

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 290**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/20** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**A61K 31/443** (2006.01)

**A61K 31/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.11.2013 PCT/US2013/067952**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.05.2014 WO14071122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.11.2013 E 13792149 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.09.2018 EP 2914248**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades mediadas por CFTR**

30 Prioridad:

**02.11.2012 US 201261721622 P**

**20.11.2012 US 201261728328 P**

**28.02.2013 US 201361770668 P**

**16.05.2013 US 201361824005 P**

**28.06.2013 US 201361840668 P**

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

**19.12.2018**

73 Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED  
(100.0%)**

**50 Northern Avenue  
Boston, MA 02210, US**

72 Inventor/es:

**VERWIJS, MARINUS, JACOBUS;  
KARKARE, RADHIKA y  
MOORE, MICHAEL, DOUGLAS**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 694 290 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

Composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades mediadas por CFTR

5 **Campo técnico de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones y se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Compuesto 1) Forma I y una dispersión sólida que comprende N-(5-hidroxi-2,4-diterc-butil-fenil)-4-oxo-1H-quinolin-3-carboxamida sustancialmente amorfa (Compuesto 2). Las composiciones farmacéuticas se pueden usar en métodos de tratamiento. La invención también se refiere a métodos de fabricación de comprimidos y a kits que comprenden las composiciones farmacéuticas.

15 **Antecedentes**

La fibrosis quística (FQ) es una enfermedad genética recesiva que afecta a aproximadamente 30.000 niños y adultos en Estados Unidos y a aproximadamente 30.000 niños y adultos en Europa. A pesar de los avances en el tratamiento de la FQ, no existe cura.

20 En los pacientes con fibrosis quística, las mutaciones en el CFTR expresado endógenamente en los epitelios respiratorios conducen a una reducción de la secreción apical de aniones que causa un desequilibrio en el transporte de iones y fluidos. La disminución resultante en el transporte de aniones contribuye a un aumento de la acumulación de moco en el pulmón y a las infecciones microbianas acompañantes que, en última instancia, causan la muerte en los pacientes con FQ. Además de la enfermedad respiratoria, los pacientes con FQ padecen normalmente problemas gastrointestinales e insuficiencia pancreática que, si se deja sin tratar, provoca la muerte. Además, la mayoría de los varones con fibrosis quística son estériles y la fertilidad disminuye entre las mujeres con fibrosis quística. Al contrario que los graves efectos de las dos copias del gen asociado a la fibrosis quística, los individuos con una sola copia del gen asociado a la FQ presentan una mayor resistencia al cólera y a la deshidratación como consecuencia de la diarrea, lo que quizás explique la frecuencia relativamente elevada del gen de la FQ dentro de la población.

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

40 La delección del residuo 508 en  $\Delta$ F508-CFTR impide el plegamiento correcto de la proteína naciente. Esto da como resultado la incapacidad de la proteína mutante para salir del ER y el tráfico a la membrana plasmática. Como resultado, el número de canales presentes en la membrana es mucho menor que el observado en las células que expresan el CFTR natural. Además de la alteración del tránsito, la mutación produce una abertura y un cierre defectuosos de los canales. En conjunto, el menor número de canales en la membrana y la abertura y cierre defectuosos tienen como resultado una reducción del transporte de los aniones a través de los epitelios, que conduce a un transporte defectuoso de iones y fluidos. (Quinton, P. M. (1990), FASEB J. 4: 2709-2727). Sin embargo, los estudios han demostrado que los números reducidos del  $\Delta$ F508-CFTR en la membrana son funcionales, aunque menos que el CFTR natural. (Dalemans et al. (1991), Nature Lond. 354: 526-528; Denning et al., citado anteriormente; Pasyk y Foskett (1995), J. Cell. Biochem. 270: 12347-50). Además de  $\Delta$ F508-CFTR, otras mutaciones en el CFTR causantes de enfermedad que producen un tránsito, una síntesis y/o una abertura y un cierre defectuosos de los canales se podrían regular por aumento o por disminución para alterar la secreción de aniones y modificar la progresión y/o gravedad de la enfermedad.

El compuesto 1 en forma de sal se desvela en la Publicación de PCT internacional WO2007056341 y en la Patente de Estados Unidos n.º 7.741.321 como un inductor de la actividad de CFTR y, por lo tanto, como un tratamiento útil para enfermedades mediadas por CFTR, tales como la fibrosis quística. La Forma I del Compuesto 1, que es una forma sustancialmente cristalina y libre de sal, se desvela en la publicación PCT internacional WO2009073757 y en la Patente de Estados Unidos n.º 8.507.534. El compuesto 2 se desvela en la publicación PCT WO2006002421 y la patente de Estados Unidos n.º 7.495.103 como inductor de la actividad de CFTR y, por tanto, como tratamiento útil para enfermedades mediadas por CFTR, tal como fibrosis quística. Una dispersión sólida que comprende un Compuesto 2 sustancialmente amorfo se desvela en la publicación internacional PCT WO2010019239 y en la solicitud de patente publicada de Estados Unidos n.º US20100074949.

Los compuestos que son potenciadores de CFTR, tal como el compuesto 2, y los compuestos que son correctores de CFTR, tal como el compuesto 1, han demostrado independientemente tener utilidad en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el CFTR, tal como la fibrosis quística.

Por consiguiente, existe la necesidad de nuevos tratamientos de enfermedades mediadas por CFTR que implique compuestos correctores y potenciadores del CFTR.

5 Particularmente, existe la necesidad de terapias de combinación para tratar enfermedades mediadas por CFTR, tales como la fibrosis quística, que incluyen compuestos correctores y potenciadores del CFTR.

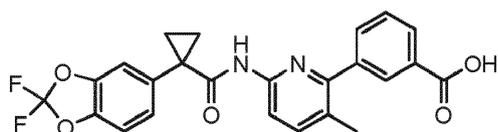
Más particularmente, hay una necesidad de terapias de combinación para tratar enfermedades mediadas por CFTR, tales como fibrosis quística, que incluyen compuestos potenciadores de CFTR, tales como el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, en combinación con compuestos correctores de CFTR, tales como la Forma I del Compuesto 1.

El Compuesto 1 como parte de una combinación con el Compuesto 2 ha recibido una Designación de Terapia de Avance por parte de la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de la fibrosis quística, una de las dos subvenciones de este tipo en el momento de la presentación de esta solicitud (siendo la otra para el compuesto 2). Esto demuestra una importante necesidad no satisfecha para el tratamiento eficaz de la causa de la fibrosis quística en comparación con los tratamientos sintomáticos. Además, un desafío común para los fármacos aprobados por la FDA es la falta ocasional de disponibilidad de medicamentos para los pacientes que lo necesitan. Por consiguiente, existe una necesidad no satisfecha significativa para las formulaciones de Compuesto 1 y Compuesto 2 desveladas en el presente documento y los procesos para prepararlos de una manera continua y controlada.

Además, el cumplimiento por parte del paciente de las pautas de tratamiento y las cantidades de dosis depende en gran medida de la facilidad de administración del fármaco. Una composición farmacéutica que comprende cantidades de dosis fijas de un corrector de CFTR y un potenciador de CFTR, en el que las formas sólidas de dicho corrector y potenciador son estables, es un avance significativo para el tratamiento de enfermedades mediadas por CFTR tales como la fibrosis quística. El documento WO 2010/019239 A2 desvela composiciones farmacéuticas que comprenden una dispersión sólida de N-[2,4-Bis(1,1-dimetiletil)-5-hidroxifenil]-1,4-dihidro-4-oxoquinolina-3-carboxamida, métodos de fabricación de estas composiciones farmacéuticas, y métodos de administración de estas composiciones farmacéuticas. El documento WO 2009/073757 A1 desvela una forma de estado sólido sustancialmente cristalina y libre de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[D][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Forma I), composiciones farmacéuticas del mismo y métodos de tratamiento con el mismo.

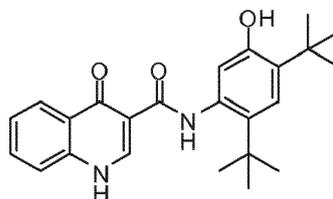
## SUMARIO

35 La invención presenta composiciones farmacéuticas que comprenden 100 mg o 200 mg de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Compuesto 1), Forma I, que tiene la siguiente estructura:



40 Compuesto 1; y

una dispersión sólida de N-(5-hidroxi-2,4-diterc-butil-fenil)-4-oxo-1H-quinolin-3-carboxamida (compuesto 2) sustancialmente amorfa, que tiene la siguiente estructura:



45 Compuesto 2;

en las que el Compuesto 2 sustancialmente amorfo está presente en la composición farmacéutica en una cantidad de 125 mg,

50 en las que la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza por uno o más picos a 15,4, 16,3 y 14,5 grados en un patrón de difracción de rayos X en polvo, y

en las que el Compuesto 2 sustancialmente amorfo tiene menos del 15 % de cristalinidad.

En una realización, la composición farmacéutica comprende:

- 5 a. la Forma I del Compuesto 1;  
 b. una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo;  
 c. una carga;  
 d. un disgregante;  
 e. un tensioactivo; y  
 f. un aglutinante;

denominado **PC-I**.

- 10 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden de 30 al 55 por ciento en peso de la Forma I del Compuesto 1 y de 10 a 45 por ciento en peso de dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

- 15 En una realización, la carga se selecciona entre celulosa, celulosa modificada, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, acetato de celulosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio dibásico, sacarosa, lactosa, almidón de maíz, almidón de patata o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, la carga es celulosa microcristalina, y está presente en una cantidad que varía del 10 al 20 por ciento en peso.

- 20 En una realización, el disgregante se selecciona entre agar-agar, alginas, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa, celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, arcillas, croscarmelosa sódica, crospovidona, gomas, silicato de magnesio y aluminio, metilcelulosa, poliacrilina potásica, alginato sódico, glicolato de almidón sódico, almidón de maíz, almidón de patata, almidón de tapioca o cualquier combinación de los mismos. En otra  
 25 realización, el disgregante es croscarmelosa sódica y está presente en una cantidad que varía de 1 a 3 por ciento en peso.

- 30 En una realización, el tensioactivo se selecciona entre laurilsulfato de sodio, estearilfumerato de sodio, monooleato de polioxietileno 20 sorbitán, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el tensioactivo es laurilsulfato de sodio, y está presente en una cantidad que varía de 0,5 a 2 por ciento en peso.

- 35 En una realización, el aglutinante se selecciona entre polivinilpirrolidona, fosfato de calcio dibásico, sacarosa, almidón de maíz, celulosa modificada, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el aglutinante es polivinilpirrolidona, y está presente en una cantidad que varía de 0 a 5 por ciento en peso.

- 35 En el presente documento se desvela una composición farmacéutica que tiene la siguiente formulación:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	35-50
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	25-40
Celulosa microcristalina	10-20
Croscarmelosa de sodio	1-3
Laurilsulfato sódico	0,5-2
Polivinilpirrolidona	0-5

denominado **PC-II**.

- 40 En otra realización, la composición farmacéutica comprende:

- 45 a. la Forma I del Compuesto 1;  
 b. una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo;  
 c. una carga;  
 d. un disgregante;  
 e. un tensioactivo;  
 f. un aglutinante; y  
 g. un lubricante;

- 50 denominado **PC-III**.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden aproximadamente 200 mg de la Forma I del Compuesto 1 y aproximadamente 125 mg de Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

5 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden de 25 a 50 por ciento en peso de la Forma I del Compuesto 1 y de 15 a 35 por ciento en peso de dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

10 En una realización, la carga se selecciona entre celulosa, celulosa modificada, carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa hidroximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, acetato de celulosa, celulosa microcristalina, fosfato de calcio dibásico, sacarosa, lactosa, almidón de maíz, almidón de patata o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, la carga es celulosa microcristalina, y está presente en una cantidad que varía del 20 al 30 por ciento en peso.

15 En una realización, el disgregante se selecciona entre agar-agar, alginas, carbonato de calcio, carboximetilcelulosa, celulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilcelulosa poco sustituida, arcillas, croscarmelosa sódica, crospovidona, gomas, silicato de magnesio y aluminio, metilcelulosa, poliacrilina potásica, alginato sódico, glicolato de almidón sódico, almidón de maíz, almidón de patata, almidón de tapioca o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el disgregante es croscarmelosa sódica y está presente en una cantidad que varía de 3 a 10 por ciento en peso.

20 En una realización, el tensioactivo se selecciona entre laurilsulfato de sodio, estearilfumerato de sodio, monooleato de polioxietileno 20 sorbitán, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el tensioactivo es laurilsulfato de sodio, y está presente en una cantidad que varía de 0,5 a 2 por ciento en peso.

25 En una realización, el aglutinante se selecciona entre polivinilpirrolidona, fosfato de calcio dibásico, sacarosa, almidón de maíz, celulosa modificada, o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el aglutinante es polivinilpirrolidona, y está presente en una cantidad que varía de 0 a 5 por ciento en peso.

30 En una realización, el lubricante se selecciona entre estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, estearato de sodio, ácido esteárico, estearato de aluminio, leucina, behenato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado o cualquier combinación de los mismos. En otra realización, el lubricante es estearato de magnesio y está presente en una cantidad que varía de 0,5 a 2 por ciento en peso.

35 En una realización, la presente invención presenta una composición farmacéutica que tiene la siguiente formulación:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	25-50
Una dispersión sólida que comprende Compuesto 2 sustancialmente amorfo.	15-35
Celulosa microcristalina	20-30
Croscarmelosa de sodio	3-10
Laurilsulfato sódico	0,5-2
Polivinilpirrolidona	0-5
Estearato de magnesio	0,5-2

denominado **PC-IV**.

40 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden además un colorante y opcionalmente una cera. En otra realización, el colorante está presente en una cantidad que varía de 2 a 4 por ciento en peso. En otra realización, la cera es cera de carnauba presente en una cantidad que varía de 0 a 0,020 por ciento en peso.

45 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención son composiciones farmacéuticas orales sólidas. En otra realización, las composiciones farmacéuticas orales sólidas son una composición farmacéutica granular o comprimido.

50 En una realización, las composiciones farmacéuticas granulares de la presente invención tienen la siguiente formulación:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	43
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	34
Celulosa microcristalina	17
Croscarmelosa de sodio	2
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3

denominado **PC-V**.

- 5 En una realización, las composiciones farmacéuticas granulares de la presente invención tienen la siguiente formulación:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	38
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	40
Celulosa microcristalina	16
Croscarmelosa de sodio	2
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3

denominado **PC-VI**.

- 10 Las composiciones farmacéuticas granulares que tienen la siguiente formulación se desvelan en el presente documento:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	51
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	27
Celulosa microcristalina	16
Croscarmelosa de sodio	2
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3

- 15 denominado **PC-VII**.

En una realización, los comprimidos de la presente invención tienen la siguiente formulación:

20

25

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	35
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	28
Compuesto 2	
Celulosa microcristalina	26
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1

denominado **PC-VIII**.

- 5 En una realización, los comprimidos de la presente invención tienen la siguiente formulación:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	31
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	32
Celulosa microcristalina	26
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1

denominado **PC-IX**.

- 10 En una realización, los comprimidos de la presente invención tienen la siguiente formulación:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	41
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	22
Celulosa microcristalina	26
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1

denominado **PC-X**.

- 15 En una realización, los comprimidos de la presente invención tienen la siguiente formulación:

20

25

	mg
Forma I del Compuesto 1	200
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	156
Celulosa microcristalina	150
Croscarmelosa de sodio	34
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	15
Estearato de magnesio	6

denominado **PC-XI**.

En el presente documento se desvelan comprimidos que tienen la siguiente formulación:

5

	mg
Forma I del Compuesto 1	150
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	156
Celulosa microcristalina	129
Croscarmelosa de sodio	30
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	13
Estearato de magnesio	5

denominado **PC-XII**.

En el presente documento se desvelan comprimidos que tienen la siguiente formulación:

10

	mg
Forma I del Compuesto 1	200
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	104
Celulosa microcristalina	128
Croscarmelosa de sodio	29
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	13
Estearato de magnesio	5

denominado **PC-XIII**.

En una realización, los comprimidos de la presente invención tienen la siguiente formulación:

15

20

25

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	34
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	27
Celulosa microcristalina	25
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1
Colorante	3

denominado **PC–XIV**.

En una realización, los comprimidos de la presente invención tienen la siguiente formulación:

5

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	30
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	31
Celulosa microcristalina	25
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1
Colorante	3

denominado **PC–XV**.

En el presente documento se desvelan comprimidos que tienen la siguiente formulación:

10

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	40
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	21
Celulosa microcristalina	25
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1
Colorante	3

denominado **PC–XVI**.

En una realización, los comprimidos de la presente invención tienen la siguiente formulación:

15

	mg
Forma I del Compuesto 1	200
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	156
Celulosa microcristalina	150
Croscarmelosa de sodio	34
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	15
Estearato de magnesio	6
Colorante	17

denominado **PC–XVII**.

En una realización, los comprimidos de la presente invención tienen la siguiente formulación:

5

	mg
Forma I del Compuesto 1	200
Compuesto 2 sustancialmente amorfo	125
Celulosa microcristalina	150
Croscarmelosa de sodio	34
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	15
Estearato de magnesio	6
Colorante	17

denominado **PC–XVIII**.

En el presente documento se desvelan comprimidos que tienen la siguiente formulación:

10

	mg
Forma I del Compuesto 1	150
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	156
Celulosa microcristalina	129
Croscarmelosa de sodio	29
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	13
Estearato de magnesio	5
Colorante	15

denominado **PC–XIX**.

En el presente documento se desvelan comprimidos que tienen la siguiente formulación:

15

	mg
Forma I del Compuesto 1	200
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	104
Celulosa microcristalina	128
Croscarmelosa de sodio	29
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	13
Estearato de magnesio	5
Colorante	14

denominado **PC–XX**.

En el presente documento se desvelan comprimidos que tienen la siguiente formulación:

5

	mg
Forma I del Compuesto 1	200
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	83
Celulosa microcristalina	128
Croscarmelosa de sodio	29
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	13
Estearato de magnesio	5
Colorante	14

denominado **PC–XXI**.

En el presente documento se desvelan comprimidos que tienen la siguiente formulación:

10

Componente	% en peso
Forma I del Compuesto 1	20-40
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	30-40
Celulosa microcristalina	20-30
Croscarmelosa de sodio	1-10
Polivinilpirrolidona	1-5
Laurilsulfato sódico	0,1-1
Estearato de magnesio	0,5-1,5

denominado **PC–XXII**.

En una realización, los comprimidos de la presente invención tienen la siguiente formulación:

15

20

ES 2 694 290 T3

Compuesto 1/Compuesto 2 100 mg/125 mg			
Componente	% en gránulo	% en comprimido	mg/comprimido
Forma I del Compuesto 1	30	25	100
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	47	38	156
Celulosa microcristalina	17	13	55
Croscarmelosa de sodio	2	2	7
Polivinilpirrolidona	3	3	11
Laurilsulfato sódico	1	1	3
Gránulos Totales	100	82	332
Croscarmelosa de sodio		4	18
Celulosa microcristalina		13	53
Estearato de magnesio		1	4
Comprimidos totales		100	407

denominado **PC-XXIII**.

En el presente documento se desvelan comprimidos que tienen la siguiente formulación:

5

Compuesto 1/Compuesto 2 150 mg/125 mg			
Componente	% en gránulo	% en comprimido	mg/comprimido
Forma I del Compuesto 1	38	31	150
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	40	32	156
Celulosa microcristalina	16	13	65
Croscarmelosa de sodio	2	2	8
Polivinilpirrolidona	3	3	13
Laurilsulfato sódico	1	1	4
Gránulos Totales	100	82	396
Croscarmelosa de sodio		4	22
Celulosa microcristalina		13	64
Estearato de magnesio		1	5
Comprimidos totales		100	487

denominado **PC-XXIV**.

En el presente documento se desvelan comprimidos que tienen la siguiente formulación:

10

15

20

Compuesto 1/Compuesto 2 75 mg/125 mg			
Componente	% en gránulo	% en comprimido	mg/comprimido
Forma I del Compuesto 1	25	20	75
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	52	43	156
Celulosa microcristalina	17	13	49
Croscarmelosa de sodio	2	2	6
Polivinilpirrolidona	3	3	10
Laurilsulfato sódico	1	1	3
Gránulos Totales	100	82	299
Croscarmelosa de sodio		4	17
Celulosa microcristalina		13	48
Estearato de magnesio		1	4
Comprimido principal		100	368
Rosa opadry		3	11
Comprimidos recubiertos con película			379

denominado **PC-XXV**.

5 En un aspecto, la presente invención presenta una composición farmacéutica, una composición farmacéutica granular o comprimido como se define en las reivindicaciones para su uso en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de la composición farmacéutica, composición farmacéutica granular o comprimido.

10 En una realización, la presente invención presenta una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, 13 o 15 para su uso en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, 13 o 15.

15 En una realización, el paciente tiene una mutación  $\Delta F508$  CFTR. En otra realización, el paciente es homocigoto en  $\Delta F508$ . En otra realización, el paciente es heterocigoto en  $\Delta F508$ . En otra realización, se administran dos comprimidos al paciente al día.

20 En un aspecto, la presente invención presenta un método para preparar un comprimido de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el método comprende

a) granular en húmedo los siguientes componentes para producir un gránulo:

- 25
- a. la Forma I del Compuesto 1;
  - b. una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo;
  - c. una carga;
  - d. un disgregante;
  - e. un tensioactivo; y
  - f. un aglutinante;

30 y

b) comprimir los siguientes componentes para producir un comprimido:

- 35
- i) una pluralidad de gránulos de la etapa a)
  - ii) un disgregante;
  - iii) una carga; y
  - iv) un lubricante;

40 en las que la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza por uno o más picos a 15,4, 16,3 y 14,5 grados en un patrón de difracción de rayos X en polvo, y

en las que el Compuesto 2 sustancialmente amorfo tiene menos del 15 % de cristalinidad.

En un aspecto, la presente invención presenta un kit que comprende composiciones farmacéuticas, composiciones farmacéuticas granulares o comprimidos de la presente invención, y un agente terapéutico separado o una composición farmacéutica del mismo.

En una realización, las composiciones farmacéuticas, las composiciones farmacéuticas granulares o los comprimidos de la presente invención, y el agente terapéutico separado o la composición farmacéutica del mismo están en recipientes separados. En otra realización, los recipientes separados son botellas. En otra realización, los recipientes separados son viales. En otra realización, los recipientes separados son envases de tipo blíster.

En el presente documento se desvela un proceso continuo o semicontinuo para preparar las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento mediante un proceso de granulación húmeda de doble tornillo que comprende las etapas de cribado y pesaje del Compuesto 1, el Compuesto 2 y los excipientes; mezclar el Compuesto 1, el Compuesto 2 y los excipientes en un mezclador y alimentar la mezcla en un granulador continuo mientras se añade un fluido de granulación que comprende tensioactivo y un aglutinante a una velocidad adecuada durante un tiempo adecuado y cortar la mezcla en gránulos; secar los gránulos; mezclar los gránulos con excipientes extragranulares durante un período de tiempo adecuado; comprimir la mezcla en comprimidos; recubrir los comprimidos; y, opcionalmente, imprimir un monograma en una o ambas caras del comprimido.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **Figura 1** es un patrón de difracción de rayos X calculado a partir de una estructura cristalina única de la Forma I del Compuesto 1.

La **Figura 2** es un patrón real de difracción de rayos X en polvo de la Forma I del Compuesto 1.

La **Figura 3** es un gráfico que representa los perfiles de disolución en gradiente de pH del Compuesto 1 para un comprimido preparado mediante un proceso de granulación de alto cizallamiento (HSG) y un proceso de granulación húmeda en tornillo doble (TSWG) (LOD significa pérdida por desecación, una medida para definir la cantidad de agua en un polvo/gránulo).

La **Figura 4** es un gráfico que representa la estabilidad de la forma sustancialmente amorfa del Compuesto 2 en la formulación de comprimido PC-XVII a 50 °C después del pre-equilibrio a 60 % de humedad relativa mostrando solo una pequeña cantidad de cristalinidad a lo largo del tiempo.

La **Figura 5** es un gráfico que muestra la estabilidad de la forma sustancialmente amorfa del Compuesto 2 en la formulación de comprimido PC-XVII a 60 °C después del pre-equilibrio a 60 % de humedad relativa mostrando solo una pequeña cantidad de cristalinidad a lo largo del tiempo.

La **Figura 6** es un gráfico que muestra la estabilidad de la forma sustancialmente amorfa del Compuesto 2 en la formulación de comprimido PC-XX a 60 °C después del pre-equilibrio a 60 % de humedad relativa mostrando solo una pequeña cantidad de cristalinidad a lo largo del tiempo.

La **Figura 7** es un gráfico que muestra la estabilidad de la forma sustancialmente amorfa del Compuesto 2 en la formulación de comprimido PC-XX a 50 °C después del pre-equilibrio a 60 % de humedad relativa mostrando solo una pequeña cantidad de cristalinidad a lo largo del tiempo.

La **Figure 8** es un espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto 1.

La **Figura 9** es un espectro de RMN <sup>1</sup>H de sal HCl del compuesto 1.

La **Figura 10** es una representación de calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la Forma I del Compuesto 1.

La **Figura 11** es una imagen conformacional de la Forma I del Compuesto 1 basada en el análisis de rayos X de cristal único.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

#### **DEFINICIONES**

Como se usa en el presente documento, "CFTR" significa regulador de conductancia transmembrana de fibrosis quística.

Como se usa en el presente documento, una "mutación ΔF508 " o "mutación F508-del" es una mutación específica dentro de la proteína CFTR. La mutación es una delección de los tres nucleótidos que comprenden el codón para el

aminoácido fenilalanina en la posición 508, lo que da como resultado en una proteína CFTR que carece de este residuo de fenilalanina.

5 Como se usa en el presente documento, un paciente que es "homocigoto" para una mutación particular, por ejemplo  $\Delta F508$ , tiene la misma mutación en cada alelo.

Como se usa en el presente documento, un paciente que es "heterocigoto" para una mutación particular, por ejemplo,  $\Delta F508$ , tiene esta mutación en un alelo y una mutación diferente en el otro alelo.

10 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "corrector de CFTR" se refiere a un compuesto que aumenta la cantidad de proteína CFTR funcional en la superficie celular, lo que da como resultado un mejor transporte de iones.

15 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "potenciador de CFTR" se refiere a un compuesto que aumenta la cantidad de proteína CFTR funcional localizada en la superficie celular, lo que da como resultado un mejor transporte de iones.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "principio farmacéutico activo" o "API" se refiere a un compuesto biológicamente activo.

Las expresiones "forma sólida", "formas sólidas" y términos relacionados, cuando se usan en el presente documento se refieren al compuesto 1 o compuesto 2, en una forma sólida particular, por ejemplo, cristales, y estados amorfos.

25 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente amorfo" se refiere a un material sólido que tiene poco o ningún orden de largo alcance en la posición de sus moléculas. Por ejemplo, los materiales sustancialmente amorfos tienen menos de aproximadamente el 15 % de cristalinidad (por ejemplo, menos de aproximadamente 10 % de cristalinidad o menos de aproximadamente 5 % de cristalinidad). También se señala que la expresión "sustancialmente amorfo" incluye el descriptor, "amorfo", que se refiere a materiales que no tienen cristalinidad (0 %).

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente cristalino" (como en la frase, Forma I del Compuesto 1 sustancialmente cristalina se refiere a un material sólido que tiene predominantemente un orden de rango predominantemente largo en la posición de sus moléculas. Por ejemplo, los materiales sustancialmente cristalinos tienen más de 85 % de cristalinidad (por ejemplo, más de 90 % de cristalinidad o más de 95 % de cristalinidad). También se observa que la expresión "sustancialmente cristalino" incluye el descriptor "cristalino", que se refiere a materiales que tienen un 100 % de cristalinidad.

40 El término "cristalino" y los términos relacionados utilizados en el presente documento, cuando se usan para describir una sustancia, componente, producto o forma, significa que la sustancia, componente o producto es sustancialmente cristalino según se ha determinado mediante difracción de rayos X. (Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21ª edición, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (2003); Farmacopea de Estados Unidos, 23ª ed., 1843–1844 (1995)).

45 Tal como se usa en el presente documento, un "excipiente" incluye componentes funcionales y no funcionales en una composición farmacéutica.

50 Tal como se usa en el presente documento, un "disgregante" es un excipiente que hidrata una composición farmacéutica y ayuda en la dispersión de comprimidos. Tal como se usa en el presente documento, un "diluyente" o "carga" es un excipiente que añade volumen a una composición farmacéutica.

Tal como se usa en el presente documento, un "tensioactivo" es un excipiente que imparte a las composiciones farmacéuticas una solubilidad y/o humectabilidad mejoradas.

55 Tal como se usa en el presente documento, un "aglutinante" es un excipiente que imparte a una composición farmacéutica mayor cohesión o resistencia a la tracción (por ejemplo, dureza).

Tal como se usa en el presente documento, un "deslizante" es un excipiente que imparte a las composiciones farmacéuticas propiedades de flujo mejoradas.

60 Tal como se usa en el presente documento, un "colorante" es un excipiente que imparte a una composición farmacéutica, por ejemplo, un comprimido, un color deseado. Los ejemplos de colorantes incluyen pigmentos disponibles comercialmente, tales como FD&C Blue # 1 Aluminum Lake, FD&C Blue # 2, otros colores FD&C Blue, dióxido de titanio, óxido de hierro y/o combinaciones de los mismos. En una realización, el comprimido proporcionada por la invención es rosa.

65

Como se usa en el presente documento, un "lubricante" es un excipiente que se añade a las composiciones farmacéuticas que se prensan para formar comprimidos. El lubricante ayuda a compactar los gránulos en comprimidos y expulsar un comprimido de una composición farmacéutica de una prensa de matriz.

- 5 Tal como se usa en el presente documento, "centímetro cúbico" y "cc" se usan de manera intercambiable para representar una unidad de volumen. Tenga en cuenta que 1 cc = 1 ml.

Como se usa en el presente documento, "kilopondio" y "kP" se usan indistintamente y se refieren a la medida de fuerza, donde kp = aproximadamente 9,8 Newtons.

- 10 Como se usa en el presente documento, "friabilidad" se refiere a la propiedad de un comprimido de permanecer intacto y mantener su forma a pesar de una fuerza externa de presión. La friabilidad se puede cuantificar usando la expresión matemática presentada en la ecuación 1:

$$\% \text{ friabilidad} = 100 \times \frac{(W_0 - W_f)}{W_0} \quad (1)$$

- 15 en la que  $W_0$  es el peso original del comprimido y  $W_f$  es el peso final del comprimido después de que se coloca a través del friabilador. La friabilidad se mide utilizando un aparato de prueba estándar de la USP que hace girar los comprimidos experimentales a 100 o 400 revoluciones. Algunos comprimidos de la invención tienen una friabilidad de menos del 5,0 %. En otra realización, la friabilidad es inferior al 2,0 %. En otra realización, la friabilidad objetivo es inferior al 1,0 % después de 400 revoluciones.

- 20 Como se usa en el presente documento, "diámetro medio de partícula" es el diámetro promedio de partícula medido usando técnicas tales como dispersión de luz láser, análisis de imagen o análisis por tamiz. En una realización, los gránulos usados para preparar las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la invención tienen un diámetro medio de partícula de menos de 1,0 mm.

- 30 Como se usa en el presente documento, "densidad aparente" es la masa de partículas de material dividida por el volumen total que ocupan las partículas. El volumen total incluye el volumen de partículas, el volumen vacío entre partículas y el volumen de poros internos. La densidad aparente no es una propiedad intrínseca de un material; puede cambiar dependiendo de cómo se procesa el material. En una realización, los gránulos usados para preparar las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la invención tienen una densidad aparente de aproximadamente 0,5-0,7 g/cc.

- 35 Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un compuesto de la invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad y el peso del sujeto, y la capacidad del compuesto de la invención para provocar una respuesta deseada en el sujeto. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Una cantidad eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial (por ejemplo, efectos secundarios) del compuesto de la invención se ve compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

- 40 Como se usa en el presente documento, y a menos que se especifique lo contrario, las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" de un compuesto significan una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de una enfermedad o trastorno, o para retrasar o minimizar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" y una "cantidad eficaz" de un compuesto significan una cantidad de agente terapéutico, solo o en combinación con uno o más agentes, que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento o manejo de la enfermedad o trastorno. Las expresiones "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad eficaz" pueden abarcar una cantidad que mejora la terapia general, reduce o evita los síntomas o causas de la enfermedad o trastorno, o aumenta la eficacia terapéutica de otro agente terapéutico.

- 45 "Sustancialmente puro", como se usa en la frase "Forma I del Compuesto 1 sustancialmente puro" significa una pureza superior a aproximadamente el 90 %. En otra realización, sustancialmente puro se refiere a una pureza superior a aproximadamente el 95 %. En otra realización, sustancialmente puro se refiere a una pureza superior a aproximadamente el 98 %. En otra realización, sustancialmente puro se refiere a una pureza superior a aproximadamente el 99 %.

- 50 Con respecto a la Forma I del Compuesto 1, o una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, los términos "aproximadamente" y "alrededor de", cuando se usan en relación con dosis, cantidades o porcentaje en peso de componentes de una composición o una forma farmacéutica, significa una dosis, cantidad o porcentaje en peso que un experto en la técnica reconoce que proporciona un efecto farmacológico equivalente al obtenido a partir de la dosis, cantidad o porcentaje en peso especificados. Específicamente, el término "aproximadamente" o "alrededor de" significa un error aceptable para un valor particular determinado por un experto

en la técnica, que depende en parte de cómo se mide o determina el valor. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" significa dentro de 1, 2, 3 o 4 desviaciones estándar. En ciertas realizaciones, el término "aproximadamente" o "alrededor de" significa dentro del 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % o 0,05 % de un valor o intervalo determinado.

5

## COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo. La cantidad de la Forma I del Compuesto 1 que está presente en la composición farmacéutica es de 100 mg o 200 mg. En algunas realizaciones de este aspecto, porcentaje en peso de la Forma I del Compuesto 1 presente en la composición farmacéutica es de 10 a 75 por ciento. En estas y otras realizaciones, la Forma I del Compuesto 1 está presente como Forma I del Compuesto 1 sustancialmente pura. La cantidad de Compuesto 2 sustancialmente amorfo que está presente en la composición farmacéutica es 125 mg. En algunas realizaciones de este aspecto, el porcentaje en peso del Compuesto 2 sustancialmente amorfo que está presente en la composición farmacéutica es de 10 a 75 por ciento. En estas y otras realizaciones, el Compuesto 2 sustancialmente amorfo está presente como Compuesto 2 sustancialmente puro y amorfo. "Sustancialmente puro" significa más del noventa por ciento de pureza; preferentemente más del 95 por ciento de pureza; más preferentemente más del 99,5 por ciento de pureza.

En una realización, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- a. la Forma I del Compuesto 1;
- b. una dispersión sólida del Compuesto 2 sustancialmente amorfo;
- c. una carga;
- d. un disgregante;
- e. un tensioactivo; y
- f. un aglutinante.

En otra realización de este aspecto, la composición farmacéutica comprende 100 mg de la Forma I del Compuesto 1. En otra realización de este aspecto, la composición farmacéutica comprende 200 mg de la Forma I del Compuesto 1.

En otra realización de este aspecto, la composición farmacéutica comprende 125 mg de Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden la Forma I del Compuesto 1, en la que la Forma I del Compuesto 1 está presente en una cantidad de al menos el 15 % en peso (por ejemplo, al menos el 20 % en peso, al menos el 30 % en peso, al menos el 40 % en peso, al menos el 50 % en peso o al menos el 60 % en peso) en peso de la composición.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, en el que el Compuesto 2 sustancialmente amorfo está presente en una cantidad de al menos el 15 % en peso (por ejemplo, al menos el 20 % en peso, al menos el 30 % en peso, al menos el 40 % en peso, al menos el 50 % en peso o al menos el 60 % en peso) en peso de la composición.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende la Forma I del Compuesto 1, una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, una carga, un disgregante, un tensioactivo y un aglutinante.

La concentración de la Forma I del Compuesto 1 y el Compuesto 2 sustancialmente amorfo en la composición depende de varios factores, TAL como la cantidad de composición farmacéutica necesaria para proporcionar una cantidad deseada de la Forma I del Compuesto 1 y el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y el perfil de disolución deseado de la composición farmacéutica.

En otra realización, la composición farmacéutica comprende la Forma I del Compuesto 1, en la que la Forma I del Compuesto 1 en su forma sólida tiene un diámetro medio de partícula, medido mediante dispersión de la luz (por ejemplo, utilizando un Malvern Mastersizer disponible en Malvern Instruments en Inglaterra) de 0, 1 micrómetros a 10 micrómetros. En otra realización, el tamaño de partícula de la Forma I del Compuesto 1 es de 1 micrómetro a 5 micrómetros. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 tiene un tamaño de partícula D50 de 2,0 micrómetros.

Como se indica, además de la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida del Compuesto 2 sustancialmente amorfo, en algunas realizaciones de la invención, las composiciones farmacéuticas que son formulaciones orales también comprenden uno o más excipientes, tales como cargas, disgregantes, tensioactivos, diluyentes, aglutinantes, deslizantes, lubricantes, colorantes o fragancias y cualquier combinación de los mismos.

65

Las cargas adecuadas para la invención son compatibles con los componentes de la composición farmacéutica, es decir, no reducen sustancialmente la solubilidad, la dureza, la estabilidad química, la estabilidad física o la actividad biológica de la composición farmacéutica. Las cargas de ejemplo incluyen: celulosas, celulosas modificadas (por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, hidroximetilcelulosa de etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa), acetato de celulosa, celulosa microcristalina, fosfatos de calcio, fosfato de calcio dibásico, almidones (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata), azúcares (por ejemplo, sorbitol, lactosa, sacarosa), o cualquier combinación de los mismos.

Por lo tanto, en una realización, la composición farmacéutica comprende al menos una carga en una cantidad de al menos el 5 % en peso (por ejemplo, al menos aproximadamente el 20 % en peso, al menos aproximadamente el 30 % en peso o al menos aproximadamente el 40 % en peso) en peso de la composición. Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 60 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 55 % en peso, de aproximadamente 25 % en peso a aproximadamente 50 % en peso o de aproximadamente 27 % en peso a aproximadamente 45 % en peso) de la carga, en peso de la composición. En otro ejemplo, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente el 20 % en peso (por ejemplo, al menos el 30 % en peso o al menos el 40 % en peso) de celulosa microcristalina, por ejemplo MCC Avicel PH102, en peso de la composición. En otro ejemplo más, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 60 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 55 % en peso o de aproximadamente 25 % en peso a aproximadamente 45 % en peso) de microcelulosa, en peso de la composición.

Los disgregantes adecuados para la invención mejoran la dispersión de la composición farmacéutica y son compatibles con los componentes de la composición farmacéutica, es decir, no reducen sustancialmente la estabilidad química, la estabilidad física, la dureza o la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los disgregantes de ejemplo incluyen croscarmelosa sódica, almidón glicolato sódico o una combinación de los mismos.

Por lo tanto, en una realización, la composición farmacéutica comprende disgregante en una cantidad de aproximadamente 10 % en peso o menos (por ejemplo, aproximadamente 7 % en peso o menos, aproximadamente 6 % en peso o menos, o aproximadamente 5 % en peso o menos) en peso de la composición. Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 10 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 1,5 % en peso a aproximadamente 7,5 % en peso o de aproximadamente 2,5 % en peso a aproximadamente 6 % en peso) de disgregante, en peso de la composición. En otro ejemplo, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 10 % en peso o menos (por ejemplo, 7 % en peso o menos, 6 % en peso o menos o 5 % en peso o menos) de croscarmelosa sódica, en peso de la composición. En otro ejemplo más, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 10 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 1,5 % en peso a aproximadamente 7,5 % en peso o de aproximadamente 2,5 % en peso a aproximadamente 6 % en peso) de croscarmelosa sódica, en peso de la composición. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 7,5 % en peso o de aproximadamente 1,5 % en peso a aproximadamente 6 % en peso) de disgregante, en peso de la composición. En aún otros ejemplos, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 1,5 % en peso a aproximadamente 7,5 % en peso o de aproximadamente 2,5 % en peso a aproximadamente 6 % en peso) de disgregante, en peso de la composición.

Los tensioactivos adecuados para la invención mejoran la humectabilidad de la composición farmacéutica y son compatibles con los componentes de la composición farmacéutica, es decir, no reducen sustancialmente la estabilidad química, la estabilidad física, la dureza o la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los tensioactivos de ejemplo incluyen laurilsulfato de sodio (SLS), estearilfumarato de sodio (SSF), monooleato de polioxietileno 20 sorbitán (por ejemplo, Tween™), o cualquier combinación de los mismos.

Por lo tanto, en una realización, la composición farmacéutica comprende un tensioactivo en una cantidad de aproximadamente 10 % en peso o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 % en peso o menos, aproximadamente 2 % en peso o menos, aproximadamente 1 % en peso o menos, aproximadamente 0,8 % en peso o menos, o aproximadamente 0,6 % en peso o menos) en peso de la composición. Por ejemplo, la composición farmacéutica incluye de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 5 % en peso a aproximadamente 0,2 % en peso o de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 0,3 % en peso) de tensioactivo, en peso de la composición. En otro ejemplo, la composición farmacéutica comprende 10 % en peso o menos (por ejemplo, aproximadamente 5 % en peso o menos, aproximadamente 2 % en peso o menos, aproximadamente 1 % en peso o menos, aproximadamente 0,8 % en peso o menos, o aproximadamente 0,6 % en peso o menos) de laurilsulfato de sodio, en peso de la composición. En otro ejemplo más, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 10 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 5 % en peso a aproximadamente 0,2 % en peso o de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 0,3 % en peso) de laurilsulfato de sodio, en peso de la composición.

Los aglutinantes adecuados para la invención mejoran la resistencia del comprimido de la composición farmacéutica y son compatibles con los componentes de la composición farmacéutica, es decir, no reducen sustancialmente la estabilidad química, la estabilidad física o la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los aglutinantes de

ejemplo incluyen polivinilpirrolidona, fosfato de calcio dibásico, sacarosa, almidón de maíz (maíz), celulosa modificada (por ejemplo, hidroximetilcelulosa), o cualquier combinación de los mismos.

5 Por lo tanto, en una realización, la composición farmacéutica comprende un aglutinante en una cantidad de al menos aproximadamente 0,1 % en peso (por ejemplo, al menos aproximadamente 1 % en peso, al menos aproximadamente 3 % en peso, al menos aproximadamente 4 % en peso o al menos aproximadamente 5 % en peso) en peso de la composición. Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 10 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 10 % en peso o de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 7 % en peso) de aglutinante, en peso de la composición. En otro ejemplo, la composición farmacéutica comprende al menos aproximadamente el 0,1 % en peso (por ejemplo, al menos aproximadamente el 1 % en peso, al menos aproximadamente el 2 % en peso, al menos aproximadamente el 3 % en peso, o al menos aproximadamente el 4 % en peso) de polivinilpirrolidona, en peso de la composición. En otro ejemplo más, la composición farmacéutica comprende un deslizante en una cantidad que varía de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 10 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 8 % en peso o de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 5 % en peso) de polivinilpirrolidona, en peso de la composición.

20 Los diluyentes adecuados para la invención pueden añadir el volumen necesario a una formulación para preparar comprimidos del tamaño deseado y son, generalmente, compatibles con los componentes de la composición farmacéutica, es decir, no reducen sustancialmente la solubilidad, la dureza, la estabilidad química, la estabilidad física o la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los diluyentes de ejemplo incluyen: azúcares, por ejemplo, azúcar de repostería, azúcar comprimible, dextratos, dextrina, dextrosa, lactosa, manitol, sorbitol, celulosa y celulosas modificadas, por ejemplo, celulosa en polvo, talco, fosfato de calcio, almidón o cualquier combinación de los mismos.

25 Por lo tanto, en una realización, la composición farmacéutica comprende un diluyente en una cantidad de 40 % en peso o menos (por ejemplo, 35 % en peso o menos, 30 % en peso o menos o 25 % en peso o menos o 20 % en peso o menos o 15 % en peso o menos o 10 % en peso o menos) en peso de la composición. Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 40 % en peso a aproximadamente 1 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 35 % en peso a aproximadamente 5 % en peso o de aproximadamente 30 % en peso a aproximadamente 7 % en peso, de aproximadamente 25 % en peso a aproximadamente 10 % en peso, de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 15 % en peso) de diluyente, en peso de la composición. En otro ejemplo, la composición farmacéutica comprende el 40 % en peso o menos (por ejemplo, el 35 % en peso o menos, el 25 % en peso o menos o el 15 % en peso o menos) de manitol, en peso de la composición. En otro ejemplo más, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 35 % en peso a aproximadamente 1 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 30 % en peso a aproximadamente 5 % en peso o de aproximadamente 25 % en peso a aproximadamente 10 % en peso) de manitol, en peso de la composición.

40 Los deslizantes adecuados para la invención mejoran las propiedades de flujo de la composición farmacéutica y son compatibles con los componentes de la composición farmacéutica, es decir, no reducen sustancialmente la solubilidad, la dureza, la estabilidad química, la estabilidad física o la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los deslizantes de ejemplo incluyen dióxido de silicio coloidal, talco o una combinación de los mismos.

45 Por tanto, en una realización, la composición farmacéutica comprende un deslizante en una cantidad del 2 % en peso o menos (por ejemplo, 1,75 % en peso, 1,25 % en peso o menos o 1,00 % en peso o menos) en peso de la composición. Por ejemplo, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 1,5 % en peso a aproximadamente 0,07 % en peso o de aproximadamente 1,0 % en peso a aproximadamente 0,09 % en peso) de deslizante, en peso de la composición. En otro ejemplo, la composición farmacéutica comprende el 2 % en peso o menos (por ejemplo, 1,75 % en peso, 1,25 % en peso o menos o 1,00 % en peso o menos) de dióxido de silicio coloidal, en peso de la composición. En otro ejemplo más, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 1,5 % en peso a aproximadamente 0,07 % en peso o de aproximadamente 1,0 % en peso a aproximadamente 0,09 % en peso) de dióxido de silicio coloidal, en peso de la composición.

55 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede incluir una forma farmacéutica sólida oral que puede comprender un lubricante que puede evitar la adhesión de una mezcla de esferas-granulado a una superficie (por ejemplo, una superficie de un recipiente de mezcla, una matriz de compresión y/o punzón). Un lubricante también puede reducir la fricción entre partículas dentro del granulado y mejorar la compresión y expulsión de las composiciones farmacéuticas comprimidas de una prensa de matriz. El lubricante también es compatible con los componentes de la composición farmacéutica, es decir, no reducen sustancialmente la solubilidad, la dureza o la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los lubricantes de ejemplo incluyen estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, estearato de sodio, ácido esteárico, estearato de aluminio, leucina, behenato de glicerilo, aceite vegetal hidrogenado o cualquier combinación de los mismos. En una realización, la composición farmacéutica comprende un lubricante en una cantidad del 5 % en peso o menos (por ejemplo, 4,75 % en peso, 4,0 % en peso o menos o 3,00 % en peso o menos, o 2,0 % en peso o menos) en peso de la composición. Por ejemplo,

la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 5 % en peso a aproximadamente 0,10 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 4,5 % en peso a aproximadamente 0,5 % en peso o de aproximadamente 3 % en peso a aproximadamente 1 % en peso) de lubricante, en peso de la composición. En otro ejemplo, la composición farmacéutica comprende el 5 % en peso o menos (por ejemplo, 4,0 % en peso o menos, 3,0 % en peso o menos o 2,0 % en peso o menos o 1,0 % en peso o menos) de estearato de magnesio, en peso de la composición. En otro ejemplo más, la composición farmacéutica comprende de aproximadamente 5 % en peso a aproximadamente 0,10 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 4,5 % en peso a aproximadamente 0,15 % en peso o de aproximadamente 3,0 % en peso a aproximadamente 0,50 % en peso) de estearato de magnesio, en peso de la composición.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender, opcionalmente, uno o más colorantes, aromas y/o fragancias para mejorar el atractivo visual, el sabor y/o el aroma de la composición. Los colorantes, aromas o fragancias adecuados son compatibles con los componentes de la composición farmacéutica, es decir, no reducen sustancialmente la solubilidad, la estabilidad química, la estabilidad física, la dureza o la actividad biológica de la composición farmacéutica. En una realización, la composición farmacéutica comprende un colorante, un aroma y/o una fragancia. En una realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la invención son de color púrpura.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye o puede prepararse en comprimidos y los comprimidos pueden recubrirse con un colorante y, opcionalmente, se pueden marcar con un logotipo, otra imagen y/o texto usando una tinta adecuada. En aún otras realizaciones, la composición farmacéutica incluye o puede prepararse en forma de comprimidos y los comprimidos pueden recubrirse con un colorante, encerarse y, opcionalmente, marcarse con un logotipo, otra imagen y/o texto usando una tinta adecuada. Los colorantes y tintas adecuados son compatibles con los componentes de la composición farmacéutica, es decir, no reducen sustancialmente la solubilidad, la estabilidad química, la estabilidad física, la dureza o la actividad biológica de la composición farmacéutica. Los colorantes y tintas adecuados pueden ser de cualquier color y son a base de agua o disolvente. En una realización, los comprimidos hechos de la composición farmacéutica se recubren con un colorante y, a continuación, se marcan con un logotipo, otra imagen y/o texto usando una tinta adecuada. Por ejemplo, los comprimidos que comprenden una composición farmacéutica como se describe en el presente documento pueden recubrirse con aproximadamente 3 % en peso (por ejemplo, menos de aproximadamente 6 % en peso o menos de aproximadamente 4 % en peso) de recubrimiento de película que comprende un colorante. Los comprimidos coloreados se pueden marcar con un logotipo y un texto que indiquen la concentración del principio activo en el comprimido usando una tinta adecuada. En otro ejemplo, los comprimidos que comprenden una composición farmacéutica como se describe en el presente documento pueden recubrirse con aproximadamente el 3 % en peso (por ejemplo, menos de aproximadamente el 6 % en peso o menos de aproximadamente el 4 % en peso) de un recubrimiento de película que comprende un colorante.

En otra realización, los comprimidos fabricados a partir de la composición farmacéutica se recubren con un colorante, se enceran y, a continuación, se marcan con un logotipo, otra imagen y/o texto usando una tinta adecuada. Por ejemplo, los comprimidos que comprenden una composición farmacéutica como se describe en el presente documento pueden recubrirse con aproximadamente 3 % en peso (por ejemplo, menos de aproximadamente 6 % en peso o menos de aproximadamente 4 % en peso) de recubrimiento de película que comprende un colorante. Los comprimidos coloreados pueden encerarse con polvo de cera de Carnauba pesado en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % p/p del peso del núcleo del comprimido de partida. Los comprimidos encerados se pueden marcar con un logotipo y un texto que indiquen la concentración del principio activo en el comprimido usando una tinta adecuada. En otro ejemplo, los comprimidos que comprenden la composición farmacéutica como se describe en el presente documento pueden recubrirse con aproximadamente el 3 % en peso (por ejemplo, menos de aproximadamente el 6 % en peso o menos de aproximadamente el 4 % en peso) de un recubrimiento de película que comprende un colorante. Los comprimidos coloreados se pueden encerrar con polvo de cera de Carnauba pesado en una cantidad de aproximadamente 0,01 % p/p del peso del núcleo del comprimido de partida. Los comprimidos encerados se pueden marcar con un logotipo y un texto que indique la concentración del principio activo en el comprimido usando una tinta de calidad farmacéutica, tal como una tinta negra (por ejemplo, Opacode® S-1-17823, una tinta a base de disolvente, disponible comercialmente en Colorcon, Inc. de West Point, PA.).

Una composición farmacéutica de ejemplo descrita en el presente documento comprende de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 70 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 60 % en peso, de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 50 % en peso, o de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 70 % en peso, o de aproximadamente 30 % en peso a aproximadamente 70 % en peso) de la Forma I del Compuesto 1 en peso de la composición; y de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 40 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 20-35 % en peso) de Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición y, más típicamente, de 25 % en peso a aproximadamente 30 % en peso del Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición. Las composiciones mencionadas anteriormente también pueden incluir uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 50 % en peso de una carga; de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de un disgregante; de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 0,3 %

en peso de un tensioactivo; y de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de un aglutinante.

5 Otra composición farmacéutica de ejemplo desvelada en el presente documento comprende de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 70 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 60 % en peso, de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 50 % en peso, o de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 40 % en peso o de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 70 % en peso, o de aproximadamente 30 % en peso a aproximadamente 70 % en peso, o de aproximadamente 40 % en peso a aproximadamente 70 % en peso, o de aproximadamente 50 % en peso a aproximadamente 70 % en peso ) de la Forma I del Compuesto 1, en peso de la composición, de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 40 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 20-35 % en peso) de Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición y, más típicamente, de 25 % en peso a aproximadamente 30 % en peso del Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición, y uno o más excipientes, por ejemplo, de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 50 % en peso de una carga; de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de un disgregante; de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 0,3 % en peso de un tensioactivo; de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de un aglutinante; y de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de un lubricante.

20 Otra composición farmacéutica de ejemplo desvelada en el presente documento comprende de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 70 % en peso (por ejemplo, de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 60 % en peso, de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 50 % en peso, o de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 40 % en peso o de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 70 % en peso, o de aproximadamente 30 % en peso a aproximadamente 70 % en peso, o de aproximadamente 40 % en peso a aproximadamente 70 % en peso, o de aproximadamente 50 % en peso a aproximadamente 70 % en peso) de la Forma I del Compuesto 1 en peso de la composición, de aproximadamente 15 % en peso a aproximadamente 40 % en peso (por ejemplo, aproximadamente 20-35 % en peso) de Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición, y más típicamente, de 25 % en peso a aproximadamente 30 % en peso de Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición, y uno o más excipientes, por ejemplo, de aproximadamente 20 % en peso a aproximadamente 50 % en peso de una carga; de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de un disgregante; de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 0,3 % en peso de un tensioactivo; de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 5 % en peso de un aglutinante; de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso de un lubricante; de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 4 % en peso de colorante; y DE aproximadamente 0,005 % en peso a aproximadamente 0,015 % en peso de cera.

35 En una realización, la invención es una composición farmacéutica granular que comprende:

- a. aproximadamente el 43 % en peso de la Forma I del Compuesto 1 en peso de la composición;
- 40 b. aproximadamente el 34 % en peso de una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición;
- c. aproximadamente el 17 % en peso de celulosa microcristalina en peso de la composición;
- d. aproximadamente el 2 % en peso de croscarmelosa sódica en peso de la composición;
- e. aproximadamente el 1 % en peso de laurilsulfato de sodio en peso de la composición; y
- 45 f. aproximadamente el 3 % en peso de polivinilpirrolidona en peso de la composición.

En una realización, la invención es un comprimido que comprende:

- a. aproximadamente el 35 % en peso de la Forma I del Compuesto 1 en peso de la composición;
- 50 b. aproximadamente el 28 % en peso de una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición;
- c. aproximadamente el 26 % en peso de celulosa microcristalina en peso de la composición;
- d. aproximadamente el 6 % en peso de croscarmelosa sódica en peso de la composición;
- e. aproximadamente el 3 % en peso de polivinilpirrolidona en peso de la composición;
- 55 f. aproximadamente el 1 % en peso de laurilsulfato de sodio en peso de la composición; y
- g. aproximadamente el 1 % en peso de estearato de magnesio en peso de la composición.

En una realización, la invención es un comprimido que comprende:

- a. aproximadamente el 34 % en peso de la Forma I del Compuesto 1 en peso de la composición;
- 60 b. aproximadamente el 27 % en peso de una dispersión sólida que comprende un Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición;
- c. aproximadamente el 26 % en peso de celulosa microcristalina en peso de la composición;
- d. aproximadamente el 6 % en peso de croscarmelosa sódica en peso de la composición;
- e. aproximadamente el 2 % en peso de polivinilpirrolidona en peso de la composición
- 65 f. aproximadamente el 1 % en peso de laurilsulfato de sodio en peso de la composición;
- g. aproximadamente el 1 % en peso de estearato de magnesio en peso de la composición;

- h. aproximadamente el 3 % en peso de un colorante en peso de la composición; y
- i. aproximadamente el 0,010 % en peso de una cera en peso de la composición.

Otro comprimido desvelado en el presente documento comprende:

- 5 a. aproximadamente 150 a 250 mg de la Forma I del Compuesto 1;
- b. aproximadamente 100 a 150 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo;
- c. aproximadamente 125 a 175 mg de celulosa microcristalina;
- d. aproximadamente 20 a 40 mg de croscarmelosa de sodio;
- 10 e. aproximadamente 10 a 20 mg de polivinilpirrolidona;
- f. aproximadamente 2 a 6 mg de laurilsulfato de sodio; y
- g. aproximadamente 3 a 7 mg de estearato de magnesio.

Otro comprimido de la invención comprende:

- 15 a. 200 mg de la Forma I del Compuesto 1;
- b. 125 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo;
- c. aproximadamente 150 mg de celulosa microcristalina;
- d. aproximadamente 34 mg de croscarmelosa de sodio;
- 20 e. aproximadamente 15 mg de polivinilpirrolidona;
- f. aproximadamente 4 mg de laurilsulfato de sodio; y g. aproximadamente 6 mg de estearato de magnesio.

Otro comprimido de la invención comprende:

- 25 a. 200 mg de la Forma I del Compuesto 1;
- b. 125 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo;
- c. aproximadamente 150 mg de celulosa microcristalina;
- d. aproximadamente 34 mg de croscarmelosa de sodio;
- e. aproximadamente 15 mg de polivinilpirrolidona;
- 30 f. aproximadamente 4 mg de laurilsulfato de sodio;
- g. aproximadamente 6 mg de estearato de magnesio;
- h. aproximadamente 17 mg de un colorante; y
- i. aproximadamente 0,06 mg de una cera.

35 En una realización, la invención es una composición farmacéutica granular que comprende:

- a. aproximadamente el 38 % en peso de la Forma I del Compuesto 1 en peso de la composición;
- b. aproximadamente el 40 % en peso de una dispersión sólida que comprende un Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición;
- 40 c. aproximadamente el 16 % en peso de celulosa microcristalina en peso de la composición;
- d. aproximadamente el 2 % en peso de croscarmelosa sódica en peso de la composición;
- e. aproximadamente el 1 % en peso de laurilsulfato de sodio en peso de la composición; y
- f. aproximadamente el 3 % en peso de polivinilpirrolidona en peso de la composición.

45 En una realización, la invención es un comprimido que comprende:

- a. aproximadamente el 31 % en peso de la Forma I del Compuesto 1 en peso de la composición;
- b. aproximadamente el 32 % en peso de una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo en peso de la composición;
- 50 c. aproximadamente el 26 % en peso de celulosa microcristalina en peso de la composición;
- d. aproximadamente el 6 % en peso de croscarmelosa sódica en peso de la composición;
- e. aproximadamente el 3 % en peso de polivinilpirrolidona en peso de la composición
- f. aproximadamente el 1 % en peso de laurilsulfato de sodio en peso de la composición;
- g. aproximadamente el 1 % en peso de estearato de magnesio en peso de la composición; y
- 55 h. aproximadamente el 3 % en peso de un colorante en peso de la composición.

Otro comprimido desvelado en el presente documento comprende:

- 60 a. aproximadamente 100 a 200 mg de la Forma I del Compuesto 1;
- b. aproximadamente 100 a 150 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo;
- c. aproximadamente 100 a 150 mg de celulosa microcristalina;
- d. aproximadamente 20 a 40 mg de croscarmelosa de sodio;
- e. aproximadamente 10 a 20 mg de polivinilpirrolidona;
- f. aproximadamente 2 a 6 mg de laurilsulfato de sodio; y
- 65 g. aproximadamente 3 a 7 mg de estearato de magnesio.

Otro comprimido desvelado en el presente documento comprende:

- a. aproximadamente 150 mg de la Forma I del Compuesto 1;
- b. aproximadamente 125 mg de Compuesto 2 sustancialmente amorfo;
- 5 c. aproximadamente 129 mg de celulosa microcristalina;
- d. aproximadamente 29 mg de croscarmelosa de sodio;
- e. aproximadamente 13 mg de polivinilpirrolidona;
- f. aproximadamente 4 mg de laurilsulfato de sodio;
- 10 g. aproximadamente 5 mg de estearato de magnesio; y
- h. aproximadamente 15 mg de un colorante.

Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden procesar en forma de comprimido, forma de cápsula, forma de bolsa, forma de pastilla u otra forma sólida que sea adecuada para la administración oral. Por tanto, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están en forma de comprimido.

15 Otro aspecto de la invención proporciona una formulación farmacéutica que consiste en un comprimido que incluye la Forma I del Compuesto 1, una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y excipientes (por ejemplo, una carga, un disgregante, un tensioactivo, un aglutinante, un colorante, un lubricante, o cualquier combinación de los mismos), cada uno de los cuales se ha descrito anteriormente y en los siguientes ejemplos, en los que el comprimido tiene una disolución de al menos aproximadamente el 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 60 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 80 %, al menos aproximadamente el 90 % o al menos aproximadamente el 99 %) en aproximadamente 30 minutos.

25 En un ejemplo, la composición farmacéutica consiste en un comprimido que incluye la Forma I del Compuesto 1 en una cantidad de 100 mg o 200 mg, el Compuesto 2 sustancialmente amorfo en una cantidad de 125 mg y uno o más excipientes (por ejemplo, una carga, un disgregante, un tensioactivo, un aglutinante, un colorante, un lubricante, o cualquier combinación de los mismos, cada uno de los cuales se ha descrito anteriormente y en los Ejemplos siguientes, en los que el comprimido tiene una disolución de aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 % (por ejemplo, de aproximadamente el 55 % a aproximadamente el 95 % o de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 90 %) en aproximadamente 30 minutos.

35 La disolución se puede medir con un aparato estándar USP Tipo II que emplea un medio de disolución de CTAB al 0,1 % disuelto en 900 ml de agua DI, tamponado a pH 6,8 con fosfato de potasio monobásico 50 mM, con agitación a aproximadamente 50–75 rpm a una temperatura de aproximadamente 37 °C. Se prueba un solo comprimido experimental en cada recipiente de prueba del aparato. La disolución también se puede medir con un aparato estándar USP Tipo II que emplea un medio de disolución de laurilsulfato de sodio al 0,7 % disuelto en 900 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), agitando a aproximadamente 65 rpm a una temperatura de aproximadamente 37 °C. Se prueba un solo comprimido experimental en cada recipiente de prueba del aparato. La disolución también se puede medir con un aparato estándar USP Tipo II que emplea un medio de disolución de laurilsulfato de sodio al 0,5 % disuelto en 900 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), agitando a aproximadamente 65 rpm a una temperatura de aproximadamente 37 °C. Se prueba un solo comprimido experimental en cada recipiente de prueba del aparato.

#### 45 **MÉTODOS PARA PREPARAR LA FORMA I DEL COMPUESTO 1 Y UNA DISPERSIÓN SÓLIDA QUE COMPRENDE COMPUESTO 2 SUSTANCIALMENTE AMORFO**

##### Compuesto 1

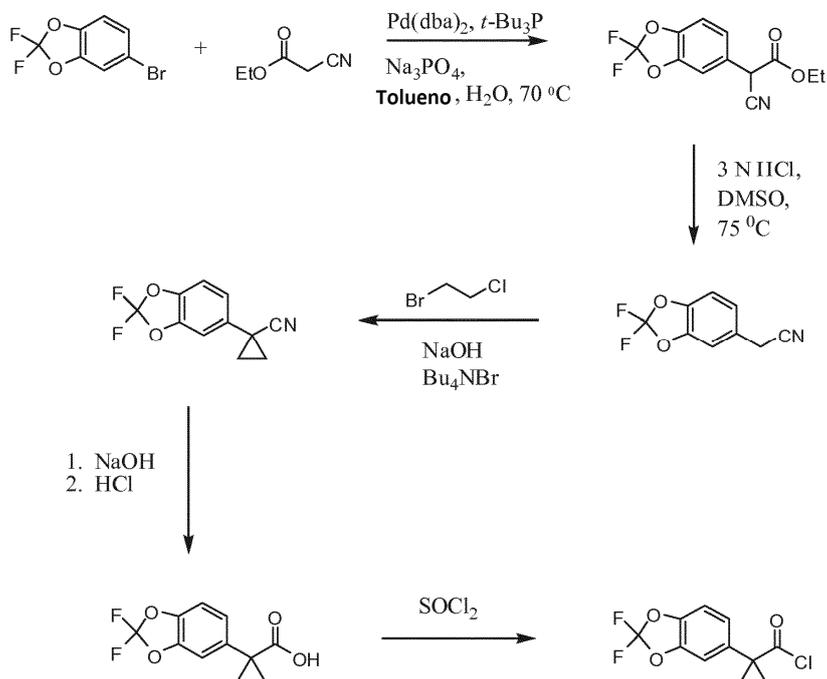
50 El Compuesto 1 se usa como punto de partida para la Forma I del Compuesto 1 y puede prepararse acoplado un resto cloruro de ácido con un resto amina de acuerdo con los Esquemas 1–4.

55

60

65

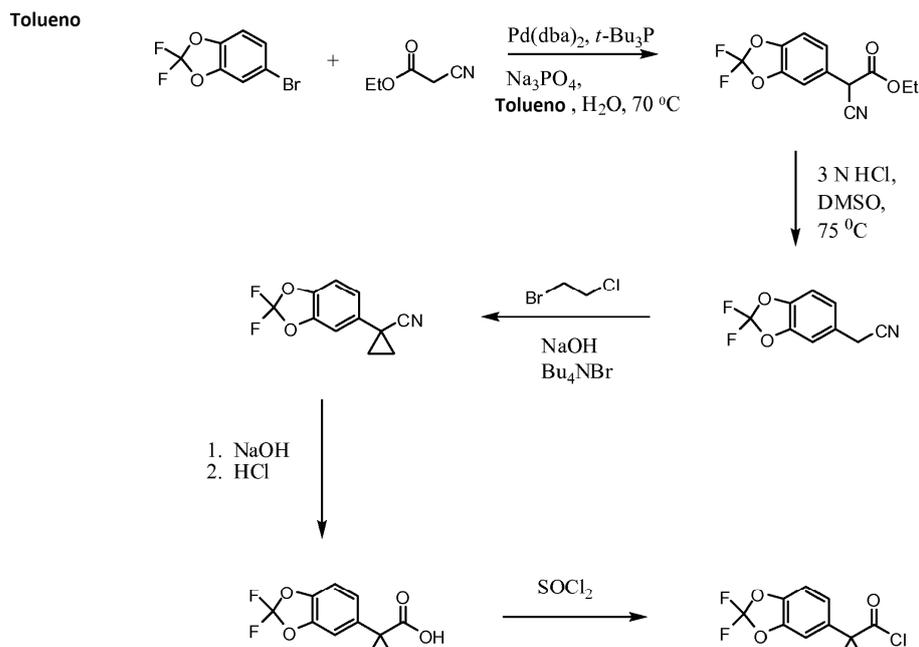
## Esquema 2. Síntesis alternativa del resto cloruro de ácido



- 5 El esquema 2 representa una síntesis alternativa del cloruro de ácido requerido. Se acopla 5-bromometil-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol con cianoacetato de etilo en presencia de un catalizador de paladio para formar el correspondiente éster alfa-cianoetílico. La saponificación del resto éster al ácido carboxílico da el compuesto de cianoetilo. La alquilación del compuesto de cianoetilo con 1-bromo-2-cloroetano en presencia de una base proporciona el compuesto de cianociclopropilo. El tratamiento del compuesto de cianociclopropilo con base proporciona la sal de carboxilato, que se convierte en el ácido carboxílico por tratamiento con ácido. La conversión del ácido carboxílico en el cloruro de ácido se lleva a cabo utilizando un agente de cloración como el cloruro de tionilo.

15

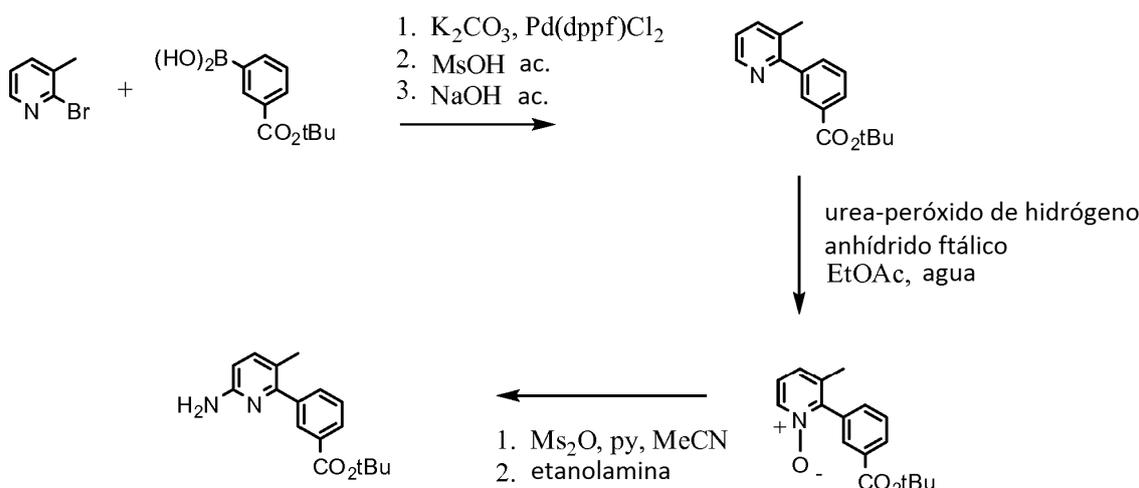
## Esquema 2. Síntesis alternativa del resto cloruro de ácido



El esquema 2 representa una síntesis alternativa del cloruro de ácido requerido. Se acopla 5-bromometil-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol con cianoacetato de etilo en presencia de un catalizador de paladio para formar el correspondiente éster alfa-cianoetílico. La saponificación del resto éster al ácido carboxílico da el compuesto de cianoetilo. La alquilación del compuesto de cianoetilo con 1-bromo-2-cloroetano en presencia de una base proporciona el compuesto de cianociclopropilo. El tratamiento del compuesto de cianociclopropilo con base proporciona la sal de carboxilato, que se convierte en el ácido carboxílico por tratamiento con ácido. La conversión del ácido carboxílico en el cloruro de ácido se lleva a cabo utilizando un agente de cloración como el cloruro de tionilo o similares.

10

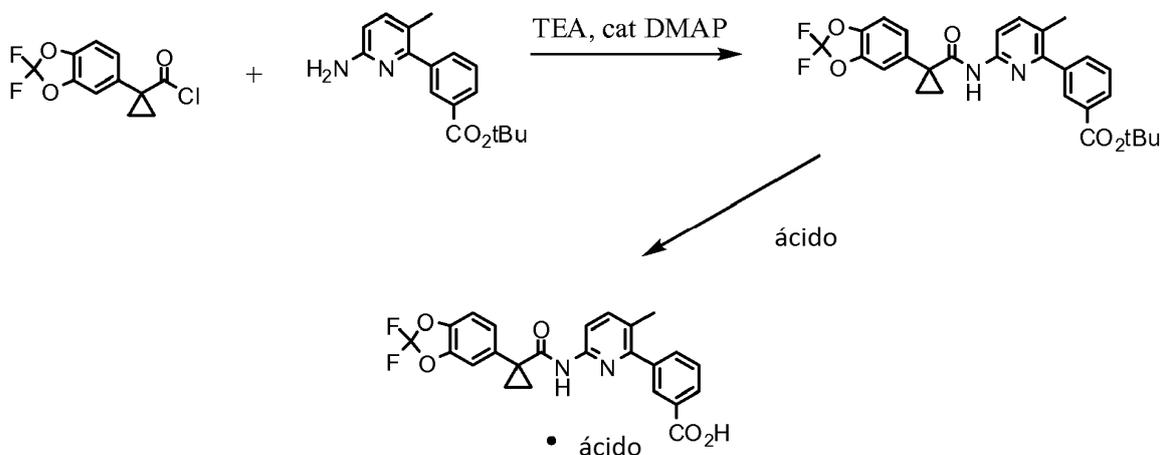
**Esquema 3. Síntesis del resto amina**



15 El esquema 3 describe la preparación del 3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo requerido, que se acopla a cloruro de 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarbonilo en el Esquema 3 para dar el Compuesto 1. El acoplamiento catalizado con paladio de 2-bromo-3-metilpiridina con ácido 3-(terc-butoxicarbonil)fenilborónico da 3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo, que posteriormente se convierte en el compuesto deseado.

20

**Esquema 4. Formación de una sal ácida de ácido 3-(6- (1- (2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido) -3-metilpiridin-2-il)benzoico**



25

El esquema 4 representa el acoplamiento de cloruro de 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarbonilo con 3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo utilizando trietilamina y 4-dimetilaminopiridina para proporcionar inicialmente el éster terc-butílico del Compuesto 1.

#### 5 Forma I del Compuesto 1

La Forma I del Compuesto 1 se prepara dispersando o disolviendo una forma de sal, tal como la sal de HCl, del Compuesto 1 en un disolvente adecuado durante una cantidad de tiempo eficaz. El tratamiento del éster terc-butílico con un ácido, tal como HCl, proporciona la sal de HCl del Compuesto 1, que suele ser un sólido cristalino. La Forma I del Compuesto 1 también se puede preparar directamente a partir del precursor de éster de terc-butílico por tratamiento con un ácido apropiado, tal como ácido fórmico.

Se puede usar la sal de HCl del ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico para elaborar la Forma I dispersando o disolviendo la sal de HCl de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico en un disolvente apropiado durante una cantidad de tiempo eficaz. Se pueden usar otras sales de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico, como, por ejemplo, sales derivadas de otros ácidos minerales u orgánicos. Las otras sales resultan de la hidrólisis mediada por ácido del resto éster t-butílico. Las sales derivadas de otros ácidos pueden incluir, por ejemplo, nítrico, sulfúrico, fosfórico, bórico, acético, benzoico y malónico. Estas formas de sal de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico pueden o no estar soluble, dependiendo del disolvente utilizado, pero la falta de solubilidad no impide la formación de la Forma I del Compuesto 1. Por ejemplo, en una realización, el disolvente apropiado puede ser agua o una mezcla de alcohol/agua, tal como una mezcla de metanol/agua al 50 %, a pesar de que la forma de sal de HCl de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico solo es escasamente soluble en agua. En una realización, el disolvente apropiado es agua.

La cantidad eficaz de tiempo para la formación de la Forma I del Compuesto 1 a partir de la sal de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridina -2-il)benzoico puede estar en cualquiera de entre 2 y 24 horas o más. Se reconoce que la cantidad de tiempo necesaria es inversamente proporcional a la temperatura. Es decir, cuanto mayor sea la temperatura, menor será el tiempo necesario para afectar a la disociación del ácido para formar la Forma I del Compuesto 1. Cuando el disolvente es agua, agitar la dispersión durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente proporciona la Forma I del Compuesto 1 con un rendimiento de aproximadamente el 98 %. Si se desea una solución de la sal del ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico para propósitos del proceso, se puede usar una temperatura elevada. Después de agitar la solución durante una cantidad eficaz de tiempo a la temperatura elevada, la recristalización al enfriar proporciona la Forma I del Compuesto 1 sustancialmente pura. En una realización, sustancialmente puro se refiere a una pureza mayor que aproximadamente 90 %. En otra realización, sustancialmente puro se refiere a una pureza superior a aproximadamente el 95 %. En otra realización, sustancialmente puro se refiere a una pureza superior a aproximadamente el 98 %. En otra realización, sustancialmente puro se refiere a una pureza superior a aproximadamente el 99 %. La temperatura seleccionada depende, en parte, del disolvente utilizado y está dentro de las capacidades de determinación de un experto en la técnica. En una realización, la temperatura está entre la temperatura ambiente y aproximadamente 80 °C. En otra realización, la temperatura está entre la temperatura ambiente y aproximadamente 40°C. En otra realización, la temperatura está entre aproximadamente 40 °C y aproximadamente 60 °C. otra realización, la temperatura está entre aproximadamente 60 °C y aproximadamente 80 °C.

La Forma I del Compuesto 1 también se puede formar directamente a partir de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato (véase el Esquema 3), que es un precursor de la sal del Compuesto 1. Por tanto, se deja que 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato reaccione con un ácido adecuado, tal como, por ejemplo, ácido fórmico en condiciones de reacción adecuadas, para dar la Forma I del Compuesto 1.

La Forma I del Compuesto 1 puede purificarse adicionalmente mediante recristalización a partir de un disolvente orgánico. Los ejemplos de disolventes orgánicos incluyen tolueno, cumeno, anisol, 1-butanol, acetato de isopropilo, acetato de butilo, acetato de isobutilo, metiléter de t-butilo, metilisobutilcetona y mezclas de 1-propanol-agua. La temperatura puede ser como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, el Forma I del Compuesto 1 se disuelve en 1-butanol a 75 °C hasta que se disuelve completamente. Enfriando la solución a 10 °C a una velocidad de 0,2 °C/min, se obtienen cristales de la Forma I del Compuesto 1 que se pueden aislar por filtración.

La Forma 1 del Compuesto 1 se caracteriza por uno o más picos a 15,4, 16,3 y 14,5 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico de 14,6 a 15,0 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico a 14,8 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico de 17,6 a 18,0 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico a 17,8 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico de 16,4 a 16,8 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además

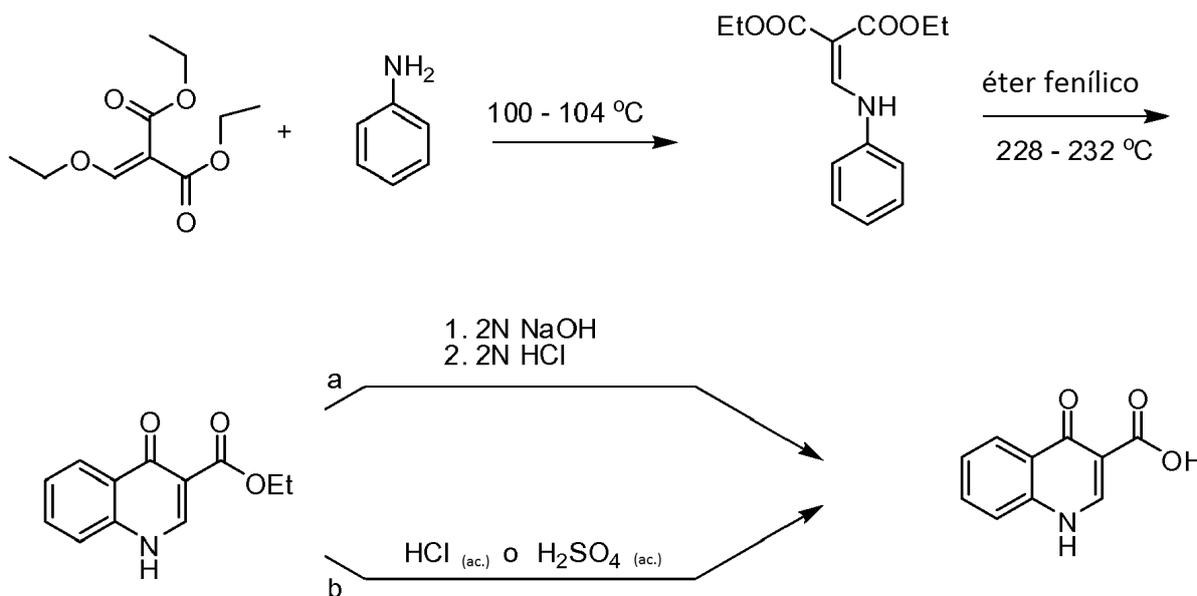
por un pico de 16,4 a 16,8 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico a 16,6 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico de 7,6 a 8,0 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico a 7,8 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico de 25,8 a 26,2 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico a 26,0 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico de 21,4 a 21,8 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico a 21,6 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico de 23,1 a 23,5 grados. En otra realización, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza además por un pico a 23,3 grados. En algunas realizaciones, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza por un patrón de difracción sustancialmente similar al de la Figura 1. En algunas realizaciones, la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza por un patrón de difracción sustancialmente similar al de la Figura 2.

En algunas realizaciones, la distribución del tamaño de partícula de D90 es aproximadamente 82 µm o menos para la Forma I del Compuesto 1. En algunas realizaciones, la distribución del tamaño de partícula de D50 es aproximadamente 30 µm o menos para la Forma I del Compuesto 1.

Compuesto 2

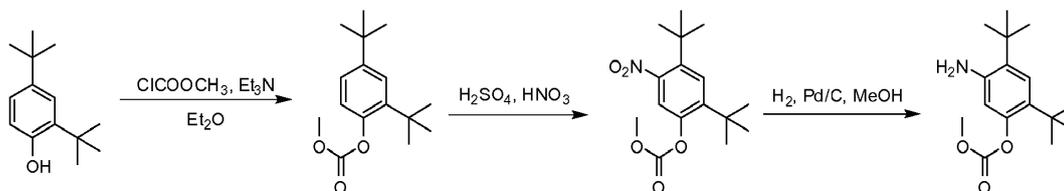
El Compuesto 2 es el punto de partida para la dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y puede prepararse acoplando un resto de ácido 4-oxo-dihidroquinolina carboxílico con un resto amina de acuerdo con los Esquemas 5-7.

**Esquema 5: Síntesis del grupo ácido 4-oxo-dihidroquinolina carboxílico**



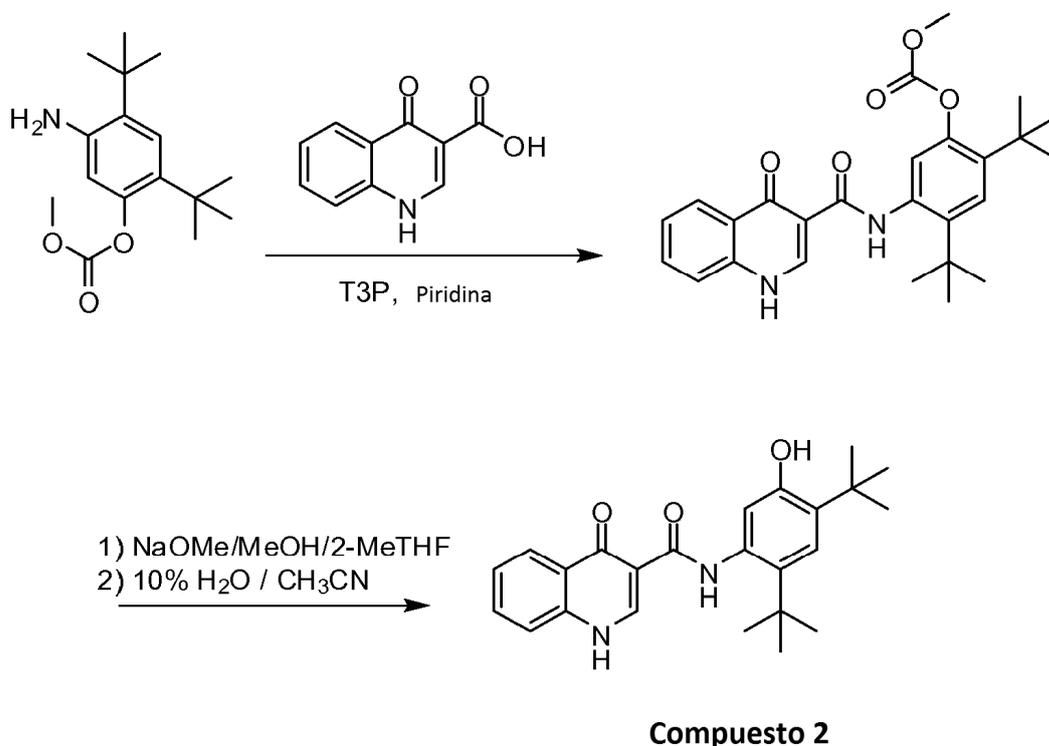
25

**Esquema 6: Síntesis del resto amina**



30

Esquema 7: Acoplamiento del resto ácido 4-oxo-dihidroquinolina carboxílico con el resto amina.

5 Dispersión sólida que comprende Compuesto 2 sustancialmente amorfo

Partiendo del Compuesto 2, la forma amorfa del Compuesto 2 se puede preparar por métodos de secado por pulverización. El secado por pulverización es un proceso que convierte una alimentación líquida en una forma de partículas secas. Opcionalmente, se puede usar un proceso de secado secundario, como el secado en lecho fluidizado o el secado al vacío, para reducir los disolventes residuales a niveles farmacéuticamente aceptables. Normalmente, el secado por pulverización implica poner en contacto una suspensión o solución líquida muy dispersa y un volumen suficiente de aire caliente para producir la evaporación y el secado de las gotas de líquido. La preparación para secar por pulverización puede ser cualquier solución, suspensión gruesa, suspensión espesa, dispersión coloidal o pasta que pueda atomizarse utilizando el aparato de secado por pulverización seleccionado. En un procedimiento estándar, la preparación se pulveriza en una corriente de aire filtrado caliente que evapora el disolvente y transporta el producto seco a un colector (por ejemplo, un ciclón). El aire gastado se agota con el disolvente o, como alternativa, el aire gastado se envía a un condensador para capturar y potencialmente reciclar el disolvente. Los tipos de aparatos disponibles comercialmente pueden usarse para realizar el secado por pulverización. Por ejemplo, los secadores por pulverización comerciales son fabricados por Buchi Ltd. y Niro (por ejemplo, la línea de secadores por pulverización PSD fabricados por Niro) (véanse los documentos US 2004/0105820; US 2003/0144257).

El secado por pulverización generalmente emplea cargas sólidas de material de aproximadamente 3 % a aproximadamente 30 % en peso (es decir, fármaco y excipientes), por ejemplo de aproximadamente 4 % a aproximadamente 20 % en peso, preferentemente al menos aproximadamente 10 %. En general, el límite superior de las cargas sólidas se rige por la viscosidad de (por ejemplo, la capacidad de bombear) la solución resultante y la solubilidad de los componentes en la solución. En general, la viscosidad de la solución puede determinar el tamaño de la partícula en el producto en polvo resultante.

Las técnicas y métodos para el secado por pulverización se pueden encontrar en Perry's Chemical Engineering Handbook, 6ª Ed., R. H. Perry, D. W. Green & J. O. Maloney, eds.), McGraw-Hill book co. (1984); y Marshall "Atomization and Spray-Drying" 50, Chem. Eng. Prog. Monogr. Series 2 (1954). En general, el secado por pulverización se lleva a cabo con una temperatura de entrada de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 200 °C, por ejemplo de aproximadamente 95 °C a aproximadamente 185 °C, de aproximadamente 110 °C a aproximadamente 182 °C, de aproximadamente 96 °C a aproximadamente 180 °C, por ejemplo 145 °C. El secado por pulverización generalmente se lleva a cabo con una temperatura de salida de aproximadamente 30 °C a

- aproximadamente 90 °C, por ejemplo de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C, de aproximadamente 45 °C a aproximadamente 80 °C, por ejemplo aproximadamente 75 °C. El caudal de atomización es, generalmente, de aproximadamente 4 kg/h a aproximadamente 12 kg/h, por ejemplo, de aproximadamente 4,3 kg/h a aproximadamente 10,5 kg/h, por ejemplo, aproximadamente 6 kg/h o aproximadamente 10, 5 kg/h. El caudal de alimentación generalmente es de aproximadamente 3 kg/h a aproximadamente 10 kg/h, por ejemplo, de aproximadamente 3,5 kg/h a aproximadamente 9,0 kg/h, por ejemplo, aproximadamente 8 kg/h, o aproximadamente 7, 1 kg/h. La relación de atomización es, generalmente, de aproximadamente 0,3 a 1,7, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a 1,5, por ejemplo, aproximadamente 0,8 o aproximadamente 1,5.
- 5
- 10 La eliminación del disolvente puede requerir una etapa de secado posterior, tal como el secado en bandeja, el secado en lecho fluido (por ejemplo, de aproximadamente la temperatura ambiente hasta aproximadamente 100 °C), secado al vacío, secado por microondas, secado con tambor rotatorio o secado por vacío biconico (por ejemplo, de aproximadamente la temperatura ambiente a aproximadamente 200 °C).
- 15 En una realización, la dispersión secada por pulverización se seca en lecho fluido.
- En un proceso, el disolvente incluye un disolvente volátil, por ejemplo un disolvente que tiene un punto de ebullición de menos de aproximadamente 100 °C. En algunas realizaciones, el disolvente incluye una mezcla de disolventes, por ejemplo una mezcla de disolventes volátiles o una mezcla de disolventes volátiles y no volátiles. Cuando se usan mezclas de disolventes, la mezcla puede incluir uno o más disolventes no volátiles, por ejemplo, cuando el disolvente no volátil está presente en la mezcla a menos de aproximadamente 15 %, por ejemplo, menos de aproximadamente 12 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 8 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 3 % o menos de aproximadamente 2 %.
- 20
- 25 Los disolventes preferidos son los disolventes en los que el compuesto 2 tiene una solubilidad de al menos aproximadamente 10 mg/ml (por ejemplo, al menos aproximadamente 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, o mayor). Los disolventes más preferidos incluyen aquellos en los que el Compuesto 2 tiene una solubilidad de al menos aproximadamente 20 mg/ml.
- 30 Los disolventes de ejemplo que pudieron analizarse incluyen acetona, ciclohexano, diclorometano, N, N-dimetilacetamida (DMA), N,N-dimetilformamida (DMF), 1,3-dimetil-2-imidazolidinona (DMI), dimetilsulfóxido (DMSO), dioxano, acetato de etilo, éter etílico, ácido acético glacial (HAc), metiletilcetona (MEK), N-metil-2-pirrolidinona (NMP), metilterc-butiléter (MTBE), tetrahidrofurano (THF), pentano, acetonitrilo, metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetato de isopropilo y tolueno. Los codisolventes de ejemplo incluyen acetona/DMSO, acetona/DMF, acetona/agua, MEK/agua, THF/agua, dioxano/agua. En un sistema de dos disolventes, los disolventes pueden estar presentes de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 99,9 %. En algunas realizaciones preferidas, el agua es un codisolvente con acetona, en la que el agua está presente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 15 %, por ejemplo de aproximadamente 9 % a aproximadamente 11 %, por ejemplo, aproximadamente 10 %. En algunas realizaciones preferidas, el agua es un codisolvente con MEK, en el que el agua está presente de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 15 %, por ejemplo, de aproximadamente 9 % a aproximadamente 11 %, por ejemplo, aproximadamente 10 %. En algunas realizaciones, la solución de disolvente incluye tres disolventes. Por ejemplo, se pueden mezclar acetona y agua con un tercer disolvente, tal como DMA, DMF, DMI, DMSO o HAc. En los casos en los que el Compuesto 2 sustancialmente amorfo es un componente de una dispersión sólida, los disolventes preferidos disuelven tanto el Compuesto 2 como el polímero. Los disolventes adecuados incluyen los descritos anteriormente, por ejemplo, MEK, acetona, agua, metanol y mezclas de los mismos.
- 35
- 40
- 45
- El tamaño de partícula y el intervalo de secado por temperatura pueden modificarse para preparar una dispersión óptima de secado por pulverización. Como apreciarán los expertos en la técnica, un pequeño tamaño de partícula conduciría a una mejor eliminación del disolvente. Los solicitantes han encontrado, sin embargo, que las partículas más pequeñas pueden conducir a partículas esponjosas que, en algunas circunstancias, no proporcionan dispersiones de secado por pulverización óptimas para el procesamiento posterior, tal como la formación de comprimidos. A temperaturas más altas, puede producirse la cristalización o degradación química del Compuesto 2 sustancialmente amorfo. A temperaturas más bajas, una cantidad suficiente de disolvente no se puede eliminar. Los métodos en el presente documento proporcionan un tamaño de partícula óptimo y una temperatura de secado
- 50
- 55
- 60
- 65
- En general, el tamaño de partícula es tal que D10 (µm) es menor que aproximadamente 5, por ejemplo, menor que aproximadamente 4,5, menor que aproximadamente 4,0, o menor que aproximadamente 3,5, D50 (µm) generalmente es menor que aproximadamente 17, por ejemplo, menor que aproximadamente 16, menor que aproximadamente 15, menor que aproximadamente 14, menor que aproximadamente 13, y D90 (µm) es, generalmente, menor que aproximadamente 175, por ejemplo, menor que aproximadamente 170, menor que aproximadamente 170, menor que aproximadamente 150, menor que aproximadamente 125, menor que aproximadamente 100, menor que aproximadamente 90, menor que aproximadamente 80, menor que aproximadamente 70, menor que aproximadamente 60, o menor que aproximadamente 50. En general, la densidad aparente de las partículas secadas por pulverización es de aproximadamente 0,08 g/cc a aproximadamente 0,20 g/cc, por ejemplo, de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,15 g/cc, por ejemplo, aproximadamente 0,11 g/cc

o alrededor de 0,14 g/cc. La densidad compactada de las partículas secadas por pulverización generalmente varía de aproximadamente 0,08 g/cc a aproximadamente 0,20 g/cc, por ejemplo, de aproximadamente 0,10 a aproximadamente 0,15 g/cc, por ejemplo, aproximadamente 0,11 g/cc o aproximadamente 0,14 g/cc, para 10 golpes; de 0,10 g/cc a aproximadamente 0,25 g/cc, por ejemplo, de aproximadamente 0,11 a aproximadamente 0,21 g/cc, por ejemplo, aproximadamente 0,15 g/cc, aproximadamente 0,19 g/cc, o aproximadamente 0,21 g/cc por 500 golpes; de 0,15 g/cc a aproximadamente 0,27 g/cc, por ejemplo, de aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,24 g/cc, por ejemplo, aproximadamente 0,18 g/cc, aproximadamente 0,19 g/cc, aproximadamente 0,20 g/cc, o aproximadamente 0,24 g/cc para 1.250 golpes; y 0,15 g/cc a aproximadamente 0,27 g/cc, por ejemplo, de aproximadamente 0,18 a aproximadamente 0,24 g/cc, por ejemplo, aproximadamente 0,18 g/cc, aproximadamente 0,21 g/cc, aproximadamente 0,23 g/cc, o aproximadamente 0,24 g/cc para 2500 golpes.

### Polímeros

Las dispersiones secadas por pulverización que incluyen el Compuesto 2 amorfo y un polímero (o transportador en estado sólido) también se incluyen en el presente documento. Por ejemplo, el Compuesto 2 está presente como un compuesto amorfo como componente de una dispersión amorfa sólida. La dispersión amorfa sólida incluye, generalmente, un Compuesto 2 sustancialmente amorfo y un polímero. Los polímeros de ejemplo incluyen polímeros celulósicos, tales como HPMC o HPMCAS y polímeros que contienen pirrolidona, tales como PVP/VA. En algunas realizaciones, la dispersión amorfa sólida incluye uno o más excipientes adicionales, tales como un tensioactivo.

En una realización, un polímero es capaz de disolverse en medios acuosos. La solubilidad de los polímeros puede ser independiente del pH o dependiente del pH. Los últimos incluyen uno o más polímeros entéricos. La expresión "polímero entérico" se refiere a un polímero que es, preferentemente, soluble en el ambiente menos ácido del intestino en relación con el ambiente más ácido del estómago, por ejemplo, un polímero que es insoluble en medios acuosos ácidos pero soluble cuando el pH está por encima de 5–6. Un polímero apropiado debe ser química y biológicamente inerte. Con el fin de mejorar la estabilidad física de las dispersiones secas por pulverización, la temperatura de transición vítrea ( $T_v$ ) del polímero debe ser lo más alta posible. Por ejemplo, los polímeros preferidos tienen una temperatura de transición vítrea al menos igual o mayor que la temperatura de transición vítrea del fármaco (es decir, el Compuesto 2). Otros polímeros preferidos tienen una temperatura de transición vítrea que está dentro de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 °C del fármaco (es decir, el Compuesto 2). Los ejemplos de temperaturas de transición vítrea adecuadas de los polímeros incluyen al menos aproximadamente 90 °C, al menos aproximadamente 95 °C, al menos aproximadamente 100 °C, al menos aproximadamente 105 °C, al menos aproximadamente 110 °C, al menos aproximadamente 115 °C, al menos aproximadamente 120 °C, al menos aproximadamente 125 °C, al menos aproximadamente 130 °C, al menos aproximadamente 135 °C, al menos aproximadamente 140 °C, al menos aproximadamente 145 °C, al menos aproximadamente 150 °C, al menos aproximadamente 155 °C, al menos aproximadamente 160 °C, al menos aproximadamente 165 °C, al menos aproximadamente 170 °C o al menos aproximadamente 175 °C (medido en condiciones secas). Sin desear limitarse a teoría alguna, se cree que el mecanismo subyacente es que un polímero con una  $T_v$  más alta generalmente tiene una movilidad molecular más baja a temperatura ambiente, lo que puede ser un factor crucial para estabilizar la estabilidad física de la dispersión amorfa secada por pulverización.

Además, la higroscopicidad de los polímeros debería ser tan baja, por ejemplo, inferior a aproximadamente el 10 %. Con el propósito de comparación en esta solicitud, la higroscopicidad de un polímero o composición se caracteriza a aproximadamente 60 % de humedad relativa. En algunas realizaciones preferidas, el polímero tiene menos de aproximadamente el 10 % de absorción de agua, por ejemplo menos de aproximadamente el 9 %, menos de aproximadamente el 8 %, menos de aproximadamente el 7 %, menos de aproximadamente el 6 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, o menos de aproximadamente el 2 % de absorción de agua. La higroscopicidad también puede afectar a la estabilidad física de las dispersiones secadas por pulverización. En general, la humedad adsorbida en los polímeros puede reducir en gran medida la  $T_v$  de los polímeros, así como las dispersiones secadas por pulverización resultantes, lo que reducirá aún más la estabilidad física de las dispersiones de secado por pulverización como se ha descrito anteriormente.

En una realización, el polímero es uno o más polímeros solubles en agua o polímeros parcialmente solubles en agua. Los polímeros solubles en agua o parcialmente solubles en agua incluyen derivados de celulosa (por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC)) o etilcelulosa; polivinilpirrolidonas (PVP); polietilenglicoles (PEG); alcoholes de polivinilo (PVA); acrilatos, tales como polimetacrilato (por ejemplo, Eudragit® E); ciclodextrinas (por ejemplo,  $\beta$ -ciclodextrina) y copolímeros y derivados de los mismos, que incluyen, por ejemplo, PVP-VA (polivinilpirrolidona-acetato de vinilo).

En algunas realizaciones, el polímero es hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), tal como HPMCAS, HPMC E50, HPMCE15 o HPMC60SH50).

Como se trata en el presente documento, el polímero puede ser un polímero entérico dependiente del pH. Dichos polímeros entéricos dependientes del pH incluyen derivados de celulosa (por ejemplo, ftalato de acetato de celulosa (CAP)), ftalatos de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCP), acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), carboximetilcelulosa (CMC) o una sal del mismo (por ejemplo, una sal de sodio, tal como (CMC-Na)); trimelitato de

acetato de celulosa (CAT), ftalato acetato de hidroxipropilcelulosa (HPCAP), ftalato acetato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAP) y ftalato acetato de metilcelulosa (MCAP) o polimetacrilatos (por ejemplo, Eudragit® S). En algunas realizaciones, el polímero es acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS). En algunas realizaciones, el polímero es acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa de calidad HG (HPMCAS-HG).

En otra realización más, el polímero es un copolímero de polivinilpirrolidona, por ejemplo, un copolímero de vinilpirrolidona/acetato de vinilo (PVP/VA).

En realizaciones en las que el Compuesto 2 forma una dispersión secada por pulverización con un polímero, por ejemplo con un polímero HPMC, HPMCAS o PVP/VA, la cantidad de polímero con respecto al peso total de la dispersión secada por pulverización varía de aproximadamente 0,1 % a 99 % en peso. A menos que se especifique lo contrario, los porcentajes de fármaco, polímero y otros excitantes descritos en una dispersión se dan en porcentajes en peso. La cantidad de polímero es típicamente al menos aproximadamente el 20 % y, preferentemente, al menos aproximadamente el 30 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 35 %, al menos aproximadamente el 40 %, al menos aproximadamente el 45 % o aproximadamente el 50 % (por ejemplo, 49,5 %). Normalmente, la cantidad es de aproximadamente el 99 % o menos y, preferentemente, aproximadamente el 80 % o menos, por ejemplo aproximadamente el 75 % o menos, aproximadamente el 70 % o menos, aproximadamente el 65 % o menos, aproximadamente el 60 % o menos o aproximadamente el 55 % o menos. En una realización, el polímero está en una cantidad de hasta aproximadamente el 50 % del peso total de la dispersión (e incluso más específicamente, entre aproximadamente el 40 % y el 50 %, tal como aproximadamente el 49 %, aproximadamente el 49,5 %, o aproximadamente el 50 %). HPMC y HPMCAS están disponibles en diversas calidades de ShinEtsu, por ejemplo, HPMCAS está disponible en una serie de variedades, incluyendo AS-LF, AS-MF, AS-HF, AS-LG, AS-MG, AS-HG. Cada una de estas calidades varía con el porcentaje de sustitución de acetato y succinato.

En algunas realizaciones, el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y el polímero están presentes en cantidades aproximadamente iguales, por ejemplo, cada uno del polímero y el fármaco constituyen aproximadamente la mitad del porcentaje en peso de la dispersión. Por ejemplo, el polímero está presente en aproximadamente el 49,5 % y el fármaco está presente en aproximadamente el 50 %.

En algunas realizaciones, el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y el polímero combinado representan del 1 % al 20 % en p/p del contenido total de sólidos de la dispersión no secada por pulverización antes del secado por pulverización. En algunas realizaciones, el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y el polímero combinado representan del 5 % al 15 % en p/p del contenido total de sólidos de la dispersión no secada por pulverización antes del secado por pulverización. En algunas realizaciones, el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y el polímero combinados representan aproximadamente el 11 % en p/p del contenido total de sólidos de la dispersión no pulverizada en seco antes del secado por pulverización.

En algunas realizaciones, la dispersión incluye además otros componentes minoritarios, tal como un tensioactivo (por ejemplo, SLS). En algunas realizaciones, el tensioactivo está presente en menos de aproximadamente el 10 % de la dispersión, por ejemplo, menos de aproximadamente el 9 %, menos de aproximadamente el 8 %, menos de aproximadamente el 7 %, menos de aproximadamente el 6 %, menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, menos de aproximadamente el 3 %, menos de aproximadamente el 2 %, aproximadamente el 1 %, o aproximadamente el 0,5 %.

En realizaciones que incluyen un polímero, el polímero debe estar presente en una cantidad eficaz para estabilizar la dispersión secada por pulverización. La estabilización incluye inhibir o prevenir, la cristalización del Compuesto 2 sustancialmente amorfo. Tal estabilización inhibiría la conversión del Compuesto 2 de forma amorfa a cristalina. Por ejemplo, el polímero evitaría al menos una porción (por ejemplo, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, o más del Compuesto 2 de la conversión desde una forma amorfa a una forma cristalina. La estabilización se puede medir, por ejemplo, midiendo la temperatura de transición vítrea de la dispersión secada por pulverización, midiendo la velocidad de relajación del material amorfo o midiendo la solubilidad o biodisponibilidad del Compuesto 2.

Los polímeros adecuados para usar en combinación con el Compuesto 2, por ejemplo para formar una dispersión secada por pulverización, tal como una dispersión secada por pulverización amorfa, deben tener una o más de las siguientes propiedades:

La temperatura de transición vítrea del polímero debe tener una temperatura de no menos de aproximadamente 10 a 15 °C más baja que la temperatura de transición vítrea del Compuesto 2 sustancialmente amorfo. Preferentemente, la temperatura de transición vítrea del polímero es mayor que la temperatura de transición vítrea del Compuesto 2 sustancialmente amorfo, y en general al menos 50 °C más alta que la temperatura de almacenamiento deseada del producto farmacéutico. Por ejemplo, al menos aproximadamente 100 °C, al menos aproximadamente 105 °C, al

menos aproximadamente 105 °C, al menos aproximadamente 110 °C, al menos aproximadamente 120 °C, al menos aproximadamente 130 °C, al menos aproximadamente 140 °C, al menos aproximadamente 150 °C, al menos aproximadamente 160 °C, al menos aproximadamente 160 °C, o más.

5 El polímero debe ser relativamente no higroscópico. Por ejemplo, cuando se almacena en condiciones estándar, el polímero debe absorber menos del 10 % de agua, por ejemplo, menos del 9 %, menos del 8 %, menos del 7 %, menos del 6 % o menos de aproximadamente el 5 %, menos de aproximadamente el 4 %, o menos de aproximadamente el 3 % de agua. Preferentemente, el polímero, cuando se almacena en condiciones estándar, estará sustancialmente libre de agua absorbida.

10 El polímero debe tener una solubilidad similar o mejor en disolventes adecuados para los procesos de secado por pulverización en relación con la del Compuesto 2. En realizaciones preferidas, el polímero se disolverá en uno o más de los mismos disolventes o sistemas disolventes que el Compuesto 2. Es preferente que el polímero sea soluble en al menos un disolvente sin hidroxilo, tal como cloruro de metileno, acetona o una combinación de los mismos.

15 El polímero, cuando se combina con el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, por ejemplo, en una dispersión secada por pulverización o en una suspensión líquida, debe aumentar la solubilidad del Compuesto 2 en medios acuosos y fisiológicamente relativos con respecto a la solubilidad del Compuesto 2 en ausencia de polímero o en relación con la solubilidad del Compuesto 2 cuando se combina con un polímero de referencia. Por ejemplo, el polímero podría aumentar la solubilidad del Compuesto 2 amorfo al reducir la cantidad de Compuesto 2 amorfo que se convierte en Compuesto 2 cristalino, ya sea de una dispersión amorfa sólida o de una suspensión líquida.

El polímero debe disminuir la tasa de relajación de la sustancia amorfa.

25 El polímero debe aumentar la estabilidad física y/o química del Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

El polímero debe mejorar una o más de la capacidad de fabricación del Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

30 El polímero debe mejorar una o más de las propiedades de manipulación, administración o almacenamiento del Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

El polímero no debe interactuar de forma desfavorable con otros componentes farmacéuticos, por ejemplo, excipientes.

35 La idoneidad de un polímero candidato (u otro componente) se puede analizar usando los métodos de secado por pulverización (u otros métodos) descritos en el presente documento para formar una composición amorfa. La composición candidata se puede comparar en términos de estabilidad, resistencia a la formación de cristales u otras propiedades y con una preparación de referencia, por ejemplo, una preparación del compuesto 2 amorfo metilo o el compuesto 2 cristalino. Por ejemplo, una composición candidata podría analizarse para determinar si inhibe el momento de inicio de la cristalización mediada por disolvente, o el porcentaje de conversión en un momento dado en condiciones controladas, en al menos 50 %, 75 %, 100 % o 110 %, así como la preparación de referencia, o una composición candidata podría analizarse para determinar si ha mejorado la biodisponibilidad o la solubilidad en relación con el Compuesto 2 cristalino.

#### 45 Tensioactivos

La dispersión secada por pulverización puede incluir un tensioactivo. Un tensioactivo o mezcla de tensioactivo generalmente disminuiría la tensión interfacial entre la dispersión secada por pulverización y un medio acuoso. Un tensioactivo o una mezcla de tensioactivo adecuados también puede mejorar la solubilidad acuosa y la biodisponibilidad del Compuesto 2 a partir de una dispersión secada por pulverización. Los tensioactivos para su uso en relación con la presente invención incluyen ésteres de ácido graso de sorbitán (por ejemplo, Spans®), ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitán (por ejemplo, Tweens®), laurilsulfato de sodio (SLS), dodecibenceno sulfonato de sodio (SDBS) dioctil sulfosuccinato de sodio (Docusate), sal sódica del ácido dioxicolico (DOSS), monoestearato de sorbitán, triestearato de sorbitán, bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HTAB), N-laurilsarcosina de sodio, oleato de sodio, miristato de sodio, estearato de sodio, palmitato de sodio, Gelucire 44/14, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), vitamina E d-alfa tocoferil polietilenglicol 1000 succinato (TPGS), lecitina, MW 677-692, ácido glutámico monosódico monohidrato, Labrasol, glicéridos caprílico/glicéridos PEG 8, Transcutol, monoetiléter de dietilenglicol, Solutol HS-15, polietilenglicol/hidroxiestearato, ácido taurocólico, Pluronic F68, Pluronic F108 y Pluronic F127 (o cualquier otro copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic®) o glicéridos poliglicolizados saturados (Gelucirs®)). Los ejemplos específicos de dichos tensioactivos que pueden usarse en relación con la presente invención incluyen Span 65, Span 25, Tween 20, Capryol 90, Pluronic F108, laurilsulfato de sodio (SLS), vitamina E TPGS, pluronics y copolímeros. Generalmente es preferente SLS.

65 La cantidad de tensioactivo (por ejemplo, SLS) en relación con el peso total de la dispersión secada por pulverización puede estar entre 0,1 y 15 %. Preferentemente, es de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10

%, más preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 %, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a 4 %, de aproximadamente 0,5 a 3 %, de aproximadamente 0,5 a 2 %, de aproximadamente 0,5 a 1 %, o aproximadamente 0,5 %.

- 5 En ciertas realizaciones, la cantidad de tensioactivo en relación con el peso total de la dispersión secada por pulverización es, al menos, aproximadamente 0,1 %, preferentemente aproximadamente 0,5 %. En estas realizaciones, el tensioactivo estaría presente en una cantidad de no más de aproximadamente el 15 %, y preferentemente no más de aproximadamente el 12 %, aproximadamente el 11 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 9 %, aproximadamente el 8 %, aproximadamente el 7 %, aproximadamente el 6 %, aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 4 %, aproximadamente el 3 %, aproximadamente el 2 % o aproximadamente el 1 %. Se prefiere una realización en la que el tensioactivo esté en una cantidad de aproximadamente 0,5 % en peso.

- 15 Los tensioactivos candidatos (u otros componentes) pueden analizarse para determinar su idoneidad para su uso en la invención de una manera similar a la descrita para analizar polímeros.

### MÉTODOS PARA PREPARAR LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- 20 Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden producir mediante granulación en húmedo, compactando o comprimiendo una mezcla o composición, por ejemplo, un polvo o gránulos, bajo presión para dar lugar a una forma tridimensional estable (por ejemplo, un comprimido). Como se usa en el presente documento, "comprimido" incluye formas unitarias de dosis farmacéuticas comprimidas de todas las formas y tamaños, ya sean recubiertas o no recubiertas.

- 25 El término "comprimido", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente discreta de agente apropiada para el paciente a tratar. En general, una mezcla compactada tiene una densidad mayor que la de la mezcla antes de la compactación. Un comprimido de dosificación de la invención puede tener casi cualquier forma, incluyendo caras cóncavas y/o convexas, esquinas redondeadas o en ángulo, y una forma redondeada a rectilínea. En algunas realizaciones, los comprimidos prensados de la invención comprenden un comprimido redondeado que tiene caras planas. Los comprimidos de la invención pueden prepararse mediante cualquier método de compactación y compresión conocido por los expertos en la técnica de la formación de formas farmacéuticas sólidas comprimidas. En realizaciones particulares, las formulaciones proporcionadas en el presente documento pueden prepararse usando métodos convencionales conocidos por los expertos en el campo de la formulación farmacéutica, como se describe, por ejemplo, en los libros de texto pertinentes. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>a</sup> edición, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms And Drug Delivery Systems, 7<sup>a</sup> Edición, Lippincott Williams & Wilkins, (1999); The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4<sup>a</sup> edición, Rowe et al., Eds., American Pharmaceutical Association (2003); Gibson, Pharmaceutical Preformulation And Formulation, CRC Press (2001).

#### 40 Granulación y compresión

- En algunas realizaciones, los componentes se pesan de acuerdo con la fórmula establecida en el presente documento. A continuación, todos los componentes intragranulares se tamizan y se mezclan bien. Los componentes pueden lubricarse con un lubricante adecuado, por ejemplo, estearato de magnesio. La siguiente etapa puede comprender la compactación/aglutinamiento de la mezcla en polvo y los componentes dimensionados. A continuación, las mezclas compactadas o aglutinadas se muelen en gránulos y se tamizan para obtener el tamaño deseado. A continuación, los gránulos pueden lubricarse adicionalmente, por ejemplo, con estearato de magnesio. A continuación, la composición granular de la invención se puede comprimir en punzones adecuados en diversas formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Opcionalmente, los comprimidos se pueden recubrir con una película, colorante u otro recubrimiento.

- Otro aspecto de la invención proporciona un método para producir una composición farmacéutica que comprende proporcionar una mezcla de una composición que comprende la Forma I del Compuesto 1, una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y uno o más excipientes seleccionados de: una carga, un diluyente, un aglutinante, un tensioactivo, un lubricante, un disgregante y la compresión de la composición en un comprimido que tiene una disolución de al menos aproximadamente el 50 % en aproximadamente 30 minutos.

- En otra realización, se realiza un proceso de granulación en húmedo para producir la formulación farmacéutica de la invención a partir de una mezcla de componentes en polvo y líquidos. Por ejemplo, una composición farmacéutica que comprende una mezcla de una composición que comprende la Forma I del Compuesto 1, una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, y uno o más excipientes seleccionados entre: una carga, un aglutinante, un tensioactivo o un disgregante, se pesan según la fórmula establecida en el presente documento. A continuación, todos los componentes intragranulares se tamizan y se mezclan en un granulador de alto cizallamiento o bajo cizallamiento usando agua o agua con un tensioactivo o agua con un aglutinante o agua con un tensioactivo y un aglutinante para granular la mezcla en polvo. También se puede usar un fluido que no sea agua con o sin tensioactivo y/o aglutinante para

granular la mezcla en polvo. A continuación, los gránulos húmedos se pueden moler, opcionalmente, usando un molino adecuado. A continuación, el agua se puede eliminar opcionalmente de la mezcla secando los componentes de cualquier manera adecuada. A continuación, los gránulos secos pueden molerse, opcionalmente, hasta el tamaño requerido. A continuación, se pueden añadir excipientes extra granulares mediante mezcla (por ejemplo, una carga, un diluyente y un disgregante). A continuación, los gránulos dimensionados se pueden lubricar adicionalmente con estearato de magnesio y un disgregante, por ejemplo, croscarmelosa sódica. A continuación, la composición granular de la invención puede tamizarse durante un tiempo suficiente para obtener el tamaño correcto y luego comprimirse en moldes adecuados en diversas formulaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. Opcionalmente, las comprimidos se pueden recubrir con una película, colorante u otro recubrimiento. Sorprendentemente, la granulación en húmedo se puede llevar a cabo sin pérdida sustancial de las formas de estado sólido de la Forma I del Compuesto 1 o Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

En una realización particularmente favorecida, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se preparan mediante un proceso de granulación en húmedo de doble tornillo (TSWG) continuo. La fabricación continua ofrece productos de alta calidad y muy consistentes con vigilancia y control en línea. La fabricación continua también facilita la calidad mediante el desarrollo del diseño con un espacio de diseño "rico en datos" y un impacto más fácil de entender de las variables aguas arriba en el proceso aguas abajo y la calidad del producto final. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden finalizar de manera temprana en un equipo a escala comercial que evita los riesgos de la escalada y los cambios de formulación en el desarrollo tardío. Finalmente, la fabricación continua tiene ventajas de fabricación comercial, como un mejor control del proceso, menor manipulación del producto y eficiencias de liberación en tiempo real. El resultado general es un proceso más robusto, controlable y escalable que tiene menos controles de proceso que resultan en una mayor calidad del producto y, por lo tanto, una mayor seguridad para el paciente. Estas ventajas abordan las inquietudes de Janet Woodcock (directora del Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER)) de que la química, la fabricación y los controles (CMC) no podrán mantenerse al día con el rápido desarrollo clínico de terapias altamente eficaces ("What we are seeing is that often the rate limiting step is going to be manufacturing," July 24, 2013 Friends of Cancer hosted congressional briefing "Answering a Compelling Need: Expediting Life-Saving Treatments to Patients" to discuss the Food and Drug Administration's Breakthrough Therapy Designation).

Por ejemplo, la granulación de alto cizallamiento (HSG), una técnica de granulación común es bien conocida por el riesgo de un exceso de granulación y un mal control del proceso. La escalada de este proceso supone un gr riesgo e implica un riesgo significativo. Al cambiar de un proceso HSG a un proceso de TSWG continuo, se puede escalar utilizando el mismo equipo para producir diferentes tamaños de lotes, funcionando durante más tiempo. Esto elimina el riesgo de escalada que habitualmente existe con otros procesos de granulación. Además, se encontró que el proceso de TSWG es más sólido, siendo menos sensible a la granulación excesiva. Como se puede ver en la Figura 3 para un comprimido del Compuesto 1, el proceso de HSG mostró una desaceleración significativa de la disolución con el aumento del contenido de agua, mientras que el proceso de TSWG no mostró un cambio para un intervalo similar de adición de agua. Sorprendentemente, no se encontraron cambios de rendimiento con las formulaciones de comprimidos que comprenden el Compuesto 1 entre 45-55 por ciento en peso y las formulaciones de comprimidos que comprenden el Compuesto 1 entre 60-70 por ciento en peso usando el proceso de granulación en húmedo de doble tornillo. Este no fue el caso con el proceso de HSG. Adicionalmente, este proceso continuo y de mayor calidad de los productos aborda una queja común de la FDA con respecto a la falta de disponibilidad de medicamentos para los pacientes que lo necesitan.

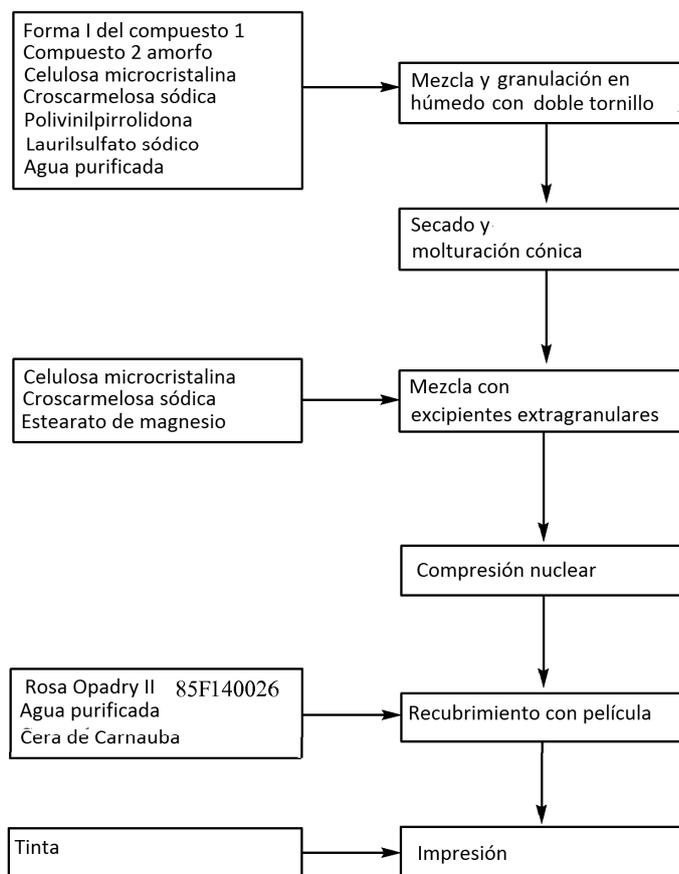
En una realización, el proceso continuo comienza con la alimentación de excipientes individuales, el Compuesto 1 y el Compuesto 2 en un mezclador continuo en línea mediante alimentación con pérdida de peso. Desde este mezclador, el material se transporta y procesa de forma continua a través de granulación en húmedo de doble tornillo, secado, molturación, adición de excipiente extragranular, mezcla, compresión y recubrimiento con película.

Por ejemplo, en una realización, un comprimido que comprende el Compuesto 1 y el Compuesto 2 se puede preparar de forma continua de acuerdo con el siguiente diagrama de flujo.

55

60

65



5 Cada uno de los componentes de esta mezcla de ejemplo se ha descrito anteriormente y se describe en los ejemplos siguientes. Adicionalmente, la mezcla puede comprender aditivos opcionales, tales como, uno o más colorantes, uno o más aromas y/o una o más fragancias como se ha descrito anteriormente y en los ejemplos siguientes. En algunas realizaciones, las concentraciones relativas (por ejemplo, % en peso) de cada uno de estos componentes (y cualquier aditivo opcional) en la mezcla también se han presentado anteriormente y en los ejemplos siguientes. Los componentes que constituyen el aditivo se pueden proporcionar secuencialmente o en cualquier combinación de adiciones; y, los componentes o la combinación de componentes se pueden proporcionar en cualquier orden. En una realización, el lubricante es el último componente añadido a la mezcla.

15 En otra realización, la mezcla comprende una composición de la Forma I del Compuesto 1, una dispersión sólida de Compuesto 2 sustancialmente amorfo y uno o más de los excipientes; un aglutinante, un tensioactivo, un diluyente, un lubricante, un disgregante y una carga, en el que cada uno de estos componentes se proporciona en forma de polvo (por ejemplo, proporcionado como partículas que tienen un diámetro medio o promedio, medido por dispersión de luz, de 250  $\mu\text{m}$  o menos (por ejemplo, 150  $\mu\text{m}$  o menos, 100  $\mu\text{m}$  o menos, 50  $\mu\text{m}$  o menos, 45  $\mu\text{m}$  o menos, 40  $\mu\text{m}$  o menos, o 35  $\mu\text{m}$  o menos)).

20 En otra realización, la compresión de la mezcla en un comprimido se realiza rellenando una forma (por ejemplo, un molde) con la mezcla y aplicando presión a la mezcla. Esto se puede lograr utilizando una prensa de matriz u otro aparato similar. En algunas realizaciones, la mezcla de la Forma I del Compuesto 1, una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, y los excipientes pueden procesarse primero en forma granular. A continuación, los gránulos pueden dimensionarse y prensarse en comprimidos o formularse para encapsulación de acuerdo con métodos conocidos en la técnica farmacéutica. También se observa que la aplicación de presión a la mezcla en la forma puede repetirse usando la misma presión durante cada compresión o usando diferentes presiones durante las compresiones. En otro ejemplo, la mezcla de componentes en polvo o gránulos se puede comprimir usando una prensa de matriz que aplica suficiente presión para formar un comprimido que tiene una disolución de aproximadamente 50 % o más en aproximadamente 30 minutos (por ejemplo, aproximadamente 55 % o más en aproximadamente 30 minutos o aproximadamente el 60 % o más en aproximadamente 30 minutos).

30 Por ejemplo, la mezcla se comprime utilizando una prensa de troquel para producir una dureza del comprimido de al menos aproximadamente 5 kP (al menos aproximadamente 5,5 kP, al menos aproximadamente 6 kP, al menos aproximadamente 7 kP, al menos aproximadamente 10 kP o al menos 15 kP). En algunos casos, la mezcla se comprime para producir una dureza del comprimido de entre aproximadamente 5 y 20 kP.

En algunas realizaciones, los comprimidos que comprenden una composición farmacéutica como se describe en el presente documento pueden recubrirse con aproximadamente el 3,0 % en peso de un recubrimiento de película que comprende un colorante en peso del comprimido. En ciertos casos, la suspensión o solución de colorante utilizada para recubrir los comprimidos comprende aproximadamente 20 % p/p de sólidos en peso de la suspensión o solución de colorante. En aún casos adicionales, los comprimidos recubiertos se pueden marcar con un logotipo, otra imagen o texto.

En otra realización, el método para producir una composición farmacéutica comprende proporcionar una mezcla de formas sólidas, por ejemplo, una mezcla de componentes en polvo y/o líquidos, comprendiendo la mezcla la Forma I del Compuesto 1, una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y uno o más excipientes seleccionados entre: un aglutinante, un diluyente, un tensioactivo, un lubricante, un disgregante, y una carga; mezclar la mezcla hasta que la mezcla sea sustancialmente homogénea, y comprimir o compactar la mezcla en forma granular. A continuación, la composición granular que comprende la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo puede comprimirse en comprimidos o formularse en cápsulas como se ha descrito anteriormente o en los Ejemplos siguientes. Como alternativa, los métodos para producir una composición farmacéutica comprenden proporcionar una mezcla de la Forma I del Compuesto 1, una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, y uno o más excipientes, por ejemplo, un aglutinante, un diluyente, un tensioactivo, un lubricante, un disgregante y una carga; mezclar la mezcla hasta que la mezcla sea sustancialmente homogénea, y comprimir/compactar la mezcla en una forma granular utilizando un proceso de compactación de gránulos en húmedo a alto cizallamiento como se indica en los ejemplos que se exponen más adelante. Las formulaciones farmacéuticas, por ejemplo, un comprimido como se describe en el presente documento, pueden prepararse utilizando los gránulos preparados que incorporan la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo además de los excipientes seleccionados descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, la mezcla se mezcla con agitación, mezclado o sacudidas usando mezclado manual, un mezclador, un batidor o cualquier combinación de los mismos. Cuando los componentes o combinaciones de componentes se añaden secuencialmente, la mezcla se puede producir entre adiciones sucesivas, de forma continua durante la adición de los componentes, después de la adición de todos los componentes o combinaciones de componentes, o cualquier combinación de los mismos. La mezcla se mezcla hasta que tiene una composición sustancialmente homogénea.

En otra realización, la presente invención comprende moler por chorro una composición farmacéutica que comprende la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo en un aparato de molienda convencional adecuado que usa una presión de aire adecuada para producir partículas que tienen una fracción de tamaño de partícula significativa entre 0, 1 micrómetros y 50 micrómetros. En otra realización, el tamaño de las partículas está entre 0,1 micrómetros y 20 micrómetros. En otra realización, el tamaño de partícula está entre 1,0 micrómetros y 5 micrómetros. En otra realización más, la composición farmacéutica tiene un tamaño de partícula D50 de 2,0 micrómetros.

Las formulaciones de la presente invención proporcionan una dosis fija de dos API para el tratamiento efectivo de la fibrosis quística, una combinación que ha recibido una de las dos únicas designaciones de terapia avanzada de la FDA, y lo hace con una sorprendente estabilidad medida por la pequeña pérdida de la forma sólida amorfa del compuesto 2. La Figura 4 muestra la pequeña cantidad de cristalinidad del Compuesto 2 a lo largo del tiempo en PC-XVII a 50 °C después del pre-equilibrio a 60 % de humedad relativa. Incluso después de cerca de 1.000 horas en estas condiciones, se ha cristalizado menos del 5 % en peso del Compuesto 2. La Figura 5 muestra para PC-XVII que incluso a una temperatura más alta de 60 °C después del pre-equilibrio a 60 % de humedad relativa, cerca de 1.000 horas en estas condiciones, se ha cristalizado menos del 10 % en peso del Compuesto 2. Las figuras 6 y 7 muestran resultados similares para PC-XIX. Las presentes formulaciones, por lo tanto, proporcionan la conveniencia de una dosificación fija de dos API avanzados en una composición farmacéutica sorprendentemente estable. Tales formulaciones aumentan el cumplimiento del paciente que se relaciona directamente con el tratamiento eficaz de enfermedades.

Las formas farmacéuticas preparadas como anteriormente se pueden someter a evaluaciones de disolución in vitro de acuerdo con la Prueba 711 "Disolución" en la Farmacopea de Estados Unidos, Convention, Inc., Rockville, Md., 2005 ("USP"), para determinar la velocidad a la que el principio activo se libera de las formas farmacéuticas. El contenido de sustancia activa y los niveles de impurezas se miden convenientemente mediante técnicas, tales como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

En algunas realizaciones, la invención incluye el uso de materiales de embalaje, tales como recipientes y cierres de polietileno de alta densidad (HDPE), polietileno de baja densidad (LDPE) y/o lámina de polipropileno y/o vidrio, Glassine, bolsas de aluminio y blíster o tiras compuestas de aluminio o cloruro de polivinilo de alta densidad (PVC), que incluye opcionalmente un desecante, polietileno (PE), dicloruro de polivinilideno (PVDC) y PVC/PE/PVDC. Estos materiales de embalaje pueden usarse para almacenar las diversas composiciones y formulaciones farmacéuticas

de forma estéril después de la esterilización apropiada del envase y su contenido utilizando técnicas de esterilización química o física de uso habitual en las técnicas farmacéuticas.

**MÉTODOS PARA ADMINISTRAR LAS COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS**

5 En un aspecto, las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar a un paciente una vez al día o aproximadamente cada veinticuatro horas. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden administrarse a un paciente dos veces al día. Como alternativa, la composición farmacéutica de la invención se puede administrar aproximadamente cada doce horas. Estas composiciones farmacéuticas se administran como formulaciones orales que contienen aproximadamente 100 mg o 200 mg de la Forma I del Compuesto 1; y  
 10 aproximadamente 125 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo. En este aspecto, además de la Forma I del Compuesto 1 y el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, las composiciones farmacéuticas comprenden una carga; un disgregante un tensioactivo una carpeta y un lubricante (dependiendo de si la composición farmacéutica es un gránulo o un comprimido). Por ejemplo, una dosis de 400 mg de la Forma I del Compuesto 1, puede comprender dos comprimidos de la invención, cada uno de los cuales contiene 200 mg de la Forma I del Compuesto 1. Una dosis de  
 15 250 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo, puede comprender dos comprimidos de la invención cada uno de los cuales contiene 125 mg del compuesto sustancialmente amorfo.

20 También se apreciará que el compuesto y las composiciones y formulaciones farmacéuticamente aceptables de la invención pueden emplearse en terapias de combinación; es decir, la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida del Compuesto 2 sustancialmente amorfo y las composiciones farmacéuticamente aceptables del mismo pueden administrarse simultáneamente, antes o después de uno o más de otros tratamientos terapéuticos o procedimientos médicos deseados.

25 En una realización, el agente terapéutico adicional se selecciona entre un agente mucolítico, un broncodilatador, un antibiótico, un agente antiinfeccioso, un agente antiinflamatorio, un compuesto inductor de actividad de CFTR diferente a la Forma I del Compuesto 1 y el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, o un agente nutricional.

30 En una realización, el agente adicional es (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxi-propil)-6-fluoro-2-(1-hidroxil-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il) ciclopropanocarboxamida. En otra realización, el agente adicional es ácido 4-(3-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamido)isoquinolin-1-il)benzoico. En otra realización, el agente adicional se selecciona entre la Tabla 1:

**Tabla 1.**

35

1	2	3
4	5	6

7	8	9
10	11	12
13	14	

En otra realización, el agente adicional es cualquier combinación de los agentes anteriores. Por ejemplo, la combinación puede comprender una composición farmacéutica o comprimido de la presente invención que comprende la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida de Compuesto 2 sustancialmente amorfo, y el agente terapéutico adicional es (*R*)-1-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il) ciclopropanocarboxamida. En otro ejemplo, la combinación puede comprender una composición farmacéutica o comprimido de la presente invención que comprende la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida de Compuesto 2 sustancialmente amorfo, y el agente terapéutico adicional es ácido 4-(3-(1-(2,2 -difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)isoquinolin-1-il)benzoico. En otro ejemplo, la combinación puede comprender una composición farmacéutica o comprimido de la presente invención que comprende la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida del Compuesto 2 sustancialmente amorfo, y el agente terapéutico adicional es uno cualquiera de los compuestos de la Tabla 1, es decir, los compuestos 1 a 14 de la Tabla 1, o cualquier combinación de los mismos.

15

En otra realización, el agente adicional se selecciona entre la Tabla 1:

**TABLA 1**

Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 7.407.976 (Col 13, en 35– col 66, en 67; compuestos 1–100 en la Tabla 1 en la col. 67, en 1–col 127, en 42)

Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.645.789 (Col 16, en 52–col 50, en 22; compuestos 1–322 en la Tabla 1 en la col. 50, en 24–col. 167, en 42)

Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.659.268 (Col. 16, en 20–col 70, en 52; Compuestos 1–528 en la Tabla 1 en la col. 70, en 53–col 331, en 34)

Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.671.221 (Col. 16, en 12–col 54, en 48; Compuestos 1-1216 en la Tabla 1 en la col. 54, en 49–col 699, en 27)

## ES 2 694 290 T3

Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.691.902 (Col. 16, en 11–col 54, en 29; Compuestos 1-959 en la Tabla 1 en la col. 54, en 29–col 683, en 44)
Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.741.321 (Col. 16, en 25–col 72, en 17; Compuestos 1-422 en la Tabla 1 en la col. 72, en 20–col 279, en 15)
Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.754.739 (Col.16, en 1–col 22, en 47; Compuestos 1–2 en Tabla 1 en la col. 18, en 26–65)
Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.776.905 (Col. 16, en 23–col 38, en 40; Compuestos 1-306 en la Tabla 1 en la col. 38, en 45–col 96, en 40)
Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.973.169 (Col. 9, en 16–col 40, en 40; Compuestos 1-289 en la Tabla 1 en la col. 40, en 41–col 289, en 39)
Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.977.322 (Col. 6, en 26–col 37, en 47; Compuestos 1-498 en la Tabla 1 en la col. 37, en 50–col 141, en 40)
Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 7.999.113 (Col. 6, en 13–col 10, en 67; Compuestos 1-13 en la Tabla 1 en la col. 11, en 5–col 13, en 65)
Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 8.227.615 (Col. 6, en 10–col 29, en 66; Compuestos 1-78 en la Tabla 1 en la col. 30, en 1–col 46, en 48)
Compuestos desvelados en la patente de Estados Unidos 8.299.099 (Col. 6, en 10–col 34, en 18; Compuestos 1-47 en la Tabla 1 en la col. 34, en 20–col 42, en 35)
Compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2006–0052358 (párrafos [0034]–[0056]; [0077]–[0240]; Compuestos 1–320 en la Tabla 1 en el párrafo [0241])
Compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2009–0143381 (párrafos [0102]–[0263]; Compuestos 1–28 en la Tabla 1 en el párrafo [0264])
Compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2009–0170905 (párrafos [0012]–[0013]; [0030]–[0051])
Compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2009-0253736 (párrafos [0031]–[0162]; Compuestos 1-15 en la Tabla 1 en el párrafo [0163])
Compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2011-0263654 (párrafos [0012]–[0013]; [0066]–[0141])
Compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2011-0251253 (párrafos [0012]–[0013]; [0054]–[0079])
Compuestos desvelados en la solicitud PCT WO2008141119 (Párrafos [0100]–[0339]; Compuestos 1–117 en la Tabla 1 en el párrafo [03401])
Compuestos desvelados en la solicitud de Estados Unidos n.º 11/047.361
Compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2013–0116238 (Párrafos [0028]–[0044]; [0117]–[0128]), o combinaciones de los mismos.

En otra realización, el agente adicional se selecciona entre la Tabla 2:

<b>TABLA 2</b>
Compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2005-0113423 (párrafo [00146]; Compuestos IA–1–IA–136 y compuestos I–1–I–21 en la Tabla 1 en los párrafos [0391]–[0392])
Compuestos desvelados en la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2005-0059687 (párrafos [00100]–[00101]; Compuestos 1-405 en la Tabla 1 en el párrafo [0169])
Compuestos 1–108 desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 7.598.412 (Col 22, en 14–col 79, en 20; Tabla 1)

Compuestos 1-485 desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 7.495.103 (Col 51, en 1-col 63, en 43;Tabla 1)
Compuestos 1-718 desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 8.354.427 (Col 51, en 3-col 71, en 46;Tabla 1)
Compuestos 1-233 desvelados la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2007-0105833 (párrafo [00145];Tabla 1)
Compuestos 1-26 desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 8.242.149 (Col 46, en 47-col 57, en 37;Tabla 1)
Compuestos 1-18 desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 8.314.256 (Col 21, en 1-col 26, en 19)
Compuestos 1-14 desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 8.399.479 (Col 36, en 20-col 38, en 40;Tabla 1)
Compuestos 1-18 desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 8.188.283 (Col 38, en 43-col 43, en 36;Tabla 1)
Compuestos 1-16 desvelados la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2010-0249180 (párrafo [0173]; Tabla 1)
Compuestos 1-19 desvelados la solicitud publicada de Estados Unidos n.º 2011-0008259 (párrafo [0172]; Tabla 1)
Compuestos 1-129 desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 8.367.660 (Col 57, en 31-col 81, en 24;Tabla 1)

5 En una realización, el agente terapéutico adicional es un antibiótico. Los antibióticos de ejemplo útiles en el presente documento incluyen tobramicina, incluyendo tobramicina inhalada en polvo (TIP), azitromicina, cayston, aztreonam, incluida la forma en aerosol de aztreonam, amikacina, incluidas las formulaciones liposomales de la misma, ciprofloxacina, incluidas las formulaciones adecuadas para su administración por inhalación, levofloxacino, incluyendo formulaciones en aerosol de los mismos, y combinaciones de dos antibióticos, por ejemplo, fosfomicina y tobramicina.

10 En otra realización, el agente adicional es un mucolítico. Los mucolíticos de ejemplo útiles en el presente documento incluyen Pulmozyme®.

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

15 En otra realización, el agente adicional es eficaz para restaurar el líquido de la superficie de las vías respiratorias pulmonares. Tales agentes mejoran el movimiento de la sal dentro y fuera de las células, lo que permite que el moco en las vías respiratorias del pulmón se hidrate más y, por lo tanto, se elimine más fácilmente. Los ejemplos de tales agentes incluyen solución salina hipertónica, denufosal tetrasodio ([[(3S, 5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidina-1-il)-3-hidroxiolan-2-il] metoxi-hidroxifosforilo][[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(2,4-dioxopirimidin-1-il)-3, 4-dihidroxiolan-2-il] metoxi-hidroxifosforil]oxi-hidroxifosforil] hidrógeno fosfato), o bronquitol (formulación inhalada de manitol).

20 En otra realización, el agente adicional es un agente antiinflamatorio, es decir, un agente que puede reducir la inflamación en los pulmones. Los ejemplos de tales agentes útiles en el presente documento incluyen ibuprofeno, ácido docosahexanoico (DHA), sildenafil, glutatión inhalado, pioglitazona, hidroxicloquina o simvastatina.

30 En otra realización, el agente adicional es un compuesto que aumenta o induce una actividad de CFTR diferente de la Forma I del Compuesto 1 o una dispersión sólida que comprende un Compuesto 2 sustancialmente amorfo, es decir, un agente que tiene el efecto de inducir o aumentar la actividad de CFTR. Los ejemplos de estos agentes incluyen ataluren ("PTC124®"; ácido 3-[5-(2-fluorofenil)-1,2,4-oxadiazol-3-il]benzoico), sinapultida, lancovutida, depelestat (un inhibidor de la elastasa de neutrófilo elastasa recombinante humano) y cobiprostona ácido (7-((2R, 4aR, 5R, 7aR)-2-[(3S)-1,1-difluoro-3-metilpentil]-2-hidroxi-6-oxooctahidrococlopenta[b]piran-5-heptanoico).

35 En otra realización, el agente adicional es un agente nutricional. Los agentes nutricionales de ejemplo incluyen pancrelipasa (reemplazo de enzima pancreática), incluyendo incluye Pancrease®, Pancreacarb®, Ultrase® o Creon®, Liprotomase® (anteriormente Trizyte®), Aquadeks® o inhalación de glutatión. En una realización, el agente nutricional adicional es pancrelipasa.

40 En otra realización, el agente adicional es un compuesto seleccionado entre gentamicina, curcumina, ciclofosfamida, 4-fenilbutirato, miglustat, felodipina, nimodipina, filoxina B, genisteína, apigenina, aumentadores o inductores de cAMP/cGMP tales como rolipram, sildenafil, milrinona, isoproterenol, tadalafilo, amrinona, isoproterenol, albuterol y

almeterol, desoxiespergualina, inhibidores de HSP 90, inhibidores de HSP 70, inhibidores de proteosoma, tales como epoxomicina, lactacistina, etc.

5 En otra realización, el agente adicional es un compuesto seleccionado entre (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 5-amino-6'-metil-3-trifluorometil-[2,3]bipiridinil-6-carboxílico; 3-amino-6-ciclopropil-N-(3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metilpropil)-5-(trifluorometil)picolinamida; 3-amino-6-metoxi-N-(3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-(trifluorometil)propil)-5-(trifluorometil)picolinamida; ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-6-(2,4-dicloro-fenil)-5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-6-(2,4-dicloro-fenil)-5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; (2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-6-(4-fluorofenil)-5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-5,6-bis-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-5,6-bis-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; (S)-3-amino-6-etoxi-N-(3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metilpropil)-5-(trifluorometil)picolinamida; ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-6-metoxi-5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; (3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-6-(4-fluoro-fenil)-5-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; ((S)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-5,6-bis-trifluorometil-piridin-2-carboxílico; ((R)-3,3,3-trifluoro-2-hidroxi-2-metil-propil)-amida de ácido 3-amino-5,6-bis-trifluorometil-piridin-2-carboxílico, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En otra realización, el agente adicional es un compuesto desvelado en la Patente de Estados Unidos n.º 8.247.436 y la publicación PCT internacional WO 2011113894.

En otra realización, el agente adicional puede ser un modulador de los canales de sodio epiteliales (ENac) desvelados en las publicaciones PCT WO2012035158, WO2009074575, WO2011028740, WO2009150137, WO2011079087, o WO2008135557.

En otras realizaciones, el agente adicional es un compuesto desvelado en los documentos WO 2004028480, WO 2004110352, WO 2005094374, WO 2005120497 o WO 2006101740. En otra realización, el agente adicional es un derivado de benzo[c]quinolizino que presenta actividad inductora o aumentadora de CFTR o un derivado de benzopirano que exhibe actividad inductora o aumentadora de CFTR. En otra realización, el agente adicional es un compuesto desvelado en la patente de EE.UU. N.º 7.202.262, patente de Estados Unidos N.º 6.992.096, US20060148864, US20060148863, US20060035943, US20050164973, WO2006110483, WO2006044456, WO2006044682, WO2006044505, WO2006044503, WO2006044502, o WO2004091502. En otra realización, el agente adicional es un compuesto desvelado en los documentos WO2004080972, WO2004111014, WO2005035514, WO2005049018, WO2006099256, WO2006127588 o WO2007044560.

En una realización, se pueden administrar 400 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 250 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo a un sujeto que lo necesite. En estas realizaciones, las cantidades de dosificación se pueden lograr mediante la administración de comprimidos de la invención. Por ejemplo, la administración de 400 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 250 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo puede lograrse administrando dos comprimidos, cada uno de los cuales contiene 200 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 125 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo. La duración de la administración puede continuar hasta que se logre una mejoría de la enfermedad o hasta que el médico del sujeto lo aconseje, por ejemplo, la duración de la administración puede ser inferior a una semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, cuatro semanas (28 días) o un mes o más. En una realización, dos comprimidos que comprenden cada uno 200 mg de la Forma I del Compuesto 1, y 125 mg de Compuesto 2 sustancialmente amorfo se pueden administrar al paciente por día. En una realización adicional, los dos comprimidos pueden administrarse al mismo tiempo o en diferentes momentos durante el día. En una realización adicional, un comprimido se administra cada 12 horas.

En una realización, se pueden administrar 400 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 500 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo a un sujeto que lo necesite. En una realización, la cantidad de dosificación se puede lograr administrando dos comprimidos, cada uno de los cuales contiene 100 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 125 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo, cada 12 horas. En otra realización, las cantidades de dosificación también se pueden lograr administrando la Forma I del Compuesto 1 y el Compuesto 2 sustancialmente amorfo en comprimidos separados. Por ejemplo, las cantidades de dosificación se pueden lograr administrando dos comprimidos que contienen 200 mg de la Forma I del Compuesto 1, y cuatro comprimidos que contienen 125 mg de Compuesto 2 sustancialmente amorfo. La duración de la administración puede continuar hasta que se logre una mejoría de la enfermedad o hasta que el médico del sujeto lo aconseje, por ejemplo, la duración de la administración puede ser inferior a una semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, cuatro semanas (28 días) o un mes o más. En una realización, dos comprimidos que comprenden 200 mg de la Forma I del Compuesto 1 y cuatro comprimidos que comprenden 125 mg de Compuesto 2 sustancialmente amorfo pueden administrarse al paciente al día. En una

realización adicional, los dos comprimidos se pueden administrar al mismo tiempo o en momentos diferentes durante el día.

5 La duración de la administración puede continuar hasta que se logre una mejoría de la enfermedad o hasta que el médico del sujeto lo aconseje, por ejemplo, la duración de la administración puede ser inferior a una semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, cuatro semanas (28 días) o un mes o más. En una realización adicional, un comprimido se administra cada 12 horas.

10 En una realización, se pueden administrar 600 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 500 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo a un sujeto que lo necesite. En estas realizaciones, las cantidades de dosificación se pueden lograr mediante la administración de comprimidos de la invención. La duración de la administración puede continuar hasta que se logre una mejoría de la enfermedad o hasta que el médico del sujeto lo aconseje, por ejemplo, la duración de la administración puede ser inferior a una semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, cuatro semanas (28 días) o un mes o más. En una realización adicional, se administran dos comprimidos cada 12 horas.

15 En una realización, se pueden administrar 800 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 500 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo a un sujeto que lo necesite. En estas realizaciones, las cantidades de dosificación se pueden lograr mediante la administración de comprimidos de la invención. Por ejemplo, la administración de 800 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 500 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo se puede lograr administrando cuatro comprimidos, cada uno de los cuales contiene 200 mg de la Forma I del Compuesto 1, y 125 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo. La duración de la administración puede continuar hasta que se logre una mejoría de la enfermedad o hasta que el médico del sujeto lo aconseje, por ejemplo, la duración de la administración puede ser inferior a una semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, cuatro semanas (28 días) o un mes o más. En una realización, se pueden administrar al paciente cuatro comprimidos, cada uno de los cuales comprende 200 mg de la Forma I del Compuesto 1, y 125 mg de Compuesto 2 sustancialmente amorfo al día. En una realización adicional, los cuatro comprimidos pueden administrarse al mismo tiempo o en momentos diferentes durante el día. En una realización adicional, se administran dos comprimidos por ocasión de dosificación, y hay dos ocasiones de dosificación por día. En una realización adicional, se administran 800 mg de Compuesto 1 y 500 mg de Compuesto 2 al paciente administrando dos comprimidos, cada uno de los cuales comprende 200 mg del Compuesto 1 y 125 mg del Compuesto 2 cada 12 horas (c12h). En una realización adicional, se administran al paciente 800 mg del Compuesto 1 y 500 mg del Compuesto 2 administrando dos comprimidos, cada uno de los cuales comprende 200 mg del Compuesto 1 y 125 mg del Compuesto 2 cada 12 horas (c12h).

35 En una realización, se pueden administrar 600 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 250 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo a un sujeto que lo necesite. En estas realizaciones, las cantidades de dosificación se pueden lograr mediante la administración de comprimidos de la invención. La duración de la administración puede continuar hasta que se logre una mejoría de la enfermedad o hasta que el médico del sujeto lo aconseje, por ejemplo, la duración de la administración puede ser inferior a una semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, cuatro semanas (28 días) o un mes o más. En una realización adicional, se administran tres comprimidos al mismo tiempo.

45 En una realización, se pueden administrar 600 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 500 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo a un sujeto que lo necesite. En estas realizaciones, las cantidades de dosificación se pueden lograr mediante la administración de comprimidos de la invención. La duración de la administración puede continuar hasta que se logre una mejoría de la enfermedad o hasta que el médico del sujeto lo aconseje, por ejemplo, la duración de la administración puede ser inferior a una semana, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, cuatro semanas (28 días) o un mes o más.

50 Estas combinaciones son útiles para tratar las enfermedades descritas en el presente documento, incluida la fibrosis quística. Estas combinaciones también son útiles en los kits descritos en el presente documento. En otro aspecto, la presente invención presenta un kit que comprende una composición farmacéutica o comprimido de la presente invención que comprende la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, y un agente terapéutico adicional separado o una composición farmacéutica del mismo. En otra realización, la composición farmacéutica o comprimido de la presente invención, el agente terapéutico adicional separado o la composición farmacéutica del mismo están en recipientes separados. En otra realización, los recipientes separados son botellas. En otra realización, los recipientes separados son viales. En otra realización, los recipientes separados son envases de tipo blíster.

60 La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de la presente invención no será más que la cantidad que normalmente se administraría en una composición que comprende dicho agente terapéutico como el único agente activo. Preferentemente, la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones desveladas en el presente documento variará desde aproximadamente el 50 % al 100 % de la cantidad que normalmente está presente en una composición que comprende dicho agente como el único agente terapéuticamente activo.

65

**USOS TERAPEUTICOS DE LA COMPOSICION**

En un aspecto, la invención también proporciona una composición farmacéutica o comprimido para su uso en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente una enfermedad en un paciente, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, preferentemente un mamífero, en el que la enfermedad es fibrosis quística. En el presente documento se desvela una composición o comprimido farmacéutica para su uso en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente el asma, la EPOC inducida por el humo, la bronquitis crónica, la rinosinusitis, el estreñimiento, la pancreatitis, la insuficiencia pancreática, la infertilidad masculina causada por la ausencia bilateral congénita del conducto deferente (CBAVD), la enfermedad pulmonar leve, la pancreatitis idiopática, la aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), la enfermedad hepática, el enfisema hereditario, la hemocromatosis hereditaria, las deficiencias en la coagulación-fibrinólisis, tal como la deficiencia de proteína C, el angioedema hereditario de tipo 1, las deficiencias en el procesamiento de lípidos, tal como la hipercolesterolemia familiar, la quilomiconemia de tipo 1, la abetalipoproteinemia, las enfermedades de almacenamiento lisosómico, tales como enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar tipo II, polendocrinopatía/hiperinsulinemia, la diabetes mellitus, el enanismo e Laron, la deficiencia de mileoperoxidasa, el hipoparatiroidismo primario, el melanoma, la glucanosis CDG de tipo 1, el hipertiroidismo congénito, la osteogénesis imperfecta, la hipofibrinogenemia hereditaria, la deficiencia de ACT, la diabetes insípida (DI), la enfermedad neurofisaria DI, la enfermedad neprogénica, el síndrome de Charcot-Marie Tooth, la enfermedad de Perlizaeus-Merzbacher, la esclerosis lateral amiotrófica, a parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos poliglutamínicos, tal como la ataxia espinocerebelosa de Huntington, la atrofia muscular espinal y bulbar, la palidolubia dentatorúbica y la distrofia miotónica, así como encefalopatías espongiiformes, tal como la enfermedad de Jakob (debido a un defecto en el procesamiento de las proteínas priónicas), la enfermedad de Fabry, el síndrome de Straussler-Scheinker, la EPOC, la enfermedad del ojo seco o enfermedad de Sjogren, la osteoporosis, la osteopenia, la curación ósea y el crecimiento óseo (incluida la reparación ósea, la regeneración ósea, la reducción de la resorción ósea y el incremento de la deposición ósea), el síndrome de Gorham, las canalopatías de cloruro, tal como la miotonía congénita (formas de Thomson y Becker), el síndrome de Bartter de tipo III, la enfermedad de Dent, la hiperekplexia, la epilepsia, la enfermedad de almacenamiento lisosomal, el síndrome de Angelman y la discinesia ciliar primaria (PCD), un término para los trastornos hereditarios de la estructura y/o función de los cilios, incluyendo PCD con *situs inversus* (también conocido como síndrome de Kartagener), PCD sin *situs inversus* y aplasia ciliar.

En el presente documento se desvela un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente una enfermedad en un paciente que comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que la enfermedad se selecciona entre epilepsia generalizada con convulsiones febriles más (GEFS +), epilepsia general con convulsiones febriles y afebriles, miotonía, paramiotonía congénita, miotonía agravada con potasio, parálisis periódica hipercalémica, LQTS/LQTS/síndrome de Brugada, LQTS autosómico dominante con sordera, LQTS autosómico recesivo, LQTS con características dismórficas, LQTS congénito y adquirido, síndrome de Timothy, hipoglucemia hiperinsulinémica persistente de la infancia, miocardiopatía dilatada, LQTS autosómico dominante, enfermedad de Dent, osteopetrosis, síndrome de Bartter de tipo III, enfermedad del núcleo central, hipertermia maligna y taquicardia polimórfica catecolaminérgica.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para su uso en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR N1303K, ΔI507 o R560T.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR G551D. En otra realización, el paciente es homocigoto en G551D. En otra realización, el paciente es heterocigoto en G551D en el que la otra mutación genética de CFTR es cualquiera de ΔF508, G542X, N1303K, W1282X, R117H, R553X, 1717-1G→A, 621 + 1G→T, 2789 + 5G→A, 3849 + 10kbC→T, R1162X, G85E, 3120 + 1G→A, ΔI507, 1898 + 1G→A, 3659delC, R347P, R560T, R334W, A455E, 2184delA o 711 + 1G→T.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR ΔF508. En otra realización, el paciente es homocigoto en ΔF508. En otra realización, el paciente es heterocigoto en ΔF508 en el que la otra mutación genética de CFTR es cualquiera de G551D, G542X, N1303K, W1282X, R117H, R553X, 1717-1G→A, 621 + 1G→T, 2789 + 5G→A, 3849 + 10kbC→T, R1162X, G85E, 3120 + 1G→A, ΔI507, 1898 + 1G→A, 3659delC, R347P, R560T, R334W, A455E, 2184delA o 711 + 1G→T.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R, S1251N, E193K, F1052V, G1069R, R117C, D150, R347H, R352Q, E56K, P67L, L206W, A455E, D579G, S1235R, S945L, R1070W, F1074L, D110E, D1270N, D1152H, 1717-1G→ A, 621 + 1G→ T, 3120 + 1G- 1898 + 1G→ A, 711 + 1G→ T, 2622 + 1G→ A, 405 + 1G→ A, 406-1G→ A, 4005 + 1G→ A, 1812-1G→ A, 1525 -1G→ A, 712-1G→ T, 1248 + 1G→ A, 1341 + 1G→ A, 3121-1G→ A, 4374 + 1G→ T, 3850-1G→ A, 2789+ 5G→ A, 3849 + 10kbC→ T, 3272-26A→ G, 711 + 5G→ A, 3120G→ A, 1811 + 1,6kbA→ G, 711 + 3A→ G, 1 898 + 3A→ G, 1717-8G→ A, 1342-2A→ C, 405 + 3A→ C, 1716G/A, 1811 + 1G→ C, 1898 + 5G→ T, 3850-3T- > G, IVS14b + 5G→ A, 1898 + 1G→ T, 4005 + 2T→ C y 621 + 3A→ G.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R, S1251N, E193K, F1052V y G1069R. En una realización de este aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica o comprimido para su uso en un método para tratar CFTR que comprende administrar el Compuesto 1 a un paciente que posee una mutación de CFTR humana seleccionada entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R y S1251N. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para su uso en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente que comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre E193K, F1052V y G1069R. En algunas realizaciones de este aspecto, el método produce un aumento de más de 10 veces en el transporte de cloruro en relación con el transporte basal de cloruro.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre R117C, D110H, R347H, R352Q, E56K, P67L, L206W, A455E, D579G, S1235R, S945L, R1070W, F1074L, D110E, D1270N y D1152H. En una realización de este aspecto, el método produce un aumento en el transporte de cloruro que es mayor o igual al 10 % por encima del transporte basal de cloruro.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 1717-1G→ A, 621 + 1G→ T, 3120 + 1G→ A, 1898 + 1G→ A, 711 + 1G→ T, 2622 + 1G→ A, 405 + 1G→ A, 406-1G→ A, 4005 + 1G→ A, 1812-1G→ A, 1525-1G→ A, 712-1G→ T, 1248 + 1G→ A, 1341 + 1G→ A, 3121-1G→ A, 4374 + 1G→ T, 3850-1G→ A, 2789 + 5G→ A, 3849 + 10kbC→ T, 3272-26A→ G, 711 + 5G→ A, 3120G→ A, 1811 + 1,6kbA→ G, 711 + 3A→ G, 1898 + 3A→ G, 1717- 8G→ A, 1342-2A→ C, 405 + 3A→ C, 1716G/A, 1811 + 1G→ C, 1898 + 5G→ T, 3850-3T→ G, IVS14b + 5G→ A, 1898 + 1G→ T, 4005 + 2T→ C y 621 + 3A→ G. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 1717-1G→ A, 1811 + 1,6kbA→ G, 2789 + 5G→ A, 3272-26A- > G y 3849 + 10kbC→ T. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 2789 + 5G→ A y 3272-26A→ G.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R, S1251N, E193K, F1052V, G1069R, R117C, D150, R347H, R352Q, E56K, P67L, L206W, A455E, D579G, S1235R, S945L, R1070W, F1074L, D110E, D1270N, D1152H, 1717-1G→ A, 621 + 1G→ T, 3120 + 1G- 1898 + 1G→ A, 711 + 1G→ T, 2622 + 1G→ A, 405 + 1G→ A, 406-1G→ A, 4005 + 1G→ A, 1812-1G→ A, 1525 -1G→ A, 712-1G→ T, 1248 + 1G→ A, 1341 + 1G→ A, 3121-1G→ A, 4374 + 1G→ T, 3850-1G→ A, 2789+ 5G→ A, 3849 + 10kbC→ T, 3272-26A→ G, 711 + 5G→ A, 3120G→ A, 1811 + 1,6kbA→ G, 711 + 3A→ G, 1 898 + 3A→ G, 1717-8G→ A, 1342-2A→ C, 405 + 3A→ C,

1716G/A, 1811 + 1G→ C, 1898 + 5G→ T, 3850-3T→ G, IVS14b + 5G→ A, 1898 + 1G→ T, 4005 + 2T→ C y 621 + 3A→ G, y una mutación de CFTR humano seleccionada entre ΔF508, R117H y G551D.

5 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R, S1251N, E193K, F1052V y G1069R, y una mutación de CFTR humano seleccionada entre ΔF508, R117H y G551D. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee una mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R y S1251N, y una mutación de CFTR humano seleccionada entre ΔF508, R117H, y G551D. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre E193K, F1052V y G1069R, y una mutación de CFTR humano seleccionada entre ΔF508, R117H, y G551D. En algunas realizaciones de este aspecto, el método produce un aumento de más de 10 veces en el transporte de cloruro en relación con el transporte basal de cloruro.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre R117C, D110H, R347H, R352Q, E56K, P67L, L206W, A455E, D579G, S1235R, S945L, R1070W, F1074L, D110E, D1270N y D1152H, y una mutación de CFTR humano seleccionada entre ΔF508, R117H y G551D. En una realización de este aspecto, el método produce un aumento en el transporte de cloruro que es mayor o igual al 10 % por encima del transporte basal de cloruro.

35 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 1717-1G→ A, 621 + 1G→ T, 3120 + 1G→ A, 1898 + 1G→ A, 711 + 1G→ T, 2622 + 1G→ A, 405 + 1G→ A, 406-1G→ A, 4005 + 1G→ A, 1812-1G→ A, 1525-1G→ A, 712-1G→ T, 1248 + 1G→ A, 1341 + 1G→ A, 3121-1G→ A, 4374 + 1G→ T, 3850-1G→ A, 2789 + 5G→ A, 3849 + 10kbC→ T, 3272-26A→ G, 711 + 5G→ A, 3120G→ A, 1811 + 1,6kbA→ G, 711 + 3A→ G, 1898 + 3A→ G, 1717- 8G→ A, 1342-2A→ C, 405 + 3A→ C, 1716G/A, 1811 + 1G→ C, 1898 + 5G→ T, 3850-3T→ G, IVS14b + 5G→ A, 1898 + 1G→ T, 4005 + 2T→ C y 621 + 3A→ G, y una mutación de CFTR humano seleccionada entre ΔF508, R117H y G551D. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 1717-1G→ A, 1811 + 1,6kbA→ G, 2789 + 5G→ A, 3272-26A→ G y 3849 + 10kbC→ T, y una mutación de CFTR humano seleccionada entre ΔF508, R117H y G551D. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 2789 + 5G→ A y 3272-26A→ G, y una mutación de CFTR humano seleccionada entre ΔF508, R117H.

55 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R, S1251N, E193K, F1052V, G1069R, R117C, D150, R347H, R352Q, E56K, P67L, L206W, A455E, D579G, S1235R, S945L, R1070W, F1074L, D110E, D1270N, D1152H, 1717-1G→ A, 621 + 1G→ T, 3120 + 1G→ 1898 + 1G→ A, 711 + 1G→ T, 2622 + 1G→ A, 405 + 1G→ A, 406-1G→ A, 4005 + 1G→ A, 1812-1G→ A, 1525-1G→ A, 712-1G→ T, 1248 + 1G→ A, 1341 + 1G→ A, 3121-1G→ A, 4374 + 1G→ T, 3850-1G→ A, 2789+ 5G→ A, 3849 + 10kbC→ T, 3272-26A→ G, 711 + 5G→ A, 3120G→ A, 1811 + 1,6kbA→ G, 711 + 3A→ G, 1 898 + 3A→ G, 1717-8G→ A, 1342-2A→ C, 405 + 3A→ C, 1716G/A, 1811 + 1G→ C, 1898 + 5G→ T, 3850-3T→ G, IVS14b + 5G→ A, 1898 + 1G→ T, 4005 + 2T→ C y 621 + 3A→ G, y una mutación de CFTR humano seleccionada entre ΔF508, R117H y G551D.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R, S1251N, E193K, F1052V y G1069R. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R y S1251N. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre E193K, F1052V y G1069R. En algunas realizaciones de este aspecto, el método produce un aumento de más de 10 veces en el transporte de cloruro en relación con el transporte basal de cloruro.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre R117C, D110H, R347H, R352Q, E56K, P67L, L206W, A455E, D579G, S1235R, S945L, R1070W, F1074L, D110E, D1270N y D1152H. En una realización de este aspecto, el método produce un aumento en el transporte de cloruro que es mayor o igual al 10 % por encima del transporte basal de cloruro.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 1717-1G-> A, 621 + 1G-> T, 3120 + 1G-> A, 1898 + 1G-> A, 711 + 1G-> T, 2622 + 1G-> A, 405 + 1G-> A, 406-1G-> A, 4005 + 1G-> A, 1812-1G-> A, 1525-1G-> A, 712-1G-> T, 1248 + 1G-> A, 1341 + 1G-> A, 3121-1G-> A, 4374 + 1G-> T, 3850-1G-> A, 2789 + 5G-> A, 3849 + 10kbC-> T, 3272-26A-> G, 711 + 5G-> A, 3120G-> A, 1811 + 1,6kbA-> G, 711 + 3A-> G, 1898 + 3A-> G, 1717- 8G-> A, 1342-2A-> C, 405 + 3A-> C, 1716G/A, 1811 + 1G-> C, 1898 + 5G-> T, 3850-3T-> G, IVS14b + 5G-> A, 1898 + 1G-> T, 4005 + 2T-> C y 621 + 3A-> G.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 1717-1G-> A, 1811 + 1,6kbA-> G, 2789 + 5G-> A, 3272-26A-> G y 3849 + 10kbC-> T. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 2789 + 5G-> A y 3272-26A-> G.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R, S1251N, E193K, F1052V, G1069R, R117C, D150, R347H, R352Q, E56K, P67L, L206W, A455E, D579G, S1235R, S945L, R1070W, F1074L, D110E, D1270N, D1152H, 1717-1G-> A, 621 + 1G-> T, 3120 + 1G-> A, 1898 + 1G-> A, 711 + 1G-> T, 2622 + 1G-> A, 405 + 1G-> A, 406-1G-> A, 4005 + 1G-> A, 1812-1G-> A, 1525 -1G-> A, 712-1G-> T, 1248 + 1G-> A, 1341 + 1G-> A, 3121-1G-> A, 4374 + 1G-> T, 3850-1G-> A, 2789+ 5G-> A, 3849 + 10kbC-> T, 3272-26A-> G, 711 + 5G-> A, 3120G-> A, 1811 + 1,6kbA-> G, 711 + 3A-> G, 1 898 + 3A-> G, 1717-8G-> A, 1342-2A-> C, 405 + 3A-> C, 1716G/A, 1811 + 1G-> C, 1898 + 5G-> T, 3850-3T-> G, IVS14b + 5G-> A, 1898 + 1G-> T, 4005 + 2T-> C y 621 + 3A-> G, y una mutación de CFTR humano seleccionada entre  $\Delta$ F508, R117H, y G551D, y una o más humanas mutaciones de CFTR humano seleccionadas entre  $\Delta$ F508, R117H y G551D.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R, S1251N, E193K, F1052V y G1069R, y una o más mutaciones de CFTR humanas seleccionadas entre  $\Delta$ F508, R117H y G551D. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la

5 gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre G178R, G551S, G970R, G1244E, S1255P, G1349D, S549N, S549R y S1251N, y una o más mutaciones de CFTR humano seleccionadas entre  $\Delta F508$ , R117H y G551D. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre E193K, F1052V y G1069R, y una o más mutaciones de CFTR humano seleccionadas entre  $\Delta F508$ , R117H y G551D. En algunas realizaciones de este aspecto, el método produce un aumento de más de 10 veces en el transporte de cloruro en relación con el transporte basal de cloruro.

15 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre R117C, D110H, R347H, R352Q, E56K, P67L, L206W, A455E, D579G, S1235R, S945L, R1070W, F1074L, D110E, D1270N y D1152H, y una o más mutaciones de CFTR humano seleccionadas entre  $\Delta F508$ , R117H y G551D. En una realización de este aspecto, el método produce un aumento en el transporte de cloruro que es mayor o igual al 10 % por encima del transporte basal de cloruro.

25 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 1717-1G→ A, 621 + 1G→ T, 3120 + 1G→ A, 1898 + 1G→ A, 711 + 1G→ T, 2622 + 1G→ A, 405 + 1G→ A, 406-1G→ A, 4005 + 1G→ A, 1812-1G→ A, 1525-1G→ A, 712-1G→ T, 1248 + 1G→ A, 1341 + 1G→ A, 3121-1G→ A, 4374 + 1G→ T, 3850-1G→ A, 2789 + 5G→ A, 3849 + 10kbC→ T, 3272-26A→ G, 711 + 5G→ A, 3120G→ A, 1811 + 1,6kbA→ G, 711 + 3A→ G, 1898 + 3A→ G, 1717- 8G→ A, 1342-2A→ C, 405 + 3A→ C, 1716G/A, 1811 + 1G→ C, 1898 + 5G→ T, 3850-3T→ G, IVS14b + 5G→ A, 1898 + 1G→ T, 4005 + 2T→ C y 621 + 3A→ G, y una o más mutaciones de CFTR humano seleccionadas entre  $\Delta F508$ , R117H y G551D. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 1717-1G→ A, 1811 + 1,6kbA→ G, 2789 + 5G→ A, 3272-26A→ G y 3849 + 10kbC→ T, y una o más mutaciones de CFTR humano seleccionadas entre  $\Delta F508$ , R117H y G551D. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o comprimido para usar en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente, preferentemente un mamífero, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica o comprimido de la invención, en el que el paciente posee la mutación genética de CFTR se selecciona entre 2789 + 5G→ A y 3272-26A→ G, y una o más mutaciones de CFTR humano seleccionadas entre  $\Delta F508$ , R117H, y G551D.

45 En ciertas realizaciones, la composición o comprimido farmacéuticamente aceptable de la presente invención que comprende la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida del Compuesto 2 sustancialmente amorfo son útiles para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en pacientes que exhiben actividad de CFTR residual en la membrana apical de los epitelios respiratorios y no respiratorios. La presencia de actividad de CFTR residual en la superficie epitelial puede detectarse fácilmente usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, técnicas electrofisiológicas, bioquímicas o histoquímicas estándar. Dichos métodos identifican la actividad de CFTR utilizando técnicas electrofisiológicas *in vivo* o *ex vivo*, la medición de las concentraciones de Cl<sup>-</sup> en el sudor o la saliva, o técnicas bioquímicas o histoquímicas *ex vivo* para controlar la densidad de la superficie celular. Usando tales métodos, la actividad de CFTR residual puede detectarse fácilmente en pacientes heterocigotos u homocigotos para diversas mutaciones diferentes, incluidos pacientes homocigotos o heterocigotos para la mutación más común,  $\Delta F508$ , así como otras mutaciones como la mutación G551D o la R117H mutación. En ciertas realizaciones, las composiciones o comprimidos farmacéuticamente aceptables que comprenden la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo son útiles para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en pacientes que exhiben poca o ninguna actividad de CFTR residual. En ciertas realizaciones, las composiciones o comprimidos farmacéuticamente aceptables que comprenden la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo son útiles para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en pacientes que muestran poca o ninguna actividad de CFTR residual en la membrana apical de los epitelios respiratorios.

65 En otra realización, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en pacientes que tienen actividad residual de CFTR inducida o aumentada usando métodos farmacológicos. En otra realización, los compuestos y composiciones de la presente invención son útiles

para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en pacientes que tienen actividad residual de CFTR inducida o aumentada usando terapia génica. Tales métodos aumentan la cantidad de CFTR presente en la superficie celular, lo que induce una actividad de CFTR hasta ahora ausente en un paciente o aumenta el nivel existente de actividad de CFTR residual en un paciente.

5 En una realización, las composiciones farmacéuticas y los comprimidos de la presente invención que comprenden la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, como se describe en el presente documento, son útiles para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en pacientes dentro de ciertos genotipos que exhiben actividad de CFTR residual, por ejemplo, mutaciones de clase I (no sintetizadas), mutación de clase II (plegamiento incorrecto), mutaciones de clase III (regulación o activación alteradas), mutaciones de clase IV (conductancia alterada) o mutaciones de clase V (síntesis reducida).

15 En una realización, las composiciones farmacéuticas y los comprimidos de la presente invención que comprenden la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, como se describe en el presente documento, son útiles para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en pacientes con ciertos fenotipos, por ejemplo, un fenotipo clínico moderado o leve que normalmente se correlaciona con la cantidad de actividad de CFTR residual en la membrana apical de los epitelios. Dichos fenotipos incluyen pacientes que exhiben suficiencia pancreática.

20 En una realización, las composiciones farmacéuticas y los comprimidos de la presente invención que comprenden la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, como se describe en el presente documento, son útiles para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente a pacientes con diagnóstico de suficiencia pancreática, pancreatitis idiopática y ausencia bilateral congénita de vasos deferentes o enfermedad pulmonar leve en la que el paciente exhibe actividad de CFTR residual.

25 En una realización, las composiciones farmacéuticas y los comprimidos de la presente invención que comprenden la Forma I del Compuesto 1 y una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo, como se describe en el presente documento, son útiles para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente a pacientes diagnosticados con suficiencia pancreática, pancreatitis idiopática y ausencia bilateral congénita de los vasos deferentes, o enfermedad pulmonar leve en la que el paciente exhibe actividad residual de CFTR.

30 Además de la fibrosis quística, la modulación de la actividad del CFTR puede ser beneficiosa para otras enfermedades no causadas directamente por mutaciones en el CFTR, tales como enfermedades secretoras y otras enfermedades del plegamiento de proteínas mediado por el CFTR. Estos incluyen la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad del ojo seco y el síndrome de Sjögren. La EPOC se caracteriza por una limitación del flujo de aire que es progresiva y no totalmente reversible. La limitación del flujo de aire se debe a una hipersecreción de moco, enfisema y bronquiolitis. Los activadores del CFTR de tipo natural o mutante ofrecen un tratamiento potencial de la hipersecreción de moco y del aclaramiento mucociliar alterado que es habitual en la EPOC. En concreto, el aumento de la secreción de aniones a través del CFTR puede facilitar el transporte de fluido hacia el líquido de la superficie de las vías respiratorias para hidratar el moco y optimizar la viscosidad del fluido periciliar. Esto conduciría a un aumento del aclaramiento mucociliar y a una reducción de los síntomas asociados con la EPOC. La enfermedad del ojo seco se caracteriza por una disminución en la producción acuosa de la lágrima y perfiles anormales de lípidos, proteínas y mucina en la película lacrimal. Existen muchas causas del ojo seco, algunas de las cuales incluyen la edad, la cirugía ocular de Lasik, la artritis, medicaciones, quemaduras químicas/térmicas, alergias y enfermedades tales como la fibrosis quística y el síndrome de Sjögren. El aumento de la secreción de aniones a través del CFTR aumentaría el transporte de fluidos desde las células endoteliales corneales y las glándulas secretoras que rodean el ojo para aumentar la hidratación corneal. Esto ayudaría a aliviar los síntomas asociados con la enfermedad del ojo seco. El síndrome de Sjögren es una enfermedad autoinmunitaria en la que el sistema inmunológico ataca las glándulas productoras de humedad de todo el cuerpo, incluyendo el ojo, la boca, la piel, el tejido respiratorio, el hígado, la vagina y los intestinos. Los síntomas incluyen sequedad ocular, de boca y vaginal, así como enfermedad pulmonar. La enfermedad también está asociada con artritis reumatoide, lupus sistémico, esclerosis sistémica y polimiositis/dermatomiositis. Se cree que un tránsito de proteínas defectuoso causa la enfermedad, para la que las opciones de tratamiento son limitadas. Los aumentadores o inductores de la actividad de CFTR pueden hidratar los diversos órganos afectados por la enfermedad y ayudar a elevar los síntomas asociados.

35 También se describe un método para aumentar o inducir la actividad del canal aniónico *in vitro*, que comprende poner en contacto el canal con cualquiera de las composiciones farmacéuticas **PC-I** a **PC-XXV**. El canal aniónico es un canal de cloruro o un canal de bicarbonato, o el canal aniónico es un canal de cloruro.

60 La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la infección, el agente en particular y su modo de administración. Las composiciones farmacéuticas de la invención se formulan preferentemente en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma farmacéutica unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente pequeña del agente terapéutico adecuado para el paciente que se va a tratar. Sin embargo, se entenderá que el médico asistente decidirá el uso diario total de las

- composiciones de la invención dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis eficaz específica para cualquier paciente u organismo en particular dependerá de diversos factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y la tasa de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los medicamentos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado, y como factores bien conocidos en las artes médicas. El término "paciente", como se usa en el presente documento, significa un animal, preferentemente un mamífero, y, lo más preferentemente, un ser humano.
- En cualquier lugar de la presente solicitud en la que el nombre de un compuesto puede no describir correctamente la estructura del compuesto, la estructura reemplaza al nombre y rige.

### **EJEMPLOS**

#### 15 XRPD (Difracción de rayos X de polvo)

Los datos de difracción de rayos X (XRD) de la Forma I del Compuesto 1 se recolectaron en un difractómetro de polvo Bruker D8 DISCOVER con detector de 2 dimensiones HI-STAR y un monocromador de grafito plano. Se usó tubo sellado de Cu con radiación  $K\alpha$  a 40 kV, 35 mA. Las muestras se colocaron en obleas de silicio de fondo cero a 25 °C. Para cada muestra, se recolectaron dos cuadros de datos a 120 segundos cada uno en 2 ángulos  $\theta_2$  diferentes: 8° y 26°. Los datos se integraron con el software GADDS y se fusionaron con el software DIFFRACT<sup>plus</sup>EVA. Las incertidumbres para las posiciones máximas indicadas son de  $\pm 0,2$  grados.

#### 25 Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los datos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la Forma I del Compuesto 1 se recolectaron utilizando un DSC Q100 V9.6 Build 290 (TA Instruments, New Castle, DE). La temperatura se calibró con indio y la capacidad térmica se calibró con zafiro. Las muestras de 3-6 mg se pesaron en bandejas de aluminio que se enroscaron utilizando tapas con 1 agujero. Las muestras se escanearon a de 25 °C a 350 °C a una velocidad de calentamiento de 1,0 °C/min y con una purga con gas nitrógeno de 50 ml/min. Los datos se recopilaron con el software Thermal Advantage Q Series<sup>TM</sup> versión 2.2.0.248 y se analizaron con el software Universal Analysis versión 4,1D (TA Instruments, New Castle, DE). Los números indicados representan análisis individuales.

#### 35 Determinación de la estructura monocristalina de la Forma I del Compuesto 1

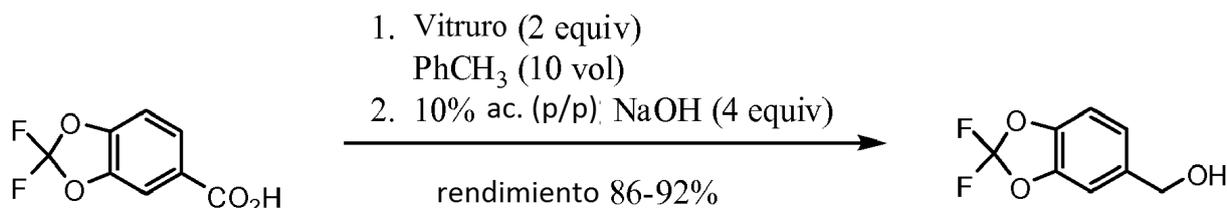
Los datos de difracción se adquirieron en un difractómetro Bruker Apex II equipado con una fuente de Cu K-alfa de tubo sellado y un detector CCD Apex II. La estructura se resolvió y se refinó utilizando el programa SHELXL (Sheldrick, G.M., Acta Cryst., (2008) A64, 112–122). Sobre la base de las estadísticas de las ausencias e intensidades sistemáticas, la estructura se resolvió y se refinó en el grupo espacial  $P2_1/n$ .

Vitride® (hidruro de bis(2-metoxietoxi)aluminio de sodio [ $NaAlH_2(OCH_2CH_2OCH_3)_2$ ], solución de 65 % en peso en tolueno) se adquirió en Aldrich Chemicals.

El ácido 2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-carboxílico se adquirió de Saltigo (una filial de Lanxess Corporation).

#### 45 Preparación del Compuesto 1

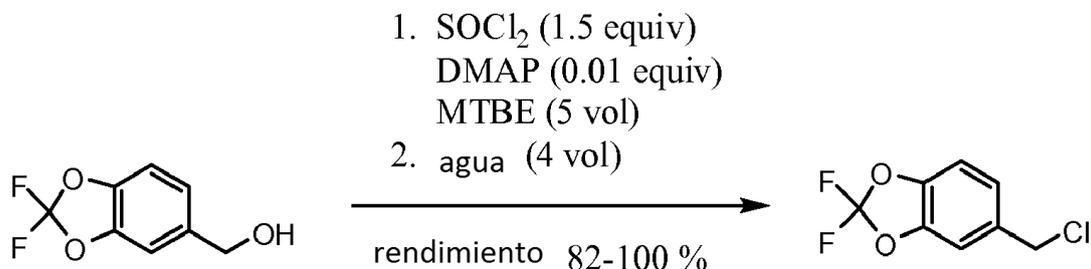
##### **Preparación de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-metanol.**



El ácido 2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-carboxílico (1,0 eq) disponible en el mercado se suspendió en tolueno (10 vol). Se añadió Vitride® (2 eq) mediante un embudo de adición a una velocidad para mantener la temperatura a 15–25 °C. Al final de la adición, la temperatura se aumentó a 40 °C durante 2 horas (h), luego se añadió cuidadosamente 10 % (p/p) de NaOH acuoso (ac.) (4,0 eq) mediante un embudo de adición, manteniendo la temperatura a 40–50 °C. Después de agitar durante 30 minutos adicionales (min), las capas se dejaron separar a 40

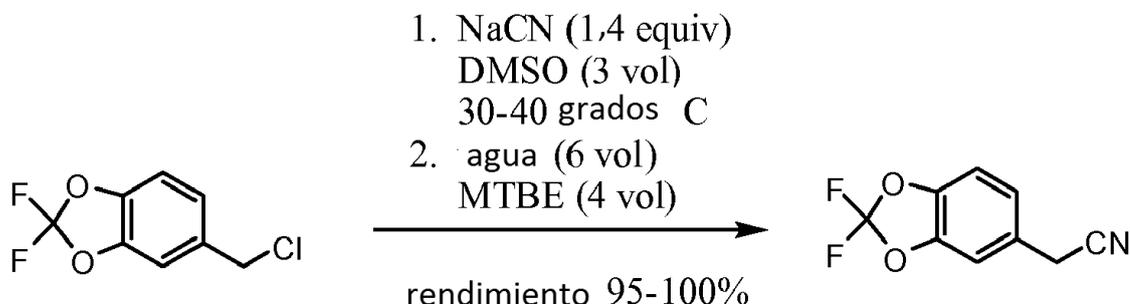
°C. La fase orgánica se enfrió a 20 °C, luego se lavó con agua (2 x 1,5 vol), se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró para proporcionar (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-metanol crudo que se usó directamente en la siguiente etapa.

5 **Preparación de 5-clorometil-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol.**



10 Se disolvió (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-metanol (1,0 eq) en MTBE (5 vol). Se añadió una cantidad catalítica de 4-(N, N-dimetil)aminopiridina (DMAP) (1 % en moles) y se añadió SOCl<sub>2</sub> (1,2 eq) mediante un embudo de adición. El SOCl<sub>2</sub> se añadió a una velocidad para mantener la temperatura en el reactor a 15-25 °C. La temperatura se aumentó a 30 °C durante 1 hora, y luego se enfrió a 20 °C. Se añadió agua (4 vol) mediante un embudo de adición mientras se mantenía la temperatura a menos de 30 °C. Después de agitar durante 30 minutos adicionales, las capas se dejaron separar. La capa orgánica se agitó y se añadió un 10 % (p/v) de NaOH ac. (4,4 vol). Después de agitar durante de 15 a 20 minutos, las capas se dejaron separar. A continuación, la fase orgánica se secó (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtró y se concentró para proporcionar 5-clorometil-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol bruto que se usó directamente en la siguiente etapa.

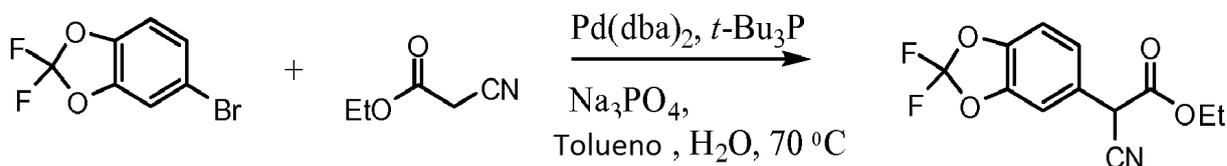
20 **Preparación de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-acetonitrilo.**



25 Se añadió una solución de 5-clorometil-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol (1 eq) en DMSO (1,25 vol) a una suspensión de NaCN (1,4 eq) en DMSO (3 vol), manteniendo la temperatura entre 30 y 40 °C. La mezcla se agitó durante 1 hora y luego se añadió agua (6 vol), seguido de éter metil-terc-butílico (MTBE) (4 vol). Después de agitar durante 30 minutos, las capas se separaron. La capa acuosa se extrajo con MTBE (1,8 vol). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (1,8 vol), se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron y se concentraron para proporcionar (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-acetonitrilo bruto (95 %) que se usó directamente en la siguiente etapa.

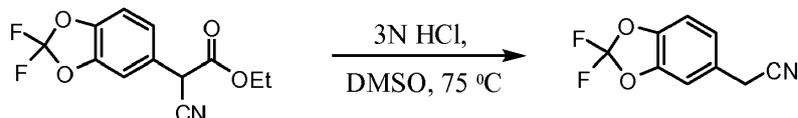
30 **Síntesis de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-1-acetato de etilo-acetonitrilo**

35



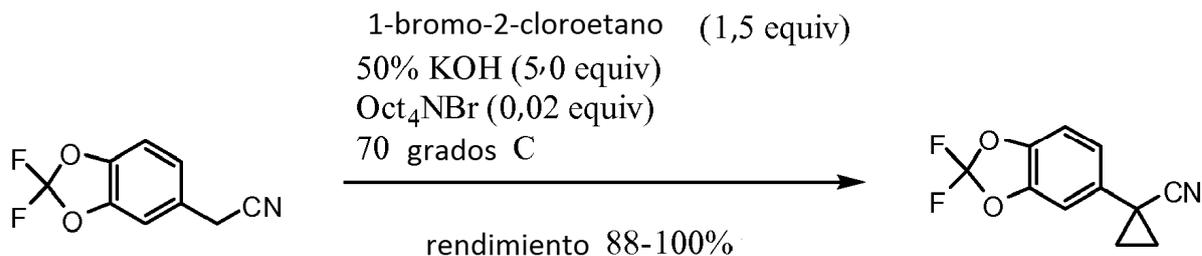
Un reactor se purgó con nitrógeno y se cargó con 900 ml de tolueno. El disolvente se desgasificó a través de rociado de nitrógeno durante no menos de 16 horas. Luego se cargó al reactor  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  (155,7 g, 949,5 mmol), seguido de bis(dibencilidenacetona)paladio (0) (7,28 g, 12,66 mmol). Se cargó una solución al 10 % p/p de terc-butilfosfina en hexanos (51,23 g, 25,32 mmol) durante 10 minutos a 23 °C de un embudo de adición purgado con nitrógeno. La mezcla se dejó agitar durante 50 minutos, momento en el que se añadió 5-bromo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol (75 g, 316,5 mmol) durante 1 minuto. Después de agitar durante 50 minutos adicionales, la mezcla se cargó con cianoacetato de etilo (71,6 g, 633,0 mmol) durante 5 minutos, seguido de agua (4,5 ml) en una porción. La mezcla se calentó a 70°C durante 40 min y se analizó mediante HPLC cada 1-2 h para determinar el porcentaje de conversión del reactivo en el producto. Después de observar la conversión completa (típicamente una conversión del 100 % después de 5-8 h), la mezcla se enfrió a 20-25 °C y se filtró a través de una almohadilla de celite. La almohadilla de Celite se aclaró con tolueno (2 x 450 ml) y los extractos orgánicos combinados se concentraron a 300 ml al vacío a 60-65 °C. El concentrado se cargó con 225 ml de DMSO y se concentró al vacío a 70-80°C hasta que cesó la destilación activa del disolvente. La solución se enfrió a 20-25 °C y se diluyó a 900 ml con DMSO en preparación para la etapa 2. RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,16–7,10 (m, 2H), 7,03 (d,  $J = 8,2$  Hz, 1H), 4,63 (s, 1H), 4,19 (m, 2H), 1,23 (t,  $J = 7,1$  Hz, 3H).

#### Síntesis de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-acetoniitrilo.



La solución DMSO de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-1-acetato de etilo-acetonitrilo anterior se cargó con HCl 3 N (617,3 ml, 1,85 mol) durante 20 minutos, mientras que Manteniendo una temperatura interna <40 °C. A continuación, la mezcla se calentó a 75 °C durante 1 hora y se analizó mediante HPLC cada 1-2 h para el % de conversión. Cuando se observó una conversión de > 99 % (típicamente después de 5-6 h), la reacción se enfrió a 20-25 °C y se extrajo con MTBE (2 X 525 ml), con tiempo suficiente para permitir la separación completa de la fase durante el extracciones Los extractos orgánicos combinados se lavaron con NaCl al 5 % (2 x 375 ml). A continuación, la solución se transfirió a un equipo apropiado para una destilación al vacío de 1,5 a 2,5 Torr que estaba equipada con un matraz receptor enfriado. La solución se concentró al vacío a < 60 °C para eliminar los disolventes. A continuación se destiló el (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-acetoniitrilo del aceite resultante a 125-130 °C (temperatura del horno) y 1,5-2,0 Torr. El (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-acetoniitrilo se aisló como un aceite transparente con un rendimiento del 66 % a partir de 5-bromo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol (2 etapas) y con una pureza de HPLC de 91,5 % AUC (corresponde a un ensayo p/p del 95 %). RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, DMSO)  $\delta$  7,44 (s, 1H), 7,43 (d,  $J = 8,4$  Hz, 1H), 7,22 (dd,  $J = 8,2, 1,8$  Hz, 1H), 4,07 (s, 2H).

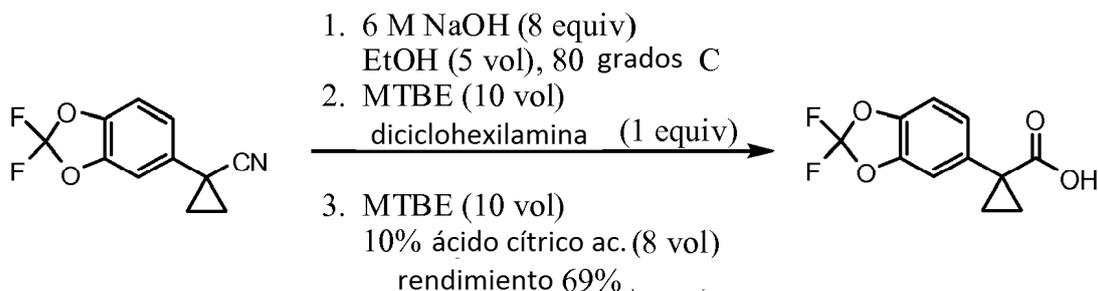
#### Preparación de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo.



Una mezcla de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-acetonitrilo (1,0 eq), 50 % en peso de KOH acuoso (5,0 eq) 1-bromo-2-cloroetano (1,5 eq) y Oct<sup>4</sup>NBr (0,02 eq) se calentó a 70 °C durante 1 h. La mezcla de reacción se enfrió, luego se trató con MTBE y agua. La fase orgánica se lavó con agua y salmuera. El disolvente se eliminó para proporcionar (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo.

5

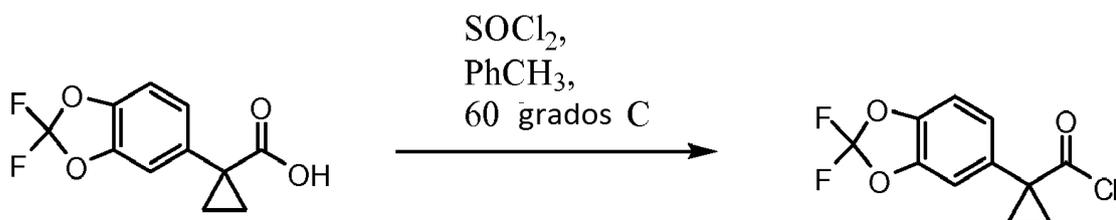
**Preparación de ácido 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarboxílico.**



- 10 El (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo se hidrolizó usando NaOH 6 M (8 equiv.) en etanol (5 vol) a 80 °C durante la noche. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el etanol se evaporó al vacío. El residuo se suspendió en agua y MTBE, se añadió HCl 1 M y se separaron las capas. La capa de MTBE se trató después con diciclohexilamina (DCHA) (0,97 equiv.). La suspensión se enfrió a 0 °C, se filtró y se lavó con heptano para dar la correspondiente sal de DCHA. La sal se suspendió en MTBE y ácido cítrico al 10 % y se agitó hasta que se disolvieron todos los sólidos. Las capas se separaron y la capa de MTBE se lavó con agua y salmuera. Un intercambio de disolvente a heptano seguido de filtración dio ácido 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarboxílico después de secar en un horno de vacío a 50 °C durante la noche.
- 15

**Preparación de cloruro de 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonilo.**

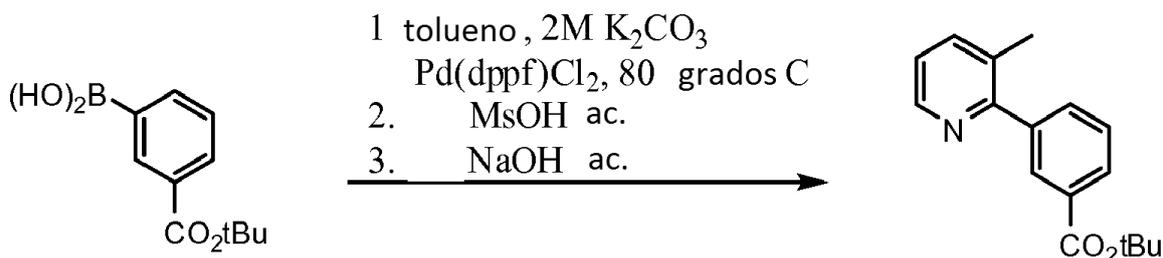
20



- 25 El ácido 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarboxílico (1,2 eq) se suspende en tolueno (2,5 vol) y la mezcla se calentó a 60 °C. Se añadió SOCl<sub>2</sub> (1,4 eq) mediante un embudo de adición. El tolueno y SOCl<sub>2</sub> se destilaron de la mezcla de reacción después de 30 minutos. Se añadió tolueno adicional (2,5 vol) y la mezcla resultante se destiló nuevamente, dejando el producto cloruro de ácido en forma de un aceite, que se usó sin purificación adicional.

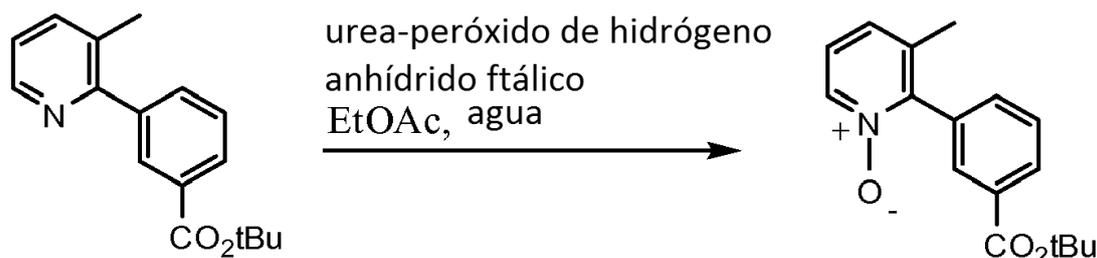
**Preparación de 3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo.**

30



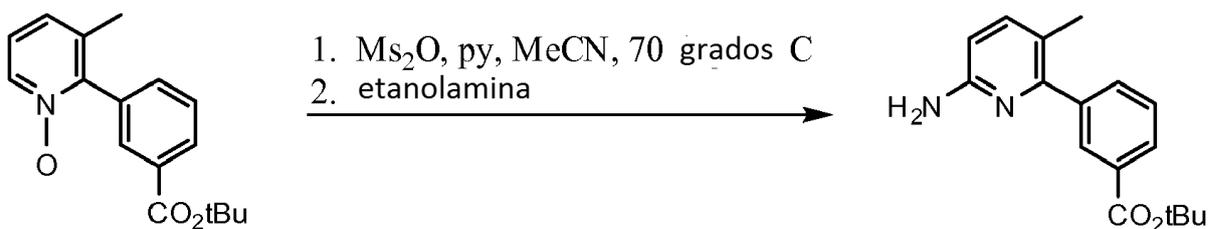
Se disolvió 2-Bromo-3-metilpiridina (1,0 eq) en tolueno (12 vol). Se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,8 eq), seguido de agua (3,5 vol). La mezcla resultante se calentó a 65 °C bajo una corriente de N<sub>2</sub> durante 1 hora. Después se añadieron ácido 3-(t-butoxicarbonil)fenilborónico (1,05 eq) y Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0,015 eq) y la mezcla se calentó a 80 °C. Tras 2 horas, se retiró el calor, se añadió agua (3,5 vol) y se dejó que las capas se separaran. La fase orgánica se lavó con agua (3,5 vol) y se extrajo con ácido metanosulfónico acuoso al 10 % (2 eq. de MsOH, 7,7 vol). La fase acuosa se hizo básica con NaOH acuoso al 50 % (2 eq) y se extrajo con EtOAc (8 vol). La capa orgánica se concentró para proporcionar 3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo crudo (82 %) que se usó directamente en la siguiente etapa.

#### Preparación de 2-(3-(terc-butoxicarbonil) fenil)-3-metilpiridin-1-óxido.



Se disolvió 3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo (1,0 eq) en EtOAc (6 vol). Se añadió agua (0,3 vol), seguido de urea y peróxido de hidrógeno (3 eq). Luego se añadió en porciones anhídrido ftálico (3 eq) a la mezcla como un sólido a una velocidad para mantener la temperatura en el reactor por debajo de 45 °C. Una vez completada la adición de anhídrido ftálico, la mezcla se calentó a 45 °C. Tras la agitación durante 4 horas adicionales, se retiró el calor. Se añadió 10% p/p de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> acuoso (1,5 eq) mediante un embudo de adición. Una vez completada la adición de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, la mezcla se agitó durante 30 min adicionales y las capas se separaron. La capa orgánica se agitó y se añadió 10 % en peso/de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acuoso (2 eq). Después de agitar durante 30 minutos, las capas se dejaron separar. La fase orgánica se lavó con 13 % en p/v de NaCl ac. La fase orgánica luego se filtró y se concentró para proporcionar 2-(3-(terc-butoxicarbonil)fenil)-3-metilpiridina-1-óxido (95 %) que se usó directamente en la siguiente etapa.

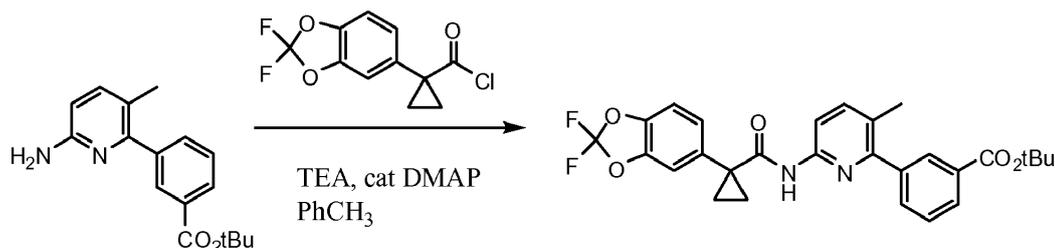
#### Preparación de 3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo.



Una solución de 2-(3-(terc-butoxicarbonil) fenil)-3-metilpiridina-1-óxido (1 eq) y piridina (4 eq) en acetonitrilo (8 vol) se calentó a 70 °C. Se añadió una solución de anhídrido metanosulfónico (1,5 eq) en MeCN (2 vol.) durante 50

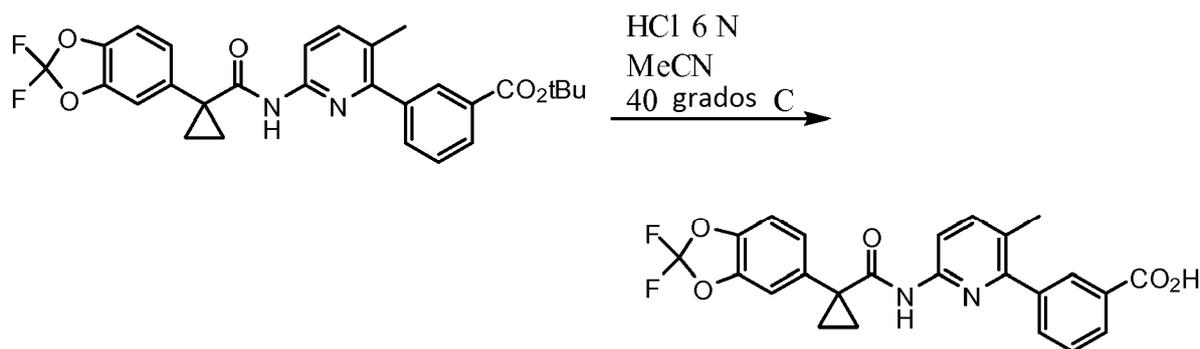
minutos a través de un embudo de adición mientras se mantenía la temperatura a menos de 75 °C. La mezcla se agitó durante 0,5 horas adicionales después de completar la adición. La mezcla se dejó enfriar luego a temperatura ambiente. Se añadió etanolamina (10 eq) mediante un embudo de adición. Después de agitar durante 2 horas, se añadió agua (6 vol) y la mezcla se enfrió a 10°C. Después de agitar durante 3 horas, el sólido se recogió por filtración y se lavó con agua (3 vol), acetonitrilo/agua (3 vol) y acetonitrilo (2 x 15 vol). El sólido se secó hasta peso constante (<1 % de diferencia) en un horno de vacío a 50 °C con una ligera mezcla de N<sub>2</sub> para proporcionar 3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo como un sólido rojo-amarillo (53 % de rendimiento).

**Preparación de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato.**



El cloruro de ácido crudo descrito anteriormente se disolvió en tolueno (2,5 vol basado en cloruro de ácido) y se añadió mediante un embudo de adición a una mezcla de 3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo (1 eq), DMAP, (0,02 eq) y trietilamina (3,0 eq) en tolueno (4 vol basados en 3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo). Después de 2 horas, se añadió agua (4 vol en base a 3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato de terc-butilo) a la mezcla de reacción. Después de agitar durante 30 minutos, las capas se separaron. A continuación, la fase orgánica se filtró y se concentró para dar un aceite espeso de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato (rendimiento bruto cuantitativo). Se añadió acetonitrilo (3 vol en base al producto crudo) y se destiló hasta que se produjo la cristalización. Se añadió agua (2 vol en base al producto crudo) y la mezcla se agitó durante 2 hora. El sólido se recogió por filtración, se lavó con 1:1 (en volumen) de acetonitrilo/agua (2 x 1 volúmenes en base al producto bruto) y se secó parcialmente en el filtro al vacío. El sólido se secó hasta un peso constante (<1 % de diferencia) en un horno de vacío a 60 °C con una ligera mezcla de N<sub>2</sub> para proporcionar 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato como un sólido marrón.

**Preparación de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico • Sal HCl.**



• HCl

A una suspensión de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato (1,0 eq.) en MeCN (3,0 vol) se añadió agua a (0,83 vol) seguido de HCl acuoso concentrado (0,83 vol). La mezcla se calentó a 45 ± 5 °C. Después de agitar durante 24 a 48 h, la reacción se completó y la mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió agua (1,33 vol) y la mezcla se agitó. El sólido se recogió por filtración, se lavó con agua (2 x 0,3 vol) y se secó parcialmente en el filtro al vacío. El sólido se secó hasta un peso constante (<1 % de diferencia) en un horno de vacío a 60 °C con una ligera mezcla de N<sub>2</sub> para proporcionar ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico • HCl como un sólido blanquecino.

Un espectro de RMN  $^1\text{H}$  del Compuesto 1 se muestra en la Figura 8 y la Figura 9 representa un espectro de RMN  $^1\text{H}$  del Compuesto 1 como una sal de HCl.

La Tabla 2 a continuación cita los datos de RMN  $^1\text{H}$  para el Compuesto I.

5

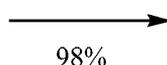
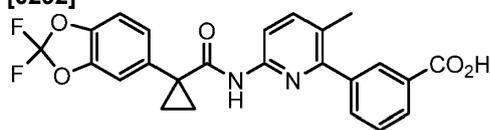
Tabla 2.

N.º de compuesto	LC/MC M + 1	LC/RT minutos	RMN
1	453,3	1,93	RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) 9,14 (s, 1H), 7,99–7,93 (m, 3H), 7,80–7,78 (m, 1H), 7,74–7,72 (m, 1H), 7,60–7,55 (m, 2H), 7,41–7,33 (m, 2H), 2,24 (s, 3H), 1,53–1,51 (m, 2H), 1,19–1,17 (m, 2H).

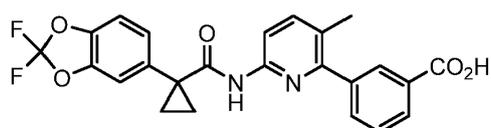
Preparación de la Forma I del Compuesto 1

#### 10 Preparación de la Forma I del Compuesto 1, método A.

[0292]



• HCl



Forma I

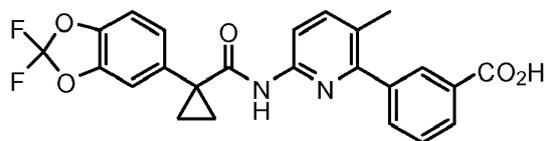
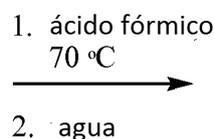
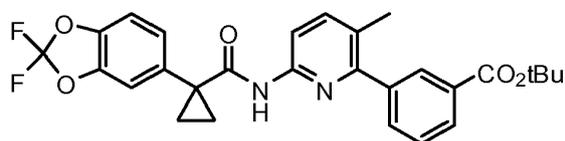
15

Una suspensión de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzodioxol-5-yl)ciclopropanocarbonylamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico • HCl (1 eq) en agua (10 vol) se agitó a temperatura ambiente. Se tomó una muestra después de agitar durante 24 h. La muestra se filtró y el sólido se lavó con agua (2 veces). Se sometió la muestra sólida a análisis por DSC. Cuando el análisis por DSC indicó la conversión completa a la Forma I, el sólido se recogió por filtración, se lavó con agua (2 x 1,0 vol) y se secó parcialmente en un filtro al vacío. El sólido se secó luego hasta un peso constante (<1 % de diferencia) en un horno de vacío a 60 °C con una ligera mezcla de  $\text{N}_2$  para proporcionar la Forma I del Compuesto 1 como un sólido blanquecino (98 % de rendimiento). RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) 9,14 (s, 1H), 7,99–7,93 (m, 3H), 7,80–7,78 (m, 1H), 7,74–7,72 (m, 1H), 7,60–7,55 (m, 2H), 7,41–7,33 (m, 2H), 2,24 (s, 3H), 1,53–1,51 (m, 2H), 1,19–1,17 (m, 2H).

20

25

#### Preparación de la Forma I del Compuesto 1, método B.



Forma I

Una solución de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato (1,0 eq) en ácido fórmico (3,0 vol) se calentó con agitación a  $70 \pm 10$  °C, durante 8 h. La reacción se consideró completa cuando no quedaba más del 1,0 % de AUC por métodos cromatográficos de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamido -3 -metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato). La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se añadió a agua (6 vol), se calentó a 50 °C y la mezcla se agitó. La mezcla se calentó luego a  $70 \pm 10$  °C hasta que el nivel de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridina-2-il)-t-butilbenzoato no fue más del 0,8 % (AUC). El sólido se recogió por filtración, se lavó con agua (2 x 3 vol) y se secó parcialmente en el filtro al vacío. El sólido se secó a un peso constante (<1 % de diferencia) en un horno de vacío a 60 °C con un ligero sangrado de N<sub>2</sub> para proporcionar la Forma I del Compuesto 1 como un sólido blanquecino.

La traza DSC del Compuesto 1 Forma I se muestra en la Figura 10. La fusión para la Forma I del Compuesto 1 se produce a aproximadamente 204 °C.

Se calculó un patrón de difracción de rayos X a partir de una estructura monocristalina de la Forma I del Compuesto 1 y se muestra en la Figura 1. La Tabla 3 enumera los picos calculados para la Figura 1.

**Tabla 3.**

Rango del pico	Ángulo 2θ [grados]	Intensidad relativa [%]
11	14,41	48,2
8	14,64	58,8
1	15,23	100,0
2	16,11	94,7
3	17,67	81,9
7	19,32	61,3
4	21,67	76,5
5	23,40	68,7
9	23,99	50,8
6	26,10	67,4
10	28,54	50,1

20

En la Figura 2 se muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X real de la Forma I del Compuesto 1. La Tabla 4 enumera los picos reales para la Figura 2.

**Tabla 4.**

Rango del pico	Ángulo 2θ [grados]	Intensidad relativa [%]
7	7,83	37,7
3	14,51	74,9
4	14,78	73,5
1	15,39	100,0
2	16,26	75,6
6	16,62	42,6
5	17,81	70,9
9	21,59	36,6
10	23,32	34,8
11	24,93	26,4
8	25,99	36,9

25

Se obtuvieron cristales incoloros de la Forma I del Compuesto 1 enfriando una solución concentrada de 1-butanol de 75 °C a 10 °C a una velocidad de 0,2 °C/min. Se seleccionó un cristal con dimensiones de 0,50 x 0,08 x 0,03 mm, se limpió con aceite mineral, se montó en un MicroMount y se centró en un sistema Bruker APEX II. Se obtuvieron tres

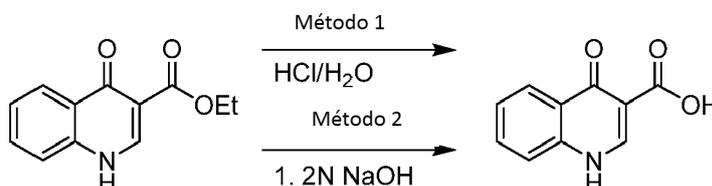
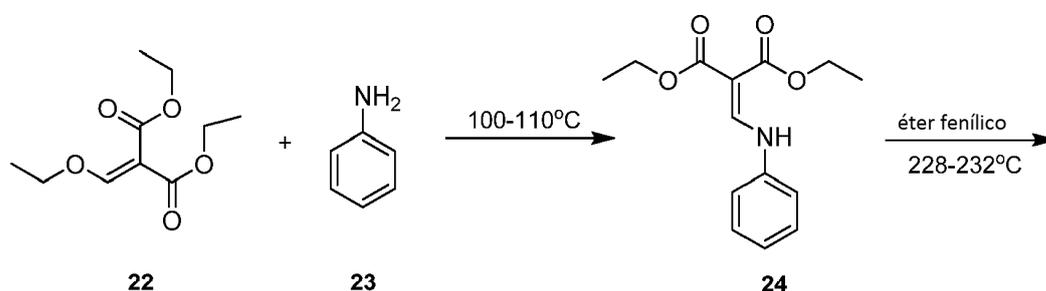
lotes de 40 cuadros separados en el espacio recíproco para proporcionar una matriz de orientación y parámetros de celda iniciales. Los parámetros de celda finales se obtuvieron y refinaron en base al conjunto completo de datos.

Se obtuvo un conjunto de datos de difracción de espacio recíproco a una resolución de 0,82 Å utilizando etapas de 0,5° usando una exposición de 30 s para cada marco. Los datos se recolectaron a 100 (2) K. La integración de las intensidades y el refinamiento de los parámetros celulares se realizó utilizando el software APEXII. La observación del cristal después de la recolección de datos no mostró signos de descomposición.

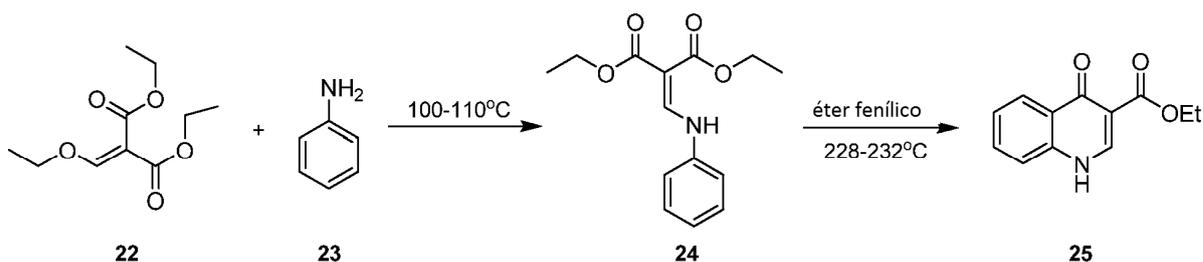
En la Figura 11 se muestra una imagen conformacional de la Forma I del Compuesto 1 basada en el análisis de rayos X de cristal único. La Forma I del Compuesto 1 es monoclinica,  $P_21/n$ , con las siguientes dimensiones de celda unitaria:  $a = 4,9626 (7) \text{ \AA}$ ,  $b = 12,299 (2) \text{ \AA}$ ,  $c = 33,075 (4) \text{ \AA}$ ,  $\beta = 93,938 (9)^\circ$ ,  $V = 2014,0 \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 4$ . La densidad de la Forma I del Compuesto 1 calculada a partir de datos estructurales es  $1,492 \text{ g/cm}^3$  a 100 K.

### Preparación del Compuesto 2

#### Síntesis del ácido 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (26)

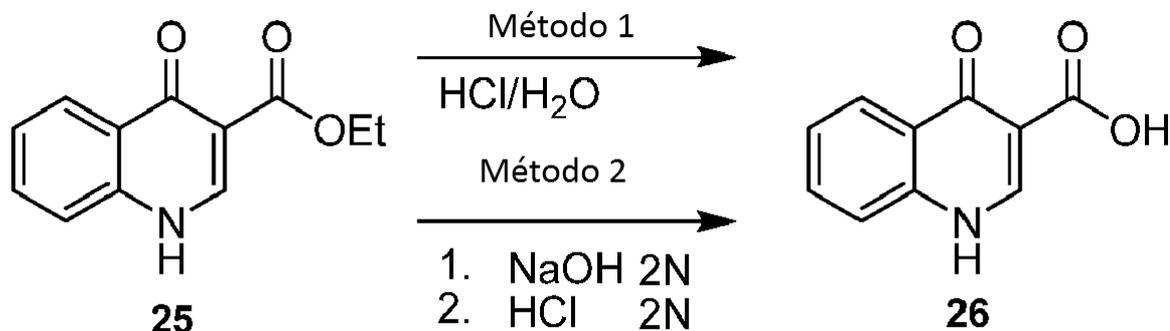


#### Procedimiento para la preparación de 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxilato de etilo (25)



El Compuesto **23** (4,77 g, 47,7 mmol) se añadió gota a gota al compuesto **22** (10 g, 46,3 mmol) con un flujo de  $N_2$  subsuperficial para expulsar el etanol por debajo de 30 °C durante 0,5 horas. La solución se calentó luego a 100-110 °C y se agitó durante 2,5 horas. Después de enfriar la mezcla por debajo de 60°C, se añadió éter de difenilo. La solución resultante se añadió gota a gota al éter de difenilo que se había calentado a 228-232 °C durante 1,5 horas con un flujo de  $N_2$  subsuperficial para expulsar el etanol. La mezcla se agitó a 228-232 °C durante otras 2 horas, se enfrió a menos de 100 °C y luego se añadió heptano para precipitar el producto. La suspensión resultante se agitó a 30 °C durante 0,5 horas. Los sólidos se filtraron luego y la torta se lavó con heptano y se secó al vacío para dar el compuesto **25** como un sólido marrón. RMN  $^1H$  (DMSO -  $d_6$ ; 400 MHz)  $\delta$  12,25 (s),  $\delta$  8,49 (d),  $\delta$  8,10 (m),  $\delta$  7,64 (m), 7,55 (m),  $\delta$  7,34 (m),  $\delta$  4,16 (q),  $\delta$  1,23 (t).

#### Procedimiento para la preparación de ácido 4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico (26)

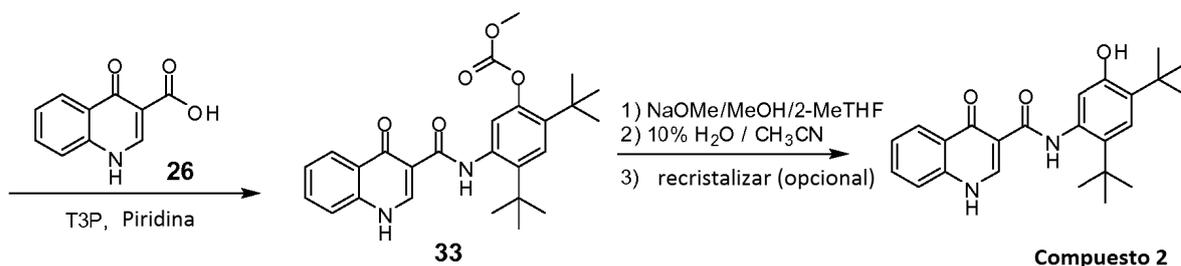
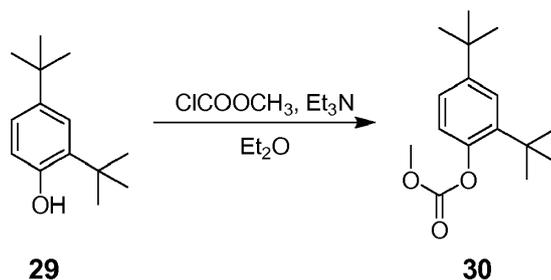
Método 1

5 El Compuesto **25** (1,0 eq) se suspendió en una solución de HCl (10,0 eq) y H<sub>2</sub>O (11,6 vol). La suspensión se calentó a 85-90 °C, aunque también son adecuadas temperaturas alternativas para esta etapa de hidrólisis. Por ejemplo, la hidrólisis puede realizarse alternativamente a una temperatura de aproximadamente 75 a aproximadamente 100°C. En algunos casos, la hidrólisis se realiza a una temperatura de aproximadamente 80 a aproximadamente 95 °C. En otros, la etapa de hidrólisis se realiza a una temperatura de aproximadamente 82 a aproximadamente 93 °C (por ejemplo, de aproximadamente 82,5 a aproximadamente 92,5 °C o de aproximadamente 86 a aproximadamente 89 °C). Después de agitar a 85-90 °C durante aproximadamente 6,5 horas, se tomó una muestra de la reacción para completar la reacción. La agitación se puede realizar a cualquiera de las temperaturas adecuadas para la hidrólisis. La solución se enfrió luego a 20-25°C y se filtró. El reactor/torta se enjuagó con H<sub>2</sub>O (2 vol x 2). La torta se lavó luego con 2 vol de H<sub>2</sub>O hasta un pH ≤ 3,0. La torta se secó luego a vacío a 60 °C para dar el compuesto **26**.

15 Método 2

20 El Compuesto **25** (11,3 g, 52 mmol) se añadió a una mezcla de NaOH al 10 % (ac.) (10 ml) y etanol (100 ml). La solución se calentó a reflujo durante 16 horas, se enfrió a 20-25 °C y luego el pH se ajustó a 2-3 con HCl al 8 %. La mezcla se agitó luego durante 0,5 horas y se filtró. La torta se lavó con agua (50 ml) y luego se secó al vacío para dar el compuesto **26** como un sólido marrón. RMN <sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>; 400 MHz) δ 15,33 (s), δ 13,39 (s), δ 8,87 (s), δ 8,26 (m), δ 7,87 (m), δ 7,80 (m), δ 7,56 (m).

25 **Síntesis total de N-(2,4-di-terc-butil-5-hidroxifenilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-3-carboxamida (Compuesto 2)**

**Procedimiento para la preparación de 2,4-di-terc-butilfenilmetilcarbonato (30)**

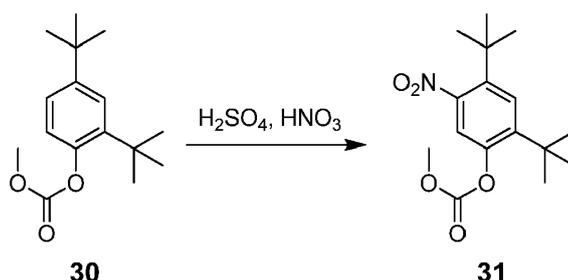
30

**Método 1**

A una solución de 2,4-di-terc-butilfenol, **29**, (10 g, 48,5 mmol) en éter dietílico (100 ml) y trietilamina (10,1 ml, 72,8 mmol), se añadió cloroformiato de metilo (7,46 ml, 97 mmol) gota a gota a 0 °C. La mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 2 horas más. A continuación, se añadieron 5 ml adicionales de trietilamina y 3,7 ml de cloroformiato de metilo y la reacción se agitó durante la noche. A continuación, la reacción se filtró, el filtrado se enfrió a 0°C, y luego se añadieron 5 ml adicionales de trietilamina y 3,7 ml de cloroformiato de metilo y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y luego se agitó durante 1 hora más. En esta etapa, la reacción estaba casi completa y se trató filtrando, a continuación lavando con agua (2x), seguido de salmuera. A continuación, la solución se concentró para producir un aceite amarillo y se purificó usando cromatografía en columna para dar el compuesto **30**. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,35 (d, *J* = 2,4 Hz, 1H), 7,29 (dd, *J* = 8,4, 2,4 Hz, 1H), 7,06 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 3,85 (s, 3H), 1,30 (s, 9H), 1,29 (s, 9H).

**Método 2**

A un recipiente del reactor cargado con 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 3,16 g, 25,7 mmol) y 2,4-di-terc-butilfenol (compuesto **29**, 103,5 g, 501,6 mmol) se añadió cloruro de metileno (415 g, 313 ml) y la solución se agitó hasta que todos los sólidos se disolvieron. A continuación, se añadió trietilamina (76 g, 751 mmol) y la solución se enfrió a 0-5 °C. Luego se añadió gota a gota cloroformiato de metilo (52 g, 550,3 mmol) durante 2,5-4 horas, mientras se mantenía la temperatura de la solución entre 0 y 5 °C. La mezcla de reacción se calentó lentamente a 23-28°C y se agitó durante 20 horas. La reacción se enfrió luego a 10-15 °C y se cargó con 150 ml de agua. La mezcla se agitó a 15-20 °C durante 35-45 minutos y, a continuación, la capa acuosa se separó y se extrajo con 150 ml de cloruro de metileno. Las capas orgánicas se combinaron y se neutralizaron con HCl al 2,5 % (ac.) a una temperatura de 5-20 °C, para dar un pH final de 5-6. La capa orgánica se lavó con agua y se concentró al vacío a una temperatura inferior a 20°C hasta 150 ml para dar el compuesto **30** en cloruro de metileno.

**Procedimiento para la preparación de 5-nitro-2,4-di-terc-butilfenilmetilcarbonato (31)**

30

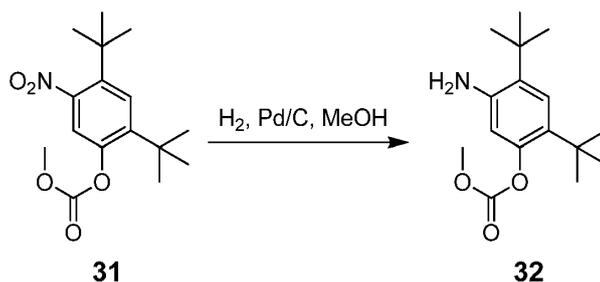
**Método 1**

A una solución agitada del compuesto **30** (6,77 g, 25,6 mmol) se añadieron 6 ml de una mezcla 1:1 de ácido sulfúrico y ácido nítrico a 0 °C gota a gota. La mezcla se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. El producto se purificó utilizando cromatografía líquida (ISCO, 120 g, EtOAc al 0-7 %/Hexanos, 38 min) produciendo aproximadamente una mezcla 8:1-10:1 de regioisómeros del compuesto **31** como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7,63 (s, 1H), 7,56 (s, 1H), 3,87 (s, 3H), 1,36 (s, 9H), 1,32 (s, 9H). HPLC tiempo de retención 3,92 min 10-99 % de CH<sub>3</sub>CN, carrera de 5 min; ESI-MS 310 m/z (MH)<sup>+</sup>.

**Método 2**

Al compuesto **30** (100 g, 378 mmol) se añadió DCM (540 g, 408 ml). La mezcla se agitó hasta que se disolvieron todos los sólidos y, a continuación, se enfrió a -5-0 °C. Después, se añadió gota a gota ácido sulfúrico concentrado (163 g), mientras se mantenía la temperatura inicial de la reacción y la mezcla se agitó durante 4,5 horas. A continuación, se añadió gota a gota ácido nítrico (62 g) durante 2-4 horas mientras se mantenía la temperatura inicial de la reacción, y luego se agitó a esta temperatura durante 4,5 horas adicionales. Después, la mezcla de reacción se añadió lentamente a agua fría, manteniendo una temperatura por debajo de 5°C. La reacción inactivada se calentó a continuación a 25 °C y la capa acuosa se retiró y se extrajo con cloruro de metileno. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron a 124-155 ml. Se añadió hexano (48 g) y la mezcla resultante se concentró de nuevo hasta 124-155 ml. Posteriormente se añadió más hexano (160 g) a la mezcla. La mezcla se agitó luego a 23-27 °C durante 15,5 horas y luego se filtró. A la torta del filtro se añadió hexano (115 g), la mezcla resultante se calentó a reflujo y se agitó durante 2-2,5 horas. La mezcla se enfrió luego a 3-7 °C, se agitó durante 1-1,5 horas adicionales y se filtró para dar el compuesto **31** como un sólido amarillo claro.

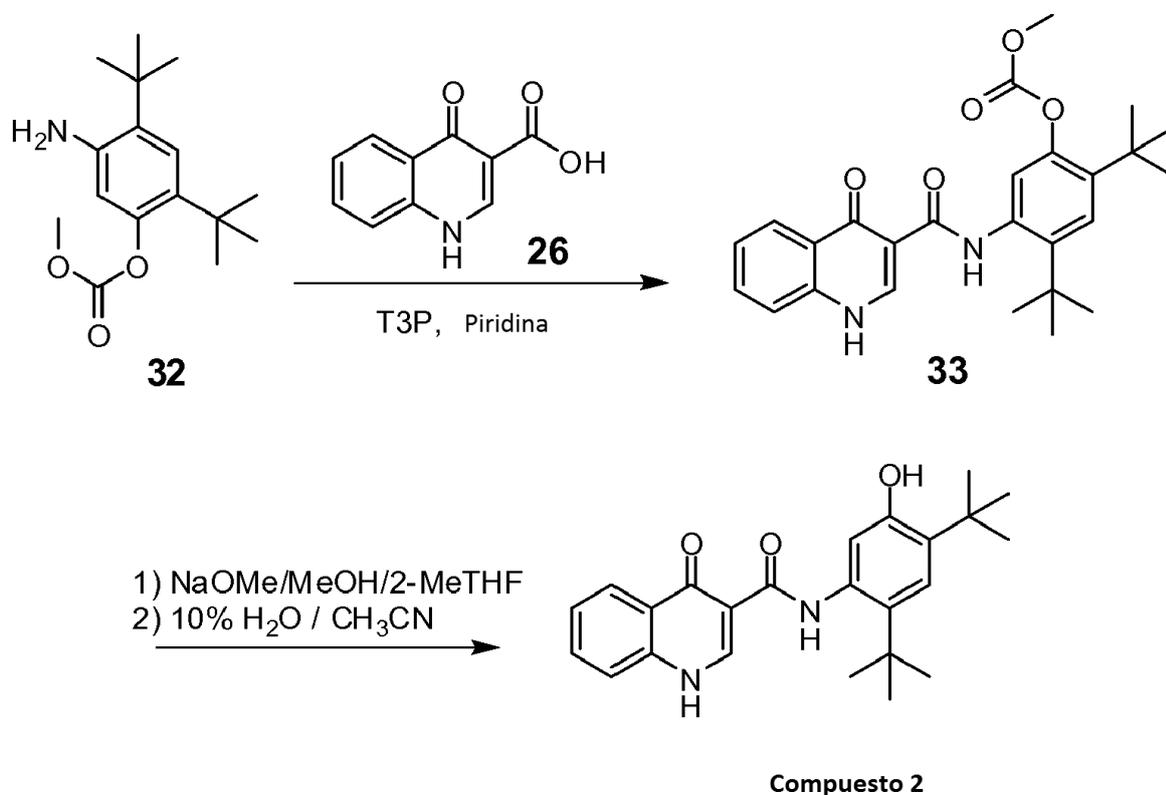
**Procedimiento para la preparación de 5-amino-2,4-di-terc-butilfenilmetilcarbonato (32)**



Se cargó 2,4-di-terc-butil-5-nitrofenilmetilcarbonato (1,00 eq) en un reactor de hidrogenación adecuado, seguido de 5 % de Pd/C (2,50 % en peso de base seca, Johnson-Matthey Type 37 ). Se cargó MeOH (15,0 vol) al reactor y se cerró el sistema. El sistema se purgó con N<sub>2</sub> (g) y luego se presurizó a 2,0 bar con H<sub>2</sub> (g). La reacción se realizó a una temperatura de reacción de 25 °C +/- 5 °C. Cuando se completó, la reacción se filtró y el reactor/torta se lavó con MeOH (4,00 vol). El filtrado resultante se destiló al vacío a no más de 50 °C a 8,00 vol. Se añadió agua (2,00 vol) a 45 °C +/- 5 °C. La suspensión resultante se enfrió a 0 °C +/- 5. La suspensión se mantuvo a 0 °C +/- 5 °C durante no menos de 1 hora y se filtró. La torta se lavó una vez con MeOH/H<sub>2</sub>O (8:2) a 0 °C +/- 5 °C (2,00 vol). La torta se secó al vacío (-0,90 bar y -0,86 bar) a 35 °C-40 °C para dar el compuesto **32**. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7,05 (s, 1H), 6,39 (s, 1H), 4,80 (s, 2H), 3,82 (s, 3H), 1,33 (s, 9H), 1,23 (s, 9H).

Una vez que se completó la reacción, la mezcla resultante se diluyó con aproximadamente de 5 a 10 volúmenes de MeOH (por ejemplo, de aproximadamente 6 a aproximadamente 9 volúmenes de MeOH, de aproximadamente 7 a aproximadamente 8,5 volúmenes de MeOH, de aproximadamente 7,5 a aproximadamente 8 volúmenes de MeOH, o aproximadamente 7,7 volúmenes de MeOH), se calentó a una temperatura de aproximadamente 35 ± 5 °C, se filtró, se lavó y se secó, como se ha descrito anteriormente.

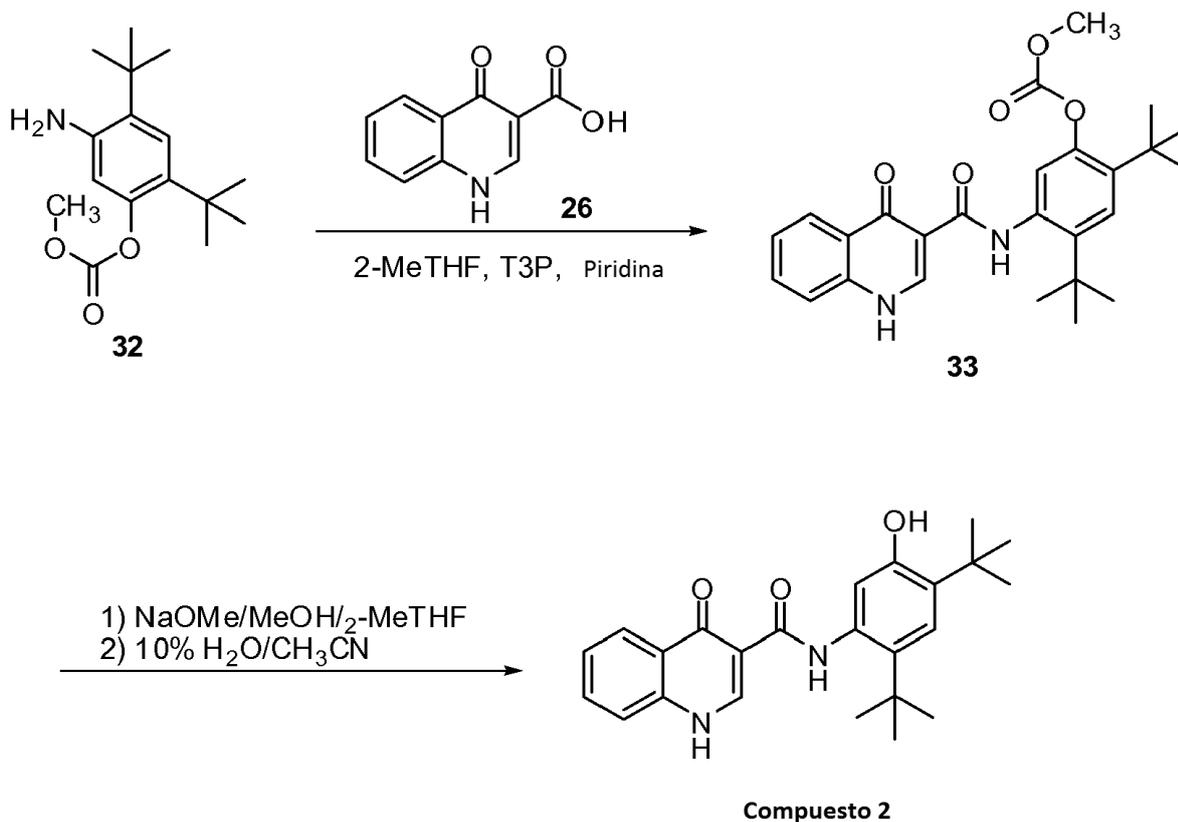
**Preparación de N-(2,4-di-terc-butil-5-hidroxifenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (Compuesto 2).**



Se cargaron ácido 4-Oxo-1,4-dihidroquinolin-3- carboxílico, **26**, (1,0 eq) y 5-amino-2,4-di-terc-butilfenilmetilcarbonato, **32**, (1,1 eq) en un reactor. Se añadió 2-MeTHF (4,0 vol, en relación con el ácido) seguido de una solución de T3P® al 50 % en 2-MeTHF (1,7 eq). El recipiente cargado con T3P se lavó con 2-MeTHF (0,6 vol). Luego se añadió piridina (2,0 eq) y la suspensión resultante se calentó a 47,5 +/- 5,0 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 8 horas. Se tomó una muestra y se verificó su finalización por HPLC. Una vez completada, la

mezcla resultante se enfrió a 25,0 °C +/- 2,5 °C. Se añadió 2-MeTHF (12,5 vol) para diluir la mezcla. La mezcla de reacción se lavó con agua (10,0 vol) 2 veces. Se añadió 2-MeTHF para llevar el volumen total de la reacción a 40,0 vol (~16,5 vol cargados). A esta solución se añadió NaOMe/MeOH (1,7 equiv.) para realizar la metanolisis. La reacción se agitó durante no menos de 1,0 horas y se verificó para completarla por HPLC. Una vez completada, la reacción se inactivó con HCl 1 N (10,0 vol) y se lavó con HCl 0,1 N (10,0 vol). La solución orgánica se filtró con pulido para eliminar las partículas y se colocó en un segundo reactor. La solución filtrada se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y no menos de 8,0 °C (temperatura de reacción interna) bajo presión reducida a 20 vol. Se añadió CH<sub>3</sub>CN a 40 vol y la solución se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y a no menos de 8,0 °C temperatura de la reacción interna) a 20 vol. La adición de CH<sub>3</sub>CN y el ciclo de concentración se repitió 2 veces más para un total de 3 adiciones de CH<sub>3</sub>CN y 4 concentraciones a 20 vol. Después de la concentración final a 20 vol, se añadieron 16,0 vol de CH<sub>3</sub>CN, seguido de 4,0 vol de H<sub>2</sub>O para preparar una concentración final de 40 vol de H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN al 10 % respecto al ácido de partida. Esta suspensión se calentó a 78,0 °C +/- 5,0 °C (reflujo). La suspensión se agitó después durante no menos de 5 horas. La suspensión se enfrió a 0,0 °C +/- 5 °C durante 5 horas y se filtró. La torta se lavó con 0,0 °C +/- 5,0 °C de CH<sub>3</sub>CN (5 vol) 4 veces. El sólido resultante (Compuesto 2) se secó en un horno de vacío a 50,0 °C +/- 5,0 °C. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12,8 (s, 1H), 11,8 (s, 1H), 9,2 (s, 1H), 8,9 (s, 1H), 8,3 (s, 1H), 7,2 (s, 1H), 7,9 (t, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,5 (t, 1H), 7,1 (s, 1H), 1,4 (s, 9H), 1,4 (s, 9H).

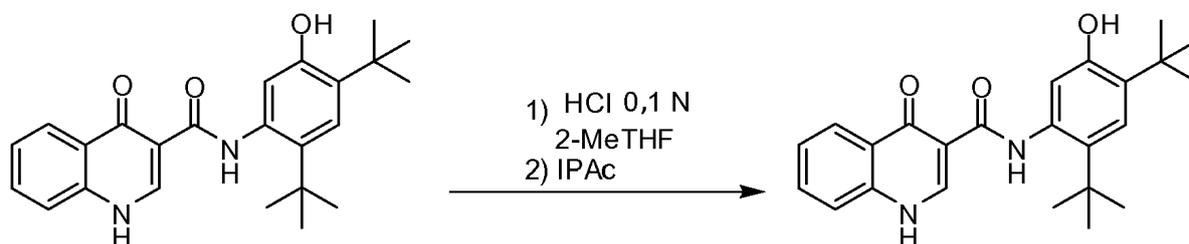
20 **Preparación alternativa de N-(2,4-di-terc-butil-5-hidroxifenilo)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (Compuesto 2).**



25 Se cargaron ácido 4-Oxo-1,4-dihidroquinolin-3- carboxílico, **26**, (1,0 eq) y 5-amino-2,4-di-terc-butilfenilmetilcarbonato, **32**, (1,1 eq) en un reactor. Se añadió 2-MeTHF (4,0 vol, en relación con el ácido) seguido de una solución de T3P® al 50 % en 2-MeTHF (1,7 eq). El recipiente cargado con T3P se lavó con 2-MeTHF (0,6 vol). Luego se añadió piridina (2,0 eq) y la suspensión resultante se calentó a 47,5 +/- 5,0 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 8 horas. Se tomó una muestra y se verificó su finalización por HPLC. Una vez completado, la mezcla resultante se enfrió a 20 °C +/- 5 °C. Se añadió 2-MeTHF (12,5 vol) para diluir la mezcla. La mezcla de reacción se lavó con agua (10,0 vol) 2 veces y se cargó 2-MeTHF (16,5 vol) en el reactor. Esta solución se cargó con 30 % p/p de NaOMe/MeOH (1,7 equiv.) para realizar la metanolisis. La reacción se agitó a 25,0 °C +/- 5,0 °C durante no menos de 1,0 horas y se verificó su finalización por HPLC. Una vez completada, la reacción se inactivó con HCl 1,2 N (10,0 vol) y se lavó con HCl/H<sub>2</sub>O 0,1 N (10,0 vol). La solución orgánica se filtró con pulido para eliminar las partículas y se colocó en un segundo reactor.

La solución filtrada se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y no menos de 8,0 °C (temperatura de reacción interna) bajo presión reducida a 20 vol. Se añadió CH<sub>3</sub>CN a 40 vol y la solución se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y a no menos de 8,0 °C (temperatura de la reacción interna) a 20 vol. La adición de CH<sub>3</sub>CN y el ciclo de concentración se repitió 2 veces más para un total de 3 adiciones de CH<sub>3</sub>CN y 4 concentraciones a 20 vol. Después de la concentración final a 20 vol, se cargaron 16,0 vol de CH<sub>3</sub>CN, seguido de 4,0 vol de H<sub>2</sub>O para preparar una concentración final de 40 vol de H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN al 10 % respecto al ácido de partida. Esta suspensión se calentó a 78,0 °C +/- 5,0 °C (reflujo). La suspensión se agitó después durante no menos de 5 horas. La suspensión se enfrió a 20 a 25 °C durante 5 horas y se filtró. La torta se lavó con CH<sub>3</sub>CN (5 vol) calentada a 20 a 25 °C 4 veces. El sólido resultante (Compuesto 2) se secó en un horno de vacío a 50,0 °C +/- 5,0 °C. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12,8 (s, 1H), 11,8 (s, 1H), 9,2 (s, 1H), 8,9 (s, 1H), 8,3 (s, 1H), 7,2 (s, 1H), 7,9 (t, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,5 (t, 1H), 7,1 (s, 1H), 1,4 (s, 9H), 1,4 (s, 9H).

**Procedimiento para la recristalización de N-(2,4-di-terc-butil-5-hidroxifenil)-4-oxo-1,4-dihidroquinolin-3-carboxamida (Compuesto 2)**



El compuesto 2 (1,0 eq) se cargó en un reactor. Se añadió 2-MeTHF (20,0 vol), seguido de HCl 0,1N (5,0 vol). La solución bifásica se agitó y se separó y la fase orgánica superior se lavó dos veces más con HCl 0,1 N (5,0 vol). La solución orgánica se filtró con pulido para eliminar las partículas y se colocó en un segundo reactor. La solución filtrada se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y no más de 8,0 °C (temperatura de reacción interna) a presión reducida a 10 vol. Se añadió acetato de isopropilo (IPAc) (10 vol) y la solución se concentró a no más de 35 °C (temperatura de la camisa) y a no más de 8 °C (temperatura de la reacción interna) a 10 vol. La adición de IPAc y la concentración se repitieron 2 veces más para un total de 3 adiciones de IPAc y 4 concentraciones a 10 vol. Tras la concentración final, se cargaron 10 vol de IPAc y la suspensión se calentó a reflujo y se mantuvo a esta temperatura durante 5 horas. La suspensión se enfrió a 0,0 °C +/- 5 °C durante 5 horas y se filtró. La torta se lavó con IPAc (5 vol) una vez. El sólido resultante se secó en un horno de vacío a 50,0 °C +/- 5,0 °C.

**Preparación de una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo**

Un sistema disolvente de agua MEK y DI, formulado de acuerdo con la relación 90 % en peso de MEK/10 % en peso de agua DI, se calentó a una temperatura de 20-30 °C en un reactor, equipado con un agitador magnético y un circuito térmico. En este sistema disolvente, se añadieron polímero de succinato acetato de hipromelosa (HPMCAS) (calidad HG), SLS y Compuesto 2 según la relación 19,5 % en peso de succinato acetato de hipromelosa/0,5 % en peso de SLS/80 % en peso del Compuesto 2. La mezcla resultante contenía 10,5 % en peso de sólidos. Las cantidades reales de componentes y disolventes utilizados para generar esta mezcla se enumeran en la Tabla 5, a continuación:

**Tabla 5:** Componentes de la dispersión de pulverización sólida para el intermedio F.

	Unidades	Lote
Compuesto 2	Kg	70,0
HPMCAS	Kg	17,1
SLS	Kg	0.438
<b>Sólidos totales</b>	<b>Kg</b>	<b>87,5</b>
MEK	Kg	671
Agua	Kg	74,6
<b>Disolventes totales</b>	<b>Kg</b>	<b>746</b>
<b>Peso total de la solución de pulverización</b>	<b>Kg</b>	<b>833</b>

La temperatura de la mezcla se ajustó a un intervalo de 20-45 °C y se mezcló hasta que fue sustancialmente homogénea y todos los componentes se disolvieron sustancialmente.

5 En el modo normal de secado por pulverización, se usó un secador por pulverización, el secador por pulverización comercial Niro PSD4, equipado con una boquilla de presión (Serie SK-MFP de Spray Systems Maximum Passage ) equipado con una tapa antideslumbramiento, siguiendo los parámetros del proceso de pulverización mencionados en la Tabla 6, a continuación.

**Tabla 6:** Parámetros del proceso de secado por pulverización utilizados para generar el Intermedio F.

Parámetro	Valor
Presión de alimentación	20 bar
Caudal de la alimentación	92-100 Kg/h
Temperatura de entrada	93 – 99 °C
Temperatura de salida	53 – 57 °C
Temperatura del secador de vacío	80 °C durante 2 horas, después 110 °C (+/- 5 ° C)
Tiempo de secado al vacío	20-24 horas

10 Un ciclón de alta eficiencia separó el producto húmedo del gas de pulverización y los vapores de disolventes. El producto húmedo contenía 8,5-9,7 % de MEK y 0,56-0,83 % de agua y tenía un tamaño de partícula medio de 17-19 um y una densidad aparente de 0,27-0,33 g/cc. El producto húmedo se transfirió a un secador de vacío de doble cono de acero inoxidable 4000L para secar y reducir los disolventes residuales a un nivel de menos de aproximadamente 5.000 ppm y generar una dispersión seca por pulverización del Compuesto 2 amorfo, que  
15 contiene <0,03 % de MEK y 0, 3 % de agua.

**Formación de comprimidos a partir de un proceso de granulación en húmedo completamente continuo**

20 *Equipo/Proceso*

*Equipo*

Desarrollo completamente continuo y equipo de lanzamiento (DLR) o equipo similar.

25 *Detección selectiva*

30 Forma I del Compuesto 1, la dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y los excipientes se pueden dispensar en recipientes de contenedores intermedios separados (IBC). Estos materiales se pueden cribar utilizando una operación de cribado "de un contenedor a otro". Los tamaños de criba apropiados son malla 20, malla 40 o malla 60.

*Mezclado*

35 Los IBC que contienen la Forma I del Compuesto 1 tamizado, la dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y los excipientes se pueden acoplar al sistema de alimentación, que puede alimentar los materiales de manera controlada, por ejemplo. usando una pérdida volumétrica o gravimétrica en alimentadores de peso, en un mezclador continuo. Las velocidades de alimentación de los componentes individuales se definen por la composición de la formulación y la velocidad de línea general. La velocidad máxima puede ser de 8 kg/h a 30 kg/h.  
40 El mezclador continuo puede tener diferentes configuraciones de cuchillas para permitir una mezcla adecuada y la velocidad de rotación de estas cuchillas puede estar entre 80 RPM y 300 RPM.

*Granulación en húmedo*

45 Se puede preparar una solución de granulación disolviendo 48 g de laurilsulfato de sodio y 159 g de polivinilpirrolidona en 1.626 g de agua en un recipiente de acero inoxidable, utilizando un agitador superior con una velocidad de agitación de 700 RPM. La solución de granulación se puede colocar en un recipiente desde el cual se puede bombear la solución al granulador de doble tornillo utilizando una bomba peristáltica con un medidor de flujo de masa y control, utilizando un índice de flujo que sea apropiado para el proceso. La mezcla se puede granular  
50 utilizando un granulador de doble tornillo como granulador que forma parte del DLR. La mezcla se puede añadir al granulador de doble tornillo utilizando un alimentador de pérdida de peso, tal como el alimentador K-Tron en el DLR, con una velocidad de alimentación de 8 kg/h a 24 kg/h. El granulador de doble tornillo se puede manejar con una temperatura de barril de 25 grados centígrados y una velocidad de tornillo de 200 a 950 RPM. El proceso de granulación se puede realizar durante tres minutos para lotes pequeños o varias horas para lotes grandes.

*Secado*

- 5 Los gránulos húmedos se pueden alimentar directamente a un secador de lecho fluido, tal como el secador de lecho fluido segmentado en el DLR. El punto final de secado se puede elegir a una temperatura del producto durante la descarga que oscile entre 40 y 55 grados Celsius, momento en el que el contenido de agua de los gránulos puede ser del 2,1 % p/p ("pérdida por desecación, LOD") o menos. El tiempo de secado puede ser de 12 minutos, o más corto o más largo, para alcanzar el punto final de secado deseado.

*Molienda*

- 10 Los gránulos secos se pueden moler para reducir el tamaño de los gránulos. Para esto se puede usar un molino de cono como el Quadro U10 CoMil integrado.

*Mezclado*

- 15 Los gránulos se pueden mezclar con excipientes extra granulares, tales como cargas y lubricantes, utilizando una pérdida de peso y un mezclador continuo. La velocidad de fusión puede ser 80-300 RPM.

*Compresión*

- 20 La mezcla de compresión se puede prensar en comprimidos utilizando una sola estación o prensa de comprimidos rotativa, como la prensa Courtoy Modul P, que forma parte del sistema DLR, usando herramientas de tamaño apropiado. El peso de los comprimidos para una dosis de 200 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 125 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo puede ser de aproximadamente 500 o 600 mg.

- 25 *Recubrimiento de película*

Las comprimidos se pueden recubrir con película utilizando el innovador recubridor de película Omega, que forma parte del sistema DLR. Este recubridor permite el recubrimiento rápido de películas de sublotos de 1 a 4 kg para permitir la fabricación continua.

30

*Impresión*

Los comprimidos recubiertos con película pueden imprimirse con un monograma en una o ambas caras del comprimido, por ejemplo, con una impresora de rampa Ackley.

35

**Formación de comprimidos a partir del proceso de granulación en húmedo de tornillo doble**

*Equipo/Proceso*

- 40 *Equipo*

Granuladores en húmedo de doble tornillo: ConsiGma-1, ConsiGma-25 o Leistritz nano.

*Cribado/Pesaje*

45

La Forma I del Compuesto 1, la dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y los excipientes se pueden cribar antes o después del pesaje. Los tamaños de criba apropiados son malla 20, malla 40 o malla 60. La Forma I del Compuesto 1 y/o la dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo puede premezclarse con uno o más de los excipientes para simplificar el cribado.

50

*Mezclado*

La Forma I del Compuesto 1, la dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo y los excipientes se pueden añadir al mezclador en un orden diferente. La mezcla se puede realizar en un mezclador Turbula, un mezclador en V o un mezclador de tipo contenedor. Los componentes se pueden mezclar durante 10 minutos.

55

*Granulación en húmedo*

- 60 Se puede preparar una solución de granulación disolviendo 48 g de laurilsulfato de sodio y 159 g de polivinilpirrolidona en 1.626 g de agua en un recipiente de acero inoxidable, utilizando un agitador superior con una velocidad de agitación de 700 RPM. La mezcla se puede granular utilizando un granulador de doble tornillo como el ConsiGma-1. La solución de granulación se puede añadir al granulador de doble tornillo con una bomba peristáltica, tal como la bomba en el ConsiGma-1, con una velocidad de alimentación de 67 g/min. La mezcla se puede añadir al granulador de doble tornillo utilizando un alimentador de pérdida de peso, como el alimentador Brabender en el ConsiGma-1, con una velocidad de alimentación de 10 kg/h. El granulador de doble tornillo se puede accionar con
- 65

una temperatura de barril de 25 grados centígrados y una velocidad de tornillo de 400 RPM. El proceso de granulación se puede realizar durante cuatro minutos. El proceso de granulación se puede realizar durante un tiempo más corto o más largo para producir una cantidad mayor o menor de gránulos húmedos.

5 *Secado*

Los gránulos húmedos se pueden alimentar directamente a un secador de lecho fluido, como la cámara de secado en el ConsiGma-1 o el secador de lecho fluido segmentado en el CTL-25. El punto final de secado se puede elegir a una temperatura del producto de 43 grados centígrados, momento en el que el contenido de agua de los gránulos puede ser del 1,6 % p/p ("Pérdida por desecación, LOD"). El tiempo de secado puede ser de 12 minutos, o más corto o más largo, para alcanzar el punto final de secado deseado. El secado se puede realizar con un flujo de aire de 59 m<sup>3</sup>/min y una temperatura de entrada de 60 grados centígrados. Como alternativa, los gránulos húmedos provenientes del granulador de doble tornillo pueden recogerse en un contenedor o recipiente durante un cierto período de tiempo, después de lo cual los gránulos húmedos se transfieren a un secador de lecho fluido independiente, como el Vector Multi 15.

*Molienda*

Los gránulos secos se pueden moler para reducir el tamaño de los gránulos. Para esto se puede usar un molino de cono, como el Quadro 194 CoMil.

*Mezclado*

Los gránulos se pueden mezclar con excipientes extragranulares, tales como cargas y lubricantes, utilizando un mezclador en V o un mezclador de tipo contenedor. El tiempo de mezclado puede ser de 5, 3 o 1 minuto(s).

*Compresión*

La mezcla de compresión se puede prensar en comprimidos utilizando una sola estación o prensa de comprimidos rotativa, como la prensa Courtoy Modul P, usando herramientas de forma ovalada de 0,55 'x 0,33'. El peso de los comprimidos para una dosis de 200 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 125 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo puede ser de aproximadamente 500 o 600 mg.

*Recubrimiento de película*

Las comprimidos se pueden recubrir con película utilizando un recubridor de bandeja, como, por ejemplo, un recubridor Thomas Engineering Compu-Lab. Se puede añadir una cantidad mínima de cera de Carnauba para mejorar el aspecto del comprimido y la capacidad del proceso.

40 *Impresión*

Los comprimidos recubiertos con película pueden imprimirse con un monograma en una o ambas caras del comprimido, por ejemplo, con una impresora Hartnett Delta.

45 **Formación de comprimidos a partir del proceso de granulación en húmedo de tornillo doble**

*Equipo/Proceso*

*Equipo*

50 Granulador: Granulador de doble tornillo ConsiGma o Leistritz o Thermo Fisher.

*Cribado/Pesaje*

55 El compuesto 1 y los excipientes se pueden cribar antes o después del pesaje. Los tamaños del cribado posibles son malla 20, malla 40 o malla 60. El compuesto 1 se puede mezclar previamente con uno o más de los excipientes para simplificar el cribado.

*Mezclado*

60 El compuesto 1 y los excipientes se pueden añadir al mezclador en orden diferente. La mezcla se puede realizar en un mezclador Turbula, un mezclador en V, un mezclador de tipo contenedor o un mezclador continuo. Los componentes se pueden mezclar durante 10 minutos para mezcladores por lotes o continuamente para un mezclador continuo.

65 *Operación de granulación*

Fluido de granulación: se añaden SLS y aglutinante al agua purificada y se mezclan hasta que se disuelven. Una relación adecuada es 2,5 % en p/p de SLS y 10,0 % en p/p de PVP K30 en agua.

5 Granulación: la mezcla que contiene el Compuesto 1 y los excipientes se puede dosificar en el granulador de doble tornillo utilizando un alimentador de pérdida de peso a una velocidad de 10 kg/h. El fluido de granulación se puede añadir utilizando una bomba peristáltica a una velocidad de 3,5 kg/h. El granulador se puede ejecutar a una velocidad de 400 RPM. Una ventaja notable del presente proceso de granulación en húmedo de doble tornillo es el uso de un fluido de granulación que comprende un tensioactivo y el aglutinante para una mejor granulación a través de una mayor humectabilidad. En una realización, el tensioactivo es SLS. Otra ventaja notable es que debido a que el proceso es continuo y en cualquier momento solo se procesa una cantidad limitada de material, el proceso puede ser bien controlado y resulta en un producto de alta calidad.

10 *Molienda*

Los gránulos pueden reducirse de tamaño utilizando un molino de tamiz o un molino de cono, ya sea antes del secado o después del secado, o ambos.

15 *Secado*

Los gránulos se pueden secar utilizando un horno de vacío, un secador de bandejas, un secador bicónico o un secador de lecho fluido.

20 *Mezclado*

Los gránulos pueden mezclarse con excipientes extragranulares. Los gránulos se mezclaron utilizando un mezclador de tipo contenedor de 300 litros durante 60 revoluciones.

25 *Compresión*

La mezcla de compresión se ha prensado en comprimidos utilizando una prensa rotativa Courtoy Modul P

30 *Recubrimiento de película*

Las comprimidos se pueden recubrir con película utilizando un recubridor de bandeja, como, por ejemplo, un O'Hara Labcoat.

35 *Impresión*

Los comprimidos recubiertos con película pueden imprimirse con un monograma en una o ambas caras del comprimido, por ejemplo, con una impresora Hartnett Delta.

40 **ENSAYOS**

**PROTOCOLO 1**

45 **Ensayos para detectar y medir las propiedades de potenciación de compuestos de 50F508-CFTR**

Procedimientos ópticos del potencial de membrana para analizar las propiedades de modulación de  $\Delta F508$ -CFTR de los compuestos

50 El ensayo utiliza colorantes fluorescentes sensibles al voltaje para medir los cambios producidos en el potencial de membrana usando un lector de placas de fluorescencia (por ejemplo, FLIPR III, Molecular Devices, Inc.) como lectura del aumento de  $\Delta F508$ -CFTR funcional en células NIH 3T3. La fuerza impulsora de la respuesta es la creación de un gradiente de iones cloruro en combinación con la activación del canal mediante una sola etapa de adición de líquido tras haberse tratado previamente las células con compuestos y cargarlas posteriormente con un colorante sensible al voltaje.

55 Identificación de los compuestos potenciadores

60 Para identificar los potenciadores de  $\Delta F508$ -CFTR se desarrolló un formato de ensayo HTS de doble adición. Este ensayo de HTS utiliza colorantes fluorescentes sensibles al voltaje para medir los cambios producidos en el potencial de membrana en un FLIPR III como medida del aumento de la abertura y el cierre (conductancia) de  $\Delta F508$  CFTR en células NIH 3T3 de  $\Delta 508$  CFTR corregido por temperatura. La fuerza impulsora de la respuesta es el gradiente de iones  $Cl^-$  en combinación con la activación del canal con forskolina en una sola etapa de adición de líquido usando un lector de placas fluorescente tal como FLIPR III después de haber tratado previamente las células con compuestos potenciadores (o control de vehículo de DMSO) y cargarlas posteriormente con un colorante de redistribución.

*Soluciones*

Solución de baño N.º 1: (en mM) NaCl 160, KCl 4,5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, HEPES 10, pH 7,4 con NaOH.

- 5 Solución de baño sin cloruro: Las sales de cloruro en la Solución de baño n.º 1 (anteriormente) están sustituidas con sales de gluconato.

*Cultivo celular*

- 10 Para las mediciones ópticas del potencial de membrana, se usan fibroblastos NIH3T3 de ratón que expresan de forma estable ΔF508-CFTR. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10 %, 1 X NEAA, β-ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>. Para todos los ensayos ópticos, las células se sembraron a 20.000/pocillo en placas de 384 pocillos recubiertas con matrigel y se cultivaron durante 2 horas a 37 °C antes de cultivar a 27 °C durante 24 horas para el ensayo del potenciador. Para los ensayos de corrección, las células se cultivan a 27 °C o 37 °C con y sin compuestos durante 16-24 horas.

Ensayos electrofisiológicos para analizar las propiedades de modulación de ΔF508-CFTR de los compuestos

- 20 *Ensayo con cámara de Ussing*

Se realizaron experimentos en la cámara de Ussing en células epiteliales de las vías respiratorias polarizadas que expresaban ΔF508-CFTR para caracterizar adicionalmente los aumentadores o inductores de ΔF508-CFTR identificados en los ensayos ópticos. Los epitelios de las vías respiratorias sin FQ y con FQ se aislaron del tejido bronquial, se cultivaron como se ha descrito anteriormente (Galletta, L.J.V., Lantero, S., Gazzolo, A., Sacco, O., Romano, L., Rossi, G.A., & Zegarra-Moran, O. (1998) *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 34, 478–481), y se sembraron en filtros Costar® Snapwell™ recubiertos previamente con medios acondicionados con NIH3T3. Tras cuatro días, se retiraron los medios apicales y se cultivaron las células en una interfaz de aire-líquido durante > 14 días antes de su uso. Esto produjo una monocapa de células columnares completamente diferenciadas que eran ciliadas, rasgos que son característicos de los epitelios de las vías respiratorias. Se aislaron HBE sin FQ de no fumadores que no tenían ninguna enfermedad pulmonar conocida. Se aislaron los HBE de FQ de pacientes homocigotos para ΔF508.

Se montaron los HBE cultivados en insertos de cultivo celular Costar® Snapwell™ en una cámara de Ussing (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA) y se midieron la resistencia transepitelial y la corriente de cortocircuito en presencia de un gradiente de Cl<sup>-</sup> de basolateral a apical (I<sub>sc</sub>) usando un sistema de fijación de voltaje (Departamento de bioingeniería, Universidad de Iowa, IA). Brevemente, los HBE se examinaron en condiciones de registro de fijación de voltaje (V<sub>retención</sub> = 0 mV) a 37 °C. La solución basolateral contenía (en mM) NaCl 145, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,83, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,3, MgCl<sub>2</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 1,2, Glucosa 10, HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con NaOH) y la solución apical contenía (en mM) NaGluconato 145, MgCl<sub>2</sub> 1,2, CaCl<sub>2</sub> 1,2, glucosa 10, HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con NaOH).

- 40 *Identificación de los compuestos potenciadores*

El protocolo típico utilizaba un gradiente de concentración de Cl<sup>-</sup> de membrana basolateral a apical. Para establecer este gradiente, se usó solución Ringer normal en la membrana basolateral, mientras que el NaCl apical se sustituyó con gluconato sódico equimolar (ajustado a pH 7, 4 con NaOH), dando un gran gradiente de concentración de Cl<sup>-</sup> a través del epitelio. Se añadieron forskolina (10 μM) y todos los compuestos de ensayo en el lado apical de los insertos de cultivo celular. Se comparó la eficacia de los potenciadores de ΔF508-CFTR putativos con la del potenciador conocido, genisteína.

- 50 *Registros de fijación de voltaje*

La corriente total de Cl<sup>-</sup> en células ΔF508–NIH3T3 se monitorizó utilizando la configuración de registro de parches perforados como se ha descrito anteriormente (Rae, J., Cooper, K., Gates, P., & Watsky, M. (1991) *J. Neurosci. Methods* 37, 15–26). Los registros de fijación de voltaje se realizaron a 22 °C con un amplificador de fijación de voltaje Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). La solución de la pipeta contenía (en mM) N–metil–D–glucamina (NMDG)–Cl 150, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, EGTA 10, HEPES 10 y 240 μg/ml de anfotericina – B (pH ajustado a 7,35 con HCl). El medio extracelular contenía (en mM) NMDG–Cl 150, MgCl<sub>2</sub> 2, CaCl<sub>2</sub> 2, HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con HCl). La generación de pulsos, la adquisición de datos y el análisis se realizaron usando un PC dotado de un interfaz A/D Digidata 1320 en combinación con Clampex 8 (Axon Instruments Inc.). Para activar ΔF508-CFTR, se añadieron forskolina 10 μM y genisteína 20 μM al baño y se monitorizó la relación entre la corriente y el voltaje cada 30 segundos.

*Identificación de los compuestos potenciadores*

- 65 También se investigó la capacidad de los potenciadores de ΔF508-CFTR para aumentar la corriente macroscópica de Cl<sup>-</sup> de ΔF508-CFTR (IΔF508) en células NIH3T3 que expresaban de manera estable ΔF508-CFTR usando

técnicas de registro de fijación de voltaje. Los potenciadores identificados de los ensayos ópticos evocaron un aumento dependiente de la dosis de  $\Delta F_{508}$  con una potencia y una eficacia similares a las observadas en los ensayos ópticos. En todas las células examinadas, el potencial de inversión antes y durante la aplicación de los potenciadores fue de aproximadamente -30 mV, que es el  $E_{Cl}$  calculado (-28 mV).

5

#### *Cultivo celular*

Para los registros de células enteras, se usan fibroblastos NIH3T3 de ratón que expresan de forma estable  $\Delta F_{508}$ -CFTR. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad en medio de Eagle modificado por Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10 %, 1 X NEAA,  $\beta$ -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>. Para los registros de células enteras, se sembraron 2.500-5.000 células sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos de poli-L-lisina y se cultivaron durante 24-48 horas a 27 °C antes de usarlas para analizar la actividad de los potenciadores; y se incubaron con o sin el compuesto de corrección a 37 °C para medir la actividad de los correctores.

15

#### *Registros de un solo canal*

Se observó la actividad de apertura y cierre de CFTR de tipo natural y  $\Delta F_{508}$ -CFTR corregido por temperatura en células NIH3T3 usando registros de fijación en membrana escindida de dentro hacia fuera según lo descrito previamente (Dalemans, W., Barbry, P., Champigny, G., Jallat, S., Dott, K., Dreyer, D., Crystal, R.G., Pavirani, A., Lecocq, J-P., Lazdunski, M. (1991) Nature 354, 526 – 528) usando un amplificador de fijación de voltaje Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.). La pipeta contenía (en mM): NMDG 150, ácido aspártico 150, CaCl<sub>2</sub> 5, MgCl<sub>2</sub> 2 y HEPES 10 (pH ajustado a 7,35 con base Tris). El baño contenía (en mM): NMDG-Cl 150, MgCl<sub>2</sub> 2, EGTA 5, TES 10 y base Tris 14 (pH ajustado a 7,35 con HCl). Tras la escisión, se activaron tanto el CFTR de tipo natural como el  $\Delta F_{508}$ -CFTR mediante la adición de Mg-ATP 1 mM, 75 nM de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA; Promega Corp. Madison, WI) y NaF 10 mM para inhibir las proteínas fosfatasa, lo que evitó la reducción de la corriente. Se mantuvo el potencial de la pipeta a 80 mV. Se analizó la actividad de los 5 canales de las fijaciones de membrana que contenían  $\geq 2$  canales activos. El número máximo de aberturas simultáneas determinó el número de canales activos durante un experimento. Para determinar la amplitud de la corriente de un solo canal, se filtraron "fuera de línea" los datos registrados de 120 s de actividad de  $\Delta F_{508}$ -CFTR a 100 Hz y luego se usaron para crear histogramas de amplitud con todos los puntos que se ajustaron con funciones multigaussianas usando el programa informático de análisis Bio-Patch Analysis (Bio-Logic Comp. Francia). Se determinaron la corriente microscópica total y la probabilidad de apertura ( $P_0$ ) de 120 segundos de actividad de los canales. La  $P_0$  se determinó usando el software Bio-Patch o a partir de la relación  $P_0 = I/i (N)$ , en la que  $I$  = corriente media;  $i$  = amplitud de la corriente de un solo canal; y  $N$  = número de canales activos de la fijación.

20

25

30

35

#### *Cultivo celular*

Los fibroblastos NIH3T3 de ratón que expresan establemente  $\Delta F_{508}$ -CFTR se utilizan para los registros de fijación de voltaje en membrana escindida. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10 %, 1 X NEAA,  $\beta$ -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>. Para registros de un solo canal, se sembraron 2.500-5.000 células en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24-48 horas a 27 °C antes de su uso.

40

45

## **PROTOCOLO 2**

### **Ensayos para detectar y medir las propiedades de corrección de $\Delta F_{508}$ -CFTR de los compuestos**

Procedimientos ópticos del potencial de membrana para analizar las propiedades de modulación de  $\Delta F_{508}$ -CFTR de los compuestos

50

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

55

60

Estos ensayos sensibles al voltaje están basados en el cambio en la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre el colorante sensible al voltaje soluble en la membrana DiSBAC<sub>2</sub> (3) y un fosfolípido fluorescente, CC2-DMPE, que se une a la lámina externa de la membrana plasmática y actúa como donante de FRET. Los cambios en el potencial de membrana ( $V_m$ ) hacen que el DiSBAC+ (3) cargado negativamente se redistribuya a través de la membrana plasmática y que, por consiguiente, la cantidad de transferencia de energía del CC2-DMPE cambie. Los cambios en la emisión de fluorescencia se pueden controlar usando VIPR™ II, que es un

65

manipulador de líquidos y detector fluorescente integrado diseñado para realizar exploraciones basadas en células en placas de microtitulación de 96 o 384 pocillos.

Identificación de los compuestos de corrección

5 Para identificar moléculas pequeñas que corrigen el defecto de tráfico asociado con  $\Delta F508$ -CFTR se desarrolló un formato de ensayo HTS de adición única. Las células se incubaron en medio sin suero durante 16 horas a 37 °C en presencia o ausencia (control negativo) del compuesto de ensayo. Como control positivo, las células sembradas en placas de 384 pocillos se incubaron durante 16 horas a 27 °C para "corregir por temperatura" el  $\Delta F508$ -CFTR. 10 Posteriormente, las células se aclararon 3X con solución de Krebs Ringers y se cargaron con los tintes sensibles al voltaje. Para activar  $\Delta F508$ -CFTR se añadieron a cada pocillo forskolina 10  $\mu M$  y el potenciador del CFTR (20  $\mu M$ ) junto con medio sin  $Cl^-$ . La adición de medio libre de  $Cl^-$  promovió el flujo de salida de  $Cl^-$  en respuesta a la activación de  $\Delta F508$ -CFTR y la despolarización de la membrana resultante se monitorizó ópticamente utilizando los colorantes sensores de voltaje basados en FRET.

Identificación de los compuestos potenciadores

15 Para identificar los potenciadores de  $\Delta F508$ -CFTR se desarrolló un formato de ensayo HTS de doble adición. Durante la primera adición, se añadió a cada pocillo un medio libre de  $Cl^-$  con o sin compuesto de prueba. Después de 22 segundos, se añadió una segunda adición de medio libre de  $Cl^-$  que contiene 2-10  $\mu M$  de forskolina para activar  $\Delta F508$ -CFTR. La concentración extracelular de  $Cl^-$  después de ambas adiciones fue de 28 mM, lo que promovió el flujo de salida de  $Cl^-$  en respuesta a la activación de  $\Delta F508$ -CFTR y la despolarización de la membrana resultante se controló ópticamente utilizando colorantes sensores de voltaje basados en FRET.

25 Soluciones

Solución del baño N.º 1:	(en mM) NaCl 160, KCl 4,5, CaCl <sub>2</sub> 2, MgCl <sub>2</sub> 1, HEPES 10, pH 7,4 con NaOH.
Solución del baño sin cloruro:	Las sales de cloruro en la Solución de baño n.º 1 (anteriormente) están sustituidas con sales de gluconato.
CC2-DMPE:	Preparado como una solución madre 10 mM en DMSO y almacenado a -20 °C.
DiSBAC <sub>2</sub> (3):	Preparado como una reserva de 10 mM en DMSO y almacenado a -20 °C.

Cultivo celular

30 Para las mediciones ópticas del potencial de membrana, se usan fibroblastos NIH3T3 de ratón que expresan de forma estable  $\Delta F508$ -CFTR. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de CO<sub>2</sub> y 90 % de humedad en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10 %, 1 X NEAA,  $\beta$ -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>. Para todos los ensayos ópticos, las células se sembraron a 30.000/pocillo en placas recubiertas con matrigel de 384 pocillos y se cultivaron durante 2 horas a 37 35 °C antes de cultivar a 27 °C durante 24 horas para el ensayo del potenciador. Para los ensayos de corrección, las células se cultivan a 27 °C o 37 °C con y sin compuestos durante 16-24 horas.

**Ensayos electrofisiológicos para analizar las propiedades de modulación de  $\Delta F508$ -CFTR de los compuestos**

40 Ensayo con cámara de Ussing

Se realizaron experimentos en la cámara de Ussing en células epiteliales de las vías respiratorias polarizadas que expresaban  $\Delta F508$ -CFTR para caracterizar adicionalmente los aumentadores o inductores de  $\Delta F508$ -CFTR 45 identificados en los ensayos ópticos. Las células epiteliales FRT <sup>$\Delta F508$ -CFTR</sup> cultivadas en insertos de cultivo de células Costar Snapwell se montaron en una cámara de Ussing (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA) y las monocapas se sometieron a cortocircuitos continuamente utilizando un sistema de fijación del voltaje (Departamento de Bioingeniería, Universidad de Iowa, IA, y, Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA). La resistencia transepitelial se midió aplicando un pulso de 2 mV. En estas condiciones, los epitelios FRT demostraron resistencias de 4 K $\Omega$ /cm<sup>2</sup> o más. Las soluciones se mantuvieron a 27 °C y se introdujeron burbujas de aire. El potencial de compensación del electrodo y la resistencia del fluido se corrigieron utilizando un inserto libre de células. En estas 50 condiciones, la corriente refleja el flujo de  $Cl^-$  a través de  $\Delta F508$ -CFTR expresado en la membrana apical. El I<sub>SC</sub> se adquirió digitalmente utilizando una interfaz MP100A-CE y el software AcqKnowledge (v3,2.6; BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA).

Identificación de los compuestos de corrección

- El protocolo típico utilizaba un gradiente de concentración de Cl<sup>-</sup> de membrana basolateral a apical. Para establecer este gradiente, se usó solución Ringer normal en la membrana basolateral, mientras que el NaCl apical se substituyó con gluconato sódico equimolar (ajustado a pH 7, 4 con NaOH), dando un gran gradiente de concentración de Cl<sup>-</sup> a través del epitelio. Todos los experimentos se realizaron con monocapas intactas. Para activar completamente  $\Delta F508$ -CFTR, se aplicó forskolina (10  $\mu M$ ) y el inhibidor de la PDE, IBMX (100  $\mu M$ ), seguido de la adición del potenciador de CFTR, genisteína (50  $\mu M$ ).
- Como se observó en otros tipos de células, la incubación a bajas temperaturas de las células FRT que expresan establemente  $\Delta F508$ -CFTR aumenta la densidad funcional de CFTR en la membrana plasmática. Para determinar la actividad de los compuestos de corrección, las células se incubaron con 10  $\mu M$  del compuesto de prueba durante 24 horas a 37 °C y posteriormente se lavaron 3X antes de registrarlas. El  $I_{SC}$  mediado por cAMP y genisteína en células tratadas con compuesto se normalizó a los controles de 27 °C y 37 °C y se expresó como EL porcentaje de actividad. La preincubación de las células con el compuesto de corrección aumentó significativamente el  $I_{SC}$  mediado por cAMP y genisteína en comparación con los controles a 37 °C.

Identificación de los compuestos potenciadores

- El protocolo típico utilizaba un gradiente de concentración de Cl<sup>-</sup> de membrana basolateral a apical. Para establecer este gradiente, se usó solución Ringer normal en la membrana basolateral y se permeabilizó con nistatina (360  $\mu g/ml$ ), mientras que el NaCl apical se substituyó con gluconato sódico equimolar (ajustado a pH 7, 4 con NaOH), dando un gran gradiente de concentración de Cl<sup>-</sup> a través del epitelio. Todos los experimentos se realizaron 30 minutos después de la permeabilización con nistatina. La forskolina (10  $\mu M$ ) y todos los compuestos de prueba se añadieron a ambos lados de los insertos de cultivo celular. Se comparó la eficacia de los potenciadores de  $\Delta F508$ -CFTR putativos con la del potenciador conocido, genisteína.

Soluciones

Solución basolateral (en mM): NaCl (135), CaCl<sub>2</sub> (1,2), MgCl<sub>2</sub> (1,2), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,4), KHPO<sub>4</sub> (0,6), ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES) (10) y dextrosa (10). La solución se valoró a pH 7,4 con NaOH.

Solución apical (en mM): Igual que la solución basolateral con NaCl reemplazado con Na Gluconato (135).

Cultivo celular

- Se usaron células epiteliales de rata Fisher (FRT) que expresaban  $\Delta F508$ -CFTR (FRT <sup>$\Delta F508$ -CFTR</sup>) para los experimentos en cámara de Ussing para los supuestos aumentadores o inductores de  $\Delta F508$ -CFTR identificados a partir de los ensayos ópticos de los inventores. Las células se cultivaron en insertos de cultivo de células Costar Snapwell y se cultivaron durante cinco días a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> en medio F-12 de Ham modificado con Coon suplementado con 5 % de suero de ternera fetal, 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu g/ml$  de estreptomina. Antes del uso para caracterizar la actividad potenciadora de los compuestos, las células se incubaron a 27 °C durante 16-48 horas para corregir el  $\Delta F508$ -CFTR. Para determinar la actividad de los compuestos de corrección, las células se incubaron a 27 °C o 37 °C con y sin los compuestos durante 24 horas.

Registros de células enteras

- Se controló la corriente macroscópica de  $\Delta F508$ -CFTR ( $I_{\Delta F508}$ ) en células NIH3T3 corregidas por temperatura y por compuesto de prueba que expresaba  $\Delta F508$ -CFTR utilizando el registro de células completas con fijación del voltaje. En resumen, los registros de fijación de voltaje de  $I_{\Delta F508}$  se realizaron a temperatura ambiente utilizando un amplificador de fijación de voltaje Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). Todos los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y filtrado de paso bajo a 1 kHz. Las pipetas tenían una resistencia de 5 a 6 M $\Omega$  cuando se cargaron con la solución intracelular. En estas condiciones de registro, el potencial de inversión calculado para Cl<sup>-</sup> ( $E_{Cl}$ ) a temperatura ambiente fue de -28 mV. Todos los registros tenían una resistencia al sellado > 20 G $\Omega$  y una resistencia en serie < 15 M $\Omega$ . La generación de pulsos, la adquisición de datos y el análisis se realizaron usando un PC dotado de un interfaz A/D Digidata 1320 en combinación con Clampex 8 (Axon Instruments Inc.). El baño contenía < 250  $\mu l$  de solución salina y se perfundió continuamente a una velocidad de 2 ml/min utilizando un sistema de perfusión impulsado por gravedad.

Identificación de los compuestos de corrección

Para determinar la actividad de los compuestos de corrección para aumentar la densidad del  $\Delta F508$ -CFTR funcional en la membrana plasmática, los inventores usaron las técnicas de registro de fijación del voltaje en microáreas

perforadas descritas anteriormente para medir la densidad de corriente tras el tratamiento durante 24 horas con los compuestos de corrección. Para activar completamente  $\Delta F508$ -CFTR, se añadieron a las células forskolina 10  $\mu\text{M}$  y genisteína 20  $\mu\text{M}$ . En las condiciones de registro de los inventores, la densidad de la corriente tras una incubación de 24 horas a 27 °C fue superior que la observada tras una incubación de 24 horas a 37 °C. Estos resultados son consistentes con los efectos conocidos de la incubación de baja temperatura sobre la densidad de  $\Delta F508$ -CFTR en la membrana plasmática. Para determinar los efectos de los compuestos de corrección sobre la densidad de la corriente del CFTR, las células se incubaron con 10  $\mu\text{M}$  del compuesto de ensayo durante 24 horas a 37 °C y se comparó la densidad de la corriente con los controles a 27 °C y a 37 °C (% de actividad). Antes del registro, las células se lavaron 3X con medio de registro extracelular para eliminar todo compuesto de ensayo restante. La preincubación con 10  $\mu\text{M}$  de los compuestos de corrección aumentó significativamente la corriente dependiente de AMPc y genisteína en comparación con los controles a 37 °C.

#### Identificación de los compuestos potenciadores

También se investigó la capacidad de los potenciadores de  $\Delta F508$ -CFTR para aumentar la corriente macroscópica de Cl<sup>-</sup> de  $\Delta F508$ -CFTR ( $I_{\Delta F508}$ ) en células NIH3T3 que expresaban de manera estable  $\Delta F508$ -CFTR usando técnicas de registro de fijación de voltaje. Los potenciadores identificados de los ensayos ópticos evocaron un aumento dependiente de la dosis de  $I_{\Delta F508}$  con una potencia y una eficacia similares a las observadas en los ensayos ópticos. En todas las células examinadas, el potencial de inversión antes y durante la aplicación de los potenciadores fue de aproximadamente -30 mV, que es el  $E_{Cl}$  calculado (-28 mV).

#### Soluciones

Solución intracelular (en mM): Cs-aspartato (90), CsCl (50),  $\text{MgCl}_2$  (1), HEPES (10) y 240  $\mu\text{g/ml}$  de anfotericina-B (pH ajustado a 7,35 con CsOH).

Solución extracelular (en mM): N-metil-D-glucamina (NMDG)-Cl (150),  $\text{MgCl}_2$  (2),  $\text{CaCl}_2$  (2), HEPES (10) (pH ajustado a 7,35 con HCl).

#### 25 Cultivo celular

Para los registros de células enteras, se usan fibroblastos NIH3T3 de ratón que expresan de forma estable  $\Delta F508$ -CFTR. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de  $\text{CO}_2$  y 90 % de humedad en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10 %, 1 X NEAA,  $\beta$ -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175  $\text{cm}^2$ . Para los registros de células enteras, se sembraron 2.500-5.000 células sobre cubreobjetos de vidrio recubiertos de poli-L-lisina y se cultivaron durante 24-48 horas a 27 °C antes de usarlas para analizar la actividad de los potenciadores; y se incubaron con o sin el compuesto de corrección a 37 °C para medir la actividad de los correctores.

#### 35 Registros de un solo canal

Las actividades de un solo canal de  $\Delta F508$ -CFTR corregido por temperatura expresadas de forma estable en células NIH3T3 y las actividades de los compuestos potenciadores se observaron utilizando un parche de membrana extirpado de dentro hacia afuera. Brevemente, los registros de la fijación de voltaje de la actividad de un solo canal se realizaron a temperatura ambiente con un amplificador de fijación de voltaje Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.). Todos los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y filtrado de paso bajo a 400 Hz. Las pipetas de parche se fabricaron con vidrio Corning Kovar Sealing # 7052 (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) y tenían una resistencia de 5-8 M $\Omega$  cuando se cargaron con la solución extracelular. El  $\Delta F508$ -CFTR se activó después de la escisión, añadiendo Mg-ATP 1 mM y 75 nM de la proteína quinasa dependiente de AMPc, subunidad catalítica (PKA; Promega Corp. Madison, WI). Después de que la actividad del canal se estabilizó, el parche se utilizó de manera periférica utilizando un sistema de microperfusión impulsado por gravedad. El flujo de entrada se colocó adyacente al parche, lo que dio como resultado un intercambio completo de la solución en 1-2 segundos. Para mantener la actividad de  $\Delta F508$ -CFTR durante la perfusión rápida, se añadió el inhibidor de fosfatasa no específico F<sup>-</sup> (NaF 10 mM) a la solución del baño. En estas condiciones de registro, la actividad del canal se mantuvo constante durante el registro del parche (hasta 60 minutos). Las corrientes producidas por la carga positiva que se mueve desde las soluciones intracelulares a extracelulares (los aniones que se mueven en la dirección opuesta) se muestran como corrientes positivas. El potencial de pipeta ( $V_p$ ) se mantuvo a 80 mV.

Se analizó la actividad de los 5 canales de las fijaciones de membrana que contenían  $\geq 2$  canales activos. El número máximo de aberturas simultáneas determinó el número de canales activos durante un experimento. Para determinar la amplitud de la corriente de un solo canal, se filtraron "fuera de línea" los datos registrados de 120 s de actividad de  $\Delta F508$ -CFTR a 100 Hz y luego se usaron para crear histogramas de amplitud con todos los puntos que se ajustaron con funciones multigaussianas usando el programa informático de análisis Bio-Patch Analysis (Bio-Logic Comp. Francia). Se determinaron la corriente microscópica total y la probabilidad de apertura ( $P_0$ ) de 120 segundos de

actividad de los canales. La  $P_0$  se determinó usando el software Bio-Patch o a partir de la relación  $P_0 = I/i (N)$ , en la que  $I$  = corriente media;  $i$  = amplitud de la corriente de un solo canal; y  $N$  = número de canales activos de la fijación.

Soluciones

5

Solución extracelular (en mM): NMDG (150), ácido aspártico (150),  $CaCl_2$  (5),  $MgCl_2$  (2) y HEPES (10) (pH ajustado a 7,35 con base Tris).

Solución intracelular (en mM): NMDG-Cl (150),  $MgCl_2$  (2), EGTA (5), TES (10) y base Tris (14) (pH ajustado a 7,35 con HCl).

Cultivo celular

10 Los fibroblastos NIH3T3 de ratón que expresan establemente  $\Delta F508$ -CFTR se utilizan para los registros de fijación de voltaje en membrana escindida. Las células se mantienen a 37 °C en 5 % de  $CO_2$  y 90 % de humedad en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con glutamina 2 mM, suero bovino fetal al 10 %, 1 X NEAA,  $\beta$ -ME, 1 X pen/estrep y HEPES 25 mM en matraces de cultivo de 175 cm<sup>2</sup>. Para registros de un solo canal, se sembraron 2.500-5.000 células en cubreobjetos de vidrio recubiertos con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24-48 horas a 27 °C antes de su uso.

15

El Compuesto 1 y el Compuesto 2 de la invención son útiles como aumentadores o inductores de la actividad de CFTR. La Tabla 5 a continuación ilustra la  $CE_{50}$  y la eficacia relativa del Compuesto 1 y del Compuesto 2. En la Tabla 5 a continuación, se aplican los siguientes significados.  $CE_{50}$  "++++" significa <10 uM; "+++" significa entre 10 uM y 25 uM; "+" significa entre 25 uM y 60 uM. % de eficacia: "+" significa <25 %; "++" significa entre 25 % y 100 %; "++++" significa > 100 %.

20

Tabla 5.

N.º de comp.	$CE_{50}$ (uM)	% de actividad
1	+++	+++
2	+++	++

**OTRAS REALIZACIONES**

25

La discusión anterior desvela y describe realizaciones meramente de ejemplo de la invención, que se definen en las reivindicaciones adjuntas.

30

35

40

45

50

55

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

5 100 mg o 200 mg de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d] [1,3] dioxo1-5-il) ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico Forma I ( Compuesto 1) y  
 una dispersión sólida que comprende una N-(5-hidroxi-2,4-diterc-butilfenil)-4-oxo-1H-quinolina-3-carboxamida sustancialmente amorfa (Compuesto 2) y un polímero,  
 10 en la que el Compuesto 2 sustancialmente amorfo está presente en la composición farmacéutica en una cantidad de 125 mg,  
 en la que la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza por uno o más picos a 15,4, 16,3 y 14,5 grados en un patrón de difracción de rayos X en polvo, y  
 en la que el Compuesto 2 sustancialmente amorfo tiene menos del 15 % de cristalinidad.

15 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende además:

a. una carga;  
 b. un disgregante;  
 20 c. un tensioactivo; y  
 d. un aglutinante;

denominado **PC-I**.

3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, que comprende además:

25 e. un lubricante

denominado **PC-III**.

30 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la composición farmacéutica comprende además:

una carga que es celulosa microcristalina en una cantidad de 20 a 30 por ciento en peso,  
 un disgregante que es croscarmelosa sódica en una cantidad de 3 a 10 por ciento en peso,  
 un tensioactivo que es laurilsulfato de sodio en una cantidad de 0,5 a 2 por ciento en peso,  
 35 un aglutinante que es polivinilpirrolidona en una cantidad de 0 a 5 por ciento en peso, y  
 un lubricante que es estearato de magnesio, en una cantidad de 0,5 a 2 por ciento en peso.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende del 30 al 55 por ciento en peso de la Forma I del Compuesto 1 y del 10 al 45 por ciento en peso de una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

6. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, que comprende del 25 al 50 por ciento en peso de la Forma I del Compuesto 1 y del 15 al 35 por ciento en peso de una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

45 7. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende 200 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 125 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, que comprende 100 mg de la Forma I del Compuesto 1 y 125 mg del Compuesto 2 sustancialmente amorfo.

9. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, o 6-7, que tiene la siguiente formulación:

55

60

65

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	25-50
Una dispersión sólida que comprende Compuesto 2 sustancialmente amorfo.	15-35
Celulosa microcristalina	20-30
Croscarmelosa de sodio	3-10
Laurilsulfato sódico	0,5-2
Polivinilpirrolidona	0-5
Estearato de magnesio	0,5-2

denominado **PC-IV**.

5 10. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende además un colorante y una cera.

11. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la composición farmacéutica es una composición farmacéutica oral sólida.

10 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que la composición farmacéutica oral sólida es un gránulo.

13. El gránulo de la reivindicación 12 que tiene la siguiente formulación:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	43
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	34
Celulosa microcristalina	17
Croscarmelosa de sodio	2
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3

15

denominado **PC-V** o:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	38
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	40
Celulosa microcristalina	16
Croscarmelosa de sodio	2
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3

denominado **PC-VI**.

20

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que la composición farmacéutica oral sólida es un comprimido.

25

15. El comprimido de la reivindicación 14 que tiene la siguiente formulación:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	35
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	28
Celulosa microcristalina	26
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1

denominado **PC-VIII**, o:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	31
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	32
Celulosa microcristalina	26
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1

5 denominado **PC-IX**, o:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	41
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	22
Celulosa microcristalina	26
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1

denominado **PC-X**, o:

	mg
Forma I del Compuesto 1	200
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	156
Celulosa microcristalina	150
Croscarmelosa de sodio	34
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	15
Estearato de magnesio	6

10

denominado **PC-XI**, o:

ES 2 694 290 T3

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	34
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	27
Celulosa microcristalina	25
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1
Colorante	3

denominado **PC–XIV**, o:

	% en peso
Forma I del Compuesto 1	30
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	31
Celulosa microcristalina	25
Croscarmelosa de sodio	6
Laurilsulfato sódico	1
Polivinilpirrolidona	3
Estearato de magnesio	1
Colorante	3

5 denominado **PC–XV**, o:

	mg
Forma I del Compuesto 1	200
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	156
Celulosa microcristalina	150
Croscarmelosa de sodio	34
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	15
Estearato de magnesio	6
Colorante	17

denominado **PC–XVII**, o:

	mg
Forma I del Compuesto 1	200
Compuesto 2 sustancialmente amorfo	125
Celulosa microcristalina	150
Croscarmelosa de sodio	34
Laurilsulfato sódico	4
Polivinilpirrolidona	15
Estearato de magnesio	6
Colorante	17

denominado **PC–XVIII**, o:

Componente	mg/comprimido
Forma I del Compuesto 1	100
Dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo	156
Celulosa microcristalina	55
Croscarmelosa de sodio	7
Polivinilpirrolidona	11
Laurilsulfato sódico	3
Gránulos Totales	332
Croscarmelosa de sodio	18
Celulosa microcristalina	53
Estearato de magnesio	4
Comprimidos totales	407

5 denominado **PC–XXIII**.

16. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para su uso en un método para tratar, disminuir la gravedad o tratar sintomáticamente la fibrosis quística en un paciente, en el que el método comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 1.

10 17. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que la composición farmacéutica tiene una de las formulaciones dadas en la reivindicación 9, 13 o 15.

15 18. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el paciente tiene una mutación  $\Delta F508$  CFTR.

19. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el paciente es homocigoto en  $\Delta F508$ .

20 20. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en la que el paciente es heterocigoto en  $\Delta F508$ .

21. Un método para preparar un comprimido de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el método comprende:

25 a) granular en húmedo los siguientes componentes para producir un gránulo:

- a. la Forma I del Compuesto 1;
- b. una dispersión sólida que comprende el Compuesto 2 sustancialmente amorfo;
- c. una carga;
- d. un disgregante;
- e. un tensioactivo; y
- f. un aglutinante;

30

y

b) comprimir los siguientes componentes para producir un comprimido:

- 5           i. una pluralidad de gránulos de la etapa a);  
          ii) un disgregante;  
          iii) una carga; y  
          iv) un lubricante,

10          en la que la Forma I del Compuesto 1 se caracteriza por uno o más picos a 15,4, 16,3 y 14,5 grados en un patrón de difracción de rayos X en polvo, y en la que el Compuesto 2 sustancialmente amorfo tiene menos del 15 % de cristalinidad.

15          22. Un kit que comprende la composición farmacéutica de la reivindicación 1 y un agente terapéutico separado.

23. El kit de la reivindicación 22, en el que la composición farmacéutica y el agente terapéutico están en recipientes separados.

20          24. El kit de la reivindicación 23, en el que los recipientes son botellas, viales o envases de tipo blíster, o una combinación de los mismos.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

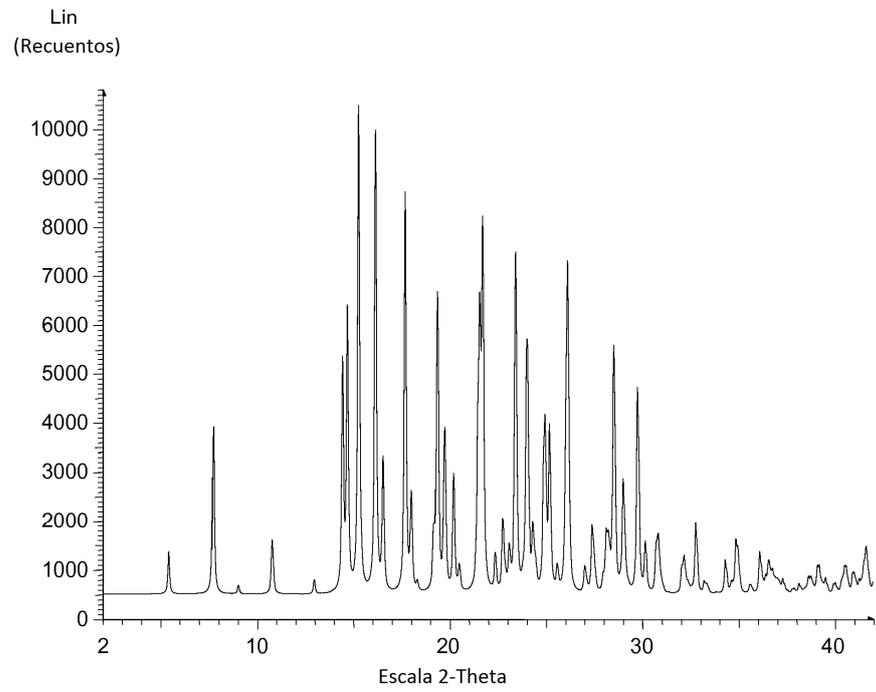


Figura 2

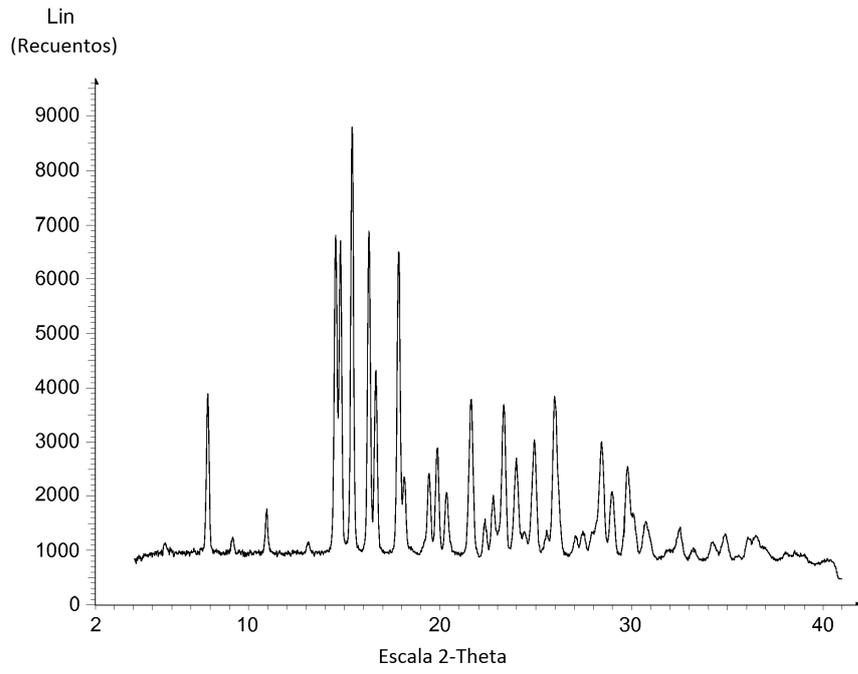


Figura 3

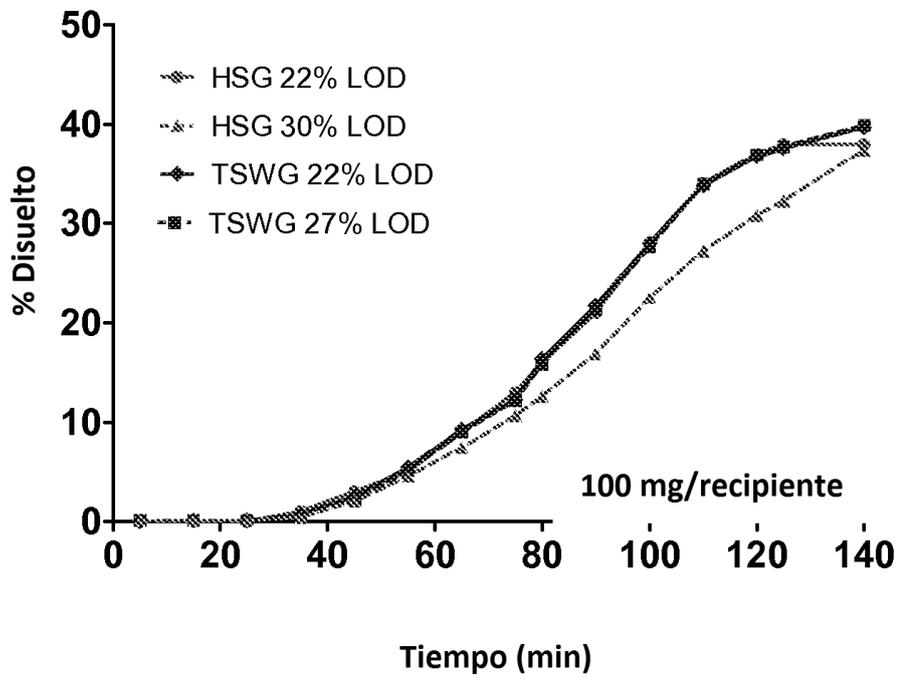


Figura 4

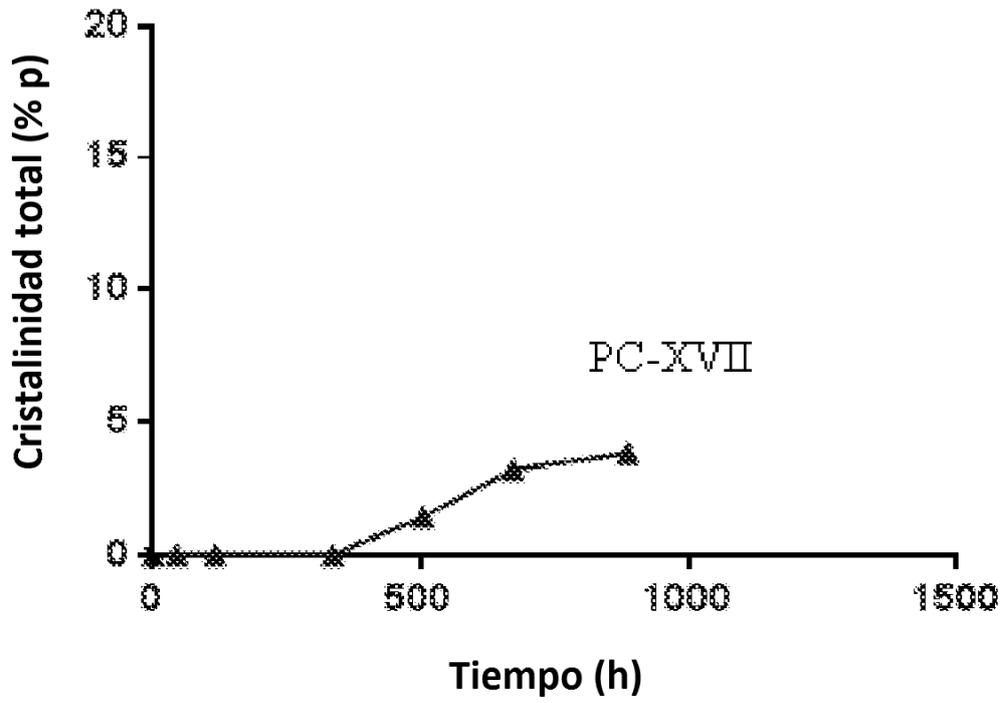


Figura 5

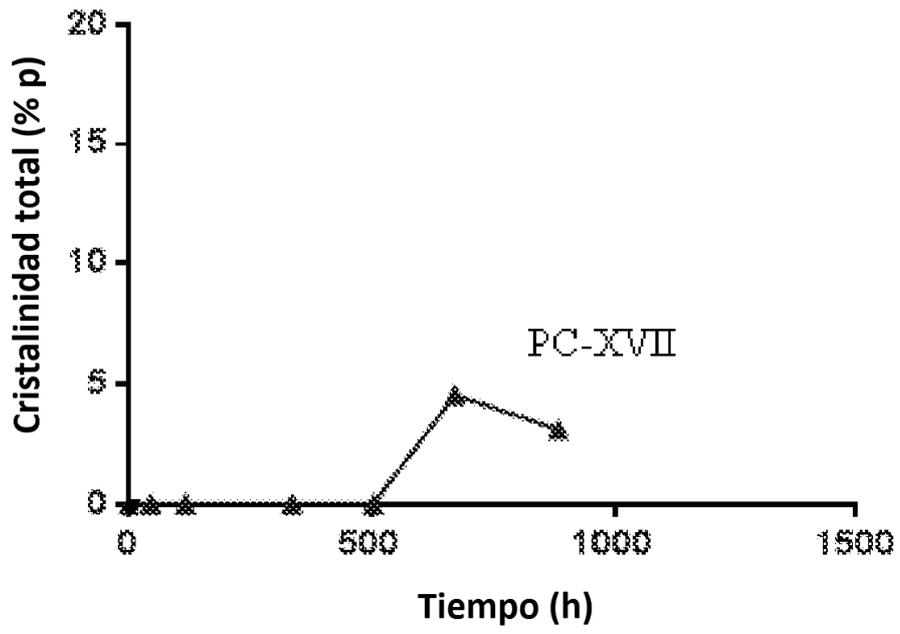


Figura 6

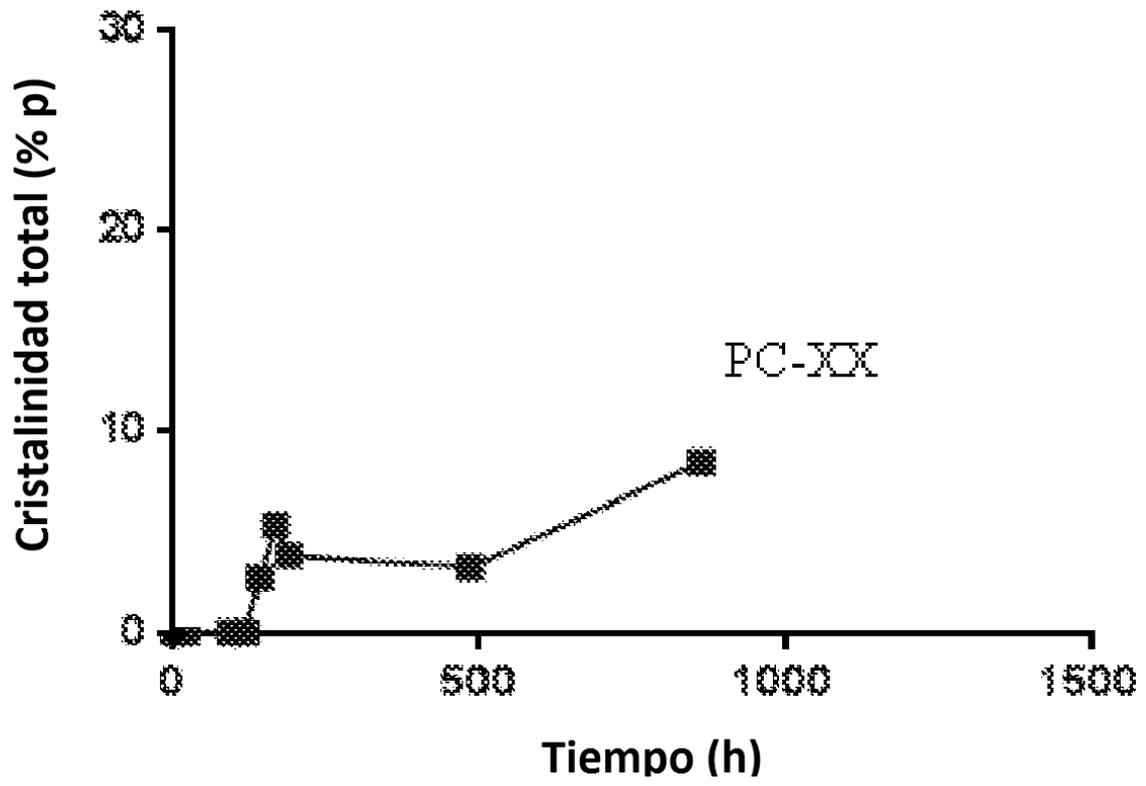


Figura 7

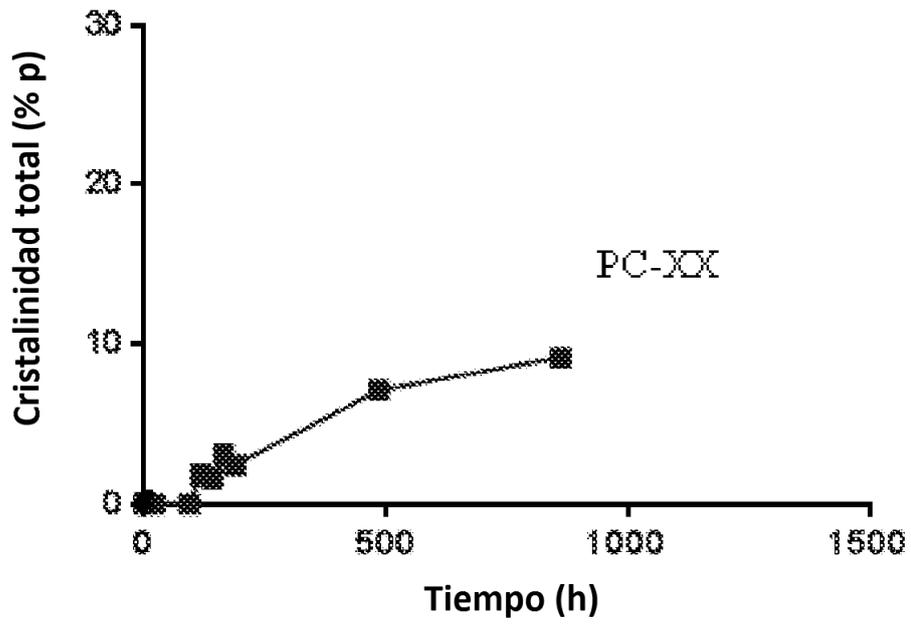


Figura 8

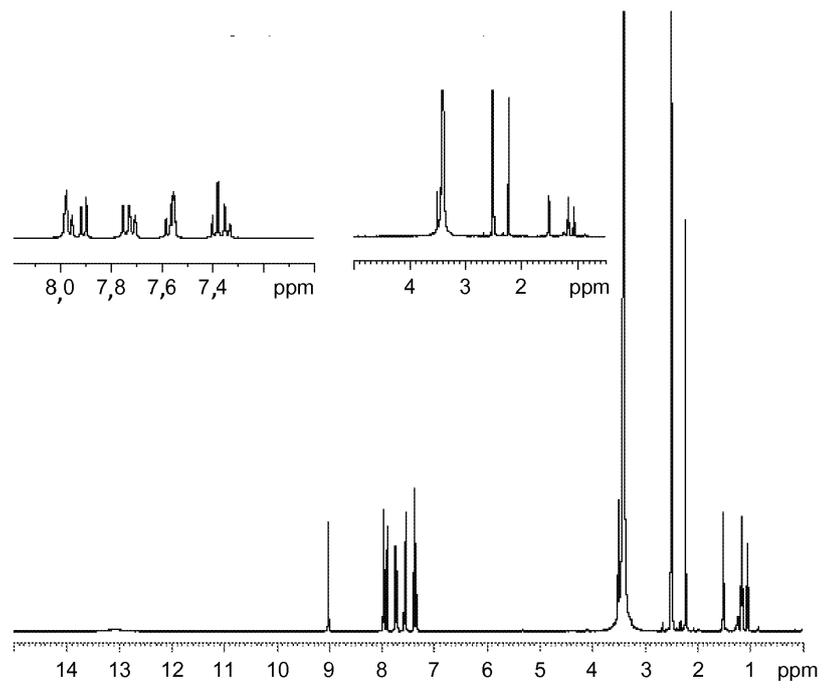


Figura 9

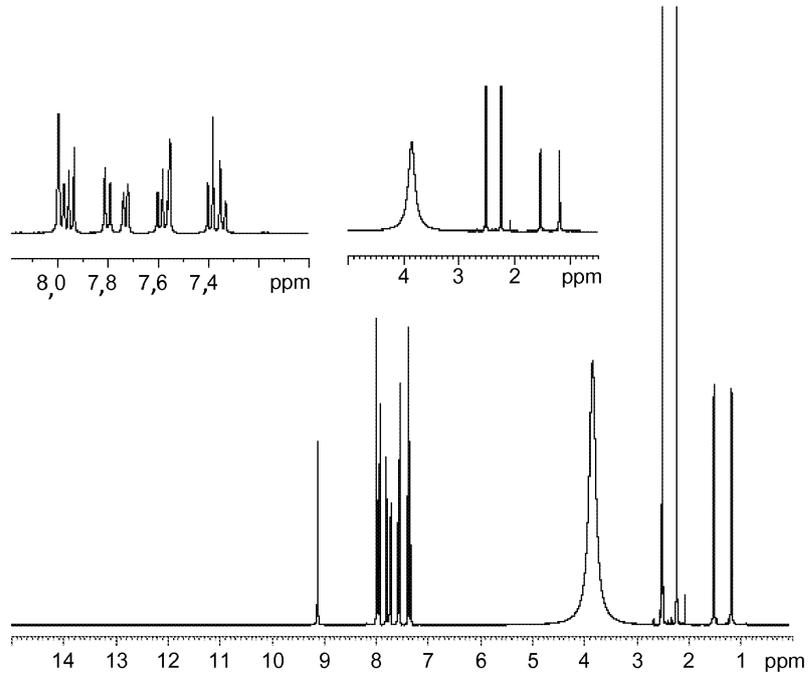


Figura 10

Flujo térmico (W/g)

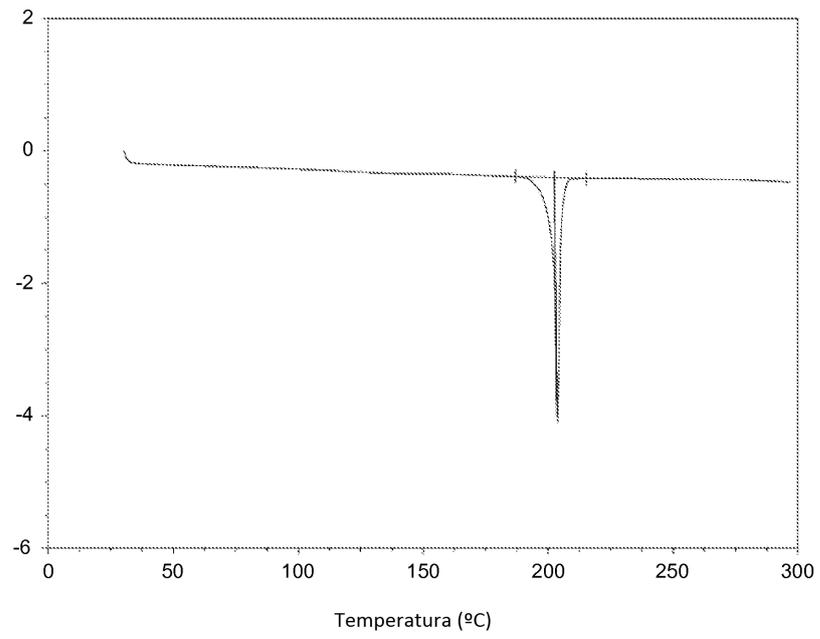


Figura 11

