5 8. Voluntad de abstenerse de relaciones sexuales o bien emplear una barrera o método médico de anticoncepción durante la administración del fármaco en estudio y períodos de seguimiento en sujetos conocidos por ser sexualmente activos;
9. Disposición y capacidad para cumplir con las visitas programadas, el plan de la administración de fármacos, pruebas de laboratorio, restricciones del estudio y procedimientos del estudio (que incluyen biopsias musculares, miometría y muestreo de PK);
- 10 10. Capacidad para otorgar su consentimiento informado por escrito si tiene ≥ 18 años de edad, o asentimiento informado por escrito (con consentimiento de los padres/tutores) si tiene ≥ 7 años de edad. Si el sujeto es < 7 años de edad, sólo se obtendrá el consentimiento de los padres/tutores legales; y
- 15 11. Evidencia de haber firmado y fechado personalmente el documento de consentimiento informado (asentimiento también necesario para niños de ≥ 7 años de edad) que indica que el sujeto/padre/tutor legal ha sido informado de todos los aspectos pertinentes de la prueba que deben seguirse.

La presencia de cualquiera de las siguientes situaciones excluirá a un sujeto de la inscripción en el estudio:

- 20 1. Afección médica previa o en curso (por ejemplo enfermedad concomitante, enfermedad psiquiátrica, alcoholismo, abuso de drogas), historia clínica, exploración física, hallazgos de ECG o anomalía de laboratorio que, en opinión del investigador, podría afectar negativamente a la seguridad del paciente, hace improbable que se pueda completar el curso del tratamiento o seguimiento, o bien podría afectar a la evaluación de los resultados del estudio;
- 25 2. Síntomas y signos clínicos de insuficiencia cardíaca congestiva (fase C o fase D del American College of Cardiology/American Heart Association) (Hunt, 2001, *J. Am. Coll. Cardiol.* 38:2101-13);
- 3 3. Antígeno superficial de hepatitis B, prueba de anticuerpos de hepatitis C o prueba del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) positivos;
4. Hemoglobina < 10 g/dL;
5. Albúmina sérica $< 2,5$ g/dL;
6. GGT o bilirrubina total anormales ($>$ límite superior de laboratorio de la normalidad);
7. Función renal anormal (creatinina sérica $> 1,5$ veces el límite superior de laboratorio de la normalidad);
- 30 8. Historia de trasplante de órgano sólido o hematológico;
9. Terapia inmunosupresora en curso (distinta de corticosteroides);
10. Exposición a otro fármaco en investigación en los 28 días anteriores al inicio del tratamiento del estudio;
11. Participación en curso en cualquier otro ensayo clínico terapéutico;
- 35 12. Uso actual de tiazolidindionas agonistas de receptor gamma activado por proliferador de peroxisomas (PPAR γ), por ejemplo rosiglitazona (Avandia[®] o equivalente) o pioglitazona (Actos[®] o equivalente);
13. Cambio en la terapia con corticosteroides sistémicos (por ejemplo, inicio del tratamiento, cese del tratamiento, cambio en la dosis, pauta posológica o tipo de esteroide) en los 3 meses anteriores al inicio del tratamiento del estudio; o bien
- 40 14. Tratamiento con antibióticos aminoglucósidos sistémicos en los 3 meses anteriores al inicio del tratamiento del estudio.

Se proporcionó ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico en una formulación descrita en la presente memoria. Se administró tratamiento durante 28 días por cada cohorte de tratamiento. Una cohorte inicial de pacientes (n=6) fue tratada diariamente durante 28 días con ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico a razón de 4, 4 y 8 mg/kg t.i.d. Después de revisar los resultados de seguridad clínica, se trató diariamente durante 28 días una segunda cohorte de pacientes (n=20) con ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico a razón de 10, 10 y 20 mg/kg t.i.d. Así, cada paciente recibió un total de 84 dosis de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico.

En algunos pacientes en ambos niveles de dosis se demostró en el día 28 restauración parcial o incremento de distrofina con respecto al valor inicial en la membrana del músculo extensor corto de los dedos por tinción del dominio C-terminal de la proteína. Los parámetros farmacocinéticos medios obtenidos del estudio se exponen a continuación en la Tabla 7 y también se muestran en la Figura 1.

5 Tabla 7

Parámetro	4, 4, 8 mg/kg			10, 10, 20 mg/kg			20, 20, 40 mg/kg		
	Predicho ^a	N=6		Predicho ^a	N=20		Predicho ^a	N=11 ^a	
		Día 1	Día 28		Día 1	Día 28		Día 1	Día 28
ABC ₀₋₂₄ µg·hora/mL	176	87	91	439	291	235	470	866	490
C _{máx} µg/mL	18	10	11	47	27	22	44	76	46
C _{mín} µg/mL	7,9	0,5	0,6	19,8	3,8	3,4	**	9,6	6,7

a Valores predichos basados en un modelo compartimental derivado de los resultados del anterior estudio de dosis múltiples en fase I

b El paciente 002-010 fue excluido del análisis debido a la insuficiencia de datos.

10 Abreviaturas: ABC = área bajo la curva de concentración-tiempo; C_{máx} = concentración máxima; C_{mín} = concentración mínima

La sangre para determinar las concentraciones de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico se recoge antes de la administración y a las 3 horas tras la administración de la primera dosis diaria del fármaco en estudio en el segundo día de cada visita.

15 Se registran los tiempos de administración del fármaco en estudio y recogida de muestras. Si se utiliza un catéter venoso heparinizado para la recogida de muestras con el fin de evitar pinchazos repetidos, al menos se extraen y se desechan 2 mL de sangre antes de tomar cada muestra, con el fin de evitar la contaminación de la muestra con heparina. Se intenta por todos los medios tomar las muestras de sangre a la hora programada o bien dentro de ± 5 minutos de la misma. El momento de la extracción de sangre está relacionado con el tiempo de administración de las dosis del fármaco en estudio.

20 Cada muestra comprende 2 mL de sangre venosa aspirados a un tubo Vacutainer[®] de 5 mL o equivalente, con K₃-AEDT como anticoagulante. Inmediatamente después de la extracción, se invierte suavemente el tubo de 8 a 10 veces para mezclar el anticoagulante con la muestra de sangre. Se guarda el tubo sobre hielo, en posición vertical, hasta la centrifugación; la centrifugación y el tratamiento de la muestra se llevan a cabo dentro del plazo de 1 hora desde la toma de la muestra. Se separa la fracción de plasma colocando el tubo de recogida en una centrifuga refrigerada (temperatura de 4 a 8°C) en un rotor horizontal (con un cabezal basculante hacia afuera) durante un mínimo de 15 minutos a una fuerza centrífuga relativa (FCR) de 1.500-1.800. Se retira con una pipeta la fracción de plasma y se reparte entre 2 tubos de congelación de polipropileno (ambos tubos receptores reciben una alícuota aproximadamente igual). Todos los tubos de recogida de muestras y de congelación están claramente etiquetados de forma que se identifiquen el sujeto, el período de estudio y la fecha y hora de recogida. Se fijan las etiquetas a los tubos de congelación de una manera que impida que la etiqueta se desprenda después de la congelación. Después del procesamiento, se colocan las muestras en un congelador a aproximadamente -20°C (o temperatura inferior).

25 Como prevención frente a la pérdida de la muestra, se dividen las muestras en dos envíos, conteniendo cada uno 1 alícuota de plasma de cada punto temporal (1 alícuota anterior a la administración de la dosis y 1 alícuota posterior a la administración de la dosis). Las primeras alícuotas de las muestras se envían en un plazo de 28 a 30 días desde su recogida. Se pueden enviar juntas muestras de varios sujetos como parte de un único envío. Antes de su envío, se envasan las muestras en recipientes térmicamente aislados con hielo seco suficiente para asegurar que se mantengan congeladas y protegidas de la rotura durante el envío. Las muestras se envían en el mismo día por correo urgente.

35 Las muestras se conservan para analizar el ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico al final del estudio utilizando un método de cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masas en tándem (CLAR/EM-EM) validado. Después se conservan las muestras para posibles análisis posteriores.

40 El criterio de valoración primario de la prueba fue la proporción de pacientes que presentaron un incremento de expresión de distrofina en el músculo durante los 28 días de tratamiento con ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico. Se obtuvieron datos de inmunofluorescencia de los músculos EDB anteriores y posteriores al tratamiento para los 38 pacientes. Tal como se muestra en la Tabla 8, los datos indicaron que, para ambos niveles de dosis, los pacientes mostraron una mejora cualitativa en la tinción de distrofina. En conjunto, 4 de los 6 pacientes (67%) (90% de IC: 27-94%) tratados con el nivel de dosis de 4, 4 y 8 mg/kg, 10 de los 20 pacientes (50%) (90% de IC: 30-70%) tratados con el nivel de dosis de 10, 10 y 20 mg/kg, y 6 de los 12 pacientes (50%) (90%

de IC: 50-75%) tratados con el nivel de dosis de 20, 20 y 40 mg/kg mostraron un aumento de la expresión de distrofina después del tratamiento. La respuesta no parecía ser dependiente de la expresión de distrofina anterior al tratamiento (ausente frente a mínima), edad, uso de esteroides o ubicación o tipo de mutación sin sentido.

5 Se disponía de células musculares primarias anteriores al tratamiento de 24 de los 26 muchachos de las dos primeras cohortes, para cultivo de miotubos *in vitro*. Cuando se cultivaron en presencia de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico, los cultivos de miotubos mostraron evidencia de un aumento en la expresión de distrofina, dependiente de la dosis, como respuesta al tratamiento con ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico. A una concentración de 10 µg/ml, 24 de 24 (100%) mostraron producción de distrofina de longitud completa, lo que sugiere la posibilidad de una supresión de la mutación sin sentido en todos los sujetos si se alcanzan concentraciones suficientes. La mayoría de los sujetos que recibieron los niveles de dosis de 4, 4 y 8 mg/kg; 10, 10 y 20 mg/kg; o 20, 20 y 40 mg/kg presentaron disminución de CK cuando se compararon los valores al final del tratamiento con los valores anteriores al tratamiento. Estos cambios eran estadísticamente significativos (p = 0,03, p = 0,002, p = 0,001 para las dosis baja, media y alta, respectivamente). El retorno a los valores basales medios tras el cese del tratamiento proporcionó un respaldo adicional a la actividad farmacológica.

15

Tabla 8

Paciente número	Edad (años)	Uso de esteroides	Mutación	Tipo de codón de parada	Respuesta de expresión <i>in vivo</i>	Respuesta de expresión <i>in vitro</i>
					Dosis baja ^a	
N=6						
001	11	Sí	W1268X	UGA	No	Sí
002	10	Sí	E2035X	UAG	Sí	Sí
001	9	Sí	S3127X	UGA	Sí	Sí
002	9	Sí	W1075X	UAG	Sí	Sí
001	6	Sí	R3381X	UGA	No	NR ^b
002	5	Sí	R3034X	UGA	Sí	NR ^b
Dosis media ^c						
N=20						
003	10	No	E2286X	UAA	Sí	Sí
004	6	No	E2035X	UAG	Sí	Sí
005	10	Sí	E1182X	UAG	No	Sí
006	9	No	R3391X	UGA	No	Sí
007	9	Sí	Q1885X	UGA	No	Sí
008	9	Sí	Q2574X	UAG	No	Sí
009	8	No	E2894X	UGA	Sí	Sí
010	8	Sí	R145X	UGA	Sí	Sí
003	9	Sí	W1879X	UGA	Sí	Sí
004	13	Sí	R1844X	UGA	No	Sí
005	11	Sí	Q555X	UAA	Sí	Sí
006	8	Sí	W2925X	UGA	No	Sí
007	8	Sí	W1956X	UAG	No	Sí
008	7	Sí	Y1882X	UAA	Sí	Sí
003	8	Sí	R539X	UGA	No	Sí
004	7	No	Q194X	UAA	Sí	Sí
005	7	Sí	R145X	UGA	Sí	Sí
006	12	Sí	R1967X	UGA	No	Sí
007	7	No	K871X	UGA	Sí	Sí
008	11	No	Q267X	UAG	No	Sí
Dosis alta ^d						
N=20						
011	6	Sí	Q2526X	UGA	Sí	Sí
012	8	Sí	R2905X	UGA	Sí	Sí
013	8	Sí	R3034X	UGA	No	Sí
014	10	No	Q555X	UAA	No	NA ^e
015	5	No	Q555X	UAA	No	NA ^e
016	9	Sí	K2791X	UGA	No	NA ^e
009	17	Sí	R2870X	UGA	Sí	Sí
010	14	No	L654X	UGA	Sí	Sí
011	14	No	R1967X	UGA	Sí	NR
012	6	Sí	S147X	UGA	Sí	Sí
009	9	Sí	R3034X	UGA	No	Sí
010	9	Sí	R195X	UGA	No	Sí

a 4 mg/kg por la mañana, 4 mg/kg al mediodía y 8 mg/kg por la noche

b Las biopsias se perdieron durante el transporte

5 c 10 mg/kg por la mañana, 10 mg/kg al mediodía y 20 mg/kg por la noche

d 20 mg/kg por la mañana, 20 mg/kg al mediodía y 40 mg/kg por la noche

e Biopsias aún no analizadas

f La muestra de biopsia no fue conservada de manera adecuada, por lo que no se pudieron cultivar células

Abreviaturas: NR = no realizado

10 Respecto a variaciones de este protocolo, en cada nivel de dosis se recomienda tomar ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico tres veces al día (t.i.d.) a intervalos de 6, 6 y 12 horas (\pm ~30 minutos). Idealmente, cada dosis se toma en el plazo de ~30 minutos después de una comida (por ejemplo, a las ~7:00 de la mañana después del desayuno, a la ~1:00 del mediodía después del almuerzo y a las ~7:00 de la tarde después de la cena). Aunque se admite que se puedan producir variaciones en la pauta de administración dentro del ámbito ambulatorio, se recomienda seguir estrictamente el régimen prescrito (que incluye los intervalos de dosificación y la relación entre ingesta de dosis y comidas) en los días de toma de muestras de PK. Los criterios de valoración clínica se evalúan empleando los procedimientos antes establecidos.

15

5.17 Ejemplo 17: Evaluación cuantitativa de la tos

Se admite comúnmente que la tos excesiva afecta a cómo se sienten las personas y a su funcionalidad. La tos se encuentra entre las razones más frecuentes por las cuales los pacientes buscan tratamiento de atención primaria en Estados Unidos (Hing *et al.*, 2006, *Adv. Data* 374:1-33). Los pacientes con tos crónica describen frustración, irritabilidad y enfado con la naturaleza disruptiva de la tos y el impacto negativo sobre el sueño y la interacción social (Kuzniar *et al.*, 2007, *Mayo Clin. Proc.* 82(1):56-60). En pacientes con fibrosis quística (FQ), la tos es uno de los síntomas más prominentes relacionados con la enfermedad, y los aumentos en la tos diurna y nocturna, junto con los aumentos en la producción de esputo son las razones más comunes para solicitar atención médica no programada (Sawicki *et al.*, 2006, *Ped. Pulm. Suppl.* 29:344(#388)). La tos en la FQ está probablemente relacionada con la obstrucción de las vías respiratorias por secreciones mucopurulentas y con la inflamación crónica de las vías respiratorias; una tos sustancialmente incrementada anuncia por lo común una exacerbación pulmonar, y está asociada con una disminución del VEF₁ y aumento de los marcadores inflamatorios (Smith *et al.*, 2006, *Thorax* 61(5):425-9). Se han documentado frecuencias de tos crónica diurna de 2 a 5 toses por hora en pacientes con FQ justo después de haber completado un tratamiento para exacerbación pulmonar (*Id.*), pero probablemente son más altas en el ámbito ambulatorio; los individuos normales tienen generalmente menor número de toses en todo el día (Hsu *et al.*, 1994, *Eur. Respir. J.* 7(7):1246-1253). La evaluación subjetiva de la tos se ve a menudo alterada por el acomodamiento del paciente a la cronicidad del evento y la consiguiente incapacidad para recordar el número de toses que se han producido; los pacientes tienden a no informar episodios de tos y a menudo existe poca correlación entre la evaluación objetiva y subjetiva de la tos (*Id.*; Coyle *et al.*, 2005, *Cough* 1:3; Smith *et al.*, 2006, *Thorax* 61(5):425-9).

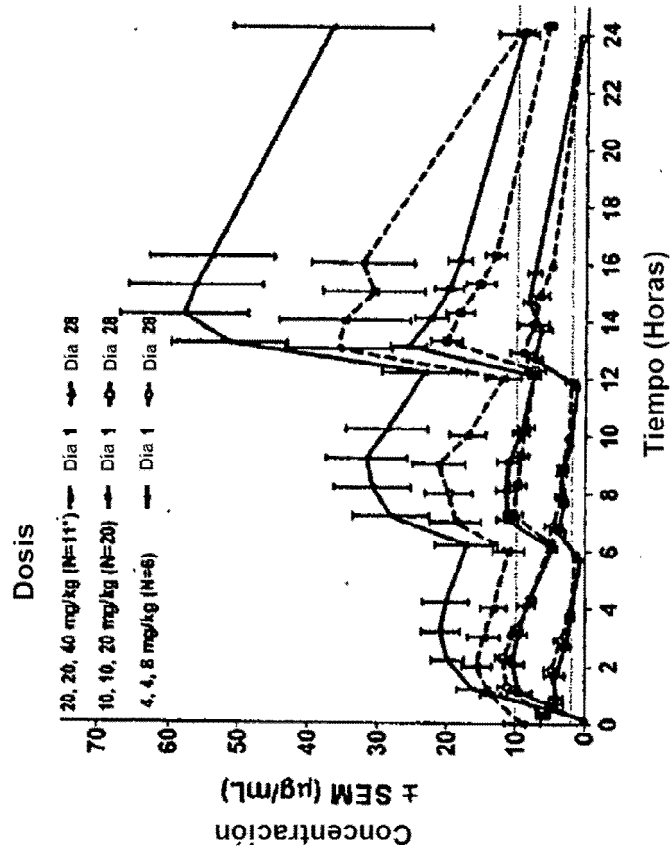
El LifeShirt[®] de VivoMetrics, Inc. incorpora transductores de detección de movimiento, electrodos, un micrófono de garganta, una bolsa de calibración y un acelerómetro de 3 ejes, dentro un chaleco ligero y lavable que está disponible para pacientes de ≥5 años de edad (véase LifeShirt[®] Monitoring System QuickStart Guide). Utilizando los datos integrados procedentes de los sensores de movimiento y del micrófono se puede medir la frecuencia y la intensidad de la tos. Los datos con fecha y hora se almacenan en una tarjeta CompactFlash alojada en el grabador de la que se pueden descargar los datos y enviarlos al fabricante, VivoMetrics, Inc., para su análisis mediante programas informáticos especializados. Se pueden transferir los datos a Excel, Oracle o SAS.

El dispositivo ha demostrado ser muy preciso en la evaluación de la tos en comparación con la evaluación por vídeo o audio de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Coyle *et al.*, 2005, *Cough* 1:3). Se ha utilizado el dispositivo para obtener los datos expuestos en la Figura 2 y se utilizará para ofrecer datos complementarios sustanciales sobre los beneficios clínicos del ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico durante las pruebas de fase III para FQ. Los datos existentes acerca de síntomas, recogidos informalmente de los estudios en fase II del ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico respaldan este concepto. Cabe destacar que varios pacientes han descritos disminuciones de la tos durante el estudio. Basándose en la hipótesis de que la inducción de la función de CFTR mediada por el ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico reduciría la obstrucción e inflamación de las vías respiratorias, la disminución de la frecuencia de tos podría servir como una integración sintomática de estos efectos farmacológicos y podría ofrecer una evaluación más precisa y cuantitativa que el informe verbal por parte del paciente.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un compuesto para uso en un método para tratar, prevenir o gestionar una enfermedad asociada con una falta de expresión de un gen resultante de un codón de parada prematura, en donde el compuesto es ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico o una sal, solvato o hidrato del mismo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha enfermedad es fibrosis quística o distrofia muscular de Duchenne, en donde dicho método comprende la administración del compuesto en tres dosis diarias, en donde se administran una primera dosis, una segunda dosis y una tercera dosis en un período de 24 horas según la fórmula 1X, 1X, 2X, en donde X es 18-22 mg/kg y en donde cada dosis mantiene el nivel plasmático de ácido 3-[5-(2-fluoro-fenil)-[1,2,4]oxadiazol-3-il]-benzoico por encima de 2 µg/ml durante al menos 2 horas.
- 10 2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde se administran las dosis por vía oral a un ser humano.
3. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el gen es el gen *CFTR*.
4. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde el gen es el gen *distrofina*.
- 15 5. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde se administra el compuesto utilizando una o más presentaciones unitarias que comprenden cada una dicho compuesto en una cantidad en un intervalo entre 35 mg y 1.400 mg.
6. El compuesto para uso según la reivindicación 5, en donde la cantidad de dicho compuesto en cada presentación unitaria está seleccionada de 35 mg, 50 mg, 70 mg, 100 mg, 125 mg, 140 mg, 175 mg, 200 mg, 250 mg, 280 mg, 350 mg, 500 mg, 560 mg, 700 mg, 750 mg, 1.000 mg o 1.400 mg.
- 20 7. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde se administra la primera dosis por la mañana, se administra la segunda dosis al mediodía y se administra la tercera dosis por la noche del período de 24 horas.
8. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde se administran las dosis a intervalos entre dosis de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 horas.
- 25 9. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde se administra la segunda dosis aproximadamente 6 horas después haber administrado la primera dosis, en donde se administra la tercera dosis aproximadamente 6 horas después haber administrado la segunda dosis y en donde se administra la primera dosis aproximadamente 12 horas después haber administrado la tercera dosis de un período de 24 horas precedente, en donde se administran la primera dosis, la segunda dosis o la tercera dosis alrededor de 30 minutos después de una comida.
10. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde se administran las tres dosis diarias en una terapia continua que comprende una pluralidad de períodos de 24 horas.

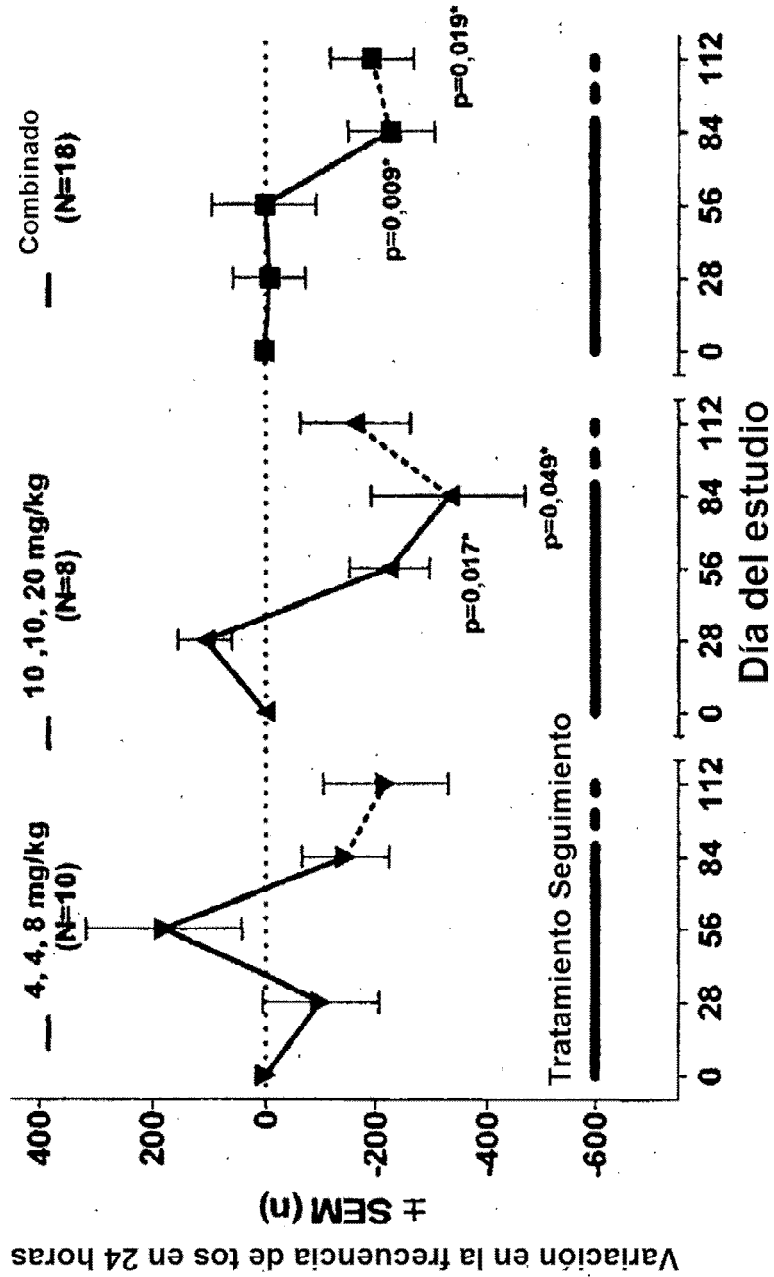
30



SEM = error estándar de la media

FIG. 1

Inducción de mejorías significativas dependientes del tiempo en la frecuencia media de tos en 24 horas



Mejoría

* Prueba de la t emparejada frente al Día 1

FIG. 2