

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 804 202**

(51) Int. Cl.:
C07D 405/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2011 E 17154840 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2020 EP 3181561**

(54) Título: **Producto intermedio sintético de Formula cristalina de (R)-1(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2il)-1h-indol-5il)ciclopropanocarboxamida**

(30) Prioridad:

**25.03.2010 US 317376 P
01.04.2010 US 319953 P
07.04.2010 US 321636 P
07.04.2010 US 321561 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.02.2021

(73) Titular/es:

**VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED (100.0%)
50 Northern Avenue Boston, MA 02210, US**

(72) Inventor/es:

**KESHAVARZ-SHOKRI, ALI;
ZHANG, BEILI;
ALCACIO, TIM EDWARD;
LEE, ELAINE CHUNGMIN;
ZHANG, YUEGANG;
KRAWIEC, MARIUSZ y
NUGENT, WILLIAM A.**

(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 2 804 202 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

Producto intermedio sintético de Formula cristalina de (R)-1(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2il)-1h-indol-5il)ciclopropanocarboxamida

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención, que se define en la reivindicación adjunta, se refiere a un producto intermedio que 10 puede usarse en la síntesis de (R)-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.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 RTFQ es un canal de aniones mediado por cAMP/ATP que se expresa en una variedad de tipos de células, incluyendo absorción y células epiteliales secretoras, donde se regula el flujo de aniones a través de la membrana, así como la actividad de otros canales de iones y proteínas. En las células epiteliales, el funcionamiento normal de la RTFQ es crítica para el mantenimiento de transporte de electrolitos en todo el cuerpo, incluyendo las vías respiratorias y el tejido digestivo. RTFQ se compone de aproximadamente 1480 aminoácidos que codifican una proteína compuesta de una repetición en tandem de dominios de transmembrana, cada uno con seis hélices de 20 transmembrana y un dominio de unión a nucleótidos. Los dos dominios de transmembrana están unidos por un (R)-dominio grande, polar, regulador con múltiples sitios de fosforilación que regulan la actividad del canal y el tráfico celular.

25 El gen que codifica RTFQ se ha identificado y secuenciado (véase Gregory, RJ et al (1990) Nature 347: 382-386; Rich, DP et al (1990) Nature 347: 358-362), (Riordan, JR et al (1989) Science 245: 1066-1073). Un defecto en este gen causa mutaciones en RTFQ que resultan en la fibrosis quística ("FQ"), la enfermedad genética fatal más común en seres humanos. La fibrosis quística afecta a aproximadamente uno de cada 2.500 recién nacidos en los Estados Unidos. Dentro de la población general de Estados Unidos, hasta 10 millones de personas llevan una sola copia del gen defectuoso sin efectos aparentes de enfermedad. Por el contrario, individuos con dos copias del gen 30 de la FQ asociada sufren los efectos debilitantes y mortales de la FQ, incluyendo la enfermedad pulmonar crónica.

35 En los pacientes con fibrosis quística, las mutaciones en RTFQ endógenamente expresada en el epitelio respiratorio producen reducción de la secreción de aniones apicales, causando un desequilibrio en el transporte de iones y fluidos. La disminución resultante en el transporte de aniones contribuye a mejorar la acumulación de moco en el pulmón y las infecciones microbianas acompañantes que en última instancia causan la muerte en pacientes con FQ. Además de las enfermedades respiratorias, los pacientes con FQ típicamente padecen problemas 40 gastrointestinales e insuficiencia pancreática que, si no se trata, da como resultado la muerte. Además, la mayoría de los hombres con fibrosis quística son infértils y la fertilidad disminuye en las mujeres con fibrosis quística. En contraste con los efectos graves de dos copias del gen de FQ asociada, los individuos con una sola copia del gen FQ asociado exhiben una mayor resistencia al cólera y a la deshidratación resultante de la diarrea - quizás para explicar la relativamente alta frecuencia del gen de la FQ en la población.

45 El análisis de secuencia del gen RTFQ de cromosomas FQ ha revelado una variedad de mutaciones causantes de enfermedad (Cutting, GR et al (1990) Nature 346: 366-369; Dean, M. et al (1990) Cell 61: 863-870; y Kerem, BS et al (1989) Science 245: 1073-1080; Kerem, BS et al (1990) Proc Natl Acad Sci EE.UU. 87: 8.447-8.451). Hasta la fecha, más de 1000 mutaciones causantes de enfermedad en el gen de la FQ se han identificado 50 según lo informado por la literatura científica y médica. La mutación más frecuente es una delección de fenilalanina en la posición 508 de la secuencia de ácido RTFQ amino, y se conoce comúnmente como ΔF508-RTFQ. Esta mutación se produce en aproximadamente el 70 por ciento de los casos de fibrosis quística y se asocia con una enfermedad severa. Otras mutaciones incluyen la R117H y G551D.

55 La eliminación de residuos 508 en ΔF508-RTFQ impide que la proteína naciente se pliegue correctamente. 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 células que expresan RTFQ de tipo salvaje. Además del tráfico de deterioro de mutación resulta en el gating de canal defectuoso. En conjunto, el número reducido de canales en la membrana y el gating defectuoso llevan a la reducción de transporte de aniones a través de los epitelios que conduce a transporte defectuoso de iones y fluidos. (Quinton, P. M. (1990), ΔFASEB J. 4: 2709-2727). Los estudios han demostrado, sin embargo, que los números reducidos de F508-RTFQ en la membrana son funcionales, aunque menos que los de tipo salvaje RTFQ. (Dalemans et al (1991), Nature Lond 354: 526 a 528; Denning et al, supra; Pasik y Foskett (1995), J. Cell Biochem 270: 12347-50). Además de ΔF508-RTFQ, otra enfermedad que causa mutaciones en RTFQ que resultan en el tráfico defectuoso, síntesis, y/o gating de canal podría regularse hacia arriba y hacia abajo para alterar la secreción de aniones y modificar la progresión y/o gravedad de la enfermedad.

65 A pesar de que RTFQ transporta una variedad de moléculas, además de aniones, es evidente que esta

función (el transporte de aniones) representa un elemento en un importante mecanismo de transporte de iones y agua a través del epitelio. Los otros elementos incluyen el canal epitelial de ENaC $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{K}^+$ co-transportador, bomba Na^+/K^+ -ATPasa y los canales de K^+ de membrana basolateral, que son responsables de la absorción de cloruro en la célula.

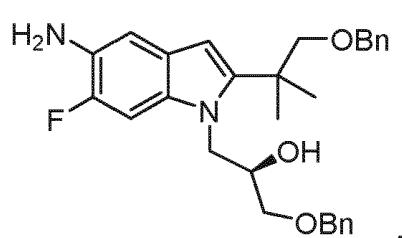
5 Estos elementos trabajan juntos para conseguir el transporte direccional a través del epitelio a través de su expresión selectiva y la localización dentro de la célula. Absorción de cloruro tiene lugar mediante la actividad coordinada de ENaC y RTFQ presentes en la membrana apical y la bomba Na^+/K^+ -ATPasa y los canales de Cl^- expresados en la superficie basolateral de la célula. El transporte activo secundario de cloruro desde el lado luminal conduce a la acumulación de cloruro intracelular, que después puede dejar pasivamente la célula a través de canales de Cl^- , dando como resultado un transporte vectorial. La disposición de $\text{Na}^+/\text{Cl}^-/\text{K}^+$ co-transportador, bomba Na^+/K^+ -ATPasa y canales de K^+ de membrana basolateral en la superficie basolateral y RTFQ en el lado luminal de coordina la secreción de cloruro a través de RTFQ en el lado luminal. Dado que el agua probablemente nunca se transporta activamente, su flujo a través de los epitelios depende de pequeños gradientes osmóticos transepiteliales generados por el flujo a granel de sodio y cloruro.

10 Como se discutió anteriormente, se cree que la eliminación de residuos 508 en $\Delta\text{F508-RTFQ}$ impide que la proteína naciente se pliegue correctamente, lo que resulta en la incapacidad de esta proteína mutante para salir de la sala de emergencia, y el tráfico a la membrana plasmática. Como resultado, cantidades insuficientes de la 15 proteína madura están presentes en la membrana plasmática y el transporte de cloruro dentro de los tejidos epiteliales se reduce significativamente. De hecho, este fenómeno celular del procesamiento defectuoso retículo endoplásmico (ER) de unión a transportadores de ATP de casete (ABC) por la maquinaria ER, se ha demostrado que es la base subyacente no solo para la enfermedad de FQ, pero para una amplia gama de otros aislados y enfermedades hereditarias. Las dos formas de que la maquinaria ER pueda funcionar mal es ya sea por pérdida de 20 acoplamiento a la exportación ER de las proteínas que conducen a degradación, ya sea por la acumulación ER de estas proteínas defectuosas/plegadas incorrectamente [Aridor M., et al., Nature Med., 5(7), pp 745-751 (1999); Shastry, B.S., et al., Neurochem. Internacional, 43, pp 1-7 (2003); Rutishauser, J., et al, Swiss Med Wkly, 132, pp 25 211-222 (2002); Morello, JP et al, TIPS, 21, pp 466- 469 (2000).; Bross P., et al., Mut Humano., 14, pp. 186-198 (1999)].

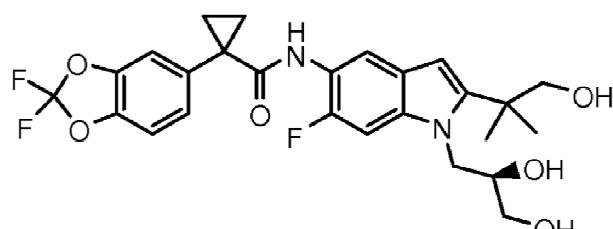
25 *(R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropil)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida* se describe en la solicitud de patente publicada de EE.UU. US20090131492 como un modulador de la actividad de RTFQ y por tanto útiles en el tratamiento de enfermedades mediadas por 30 RTFQ como la fibrosis quística. Sin embargo, hay una necesidad de formas sólidas estables de dicho Compuesto 35 que se pueden utilizar fácilmente en composiciones farmacéuticas adecuadas para uso como agentes terapéuticos.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

40 La presente invención se refiere a compuestos de la fórmula:



45 o una sal de los mismos. Este compuesto puede usarse como un producto intermedio en la síntesis de *(R)-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 lo sucesivo "Compuesto 1"), y formas sólidas del mismos. El Compuesto 1 tiene la estructura siguiente:



Compuesto 1.

5 El Compuesto 1 y composiciones farmacéuticamente aceptables de los mismos son útiles para tratar o disminuir la gravedad de enfermedades mediadas por RTFQ, tales como, por ejemplo, fibrosis quística. En un aspecto, el Compuesto 1 está en una forma sustancialmente libre de sal cristalina y se refiere como la Forma A como se ha descrito y caracterizado en el presente documento. En otro aspecto de la descripción, el Compuesto 1 está en una forma amorfá tal como se describe y se caracteriza en el presente documento. Las propiedades de un sólido correspondiente a su eficacia como un fármaco pueden depender de la forma del sólido. Por ejemplo, en una sustancia de fármaco, la variación en la forma sólida puede conducir a diferencias en las propiedades tales como punto de fusión, velocidad de disolución, la absorción oral, la biodisponibilidad, los resultados de toxicología y resultados de los ensayos clínicos.

10 15 Los procesos descritos en la presente pueden ser utilizados para preparar las composiciones de esta divulgación que comprende la Forma A o amorfá del Compuesto 1, o ambas. Las cantidades y las características de los componentes usados en los procesos serán como se describe en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 20 La **Figura 1** es un patrón de difracción de polvo de rayos X del Compuesto 1.
- La **Figura 2** es una traza de calorimetría diferencial de barrido (DSC) del Compuesto 1.
- 25 La **Figura 3** es parcela de análisis termogravimétrico (TGA) del Compuesto 1.
- La **Figura 4** es un patrón de difracción de polvo de rayos X calculado a partir de un único cristal de Forma A de Compuesto 1.
- 30 La **Figura 5** es un patrón de difracción de polvo de rayos X real de la Forma A de Compuesto 1 preparado por la técnica de suspensión (2 semanas) con DCM como disolvente.
- La **Figura 6** es una traza de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la Forma A de Compuesto 1.
- 35 La **Figura 7** es un patrón de difracción de polvo de rayos X real de Forma A de Compuesto 1 preparado por el método de evaporación rápida a partir de acetonitrilo.
- La **Figura 8** es un patrón de difracción de polvo de rayos X real de Forma A de Compuesto 1 preparado por el método de lucha contra disolvente usando EtOAc y heptano.
- 40 La **Figura 9** es una imagen conformacional de la Forma A de Compuesto 1 basada en el análisis de cristal único de rayos X.
- La **Figura 10** es una imagen conformacional que muestra el orden de apilamiento de la Forma A de Compuesto 1.
- 45 La **Figura 11** es un espectro de estado sólido ^{13}C RMN (spinning 15,0 kHz) de la Forma A de Compuesto 1.
- La **Figura 12** es un espectro de estado sólido ^{19}F RMN (spinning 12,5 kHz) de la Forma A de Compuesto 1.
- 50 La **Figura 13** es un patrón de difracción de polvo de rayos X de la Forma A de Compuesto 1 amorfá a partir del método de evaporación rotatoria de evaporación rápida.
- La **Figura 14** es una traza de calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) de la Forma A de Compuesto 1 amorfá preparada por el método de evaporación rotatorio de evaporación rápida.
- 55 La **Figura 15** es un gráfico de análisis termogravimétrico (TGA) de la Forma A de Compuesto 1 amorfá preparada por el método de evaporación rotatorio de evaporación rápida.
- 60 La **Figura 16** es un patrón de difracción de polvo de rayos X de la Forma A de Compuesto 1 amorfá preparada por métodos de secado por pulverización.
- La **Figura 17** es una traza de calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) de la forma amorfá de Compuesto 1 preparada por métodos secados por pulverización.
- 65 La **Figura 18** es un espectro de ^{13}C RMN de estado sólido (spinning 15,0 kHz) de la forma amorfá de

Compuesto 1.

La **Figura 19** es un espectro estado sólido ^{19}F de RMN (spinning 12,5 kHz) de la forma amorfa de Compuesto 1.

5

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

10 Tal como se usa en el presente documento, se aplicarán las siguientes definiciones a menos que se indique lo contrario.

15 El término "RTFQ" como se usa en el presente documento significa regulador de conductancia de transmembrana de fibrosis quística o una mutación capaz de actividad reguladora, incluyendo, pero no limitado a $\Delta\text{F508 RTFQ}$ y G551D RTFQ (véase, por ejemplo, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>, para mutaciones de RTFQ).

Tal como se utiliza aquí, el término "amorfo" se refiere a formas sólidas que consisten en disposiciones desordenadas de moléculas y no poseen una red cristalina distinguible.

20 Como se usa aquí, "cristalino" se refiere a Compuestos o composiciones en las que las unidades estructurales están dispuestas en patrones o retículas geométricas fijas, de manera que los sólidos cristalinos tienen orden de escala larga rígida. Las unidades estructurales que constituyen la estructura cristalina pueden ser átomos, moléculas, o iones. Los sólidos cristalinos muestran puntos de fusión definidos.

25 El término "modulación", como se usa en este documento significa aumentar o disminuir, por ejemplo, actividad, en una cantidad medible.

30 El término "químicamente estable", como se usa aquí, significa que la forma sólida de Compuesto 1 no se descompone en uno o más Compuestos químicos diferentes cuando se someten a condiciones especificadas, por ejemplo, 40°C/75% de humedad relativa, durante un período de tiempo específico, p.ej. 1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas o más. En algunas realizaciones, menos de 25% de la forma sólida del Compuesto 1 se descompone, en algunas realizaciones, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 1%, menos de aproximadamente 0,5% de la forma de Compuesto 1 se descompone en las 35 condiciones especificadas. En algunas formas de realización, ninguna cantidad detectable de la forma sólida de Compuesto 1 se descompone.

40 El término "físicamente estable", como se usa aquí, significa que la forma sólida de Compuesto 1 no cambia en una o más formas físicas diferentes del Compuesto 1 (por ejemplo, formas sólidas diferentes tal como se mide mediante XRPD, DSC, etc.) cuando se somete a condiciones específicas, por ejemplo, 40°C/75% de humedad relativa, durante un período de tiempo específico, p.ej. 1 día, 2 días, 3 días, 1 semana, 2 semanas o más. En algunas realizaciones, menos de 25% de la forma sólida del Compuesto 1 se transforma en una o más formas físicas diferentes cuando se someten a condiciones específicas. En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 20%, menos de aproximadamente 15%, menos de aproximadamente 10%, menos de 45 aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 1%, menos de aproximadamente 0,5% de la forma sólida del Compuesto 1 se transforma en una o más formas físicas diferentes del Compuesto 1 cuando se sometieron a condiciones especificadas. En algunas formas de realización, ninguna cantidad detectable de la forma sólida del Compuesto 1 cambia en una o más formas sólidas físicamente diferentes del Compuesto 1.

50 Tal como se usa en el presente documento, la frase "Compuesto 1 sustancialmente amorfo" se usa de manera intercambiable con las frases "Compuesto 1 amorfo", "Compuesto 1 amorfo sustancialmente libre de Compuesto 1 cristalino," y "sustancialmente amorfo (R)-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 algunas 55 realizaciones, el Compuesto 1 sustancialmente amorfo tiene menos de aproximadamente 30% de Compuesto 1 cristalino, por ejemplo, menos de aproximadamente 30% de Compuesto 1 cristalino, por ejemplo, menos de aproximadamente 25% de Compuesto 1 cristalino, menos de aproximadamente 20% de Compuesto 1 cristalino, menos de aproximadamente 15% de Compuesto 1 cristalino, menos de aproximadamente 10% de Compuesto 1 cristalino, menos de aproximadamente 5% de Compuesto 1 cristalino, menos de aproximadamente 2% de 60 Compuesto 1 cristalino.

65 Tal como se usa aquí, la expresión "Forma A de Compuesto 1 sustancialmente cristalina" se usa indistintamente con las expresiones "Forma A de Compuesto 1" y "Forma A de Compuesto 1 cristalino sustancialmente libre del Compuesto 1 amorfo". En algunas realizaciones, Forma A de Compuesto 1 sustancialmente cristalina tiene menos de aproximadamente 30% de Compuesto 1 amorfo o en otras formas sólidas,

por ejemplo, menos de aproximadamente 30% de Compuesto 1 amorf o en otras formas sólidas, por ejemplo, menos de aproximadamente 25% de Compuesto 1 amorf o en otras formas sólidas, menos de aproximadamente 20% de Compuesto 1 amorf o en otras formas sólidas, menos de aproximadamente 15% de Compuesto 1 amorf o en otras formas sólidas, menos de aproximadamente 10% de Compuesto 1 amorf o en otras formas sólidas, menos de aproximadamente 5% Compuesto 1 amorf u otras formas sólidas, menos de aproximadamente 2% de Compuesto 1 amorf u otras formas sólidas. En algunas realizaciones, Forma A de Compuesto 1 sustancialmente cristalina tiene menos de aproximadamente 1% de Compuesto 1 amorf u otras formas sólidas.

El término "sustancialmente libre" (como en la frase "sustancialmente libre de la forma X") cuando se refiere a una forma sólida designada del Compuesto 1 (por ejemplo, una forma amorf o cristalina descrita en este documento) significa que hay menos de 20% (en peso) de la forma designada o co-forma (por ejemplo, una forma cristalina o amorf del Compuesto 1) presente, más preferentemente, no es inferior a 10% (en peso) de la forma designada presente, más preferentemente, no es inferior a 5% (en peso) de la forma designada presente, y lo más preferiblemente, hay menos de 1% (en peso) de la forma designada presente.

El término "sustancialmente puro" cuando se refiere a una forma sólida designada del Compuesto 1 (por ejemplo, una forma de sólido amorf o cristalino se describe en el presente documento) significa que la forma sólida designada contiene menos de 20% (en peso) de componentes residuales tales como forma o co-forma de cristalina alternativa polimórfica o isomórfica del Compuesto 1. Se prefiere que una forma sólida sustancialmente pura del Compuesto 1 contiene menos de 10% (en peso) de formas cristalinas polimórficas o isomórficas alternativas de Compuesto 1, más preferiblemente menos de 5% (en peso) de formas cristalinas polimórficas o isomórficas alternativas de Compuesto 1, y lo más preferiblemente menos de 1% (en peso) de formas cristalinas polimórficas o isomórficas alternativas de Compuesto 1.

Tal como se utiliza aquí, una "dispersión" se refiere a un sistema disperso en la que se distribuye una sustancia, la fase dispersa, en unidades discretas, a través de una segunda sustancia (la fase continua o vehículo). El tamaño de la fase dispersa puede variar (por ejemplo, partículas coloidales de dimensión nanométrica, a varios micrómetros de tamaño) considerablemente. En general, las fases dispersas pueden ser sólidas, líquidas o gases. En el caso de una dispersión sólida, las fases dispersa y continua son sólidos. En aplicaciones farmacéuticas, una dispersión sólida puede incluir un fármaco cristalino (fase dispersa) en un polímero amorf (fase continua), o alternativamente, un fármaco amorf (fase dispersa) en un polímero amorf (fase continuos). En algunos aspectos una dispersión sólida amorf incluye el polímero que constituye la fase dispersa, y el fármaco constituye la fase continua. En algunos aspectos, la dispersión incluye Compuesto 1 amorf o el Compuesto 1 sustancialmente amorf.

El término "dispersión sólida amorf" se refiere en general a una dispersión sólida de dos o más componentes, por lo general un fármaco y el polímero, pero que posiblemente contiene otros componentes tales como surfactantes u otros excipientes farmacéuticos, donde el Compuesto 1 es amorf o sustancialmente amorf (por ejemplo, sustancialmente libre de Compuesto 1 cristalino), y la estabilidad física y/o disolución y/o solubilidad del fármaco amorf se ve reforzada por los otros componentes.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "cerca de" y "aproximadamente", cuando se usa en relación con las dosis, cantidades, o porcentaje en peso de los ingredientes de una composición o una forma de dosificación, significan una dosis, la cantidad o porcentaje en peso que es reconocido por expertos en la técnica para proporcionar un efecto farmacológico equivalente al obtenido a partir de la dosis especificada, cantidad o porcentaje en peso. Específicamente el término "cerca de" o "aproximadamente" significa un error aceptable para un valor particular como se determina por un experto normal en la técnica, que depende en parte de cómo se mide o determina el valor. En ciertas realizaciones, el término "cerca de" o "aproximadamente" significa dentro de 1, 2, 3, o 4 desviaciones estándar. En ciertas realizaciones, el término "cerca de" o "aproximadamente" significa dentro de 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 dado.

Las abreviaturas "MTBE" y "DCM" significan éter de metilo t-butilo y diclorometano, respectivamente.

La abreviatura "XRPD" significa difracción en polvo de rayos X.

La abreviatura "DSC" significa calorimetría diferencial de barrido.

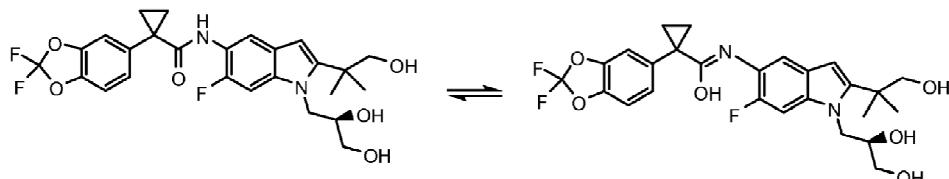
La abreviatura "TGA" significa análisis termogravimétrico.

A menos que se indique lo contrario, las estructuras representadas en este documento también pretenden incluir todas las formas isómeras (por ejemplo, formas enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros de doble enlace (Z) y (E), y isómeros conformacionales (Z) y (E). Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o conformacionales) de los

presentes Compuestos están dentro del alcance de la invención. Todas las formas tautómeras del Compuesto 1 se incluyen en el presente documento. Por ejemplo, el Compuesto 1 puede existir como tautómeros, los cuales se incluyen en el presente documento:

5

10



15

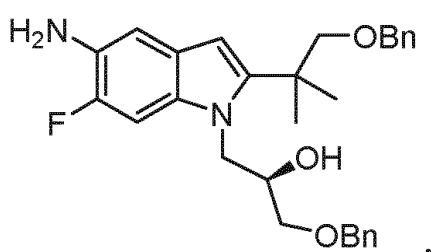
20

Además, a menos que se indique otra cosa, también se pretende que las estructuras representadas en el presente documento incluyan compuestos que difieren sólo en la presencia de uno o más átomos isotópicamente Enriquecidos. Por ejemplo, el Compuesto 1, en el que uno o más átomos de hidrógeno están deuterio o tritio reemplazados, o uno o más átomos de carbono se sustituyen por un carbono ^{13}C o ^{14}C enriquecido están dentro del alcance de esta invención. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas de análisis, sondas en ensayos biológicos, o compuestos con un mejor perfil terapéutico.

La invención se define en la reivindicación adjunta y se refiere a un compuesto de la fórmula:

25

30



35

o una sal del mismo. En la presente se divulga (*R*)-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 caracterizado como la Forma A cristalina.

40

45

50

55

En otra realización, la forma A se caracteriza por uno o más picos a 19,3 a 19,7 grados, 21,5 a 21,9 grados, y 16,9 a 17,3 grados en un gráfico de difracción de polvo de rayos X obtenido usando radiación alfa Cu K. En otra realización, la forma A se caracteriza por uno o más picos a aproximadamente 19,5, 21,7, y 17,1 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a 20,2 a 20,6 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a aproximadamente 20,4 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a 18,6 a 19,0 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a aproximadamente 18,8 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a 24,5 a 24,9 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a aproximadamente 24,7 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico en 9,8 a 10,2 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a aproximadamente 10,0 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico en 4,8 a 5,2 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a aproximadamente 5,0 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a 24,0 a 24,4 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a aproximadamente 24,2 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a 18,3 a 18,7 grados. En otra realización, la forma A se caracteriza además por un pico a aproximadamente 18,5 grados.

60

En otra realización, la forma A se caracteriza por un patrón de difracción sustancialmente similar a la de la Figura 4. En otra realización, la forma A se caracteriza por un patrón de difracción sustancialmente similar a la de la Figura 5.

65

En la presente se divulga una forma de cristal de (*R*)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida que tiene un sistema monoclínico cristal, un grupo espacial C2, y las siguientes dimensiones de la celda unidad: $a = 21,0952$ (16) Å, $\alpha = 90^\circ$, $b = 6,6287$ (5) Å, $\beta = 95,867$ (6)°, $c = 17,7917$ (15) Å, $\gamma = 90^\circ$.

65

En la presente se divulga una composición farmacéutica que comprende la forma A y un portador farmacéuticamente aceptable. En otra realización, la composición farmacéutica comprende además un agente

terapéutico adicional. En otra realización, el agente terapéutico adicional se selecciona de un agente mucolítico, broncodilatador, un agente anti-biótico, un agente anti-infeccioso, un agente anti-inflamatorio, un potenciador RTFQ, o un agente nutricional.

5 En la presente se divulga un proceso de preparación de la Forma A poniéndose en suspensión que comprende (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-ilo)ciclopropanocarboxamida en un disolvente para una cantidad eficaz de tiempo. En otra realización, el disolvente es acetato de etilo, diclorometano, MTBE, acetato de isopropilo, agua/etanol, agua/acetonitrilo, agua/metanol o agua/alcohol isopropílico. En otra realización, la cantidad eficaz de tiempo es de 24 horas a 2
10 semanas. En otra realización, la cantidad eficaz de tiempo es de 24 horas a 1 semana. En otra realización, la cantidad eficaz de tiempo es de 24 horas a 72 horas.

15 En la presente se divulga un proceso de preparación de la Forma A que comprende la disolución de (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-
20 ilo)ciclopropanocarboxamida en un disolvente y evaporando el disolvente. En otra realización, el disolvente es acetona, acetonitrilo, metanol o alcohol isopropílico.

25 En la presente se divulga un proceso de preparación de la Forma A que comprende la disolución de (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-
30 ilo)ciclopropanocarboxamida en un primer disolvente y la adición de un segundo disolvente en el que (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-
35 ilo)ciclopropanocarboxamida no es soluble. En otra realización, el primer disolvente es acetato de etilo, etanol, alcohol isopropílico, o acetona. En otra realización, el segundo disolvente es heptano o agua. En otra realización, la adición del segundo disolvente se realiza mientras se agitaba la solución del primer disolvente y (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-
40 ilo)ciclopropanocarboxamida.

45 Se describe aquí un sólido sustancialmente amorfo (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-ilo)ciclopropanocarboxamida. En otro aspecto, la (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-propano-2-ilo)-1H-indol-5-ilo)ciclopropanocarboxamida amorfá comprende menos de aproximadamente 5% cristalino (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-ilo)ciclopropanocarboxamida.

55 Se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-
60 ilo)ciclopropanocarboxamida amorfá y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la composición farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional. En otro aspecto, el agente terapéutico adicional se selecciona de un agente mucolítico, broncodilatador, un anti-biótico, un agente anti-infeccioso, un agente anti-inflamatorio, un potenciador RTFQ, o un agente nutricional.

65 Se describe aquí un proceso de preparación de (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-ilo)ciclopropanocarboxamida amorfá que comprende la disolución de (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-ilo)ciclopropanocarboxamida en un disolvente adecuado y eliminando el disolvente por evaporación rotatoria. En otro aspecto, el disolvente es metanol.

70 Se describe en el presente documento una dispersión sólida que comprende (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-
75 ilo)ciclopropanocarboxamida amorfá y un polímero. En otro aspecto, el polímero es hidroxipropilmelcelulosa (HPMC). En otro aspecto, el polímero es acetato succinato de hidroxipropilmelcelulosa (HPMCAS).

80 En otra realización, el polímero está presente en una cantidad de 10% en peso a 80% en peso. En otra realización, el polímero está presente en una cantidad de 30% en peso a 60% en peso. En otra realización, el polímero está presente en una cantidad de aproximadamente 49,5% en peso.

85 En otra realización, la (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-ilo)ciclopropanocarboxamida está presente en una cantidad de 10% en peso a 80% en peso. En otra realización, la (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-ilo)ciclopropanocarboxamida está presente en una cantidad de 30% en peso a 60% en peso. En otra realización, la (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilo-2-ilo)-1H-indol-5-ilo)ciclopropanocarboxamida está presente en una cantidad de aproximadamente 50% en peso.

90 En otra realización, la dispersión sólida comprende además un surfactante. En otra realización, el agente

surfactante es laurilsulfato de sodio. En otra realización, el surfactante está presente en una cantidad de 0,1% en peso a 5% en peso. En otra realización, el agente surfactante está presente en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso.

5 En otra realización, el polímero es acetato succinato de hidroxipropilmelcelulosa (HPMCAS) en la cantidad de 49,5% en peso, el surfactante es sulfato de laurilo de sodio en la cantidad de 0,5% en peso, y el (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilopropano-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida está presente en la cantidad de 50% en peso.

10 Se describe en el presente documento una composición farmacéutica que comprende la dispersión sólida y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la composición farmacéutica comprende además un agente terapéutico adicional. En otro aspecto, el agente terapéutico adicional se selecciona de un agente mucolítico, broncodilatador, un antibiótico, un agente anti-infeccioso, un agente anti-inflamatorio, un potenciador RTFQ, o un agente nutricional.

15 Se describe aquí un proceso de preparación amorfía (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilopropano-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida de secado que comprende la pulverización a secado (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilopropano-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida.

20 En otro aspecto, el procedimiento comprende la combinación de (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilopropano-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida y un disolvente adecuado y después el secado por pulverización de la mezcla para obtener (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilopropano-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida amorfía. En otro aspecto, el disolvente es un alcohol. En otro aspecto, el disolvente es metanol.

25 En otro aspecto, el procedimiento comprende: a) formar una mezcla que comprende (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilopropano-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida, un polímero, y un disolvente; y b) secar por pulverización la mezcla para formar una dispersión sólida.

30 En otra realización, el polímero es acetato succinato de hidroxipropilmelcelulosa (HPMCAS). En otra realización, el polímero está en una cantidad de 10% en peso a 80% en peso de la dispersión sólida. En otra realización, el polímero está en una cantidad de aproximadamente 49,5% en peso de la dispersión sólida. En otra realización, el disolvente es metanol. En otra realización, la mezcla comprende además un surfactante. En otra realización, el agente surfactante es laurilsulfato de sodio (SLS). En otra realización, el agente surfactante está en una cantidad de 0,1% en peso a 5% en peso de la dispersión sólida. En otra realización, el agente surfactante está en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso de la dispersión sólida.

35 En otra realización, el polímero es succinato de acetato de hidroxipropilmelcelulosa (HPMCAS) en la cantidad de aproximadamente 49,5% en peso de la dispersión sólida, el disolvente es metanol, y la mezcla comprende además sulfato de laurilo de sodio en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso de la dispersión sólida.

40 En la presente se divulga un método para tratar una enfermedad mediada por RTFQ en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de la Forma A, la (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilopropano-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida amorfía, o la dispersión sólida de (R)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-N-(1-(2,3-dihidroxipropilo)-6-fluoro-2-(1-hidroxi-2-metilopropano-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarboxamida amorfía.

45 En otra realización, la enfermedad mediada RTFQ se selecciona de fibrosis quística, el asma, el humo inducido EPOC, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, la infertilidad masculina causada por ausencia bilateral congénita de los vasos deferentes (CBAVD), enfermedad leve pulmonar, pancreatitis idiopática, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedad del hígado, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias de la coagulación-fibrinolisis, deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de Tipo 1, deficiencias de procesamiento de lípidos, la hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia de Tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento lisosomal, enfermedad de células I/pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis, Sandhoff/Tay-Sachs, Crigler-Najjar de Tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, Diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glucanosis CDG de tipo 1, el hipertiroidismo congénito, la osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), neurohipófisis DI, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, plasia supranuclear, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de poliglutamina, enfermedad de Huntington, la ataxia de espinocerebelosa de tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar,

palidoluisiano dentatorubal, distrofia miotónica, encefalopatías espongiformes, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob hereditaria (debido al defecto de procesamiento de proteína priónica), la enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco, enfermedad de Sjogren, la osteoporosis, la osteopenia, síndrome de Gorham, canalopatías cloruro, miotonía congénita (formas Thomson y Becker), el síndrome de Bartter tipo III, enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento lisosomal, el síndrome de Angelman, discinesia ciliar primaria (DCP), trastornos heredados de la estructura y/o función de los cilios, PCD con situs inverso (también conocido como síndrome de Kartagener), PCD sin situs inverso, o aplasia ciliar. En otra realización, la enfermedad mediada RTFQ es la fibrosis quística. En otra realización, el sujeto tiene receptor de transmembrana de la fibrosis quística (RTFQ) con una mutación ΔF508. En otra realización, el sujeto tiene receptor de transmembrana de la fibrosis quística (RTFQ) con una mutación R117H. En otra realización, el sujeto tiene receptor de transmembrana de la fibrosis quística (RTFQ) con una mutación G551D.

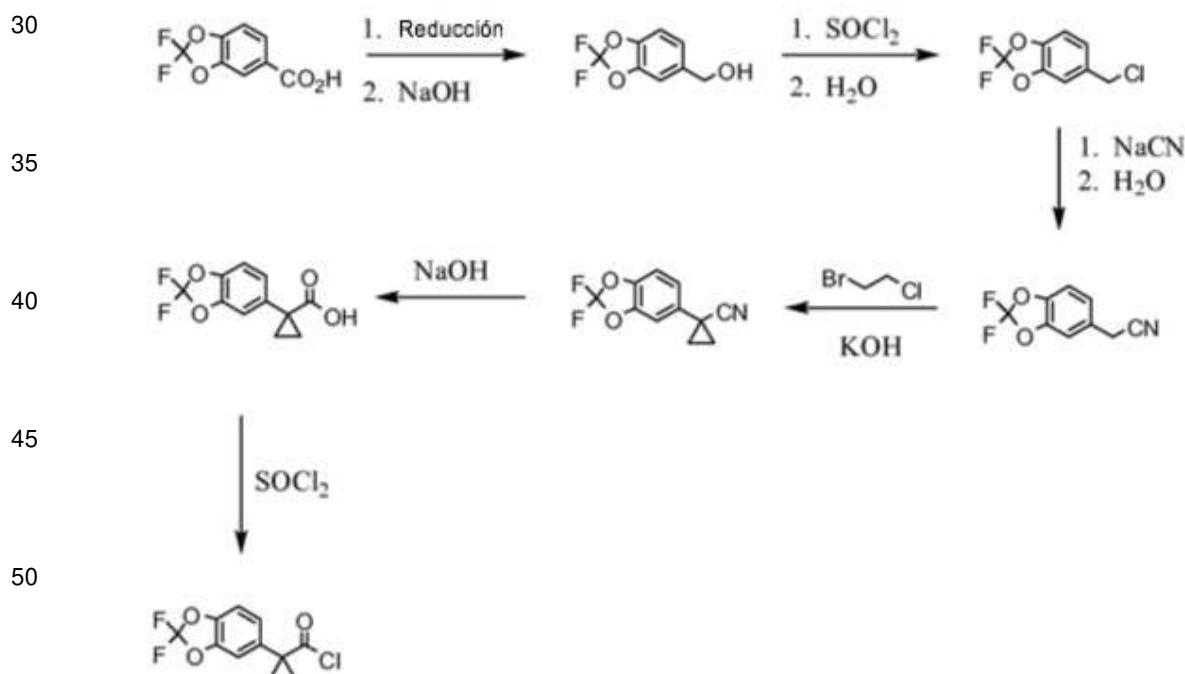
En otra realización, el método comprende la administración de un agente terapéutico adicional. En otra forma de realización, el agente terapéutico se selecciona de un agente mucolítico, broncodilatador, un anti-biótico, un agente anti-infeccioso, un agente anti-inflamatorio, un potenciador RTFQ, o un agente nutricional.

En la presente se divulga un kit que comprende la Forma A, la (*R*)-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 amorfa, o la dispersión sólida que comprende la (*R*)-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 amorfa, e instrucciones de uso del mismo.

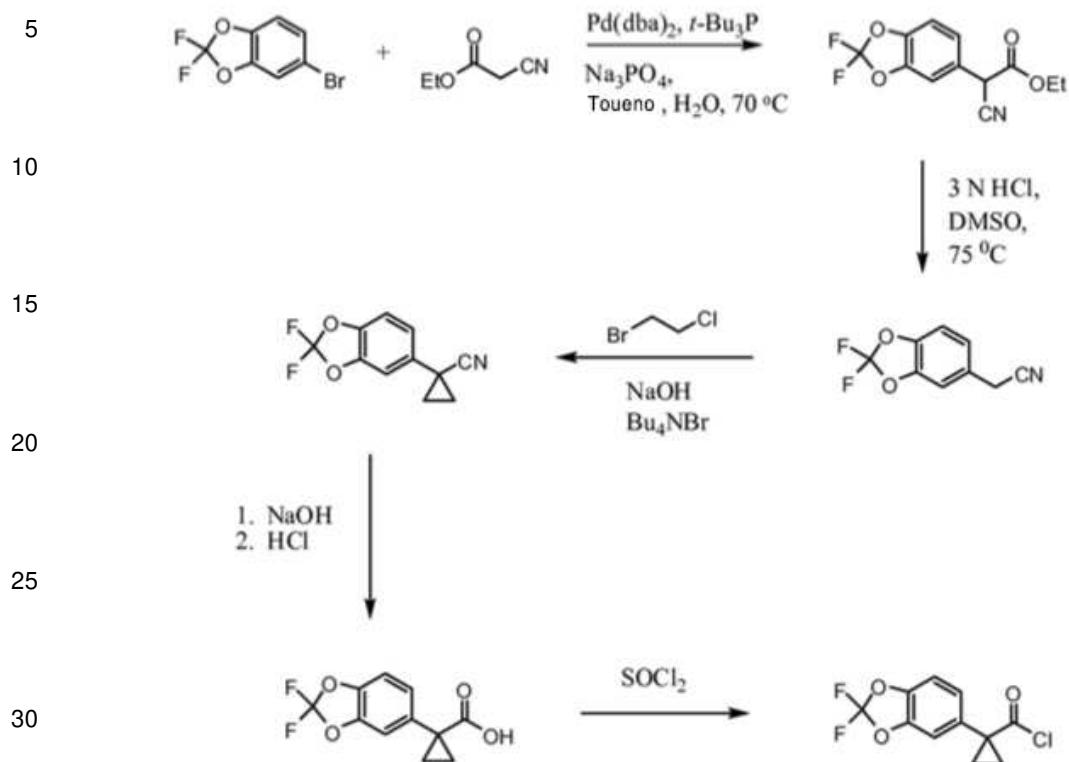
Métodos de preparación de Forma A de Compuesto 1 y la forma amorfa

El Compuesto 1 es el punto de partida y en una realización se puede preparar por acoplamiento de un resto de cloruro de ácido con un resto de amina de acuerdo con los Esquemas 1-4.

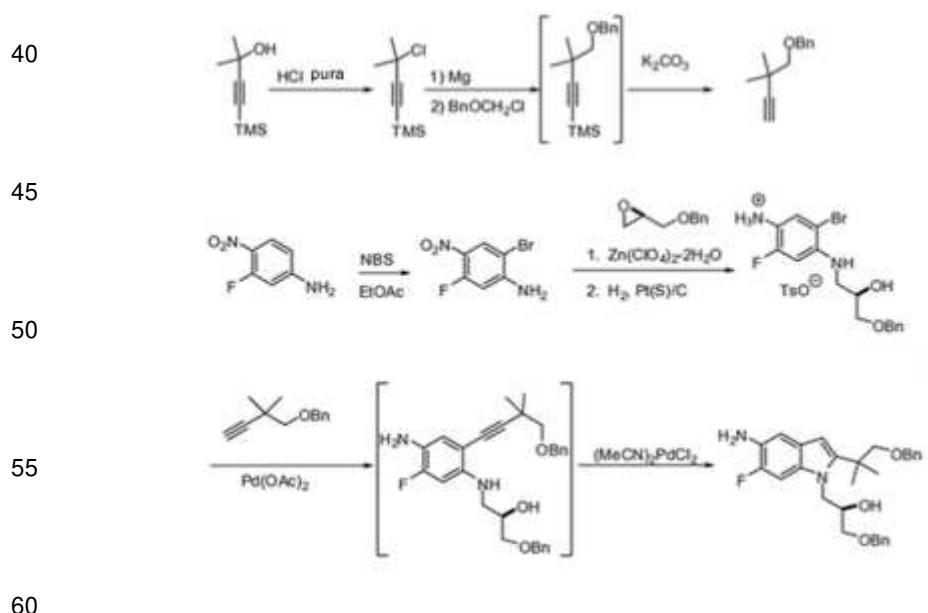
Esquema 1. Síntesis del resto de cloruro acídico.



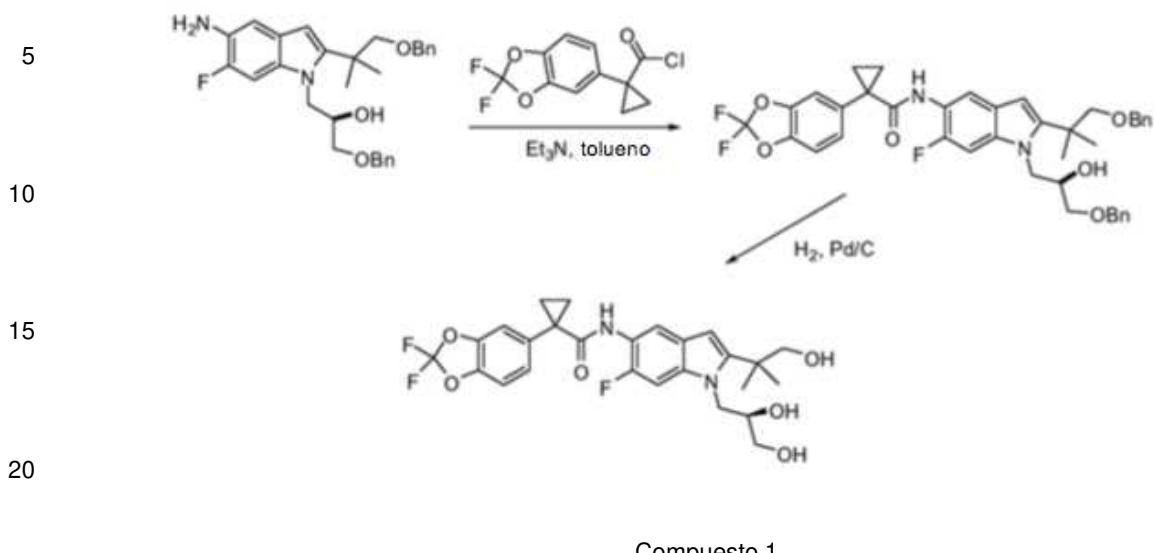
Esquema 2. Síntesis alternativa del resto de cloruro acídico.



Esquema 3. Síntesis del resto de amina. (el compuesto de la invención).



Esquema 4. Formación del Compuesto 1.



Métodos para la formación de Forma A de Compuesto 1

30 En una realización, la forma A se prepara suspendiendo el Compuesto 1 en un disolvente apropiado para una cantidad eficaz de tiempo. En otra realización, el disolvente adecuado es acetato de etilo, diclorometano, MTBE, acetato de isopropilo, diversas relaciones de las soluciones de agua/etanol, diversas relaciones de las soluciones de agua/acetonitrilo, diversas relaciones de soluciones de agua/metanol o diversas relaciones de soluciones de alcohol agua/isopropílico. Por ejemplo, diversas relaciones de soluciones de agua/etanol incluyen agua/etanol 1:9 (vol/vol), agua/etanol 1:1 (vol/vol), y agua/etanol 9:1 (vol/vol). Diversas relaciones de las soluciones de agua/acetonitrilo incluyen agua/acetonitrilo 1:9 (vol/vol), agua/acetonitrilo 1:1 (vol/vol), y agua/acetonitrilo 9:1 (vol/vol). Diversas relaciones de las soluciones de agua/metanol incluyen agua/metanol 1:9 (vol/vol), agua/metanol 1:1 (vol/vol), y agua/metanol 9:1 (vol/vol). Diversas relaciones de las soluciones de alcohol isopropílico/agua incluyen el alcohol agua/isopropílico 1:9 (vol/vol), alcohol agua/isopropílico 1:1 (vol/vol), y alcohol agua/isopropílico 9:1 (vol/vol).

Generalmente, cerca de 40 mg del Compuesto 1 se arrastra en aproximadamente 1,5 ml de un disolvente apropiado (concentración objetivo en 26,7 mg/ml) a temperatura ambiente durante una cantidad de tiempo eficaz. En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de tiempo es de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 2 semanas. En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de tiempo es de aproximadamente 24 horas a alrededor de 1 semana. En algunas formas de realización, la cantidad eficaz de tiempo es de aproximadamente 24 horas a aproximadamente 72 horas. Después los sólidos se recogen.

En otra realización, la forma A se prepara disolviendo el Compuesto 1 en un disolvente apropiado y después evaporando el disolvente. En una realización, el disolvente adecuado es aquel en el que el Compuesto 1 tiene una solubilidad de más de 20 mg/ml. Por ejemplo, estos disolventes incluyen acetonitrilo, metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetona, y similares.

En general, el Compuesto 1 se disuelve en un disolvente apropiado, se filtró, y después a la izquierda, ya sea para la evaporación lenta o rápida evaporación. Un ejemplo de evaporación lenta incluye un recipiente, tal como un vial, que comprende la solución del Compuesto 1 con parafilm que tiene un agujero. Un ejemplo de rápida evaporación consiste en dejar un recipiente, tal como un vial, que comprende la solución del Compuesto 1, no cubierto. Los sólidos se recogen después.

En la presente se divulga un proceso de preparación de la Forma A que comprende la disolución del Compuesto 1 en un primer disolvente y la adición de un segundo disolvente en el que el Compuesto 1 tiene una pobre solubilidad (solubilidad <1 mg/ml). Por ejemplo, el primer disolvente puede ser un disolvente en el que el Compuesto 1 tiene más de 20 mg/ml de solubilidad, por ejemplo acetato de etilo, etanol, alcohol isopropílico, o acetona. El segundo disolvente puede ser, por ejemplo, heptano o agua.

En general, el Compuesto 1 se disuelve en el primer disolvente y se filtró para eliminar cualesquiera

cristales de siembra. Se añade el segundo disolvente lentamente mientras se agite. Los sólidos se precipitan y se recogen por filtración.

Métodos de preparación de Compuesto 1 amorf

- 5 A partir de Compuesto 1 o Forma A de Compuesto 1, la forma amorf del Compuesto 1 se puede preparar por evaporación rotatoria o por métodos secos de pulverización.
- 10 La disolución de Compuesto 1 en un disolvente apropiado como metanol y evaporación rotatoria del metanol para dejar una espuma produce la forma amorf de Compuesto 1. En algunos aspectos, un baño de agua caliente se utiliza para acelerar la evaporación.
- 15 La forma amorf de Compuesto 1 también se puede preparar a partir de la Forma A de Compuesto 1 mediante métodos de pulverización seca. El secado por pulverización es un proceso que convierte una alimentación líquida a una forma particulada seca. Opcionalmente, un proceso de secado secundario tal como secado en lecho fluidizado o secado al vacío, se puede utilizar para reducir los disolventes residuales a niveles farmacéuticamente aceptables. Típicamente, el secado por pulverización implica la puesta en contacto de una suspensión altamente dispersa líquida o solución, y un volumen suficiente de aire caliente para producir la evaporación y secado de las gotas de líquido. La preparación para el secado por pulverización puede ser cualquier solución, suspensión, dispersión coloidal, o pasta que puede atomizarse usando el aparato de secado por pulverización seleccionada. En un procedimiento estándar, la preparación se pulveriza en una corriente de aire caliente filtrado que evapora el disolvente y transporta el producto seco a un colector (por ejemplo, un ciclón). El aire gastado entonces se agota con el disolvente, o, alternativamente, se envía el aire pasado a un condensador para capturar y reciclar potencialmente el disolvente. Comercialmente tipos disponibles de aparato puede utilizarse para llevar a cabo el secado por pulverización. Por ejemplo, secadores de pulverización comerciales son fabricados por Buchi Ltd. And Niro (por ejemplo, la línea de PSD de atomizadores fabricados por Niro) (véase, US 2004/0105820, US 2003/0144257).
- 20
- 25
- 30 El secado por pulverización emplea típicamente cargas de sólidos 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, preferiblemente al menos aproximadamente 10%. En general, el límite superior de las cargas de sólidos se rige por la viscosidad de (por ejemplo, la capacidad de bombeo) la solución resultante y la solubilidad de los componentes en la solución. Generalmente, la viscosidad de la solución puede determinar el tamaño de la partícula en el producto en polvo resultante.
- 35 Las técnicas y métodos para el secado por pulverización se pueden encontrar en Perry's Chemical Engineering Handbook, 6th 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. Serie 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, a partir de aproximadamente 96°C a aproximadamente 180°C, por ejemplo, aproximadamente 145°C. El secado por pulverización se lleva a cabo generalmente con una temperatura de salida de aproximadamente 30°C a aproximadamente 90°C, por ejemplo de aproximadamente 40°C a aproximadamente 80°C, aproximadamente 45°C a aproximadamente 80°C por ejemplo, aproximadamente 75°C. La velocidad de flujo de atomización es generalmente de aproximadamente 4 kg/h a aproximadamente 12 kg/h, por ejemplo, de alrededor de 4,3 kg/h a aproximadamente 10,5 kg/h, por ejemplo, aproximadamente 6 kg/h a aproximadamente 10,5 kg/h. El caudal de alimentación es generalmente de aproximadamente 3 kg/h a aproximadamente 10 kg/h, por ejemplo, de alrededor de 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 la 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.
- 40
- 45
- 50 La eliminación del disolvente puede requerir una etapa de secado posterior, como secado en bandejas, secado en lecho fluido (por ejemplo, de aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 100°C), secado al vacío, secado por microondas, secado en tambor rotatorio o secado al vacío biconico (por ejemplo, de aproximadamente temperatura ambiente a aproximadamente 200°C).
- 55 En una realización, la dispersión sólida se seca a lecho fluido.
- 60 En un procedimiento, el disolvente incluye un disolvente volátil, por ejemplo un disolvente que tiene un punto de menos de aproximadamente 100°C de ebullición. En algunos aspectos, 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, en el que 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%.
- 65

Los disolventes preferidos son aquellos disolventes en los que el Compuesto 1 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). Disolventes más preferidos incluyen aquellos en los que el Compuesto 1 tiene una solubilidad de al menos aproximadamente 20 mg/ml.

Ejemplos de disolventes que pueden ser probados incluyen acetona, ciclohexano, diclorometano, N,N-dimetilacetamida (DMA), N,N-dimetilformamida (DMF), 1,3-dimetilo-2-imidazolidinona (DMI), dimetilo sulfóxido (DMSO), dioxano, acetato de etilo, éter etílico, ácido acético glacial (HAc), metilo etilo cetona (MEK), N-metilo-2-pirrolidinona (NMP), éter metilo terc-butílico (MTBE), tetrahidrofurano (THF), pentano, acetonitrilo, metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetato de isopropilo y tolueno. Ejemplos de co-disolventes incluyen acetona/DMSO, acetona/DMF, acetonaagua, MEKagua, THFagua, dioxanoagua. En un sistema de dos disolventes, los disolventes pueden estar presentes en de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 99,9%. En algunos aspectos preferidos, el agua es un co-disolvente con acetona donde el agua está presente desde aproximadamente 0,1% a aproximadamente 15%, por ejemplo aproximadamente 9% a aproximadamente 11%, por ejemplo, aproximadamente 10%. En algunos aspectos preferidos, el agua es un co-disolvente con MEK donde el agua está presente desde aproximadamente 0,1% a aproximadamente 15%, por ejemplo aproximadamente 9% a aproximadamente 11%, por ejemplo, aproximadamente 10%. En algunos aspectos la solución de disolvente incluye tres disolventes. Por ejemplo, la acetona y el agua se pueden mezclar con un tercer disolvente, tal como DMA, DMF, DMI, DMSO, o HAc. En casos en los que el Compuesto 1 amorf es un componente de una dispersión sólida amorf, los disolventes preferidos disuelven tanto el Compuesto 1 como el polímero. Los disolventes adecuados incluyen los descritos anteriormente, por ejemplo, MEK, acetona, agua, metanol, y mezclas de los mismos.

El tamaño de las partículas y el rango de temperatura de secado pueden ser modificados para preparar una dispersión sólida óptima. Como se apreciaría por profesionales cualificados, un tamaño de partícula pequeño permitiría mejorar la eliminación del disolvente. Los solicitantes han encontrado, sin embargo, que las partículas más pequeñas pueden dar lugar a partículas esponjosas que, en algunas circunstancias no proporcionan dispersiones sólidas óptimas para el procesamiento aguas abajo, como la formación de comprimidos. A temperaturas más altas, se puede producir cristalización o degradación química del Compuesto 1. A temperaturas más bajas, una cantidad suficiente del disolvente no puede ser eliminada. Los métodos de la presente memoria proporcionan un tamaño de partícula óptimo y una temperatura de secado óptimo.

En general, el tamaño de partícula es tal que D10 (μm) es menor que aproximadamente 5, por ejemplo, menos de aproximadamente 4,5, menos de aproximadamente 4,0, o menor que aproximadamente 3,5, D50 (μm) es generalmente menor que aproximadamente 17, por ejemplo, menos de aproximadamente 16, menos de aproximadamente 15, menos de aproximadamente 14, menos de aproximadamente 13, y D90 (μm) es generalmente menor que aproximadamente 175, por ejemplo, menos de aproximadamente 170, menos de aproximadamente 170, menos de aproximadamente 150, menos de aproximadamente 125, menos de aproximadamente 100, menos de aproximadamente 90, menos de aproximadamente 80, menos de aproximadamente 70, menos de aproximadamente 60, o menos de 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 aparente 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 alrededor de 0,14 g/cc, para 10 grifos; 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 alrededor de 0,21 g/cc por 500 grifos; 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 alrededor de 0,24 g/cc para 1250 grifos; 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 alrededor de 0,24 g/cc por 2500 grifos.

Polímeros

Las dispersiones sólidas incluyendo el Compuesto 1 amorf y un polímero (o vehículo en estado sólido) también se dan a conocer en el presente documento. Por ejemplo, el Compuesto 1 está presente como un Compuesto amorf como un componente de una dispersión sólida amorf. La dispersión amorf sólida, por lo general incluye el Compuesto 1 y un polímero. Ejemplos de polímeros incluyen polímeros celulósicos tales como HPMC o HPMCAS y pirrolidona que contiene polímeros tales como PVP/VA. En algunos aspectos, la dispersión sólida amorf incluye uno o más excipientes adicionales, tales como un agente surfactante.

En una realización, un polímero es capaz de disolverse en medios acuosos. La solubilidad de los polímeros puede ser pH-independiente o pH-dependiente. Estos últimos incluyen uno o más polímeros entéricos. El término "polímero entérico" se refiere a un polímero que es preferentemente soluble en el ambiente menos acídico del pariente intestinal al entorno más acídico del estómago, por ejemplo, un polímero que es insoluble en medios

acosos ácidos, pero soluble cuando el pH es por encima de 5-6. Un polímero adecuado debe ser química y biológicamente inerte. Con el fin de mejorar la estabilidad física de las dispersiones sólidas, la temperatura de transición vítreo (T_g) del polímero debe ser lo más alto posible. Por ejemplo, los polímeros preferidos tienen una temperatura de transición vítreo por lo menos igual o mayor que la temperatura de transición vítreo del fármaco (es decir, el Compuesto 1). Otros polímeros preferidos tienen una temperatura de transición vítreo que está dentro de aproximadamente 10 a aproximadamente 15°C del fármaco (es decir, el Compuesto 1). Ejemplos de temperaturas de transición vítreo 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 estar limitado por la teoría, se cree que el mecanismo subyacente es que un polímero con una T_g más alta tiene en general una movilidad molecular inferior a temperatura ambiente, que puede ser un factor crucial en la estabilización de la estabilidad física de la dispersión sólida amorfía.

Además, la higroscopiedad de los polímeros debe ser igual de baja, por ejemplo, menos de 10%. Para el propósito de comparación en esta solicitud, la higroscopiedad de un polímero o composición se caracteriza en alrededor de 60% de humedad relativa. En algunos aspectos preferidos, el polímero tiene menos de aproximadamente 10% de absorción de agua, por ejemplo menos de aproximadamente el 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, o menos de aproximadamente 2% de absorción de agua. La higroscopiedad también puede afectar a la estabilidad física de las dispersiones sólidas. En general, la humedad adsorbida en los polímeros se puede reducir en gran medida la T_g de los polímeros, así como las dispersiones sólidas resultantes, lo que reducirá aún más la estabilidad física de las dispersiones sólidas como se describió anteriormente.

En una realización, el polímero es uno o más polímero(s) soluble(s) en agua o polímero(s) parcialmente soluble(s) en agua. Polímeros solubles en agua o parcialmente solubles en agua incluyen pero no se limitan a, derivados de celulosa (por ejemplo, hidroxipropilmetylcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC)) o etilcelulosa; polivinilpirrolidonas (PVP); polietilenglicoles (PEG); alcoholes de polivinilo (PVA); acrilatos, tales como polimetacrilato (por ejemplo, Eudragit® E); ciclodextrinas (por ejemplo, β -ciclo-dextina) y copolímeros y derivados de los mismos, incluyendo por ejemplo PVP-VA (acetato de polivinilpirrolidona-vinilo).

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

Como se ha expuesto en el presente documento, el polímero puede ser un polímero entérico dependiente del pH. Tales polímeros entéricos dependientes del pH incluyen, pero no se limitan a, derivados de celulosa (por ejemplo, acetato ftalato de celulosa (CAP)), ftalatos de celulosa de metilo de hidroxipropilo (HPMCP), succinato de acetato de celulosa de hidroxipropilmetylcelulosa (HPMCAS), carboximetylcelulosa (CMC) o una sal del mismo (por ejemplo, una sal de sodio tal como (CMC-Na)); trimelitato de acetato de celulosa (CAT), ftalato de acetato de hidroxipropilcelulosa (HPCAP), ftalato de acetato de celulosa de hidroxipropilmetylcelulosa (HPMCAP), y ftalato de acetato de metilcelulosa (MCAP), o polimetacrilatos (por ejemplo, Eudragit® S). En algunos aspectos, el polímero es succinato de celulosa de acetato de metilo de hidroxipropilo (HPMCAS). En algunos aspectos, el polímero es succinato de acetato de celulosa de metilo de hidroxipropilo de grado HG (HPMCAS-HG).

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

En realizaciones en las que el Compuesto 1 forma una dispersión sólida con un polímero, por ejemplo con un HPMC, HPMCAS, o polímero PVP/VA, la cantidad de polímero con respecto al peso total de los rangos de dispersión sólida varía de aproximadamente 0,1% a 99 % por peso. A menos que se especifique lo contrario, los porcentajes de fármaco, polímero y otros excipientes como se describe dentro de una dispersión se dan en porcentajes en peso. La cantidad de polímero es típicamente al menos aproximadamente 20%, y preferiblemente al menos aproximadamente 30%, por ejemplo, al menos aproximadamente 35%, al menos aproximadamente 40%, al menos aproximadamente 45%, o aproximadamente 50% (por ejemplo, 49,5%). La cantidad es típicamente de aproximadamente 99% o menos, y preferiblemente de aproximadamente 80% o menos, por ejemplo aproximadamente 75% o menos, aproximadamente 70% o menos, aproximadamente 65% o menos, aproximadamente 60% o menos, o aproximadamente de 55% o menos. En un aspecto, el polímero está en una cantidad de hasta aproximadamente 50% del peso total de la dispersión (y aún más específicamente, entre aproximadamente 40% y 50%, tal como aproximadamente 49%, aproximadamente el 49,5%, o aproximadamente 50 %). HPMC y HPMCAS están disponibles en una variedad de grados de ShinEtsu, por ejemplo, HPMCAS está disponible en un número de variedades, incluyendo AS-LF, AS-MF, AS-HF, AS-LG, AS-MG, AS-HG. Cada uno de

estos grados varían con el porcentaje de sustitución de acetato y succinato.

En algunas realizaciones, el Compuesto 1 y el polímero están presentes en cantidades aproximadamente iguales, por ejemplo, cada uno del polímero y el fármaco representan aproximadamente la mitad del porcentaje en peso de la dispersión. Por ejemplo, el polímero está presente en aproximadamente el 49,5% y está presente en aproximadamente 50% del fármaco.

En algunas realizaciones, el Compuesto 1 y el polímero combinado representan 1% a 20% en peso de contenido sólido total de la dispersión no sólida antes del secado por pulverización. En algunos aspectos, el Compuesto 1 y el polímero combinado representan 5% a 15% en peso de contenido sólido total de la dispersión no sólida antes del secado por pulverización. En algunos aspectos, el Compuesto 1 y el polímero combinado representan alrededor del 11% en peso de contenido sólido total de la dispersión no sólida antes del secado por pulverización.

En algunas realizaciones, la dispersión incluye, además, otros ingredientes menores, tales como un agente surfactante (por ejemplo, SLS). En algunos aspectos, el agente surfactante está presente en menos de aproximadamente 10% de la dispersión, por ejemplo menos de aproximadamente el 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6%, menos de aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, aproximadamente 1%, o aproximadamente 0,5%.

En realizaciones que incluyen un polímero, el polímero debe estar presente en una cantidad eficaz para la estabilización de la dispersión sólida. La estabilización incluye la inhibición o prevención de la cristalización del Compuesto 1. Tal estabilización inhibiría la conversión del Compuesto 1 de forma amorf a la forma cristalina. Por ejemplo, el polímero podría evitar al menos una parte (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 mayor) del Compuesto 1 de la conversión de una forma amorf a una cristalina. La estabilización puede ser medida, por ejemplo, mediante la medición de la temperatura de transición vítreo de la dispersión sólida, la medición de la tasa de relajación del material amorf, o midiendo la solubilidad o la biodisponibilidad del Compuesto 1.

Los polímeros adecuados para uso en combinación con el Compuesto 1, por ejemplo para formar una dispersión sólida, tal como una dispersión sólida amorf, debe tener una o más de las siguientes propiedades:

La temperatura de transición vítreo del polímero debe tener una temperatura de no menos de aproximadamente 10-15°C más baja que la temperatura de transición vítreo del Compuesto 1. Preferiblemente, la temperatura de transición vítreo del polímero es mayor que la temperatura de transición vítreo del Compuesto 1 y, en general, al menos 50°C más alta que la temperatura de almacenamiento deseada del medicamento. 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 mayor.

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

El polímero debe tener una solubilidad similar o mejor en disolventes adecuados para los procesos de secado por pulverización con relación al del Compuesto 1. En aspectos preferidos, el polímero se disuelve en uno o más de los mismos disolventes o sistemas de disolventes como el Compuesto 1. Se prefiere que el polímero sea soluble en al menos un disolvente que contiene no-hidroxi tal como cloruro de metileno, acetona, o una combinación de los mismos.

El polímero, cuando se combina con el Compuesto 1, por ejemplo en una dispersión sólida o en una suspensión líquida, debería aumentar la solubilidad del Compuesto 1 en medios acuosos y fisiológicamente relativos ya sea con respecto a la solubilidad del Compuesto 1 en ausencia de polímero o en relación con la solubilidad del Compuesto 1 cuando se combina con un polímero de referencia. Por ejemplo, el polímero podría aumentar la solubilidad del Compuesto 1 amorf mediante la reducción de la cantidad de Compuesto 1 amorf que convierte a Compuesto 1 cristalino, ya sea desde una dispersión sólida amorf o desde una suspensión líquida.

El polímero debe disminuir la velocidad de relajación de la sustancia amorfá.

El polímero debe aumentar la estabilidad física y/o química del Compuesto 1.

5 El polímero debería mejorar la capacidad de fabricación del Compuesto 1.

El polímero debe mejorar una o más de las propiedades de manipulación, administración o almacenamiento del Compuesto 1.

10 El polímero no debe interactuar desfavorablemente con otros componentes farmacéuticos, por ejemplo, excipientes.

15 La idoneidad de un polímero de candidato (u otro componente) se puede probar usando los métodos de secado por aspersión (u otros métodos descritos en este documento) para formar una composición amorfá. La composición de candidato puede compararse en términos de estabilidad, la resistencia a la formación de cristales, u otras propiedades, y se comparó con una preparación de referencia, por ejemplo, una preparación de Compuesto 1 amoro puro o el Compuesto 1 cristalino. Por ejemplo, una composición candidato podría ser probada para determinar si inhibe el tiempo de aparición de disolvente mediada por cristalización, o el porcentaje de conversión en un momento dado en condiciones controladas, por al menos 50%, 75%, 100%, o 110%, así como la preparación de referencia, o una composición candidato podría ser analizada para determinar si ha mejorado la biodisponibilidad o la solubilidad relativa a Compuesto 1 cristalino.

Surfactantes

25 Una dispersión sólida u otra composición puede incluir un agente surfactante. Un surfactante o mezcla de surfactante en general disminuiría la tensión interfacial entre la dispersión sólida y un medio acuoso. Un surfactante adecuado o mezcla surfactante adecuada superficie también podría mejorar la solubilidad acuosa y la biodisponibilidad del Compuesto 1 a partir de una dispersión sólida. Los surfactantes para su uso en conexión con la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, ésteres de sorbitán de ácidos grasos (por ejemplo, Spans®, 30 ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno (por ejemplo, Tweens®), sulfato de laurilo de sodio (SLS), dodecilbenceno de sodio sulfonato (DBSS) dioctilsulfosuccinato de sodio (docusato), sal sódica del ácido dioxícolico (DOSS), monoestearato de sorbitán, triestearato de sorbitán, bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HTAB), sodio N-Lauroilsarcosina, oleato de sodio, sodio de miristilo, estearato de sodio, sodio palmitato, gelucire 44/14, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), la vitamina E d-alfa tocoferol polietileno glicol 1000 succinato (TPGS), lecitina, 35 677-692 MW, monohidrato monosódico de ácido glutámico, labrasol, PEG 8 glicéridos caprílico/cáprico, Transcutol, éter monoetilo dietilenglicol, Solutol HS-15, polietilenglicol/hidroxiestearato, ácido taurocólrico, Pluronic F68, Pluronic F108, y Pluronic F127 (o cualesquiera otros co-polímeros de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronics) o glicéridos poliglicolizados saturados (Gelucirs®)). Un ejemplo específico de tales surfactantes que pueden ser utilizados en conexión con esta invención incluyen, pero no se limitan a Span 65, Span 25, Tween 20, Capryol 90, Pluronic F108, 40 sulfato de laurilo de sodio (SLS), la vitamina E TPGS, Pluronics y copolímeros. SLS se prefiere generalmente.

45 La cantidad del agente surfactante (por ejemplo, SLS) con respecto al peso total de la dispersión sólida puede estar entre 0,1 a 15%. Preferiblemente, es de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10%, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5%, por ejemplo, aproximadamente 0,5 a 4%, aproximadamente 0,5 a 3%, aproximadamente 0,5 a 2%, aproximadamente 0,5 a 1%, o aproximadamente 0,5%.

50 En ciertas realizaciones, la cantidad del agente surfactante con respecto al peso total de la dispersión sólida es al menos aproximadamente 0,1%, preferiblemente de aproximadamente 0,5%. En estas realizaciones, el surfactante está presente en una cantidad de no más de aproximadamente 15%, y preferiblemente no más de aproximadamente 12%, aproximadamente 11%, aproximadamente 10%, aproximadamente 9%, aproximadamente 8%, aproximadamente 7%, aproximadamente 6%, aproximadamente 5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 3%, aproximadamente 2% o aproximadamente 1%. Se prefiere una realización en la que el surfactante está en una cantidad de aproximadamente 0,5% en peso.

55 Los surfactantes candidatos (u otros componentes) se pueden probar para determinar su idoneidad para su uso en la invención de una manera similar a la descrita para los polímeros de prueba.

Usos, Formulación y Administración

60 *Composiciones farmacéuticamente aceptables*

65 En la presente se divulan composiciones farmacéuticamente aceptables, en el que estas composiciones comprenden Forma A de Compuesto 1 como se describe en el presente documento, y comprenden opcionalmente un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, estas composiciones comprenden además opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Como se describió anteriormente, las composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención, además, comprende un vehículo, adyuvante o vehículo farmacéuticamente, que, como se usa aquí, incluye cualquiera y todos los disolventes, diluyentes, u otro vehículo líquido, dispersión o auxiliares de suspensión, agentes surfactantes, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, adecuado para la forma de dosificación particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) da a conocer diversos portadores utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para su preparación. Excepto en tanto que cualquier medio portador convencional es incompatible con los compuestos de la invención, tales como mediante la producción de cualquier efecto biológico indeseable o de otro modo interactúa de manera perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéuticamente aceptable, estando su uso contemplado dentro del alcance de esta invención. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, esteárate de aluminio, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sóblico, o sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato disódico, fosfato potásico de hidrógeno, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros de polietileno-polioxipropileno de bloques, grasa de lana, azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón; aceite de cártamo; aceite de sésamo; aceite de oliva; aceite de maíz y aceite de soja; glicoles; tal propilenglicol o polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio tamponantes; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico, y tampón de fosfato de soluciones, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos tales como sulfato de lauril sódico y esteárate de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes pueden también estar presente en la composición, según el juicio del formulador.

30 *Usos de compuestos y composiciones faracéuticamente aceptables*

En la presente se divulga un método de tratamiento de una afección, enfermedad, o trastorno implicado por RTFQ. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una composición que comprende una forma en estado sólido de la Forma A de Compuesto 1 para uso en un método de tratamiento de una afección, enfermedad, o trastorno implicado por una deficiencia de la actividad de RTFQ, el método comprende la administración de una composición que comprende una forma en estado sólido de la Forma A de Compuesto 1 descrito en este documento a un sujeto, preferiblemente un mamífero, en necesidad del mismo.

Una "enfermedad mediada por RTFQ", como se usa en el presente documento es una enfermedad seleccionada de la fibrosis quística, el asma, el humo inducido por la EPOC, bronquitis crónica, rinosinusitis, estreñimiento, pancreatitis, insuficiencia pancreática, la infertilidad masculina causada por la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes (ABCCD), enfermedad pulmonar leve, pancreatitis idiopática, aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA), enfermedad hepática, enfisema hereditario, hemocromatosis hereditaria, deficiencias de coagulación-fibrinolisis, deficiencia de proteína C, angioedema hereditario de tipo 1, deficiencias de procesamiento de lípidos, hipercolesterolemia familiar, quilomicronemia de tipo 1, abetalipoproteinemia, enfermedades de almacenamiento lisosomal, enfermedad/pseudo-Hurler de células I, mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar II de tipo II, poliendocrinopatía/hiperinsulinemia, diabetes mellitus, enanismo de Laron, deficiencia de mieloperoxidasa, hipoparatiroidismo primario, melanoma, glucanosis CDG de tipo 1, hipertiroidismo congénito, osteogénesis imperfecta, hipofibrinogenemia hereditaria, deficiencia de ACT, diabetes insípida (DI), neurohipofisísis DI, DI nefrogénica, síndrome de Charcot-Marie Tooth, enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, plasy progresiva supranuclear, enfermedad de Pick, varios trastornos neurológicos de la poliglutamina, enfermedad de Huntington, ataxia espinocerebelosa de tipo I, atrofia muscular espinal y bulbar, palidoluisiana dentatorubal, distrofia miotónica, encefalopatías espongiformes, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob hereditaria (debido al defecto de procesamiento de proteína priónica), la enfermedad de Fabry, síndrome de Gerstmann-Sträussler Scheinker, EPOC, enfermedad del ojo seco, enfermedad de Sjogren, osteoporosis, osteopenia, síndrome de Gorham, cloruro de canalopatías, miotonía congénita (formas Thomson y Becker), síndrome de Bartter de tipo III, enfermedad de Dent, hiperekplexia, epilepsia, hiperekplexia, enfermedad de almacenamiento lisosomal, síndrome de Angelman, discinesia ciliar primaria (DCP), trastornos hereditarios de la estructura y/o función de los cilios, PCD con situs inverso (también conocido como síndrome de Kartagener), PCD sin situs inverso, o aplasia ciliar.

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de una enfermedad mediada por RTFQ en un ser humano que comprende la etapa de administrar a dicho ser humano una cantidad eficaz de una composición que comprende la Forma A de Compuesto 1 descrita en el presente documento.

De acuerdo con una realización preferida alternativa, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de la fibrosis quística en un ser humano que comprende la etapa de administrar a dicho ser humano una composición que comprende una Forma A del Compuesto 1 que se describe aquí.

5 De acuerdo con la divulgación una "cantidad eficaz" de la Forma A de Compuesto 1 o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo es la cantidad eficaz para tratar o reducir la gravedad de cualquiera de las enfermedades citadas anteriormente.

10 La Forma A de Compuesto 1 o una composición farmacéuticamente aceptable de la misma se puede administrar usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para tratar o disminuir la gravedad de una o más de las enfermedades citadas anteriormente.

15 En ciertas realizaciones, la forma A de Compuesto 1 aquí descrita o una composición farmacéuticamente aceptable de la misma es útil para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en los pacientes que presentan actividad RTFQ residual en la membrana apical de los epitelios respiratorio y no respiratorio. La presencia de actividad RTFQ residual en la superficie epitelial se puede detectar fácilmente usando métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, electrofisiológicos estándares, bioquímicos, o técnicas histoquímicas. Tales métodos identifican actividad RTFQ utilizando técnicas electrofisiológicas *in vivo* o *ex vivo*, la medición de sudor o concentraciones salivales Cl⁻, o técnicas bioquímicas o histoquímicas *ex vivo* para controlar la densidad de la superficie celular. El uso de tales métodos, la actividad RTFQ residual se puede detectar fácilmente en pacientes heterocigotos o homocigotos para una variedad de diferentes mutaciones, incluyendo pacientes homocigotos o heterocigotos para la mutación más común, ΔF508, así como otras mutaciones tales como la mutación G551D, o la mutación R117H.

20 25 En una realización, la forma A de Compuesto 1 o el Compuesto 1 amorfos descritos en la presente o una composición farmacéuticamente aceptable de los mismos es útil para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en los pacientes dentro de ciertos genotipos que presentan actividad RTFQ residual, por ejemplo, mutaciones de clase III (regulación alterada o gating), las mutaciones de clase IV (conductancia alterada), o mutaciones de clase V (reducción de la síntesis) (R. Lee Kang-Choo, Pamela L., Zeitlin, Tipo I, II, III, IV, y la fibrosis quística reguladora de la conductancia transmembrana de defectos V y oportunidades de la terapia; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6: 521 - 529, 2000). Otros genotipos de pacientes que exhiben actividad RTFQ residual incluyen pacientes homocigotos para una de estas clases o heterocigotos con cualquier otra clase de mutaciones, incluyendo mutaciones de clase I, mutaciones de clase II, o una mutación que carece de clasificación.

30 35 En una realización, La forma A de Compuesto 1 o el Compuesto 1 amorfos descritos en la presente o una composición farmacéuticamente aceptable de la misma es útil para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística en los pacientes dentro de ciertos fenotipos clínicos, por ejemplo, un fenotipo clínico moderado a leve que por lo general se correlaciona con la cantidad de actividad RTFQ residual en la membrana apical de los epitelios. Tales fenotipos incluyen pacientes que presentan insuficiencia pancreática o pacientes con diagnóstico de 40 pancreatitis idiopática y la ausencia bilateral congénita de los conductos deferentes, o enfermedad pulmonar leve.

45 50 55 La cantidad exacta requerida variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la especie, edad, y condición general del sujeto, la gravedad de la infección, el agente particular, su modo de administración, y similares. Los Compuestos de la invención se formulan preferiblemente en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La expresión "forma de unidad de dosificación" tal como se utiliza aquí, se refiere a una unidad físicamente discreta de agente apropiado paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención será decidido por el médico asistente dentro del alcance del juicio médico. El nivel de dosis eficaz específica para cualquier paciente u organismo particular dependerá de una variedad de factores incluyendo el trastorno a tratar y la gravedad del trastorno; la actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; edad, peso corporal, salud general, sexo y dieta del paciente; tiempo de administración, vía de administración, y velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. El término "paciente" o "sujeto", como se usa aquí, significa un animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un humano.

60 Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, ungüentos, o gotas), bucal, como pulverización oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la infección que se está tratando. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral o parenteral a niveles de dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg y preferiblemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, de peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

65 En ciertas realizaciones, la cantidad de dosis de la Forma A de Compuesto 1 o el Compuesto 1 amorfos en

la forma unitaria de dosificación es de 100 mg a 1.000 mg. En otra realización, la cantidad de dosis de la Forma A de Compuesto 1 es de 200 mg a 900 mg. En otra realización, la cantidad de dosis de la Forma A de Compuesto 1 es de 300 mg a 800 mg. En otra realización, la cantidad de dosis de la Forma A de Compuesto 1 es de 400 mg a 700 mg. En otra realización, la cantidad de dosis de la Forma A de Compuesto 1 es de 500 mg a 600 mg.

5 Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución inyectable, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente no tóxico parenteralmente aceptable o disolvente, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como medio disolvente o de suspensión. Para este propósito cualquier aceite fijo suave puede ser empleado incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como ácido oleico se usan en la preparación de inyectables.

10 15 Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

20 25 Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de esta invención con excipientes o portadores no irritantes adecuados tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de suppositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y por lo tanto se fundirán en el recto o la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

30 35 40 Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o vehículo inerte, farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) rellenos o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa, y acacia, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgragantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la disolución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, sulfato de laurilo de sodio, y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes tamponantes.

45 50 55 Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina llenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberen el ingrediente activo solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como cargas en cápsulas de gelatina llenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

60 65 Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se indicó anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos de liberación controlada y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. En tales formas de dosificación sólida el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes de compresión y otros adyuvantes para un estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes tamponantes. Pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y también pueden ser de una composición tal que liberen el ingrediente activo solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse, incluyen sustancias poliméricas y ceras.

70 También se apreciará que la Forma A de Compuesto 1 se describe en el presente documento o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo se pueden emplear en terapias de combinación, es decir, la Forma A de Compuesto 1 se puede administrar simultáneamente con, antes de, o después de, uno o más otros

agentes terapéuticos o procedimientos médicos deseados. La combinación particular de terapias (agentes terapéuticos o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación tendrá en cuenta la compatibilidad de los agentes terapéuticos deseados y/o procedimientos y el efecto terapéutico deseado a alcanzarse. También se apreciará que las terapias empleadas pueden lograr un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto de la invención puede administrarse simultáneamente con otro agente usado para tratar el mismo trastorno), o pueden conseguir diferentes efectos (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso). Tal como se usa en el presente documento, los agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar o prevenir una enfermedad particular, o condición, son conocidos como "apropiados para la enfermedad, o condición, que se está tratando".

En una realización, el agente adicional se selecciona de un agente mucolítico, broncodilatador, un antibiótico, un agente anti-infeccioso, un agente anti-inflamatorio, un modulador RTFQ que no sea un compuesto de la presente invención, o un agente nutricional.

En una realización, el agente adicional es ácido benzoico 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)-ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-ilo). En otra realización, el agente adicional es N-(5-hidroxi-2,4-diterbutilfenilo)-4-oxo-1H-quinolina-3-carboxamida. En otra realización, el agente adicional se selecciona de la Tabla 1:

Tabla 1.

1	2	3
4	5	6
7	8	9
10	11	12

20

25

30

35

40

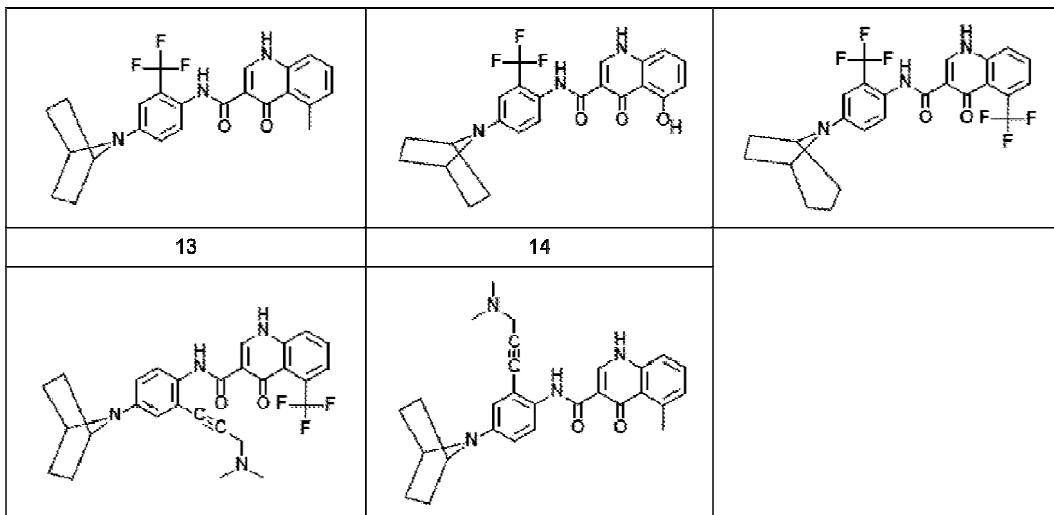
45

50

55

60

65



En otra realización, el agente adicional es cualquier combinación de los agentes anteriores. Por ejemplo, la composición puede comprender compuesto 1, 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-ilo)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridina-2-ilo)ácido benzoico, y N-(5-hidroxi-2,4-di-ter-butilo-fenilo)-4-oxo-1H-quinolina-3-carboxamida. En otro ejemplo, la composición puede comprender compuesto 1, N-(5-hidroxi-2,4-di-ter-butilo-fenilo)-4-oxo-1H-quinolina-3-carboxamida, y uno cualquiera de los compuestos de la Tabla 1, es decir, compuestos 1 a 14 de la Tabla 1, o cualquier combinación de los mismos.

En una realización, el agente terapéutico adicional es un antibiótico. Antibióticos ejemplares útiles en este documento incluyen tobramicina, incluyendo tobramicina inhalada en polvo (TIP), azitromicina, aztreonam, incluyendo la forma de pulverización de aztreonam, amikacina, incluyendo formulaciones liposomales de los mismos, ciprofloxacina, incluyendo sus formulaciones adecuadas para la administración por inhalación, levoflaxacina, incluyendo formulaciones en aerosol y combinaciones de dos antibióticos, por ejemplo, la fosfomicina y tobramicina.

En otra realización, el agente adicional es un mucolito. Mucolitos ejemplares útiles en este documento incluyen Pulgarmozyme®.

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

En otra realización, el agente adicional es eficaz en la restauración del líquido de superficie de vías respiratorias pulmonares. Tales agentes mejoran la circulación de sal en y fuera de las células, permitiendo que el moco en las vías respiratorias del pulmón sea más hidratado y, por lo tanto, se aclaró con más facilidad. Los ejemplos de tales agentes incluyen la solución salina hipertónica, de tetrasodio denufosol ([[(3S, 5R)-5-(4-amino-2-oxopirimidina-1-ilo)-3-hidroxioxolano-2-ilo] metoxi-hidroxifosforilo][[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(2,4-dioxopirimidina-1-ilo)-3, 4-dihidroxioxolan-2-ilo] metoxi-hidroxifosforilo] oxi-hidroxifosforilo] fosfato de hidrógeno), o bronchitol (formulación inhalada de manitol).

En otra realización, el agente adicional es un agente anti-inflamatorio, es decir, un agente que puede reducir la inflamación en los pulmones. Los ejemplos de tales agentes útiles en esta invención incluyen ibuprofeno, ácido docosahexanoico (DHA), sildenafil, glutatión inhalado, pioglitazona, hidroxicloroquina, o simavastatina.

En otra realización, el agente adicional es un modulador de RTFQ diferente de la Forma I de Compuesto 1, es decir, un agente que tiene el efecto de modular la actividad de RTFQ. Los ejemplos de tales agentes incluyen ataluren ("PTC124®"; 3-[5-(2-fluorofenilo)-1,2,4-oxadiazol-3-ilo]benzoico), sinapultida, lancovutida, depelestat (un inhibidor de elastasa neutrófilo humano recombinante), cobiprostona (7-{(2R, 4aR, 5R, 7aR)-2-[(3S)-1,1-difluoro-3-metilpentilo]-2-hidroxi-6-oxooctahidrociclopenta[b]pirano-5-ilo}heptanoico), y N-(5-hidroxi-2,4-di-ter-butilo-fenilo)-4-oxo-1H-quinolina-3-carboxamida.

En otra realización, el agente adicional es un agente nutricional. Agentes nutricionales ejemplares incluyen pancrelipasa (reemplazo enzimático pancreática), incluyendo Pancrease®, Pancreacarb®, Ultrase®, o Creon®, Liprotomase® (anteriormente, Trizytek®), Aquadeks®, o la inhalación de glutatión. En una realización, el agente nutricional adicional es pancrelipasa.

En otra realización, el agente adicional es un compuesto seleccionado de gentamicina, curcumina, ciclofosfamida, 4-fenilbutirato, miglustato, felodipino, nimodipino, filoxina B, genistein, apigenina, moduladores cAMP/cGMP como rolipram, sildenafilo, milrinona, tadalafilo, amrinona, isoproterenol, albuterol, y almeterol, desoxiespergualina, inhibidores de HSP 90, inhibidores de HSP 70, proteosoma como epoxomicina, lactacistina, etc.

En otra realización, el agente adicional es un compuesto descrito en el documento WO 2004028480, WO 2004110352, WO 2005094374, WO 2005120497 o WO 2006101740.

En otra realización, el agente adicional es un derivado benzo(c)quinolizino que muestra una actividad de modulación de RTFQ o un derivado de benzopirano que presenta actividad de modulación de RTFQ.

En otra realización, el agente adicional es un Compuesto descrito en US7202262, US6992096, US20060148864, US20060148863, US20060035943, US20050164973, WO2006110483, WO2006044456, WO2006044682, WO2006044505, WO2006044503, WO2006044502, o WO2004091502.

En otra realización, el agente adicional es un compuesto descrito en WO2004080972, WO2004111014, WO2005035514, WO2005049018, WO2006099256, WO2006127588, o WO2007044560.

Estas combinaciones son útiles para tratar las enfermedades descritas en el presente documento incluyendo la fibrosis quística. Estas combinaciones son también útiles en los kits descritos en este documento.

La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de esta invención no será más que la cantidad que normalmente se administraría en una composición que comprende ese agente terapéutico como el único agente activo. Preferiblemente, la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones actualmente descritas variará de aproximadamente 50% a 100% de la cantidad normalmente presente en una composición que comprende ese agente como el único agente terapéuticamente activo.

La Forma A del Compuesto 1 y la forma amorfa descritas aquí o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo también se puede incorporar en composiciones para el recubrimiento de un dispositivo médico implantable, tales como prótesis, válvulas artificiales, injertos vasculares, stents y catéteres. De acuerdo con ello, la presente invención, en otro aspecto, incluye una composición para recubrir un dispositivo implantable que comprende Forma A de Compuesto 1 o la Forma A de Compuesto 1 y la forma amorfa se describe en el presente documento o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo, y en clases y subclases aquí, y un vehículo adecuado para el recubrimiento de dicho dispositivo implantable. En otro aspecto más, la presente descripción incluye un dispositivo implantable recubierto con una composición que comprende Forma A de Compuesto 1 o Forma A de Compuesto 1 y la forma amorfa se describe en el presente documento o una composición farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo adecuado para el recubrimiento de dicho dispositivo implantable. Los recubrimientos adecuados y la preparación general de dispositivos implantables revestidos se describen en las patentes US 6.099.562; 5.886.026; y 5.304.121. Los recubrimientos son típicamente materiales poliméricos biocompatibles tales como un polímero de hidrogel, polimetildisiloxano, policaprolactona, polietilenglicol, ácido poliláctico, acetato de etileno de vinilo, y mezclas de los mismos. Los recubrimientos pueden estar opcionalmente cubiertos además por una capa superior adecuada de fluorosilicona, polisacáridos, polietilenglicol, fosfolípidos o combinaciones de los mismos para impartir características de liberación controlada en la composición.

A fin de que la invención aquí descrita pueda ser entendida más completamente, los siguientes ejemplos se exponen. Se debe entender que estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no se deben interpretarse como limitantes de esta invención de ninguna manera. La invención se define en la reivindicación adjunta.

EJEMPLOS

Métodos y materiales

Calorimetría diferencial modulada de barrido (MDSC) y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se utilizó la calorimetría diferencial de barrido modulada (MDSC) para probar la temperatura de transición vítreo de la forma amorfa y se secó por pulverización la dispersión de un compuesto. Se utilizó calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar el punto de fusión de los materiales cristalinos y de discriminar entre diferentes polimorfos. Los datos fueron recolectados a través de un calorímetro diferencial de barrido TA DSC Q2000 (TA Instruments, New Castle, DE). El instrumento se calibró con indio. Muestras de aproximadamente 1-5 mg se pesaron en los moldes herméticos de aluminio que fueron plegados utilizando tapas con un agujero. Para MDSC las muestras se escanearon desde -20°C a 220°C en tasa de calentamiento 2°C/minuto con modulación +/- 1°C cada 60 segundos. Para DSC, las muestras se escanearon desde 25°C a 220°C a una tasa de calentamiento de 10°C/min. Los datos fueron recolectados por el software Thermal Advantage Q Series™ (versión: 2.7.0.380) y se analizaron mediante el software de análisis universal (versión: 4.4A, constructo: 4.4.0.5) (TA Instruments, New

Castle, DE).

XRPD (Difracción de Polvo de rayos X)

5 Difracción de Polvo de Rayos X se utilizó para caracterizar la forma física de los lotes producidos hasta la fecha y para caracterizar diferentes polimorfos identificados. Los datos de XRPD de un compuesto se recogieron en un PANalytical X'pert Pro X-ray Diffractometer (Almelo, Países Bajos). El patrón de XRPD se registró a temperatura ambiente con radiación de cobre (1,54060 Å). La radiografía se ha generado utilizando tubo sellado Cu a 45 kV, 40 mA con un filtro de supresión de níquel K β . La óptica de haz incidente se compone de una divergencia variable de hendidura para asegurar una longitud iluminada constante sobre la muestra y en el lado de haz difractado; un detector de estado sólido lineal rápido se utilizó con una longitud activa de 2,12 grados 2 theta medidos en el modo de exploración. La muestra de polvo estaba llena en el área dentada de un titular de silicio de fondo de cero y el hilado se realizó para lograr mejores estadísticas. Una exploración simétrica se midió a partir de 4 - 40 grados 2 theta con un tamaño de paso de 0,017 grados y un tiempo de paso de exploración de 15,5 segundos. El software de recopilación de datos es X'pert Data Collector (versión 2.2e). El software de análisis de datos es X'pert Data Viewer (versión 1.2d) o X'pert Highscore (versión: 2.2c).

Análisis termogravimétrico (TGA)

20 TGA se utilizó para investigar la presencia de disolventes residuales en los lotes que se caracterizan, e identificar la temperatura a la que ocurre la descomposición de la muestra. Datos TGA se recogieron en un Analizador Termogravimétrico TA Q500 (TA Instruments, New Castle, DE). Una muestra con peso de aproximadamente 2-5 mg se escaneó de 25°C a 300°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min. Los datos fueron recolectados por el software Thermal Advantage Q Series™ (versión 2.5.0.255) y se analizaron mediante el software de análisis universal (versión 4.4A, constructo 4.4.0.5) (TA Instruments, New Castle, DE).

Forma A de Compuesto 1 determinación de estructura cristal único

30 Los datos de difracción fueron adquiridos en difractómetro Bruker Apex II equipado con tubo sellado de fuente Cu K α y un detector CCD Apex II. La estructura se resolvió y se refinó mediante el programa SHELX (Sheldrick, G. M., Acta Cryst., (2008) A64, 112-122). Sobre la base de las estadísticas de intensidades y ausencias sistemáticas, la estructura se resolvió y se refinó en el grupo espacial C2. La configuración absoluta se determinó utilizando difracción anómala. El parámetro de Flack se refinó a 0,00 (18) que indica que el modelo representa el enantiómero correcto [(R)].

35 RMN de estado sólido

40 RMN de estado sólido se llevó a cabo en un espectrómetro de calibre ancho 400 MHz de Bruker-Biospin equipado con una sonda Bruker-Biospin 4 mm HFX. Las muestras se envasaron en rotores de ZrO₂ de 4 mm y se centrifugan bajo condición Magic Angle Spinning (MAS) con una velocidad de giro de 12,5 kHz. El tiempo de relajación de protones se midió utilizando experimento de relajación de recuperación de saturación ¹H MAS T₁ con el fin de establecer retardo de reciclaje adecuado del experimento MAS de polarización cruzada ¹³C (CP). El tiempo de contacto CP del experimento CPMAS de carbono se ajusta a 2 ms. Un pulso de protones CP con rampa lineal (de 50% a 100%) se empleó. La combinación Hartmann-Hahn se optimizó en muestra de referencia externa (glicina). El espectro de flúor MAS fue grabado con desacoplamiento de protones. La secuencia de desacoplamiento TPPM15 se utilizó con la intensidad de campo de aproximadamente 100 kHz tanto para adquisiciones ¹³C como ¹⁹F.

45 Vitride® (de sodio y bis (2-metoxietoxi) aluminio [o NaAlH₂ (OCH₂CH₂OCH₃)₂], 65 % en peso solución en tolueno) se adquirió de Aldrich Chemicals.

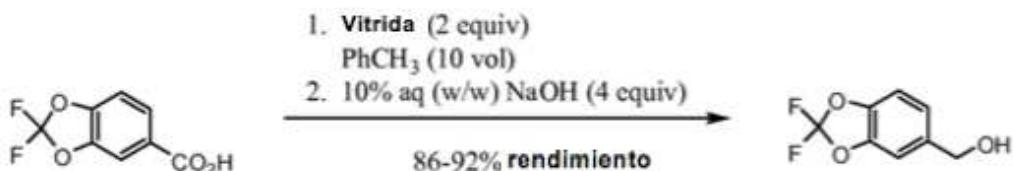
50 2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ácido carboxílico se adquirió de Saltigo (una filial de la Lanxess Corporation).

55 En cualquier parte de la presente solicitud, en la que el nombre de un compuesto no describa correctamente la estructura del Compuesto, la estructura reemplaza el nombre y gobierna.

Síntesis del Compuesto 1

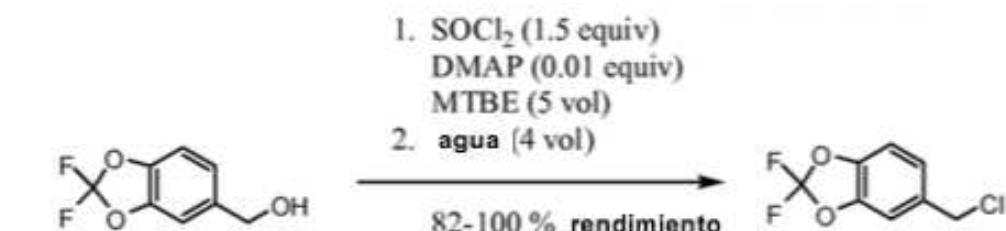
Resto de ácido

60 **Síntesis de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-metanol.**



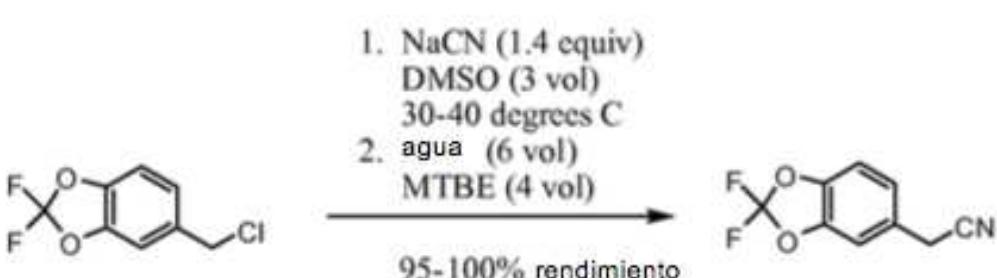
10 2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ácido carboxílico comercialmente disponible (1,0 eq) se suspendió en tolueno (10 vol). Se añade Vitride® (2 eq) a través de un embudo de adición a una tasa para mantener la temperatura a 15-25°C. Al final de la adición la temperatura se aumenta a 40°C durante 2 h, después 10% (en peso) aq. Se añadió cuidadosamente NaOH (4,0 eq) a través de un embudo de adición manteniendo la temperatura a 40-50°C. Después de agitarse durante 30 minutos, 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 (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró para proporcionar (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-metanol crudo que se utiliza directamente en la siguiente etapa.

15 Síntesis de 5-clorometilo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol.



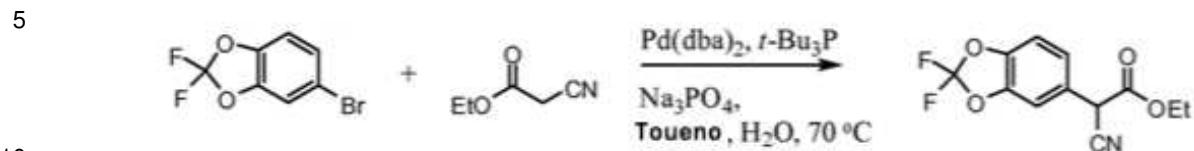
25 30 35 40 45 Una solución de 2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo-metanol (1,0 eq) se disuelve en MTBE (5 vol). Se añade una cantidad catalítica de DMAP (1% en moles) y se añade SOCl₂ (1,2 eq) a través de un embudo de adición. El SOCl₂ se añade a una tasa para mantener la temperatura en el reactor a 15-25°C. La temperatura se aumenta a 30°C durante 1 hora y después se enfrió a 20°C y después se añade agua (4 vol) a través de un embudo de adición manteniendo la temperatura a menos de 30°C. Después de agitarse durante 30 minutos, las capas se dejaron separar. La capa orgánica se agitó y 10% (peso/volumen) aq. se añade NaOH (4,4 vol). Después de agitarse durante 15 a 20 minutos, las capas se dejaron separar. La fase orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró, y se concentró para proporcionar 5-clorometilo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol crudo que se utiliza directamente en la siguiente etapa.

50 Síntesis de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-acetonitrilo.



60 Una solución de 5-clorometilo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol (1 eq) en DMSO (1,25 vol) se añadió a una suspensión de NaCN (1,4 eq) en DMSO (3 vol) manteniendo la temperatura entre 30-40°C. La mezcla se agitó durante 1 hora y después con agua (6 vol) se añade seguido por MTBE (4 vol). Después de agitarse durante 30 min, las capas se separan. La capa acuosa se extrae con MTBE (1,8 vol). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con agua (1,8 vol), se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró para dar (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-acetonitrilo crudo (95%) que se usa directamente en el siguiente paso. ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 7,44 (br s, 1H), 7,43 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,22 (dd, J = 8,2, 1,8 Hz, 1H), 4,07 (s, 2H).

Síntesis de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-1-acetato de etilo-acetonitrilo



En un reactor se purga con nitrógeno y se cargó con 900 ml de tolueno. El disolvente se desgasifica mediante burbujeo de nitrógeno durante no menos de 16 h. Al reactor se cargó entonces Na_3PO_4 (155,7 g, 949,5 mmol), seguido de bis(dibencilidenoacetona) paladio (0) (7,28 g, 12,66 mmol). Una solución de 10% en peso de terc-butilfosfina en hexanos (51,23 g, 25,32 mmol) se cargó sobre 10 min a 23°C de un embudo de adición de nitrógeno purgado. La mezcla se dejó en agitación durante 50 min, momento en el que se añadió 5-bromo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol (75 g, 316,5 mmol) durante 1 min. Después de agitarse durante 50 minutos adicionales, la mezcla se cargó con cianoacetato de etilo (71,6 g, 633,0 mmol) durante 5 min seguido de agua (4,5 ml) en una porción. La mezcla se calentó a 70°C durante 40 min y se analizó por HPLC cada 1-2 h para el porcentaje de conversión del reactivo en el producto. Después, se observó la conversión completa (típicamente 100% de conversión 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 orgánicos combinados se concentraron a 300 ml a vacío a 60 - 65°C. El concentrado se cargó con 225 ml de DMSO y se concentró a vacío a 70-80°C hasta que cesó la destilación del disolvente activo. La solución se enfrió a 20-25°C y se diluyó a 900 ml con DMSO en la preparación para el Paso 2.

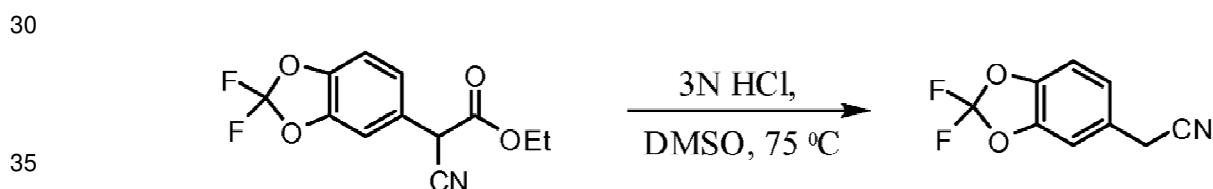
20

25

La solución se enfrió a 20-25°C y se diluyó a 900 ml con DMSO en la preparación para el Paso 2.

^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 7.16 a 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-ilo)-acetonitrilo.



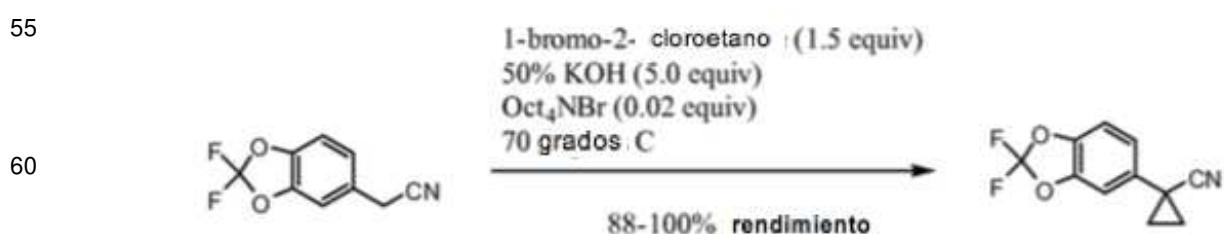
40

45

50

La solución de DMSO de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-1-acetato de etilo-acetonitrilo de arriba se cargó con 3 N HCl (617,3 ml, 1,85 mol) durante 20 min mientras se mantenía una temperatura interna <40°C. La mezcla se calentó después a 75°C durante 1 h y se analizó por HPLC cada 1-2 h para el % de conversión. Cuando se observó una conversión de > 99% (típicamente después de 5 a 6 h), la reacción se enfrió a 20 -25°C y se extrajo con MTBE (2 X 525 ml), con el tiempo suficiente para permitir la separación de fases completa durante las 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 1,5 - 2,5 Torr que estaba equipado con un matraz receptor enfriado. La solución se concentró a vacío a <60°C para eliminar los disolventes. (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-acetonitrilo se destila a partir del aceite resultante a 125-130°C (temperatura del horno) y 1,5 a 2,0 Torr. (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-acetonitrilo se aisló como un aceite claro con un rendimiento del 66% a partir de 5-bromo-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol (2 pasos) y con una pureza HPLC de 91,5% AUC (corresponde al ensayo en peso de 95%). ^1H RMN (500 MHz, DMSO) δ 7,44 (br s, 1H), 7,43 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7,22 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 1H), 4,07 (s, 2H).

Síntesis de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-ciclopropanocarbonitrilo.



eq) 1-bromo-2-cloroetano (1,5 eq) y Oct₄NBr (0,02 eq) se calienta a 70°C durante 1 h. La mezcla de reacción se enfriá a continuación se trató con MTBE y agua. La fase orgánica se lava con agua y salmuera, después se elimina el disolvente para producir (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo. ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 7,43 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,40 (d, J = 1,9 Hz, 1H), 7,30 (dd, J = 8,4, 1,9 Hz, 1H), 1,75 (m, 2H), 1,53 (m, 2H).

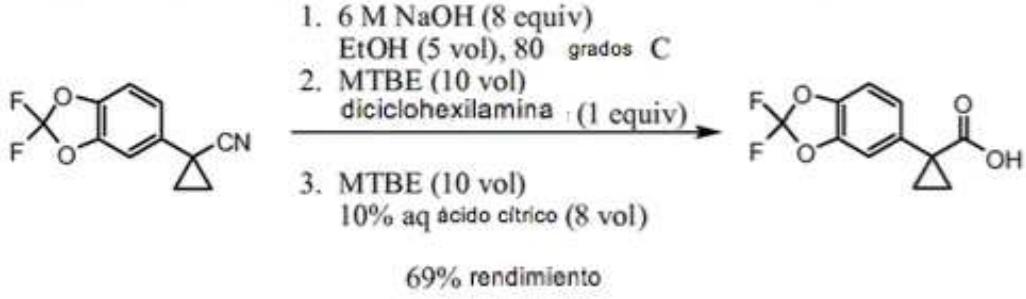
5

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

10

15

20



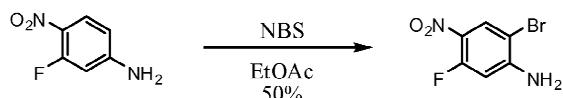
(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo se hidroliza utilizando 6 M NaOH (8 equiv) en etanol (5 vol) a 80°C durante la noche. La mezcla se enfriá a temperatura ambiente y el etanol se evapora al vacío. El residuo se recoge en agua y MTBE, se añadió 1 M HCl y se separan las capas. A continuación, la capa de MTBE se trató con diciclohexilamina (0,97 equiv). La suspensión se enfriá a 0°C, se filtró y se lavó con heptano para dar la sal DCHA correspondiente. La sal se toma en ácido cítrico MTBE y 10% y se agitó hasta que todos los sólidos se disuelven. Las capas se separaron y la capa de MTBE se lavó con agua y salmuera. Intercambio de disolvente a heptano seguido de filtración produce 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ácido ciclopropanocarboxílico, después de secarse en un horno de vacío a 50°C durante la noche. ESI-MS m/z calc. 242,04, encontrado 241,58 (M+1)⁺; ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 12,40 (s, 1H), 7,40 (d, J = 1,6 Hz, 1H), 7,30 (d, J = 8,3 Hz, 1H), 7,17 (dd, J = 8,3, 1,7 Hz, 1H), 1,46 (m, 2H), 1,17 (m, 2H).

Resto de amina

35

Síntesis de 2-bromo-5-fluoro-4-nitroanilina.

40



45

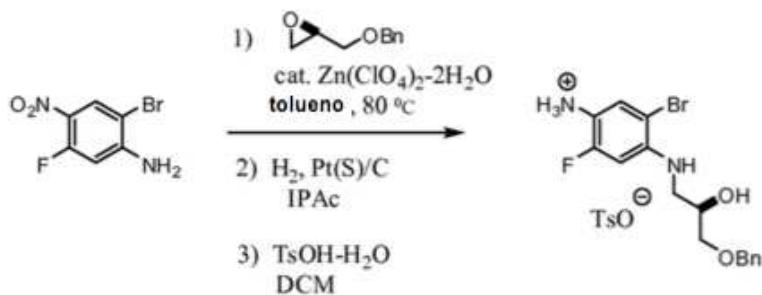
Un matraz se cargó con 3-fluoro-4-nitroanilina (1,0 equiv) seguido de acetato de etilo (10 vol) y se agita para disolver todos los sólidos. Se añadió N-bromosuccinimida (1,0 equiv) en porciones para mantener la temperatura interna de 22°C. Al final de la reacción, la mezcla de reacción se concentró a vacío en un rotavapor. El residuo se suspendió en agua destilada (5 vol) para disolver y eliminar la succinimida. (La succinimida también puede ser eliminada por un procedimiento de tratamiento de agua). Se decantó el agua y el sólido se suspendió en 2-propanol (5 vol) durante la noche. La suspensión resultante se filtró y la torta húmeda se lavó con 2-propanol, se secó en horno de vacío a 50°C durante la noche con N₂ sangrado hasta que se consiguió un peso constante. Se aisló un sólido marrón amarillento (rendimiento del 50%, 97,5% AUC). Otras impurezas eran un bromo-regiosímero (1,4% AUC) y un aducto de di-bromo (1,1% AUC). ¹H RMN (500 MHz, DMSO) δ 8,19 (1 H, d, J = 8,1 Hz), 7,06 (br. s, 2 H), 6,64 (d, 1 H, J = 14,3 Hz).

55

Síntesis de benciloglicolado-4-amonio-2-bromo-5-sal de tosilato fluoroanilina

60

65



Un matraz bien secado bajo N₂ se cargó con los siguientes: tamices moleculares activados en polvo 4A (50% en peso basado en 2-bromo-5-fluoro-4-nitroanilina), 2-Bromo-5-fluoro-4-nitroanilina (1,0 equiv), dihidrato perclorato de zinc (20% mol), y tolueno (8 vol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante NMT 30 min. Por último, (R)-éter de glicidilo de bencílo (2,0 equiv) en tolueno (2 vol) se añadió en un flujo constante. La reacción se calentó a 80°C (temperatura interna) y se agitó durante aproximadamente 7 horas o hasta 2-Bromo-5-fluoro-4-nitroanilina era <5% AUC.

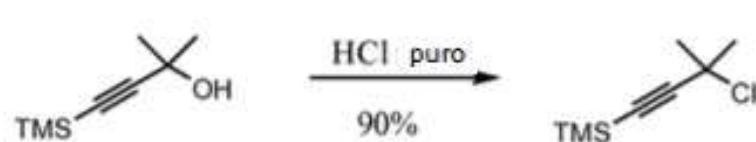
20 La reacción se enfrió a temperatura ambiente y Celite (50% en peso) se añadió, seguido por acetato de etilo (10 vol). La mezcla resultante se filtró para eliminar Celite y tamices y se lavó con acetato de etilo (2 vol). El filtrado se lavó con solución de cloruro de amonio (4 vol, 20% peso/volumen). La capa orgánica se lavó con solución de bicarbonato de sodio (4 vol x 2,5% peso/volumen). La capa orgánica se concentró a vacío en un evaporador rotatorio. La suspensión resultante se disolvió en acetato de isopropilo (10 vol) y esta solución se transfirió a un hidrogenador Buchi.

25 El hidrogenador se cargó con 5% en peso de Pt(S)/C (1,5% mol) y la mezcla se agitó bajo N₂ a 30°C (temperatura interna). La reacción se lavó abundantemente con N₂ seguido de hidrógeno. La presión de hidrogenador se ajustó a 1 bar de hidrógeno y la mezcla se agitó rápidamente (> 1200 rpm). Al final de la reacción, el catalizador se filtró a través de una almohadilla de Celite y se lavó con diclorometano (10 vol). El filtrado se concentró al vacío. Cualquier acetato de isopropilo restante fue perseguido con diclorometano (2 vol) y se concentró en un rotavapor hasta sequedad.

30 El residuo resultante se disolvió en diclorometano (10 vol). Se añadió p-toluenosulfónico monohidrato de ácido (1,2 equiv) y se agitó durante la noche. El producto se filtró y se lavó con diclorometano (2 vol) y se secó por succión. La torta húmeda se transfirió a bandejas de secado y en un horno de vacío y se secó a 45°C con N₂ sangrado hasta que se consiguió un peso constante. Benciloglicolado-4-amonio-2-bromo-5-sal de tosilato de fluoroanilina se aisló como un sólido de color blanquecino.

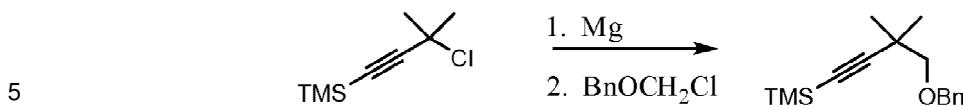
35 Se determinó que la pureza quirala era > 97%ee.

40 Síntesis de (3-cloro-3-metilbut-1-inilo)trimetilsilano.



55 El alcohol propargílico (1,0 equiv) se cargó a un recipiente. Se añadió ácido clorhídrico acuoso (37%, 3,75 vol) y se comenzó la agitación. Durante la disolución del alcohol sólido, se observa una endotermita modesta (5-6°C). La mezcla resultante se agitó durante la noche (16 h), poniéndose lentamente rojo oscuro. Un recipiente encamisado de 30 l se carga con agua (5 vol) que se enfriá a continuación a 10°C. La mezcla de reacción se transfiere lentamente en el agua mediante vacío, manteniendo la temperatura interna de la mezcla por debajo de 25°C. Hexanos (3 vol) se añaden y la mezcla resultante se agita durante 0,5 h. Las fases se establecieron y la fase acuosa (pH <1) se drenó y se descartó. La fase orgánica se concentró a vacío usando un evaporador rotatorio, el suministro de producto en forma de aceite de color rojo.

60 Síntesis de (4-(benciloglio)-3,3-dimetilbut-1-inilo)trimetilsilano.

Método A

10 Todos los descriptores equivalentes y volumen en esta parte se basan en una reacción de 250 g. Virutas de magnesio (69,5 g, 2,86 mol, 2,0 equiv) se cargaron en un reactor de 4 bocas de 3 L y se agitó con un agitador magnético en atmósfera de nitrógeno durante 0,5 h. El reactor se sumergió en un baño de hielo-agua. Se añadió una solución del cloruro de propargilo (250 g, 1,43 mol, 1,0 equiv) en THF (1,8 L, 7,2 vol) lentamente al reactor, con agitación, hasta que se observó un efecto exotérmico inicial (~10°C). La formación reactiva de Grignard se confirmó por IPC usando espectroscopía de ¹H-RMN. Una vez que la reacción exotérmica se calmó, se añadió lentamente el resto de la solución, manteniendo la temperatura del lote <15°C. La adición requirió ~3.5 h. La mezcla de color verde oscuro resultante se decantó en un frasco tapado de 2 l.

15

20 Todos los descriptores equivalentes y volumen en esta parte se basan en una reacción de 500 g. Un reactor de 22 L se cargó con una solución de éter clorometilo de bencilo (95%, 375 g, 2,31 mol, 0,8 equiv) en THF (1,5 L, 3 vol). El reactor se enfrió en un baño de hielo-agua. Dos de los cuatro lotes de reactivo de Grignard preparado anteriormente se combinaron y después se añadió lentamente a la solución de éter de clorometilo de bencilo a través de un embudo de adición, manteniendo la temperatura del lote por debajo de 25°C. La adición requirió 1,5 h. La mezcla de reacción se agitó durante la noche (16 h).

25

30 Todos los descriptores equivalentes y volumen en esta parte se basan en una reacción de 1 kg. Una solución de cloruro de amonio 15% se preparó en un reactor con encamisado 30 L (1,5 kg en 8,5 kg de agua, 10 vol). La solución se enfrió a 5°C. Las dos mezclas de reacción de Grignard anterior se combinaron y después se transfirieron a la solución de cloruro de amonio a través de un recipiente de cabecera. Una exotermia se observó en este enfriamiento rápido, que se llevó a cabo a una velocidad para mantener la temperatura interna por debajo de 25°C. Una vez que la transferencia se completa, la temperatura de recipiente encamisado se fijó a 25°C. Se añadieron hexanos (8 L, 8 vol) y la mezcla se agitó durante 0,5 h. Después de establecerse las fases, la fase acuosa (pH 9) se drenó y se descartó. La fase orgánica restante se lavó con agua (2 L, 2 vol). La fase orgánica se concentró a vacío usando un evaporador rotatorio de 22 l, proporcionando el producto bruto como un aceite naranja.

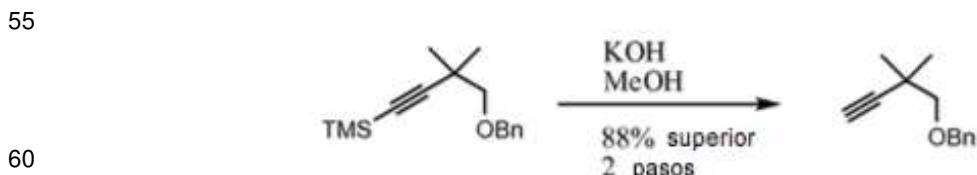
35

Método B

40 Virutas de magnesio (106 g, 4,35 mol, 1,0 eq) se cargaron en un reactor de 22 L y después se suspendieron en THF (760 ml, 1 vol). El recipiente se enfrió en un baño de agua helada de manera que la temperatura del lote alcanzó 2°C. Se añadió una solución del cloruro de propargilo (760 g, 4,35 mol, 1,0 equiv) en THF (4,5 L, 6 vol) lentamente al reactor. Después se añadió 100 ml, se detuvo la adición y la mezcla se agitó hasta que se observó una exoterma de 13°C, lo que indica la iniciación reactiva de Grignard. Una vez que la reacción exotérmica se calmó, se añadió otros 500 ml de la solución de cloruro de propargilo lentamente, manteniendo la temperatura del lote <20°C. La formación de reactivo de Grignard fue confirmada por IPC usando espectroscopía ¹H-RMN. Se añadió lentamente el resto de la solución de cloruro de propargilo, el mantenimiento de la temperatura del lote <20°C. La adición requirió ~1,5 h. La solución de color verde oscuro resultante se agitó durante 0,5 h. La formación reactiva de Grignard se confirmó por IPC usando espectroscopía de ¹H-RMN. Éter de clorometilo de bencilo puro se cargó en el embudo de adición de reactor y después se añadió gota a gota en el reactor, manteniendo la temperatura del lote por debajo de 25°C. La adición requirió 1,0 h. La mezcla de reacción se agitó durante la noche. El tratamiento acuoso y la concentración se llevó a cabo utilizando el mismo procedimiento y cantidades relativas de los materiales como en el Método A para producir el producto como un aceite naranja.

45

50

Síntesis de 4-benciloxi-3,3-dimetilbut-1-ino.

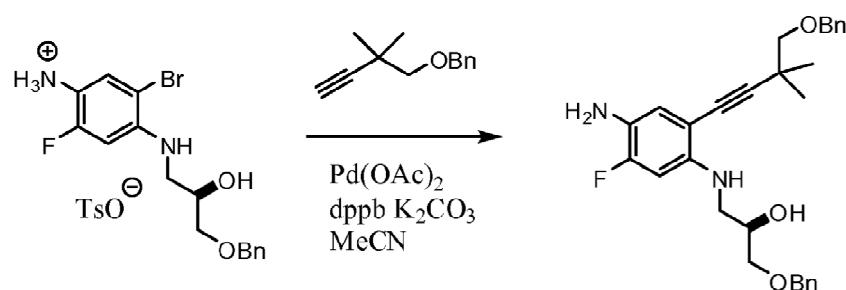
60 Un reactor encamisado de 30 L se cargó con metanol (6 vol) que después se enfrió a 5°C. Se añadió hidróxido potásico (85%, 1,3 equiv) en el reactor. Se produjo una exotermia de 15-20°C se observó como el hidróxido de potasio disuelto. La temperatura de la camisa se fijó a 25°C. Se añadió una solución de 4-benciloxi-3,3-

65

5 dimetilo-1-trimetilsililbut-1-ino (1,0 equiv) en metanol (2 vol) y la mezcla resultante se agitó hasta completarse la reacción, según se monitoriza mediante HPLC. El tiempo de reacción típica a 25°C es de 3-4 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua (8 vol) y después se agitó durante 0,5 h. Hexanos (6 vol) se añadió y la mezcla resultante se agitó durante 0,5 h. Las fases se dejaron sedimentar y después la fase acuosa (pH 10 a 11) se drenó y se descartó. La fase orgánica se lavó con una solución de KOH (85%, 0,4 equiv) en agua (8 vol) seguido de agua (8 vol). Después, la fase orgánica se concentró usando un evaporador rotatorio, produciendo el material del título como un aceite amarillo-naranja. La pureza típica de este material está en el intervalo 80% con la presencia principalmente de una impureza individual. ^1H RMN (400 MHz, C6D6) δ 7,28 (d, 2 H, J = 7,4 Hz), 7,18 (t, 2 H, J = 7,2 Hz), 7,10 (d, 1 H, J = 7,2 Hz), 4,35 (s, 2 H), 3,24 (s, 2 H), 1,91 (s, 1 H), 1,25 (s, 6 H).

10

Síntesis de benciglicolado 4-amino-2-(4-benciloxi-3,3-dimetilbut-1-inilo)-5-fluoroanilina.



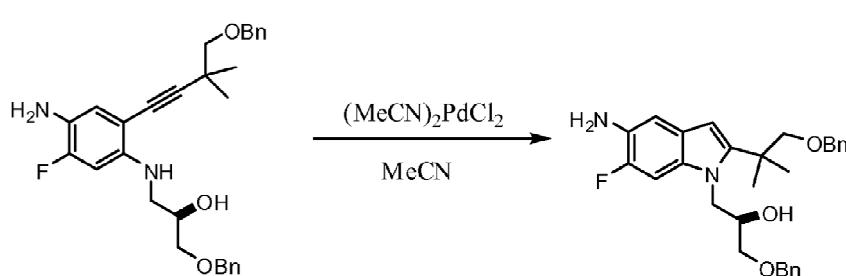
30 4-amonio-2-bromo-5-sal tosilato flouroanilina benciglicolado se convirtió mediante la agitación del sólido en EtOAc (5 vol) y solución saturada de NaHCO₃ (5 vol) hasta que se consiguió la capa orgánica clara. Las capas resultantes se separaron y la capa orgánica se lavó con solución saturada de NaHCO₃ (5 vol) seguido de salmuera y se concentró al vacío para obtener la 4-amonio-2-bromo-5-sal tosilato flouroanilina benciglicolado como un aceite.

35 A continuación, un matraz se cargó con 4-amonio-2-bromo-5-sal tosilato flouroanilina benciglicolado (base libre, 1,0 equiv), Pd(OAc) (4,0% mol), dppb (6,0% mol) y K₂CO₃ en polvo (3,0 equiv) y se agitó con acetonitrilo (6 vol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción resultante se desgasificó durante aproximadamente 30 min burbujeando en N₂ con ventilación. Después, se añadió 4-benciloxi-3,3-dimetilbut-1-ino (1,1 equiv) disuelto en acetonitrilo (2 vol) en una corriente rápida y se calienta a 80°C y se agitó hasta que se consiguió el consumo completo de 4-amonio-2-bromo-5-sal tosilato flouroanilina. La suspensión de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de Celite y se lavó con acetonitrilo (2 vol). El filtrado se concentró al vacío y el residuo se volvió a disolver en EtOAc (6 vol). La capa orgánica se lavó dos veces con solución de NH₄Cl (20% peso/volumen, 4 vol) y salmuera (6 vol). La capa orgánica resultante se concentró para producir un aceite marrón y se utiliza como tal en la siguiente reacción.

40

Síntesis de N-benciglicolado-5-amino-2-(2-benciloxi-1,1-dimetiletilo)-6-fluoroindol (el compuesto de la invención).

45



60 El petróleo crudo de benciglicolado 4-amino-2-(4-benciloxi-3,3-dimetilbut-1-inilo)-5-fluoroanilina se disolvió en acetonitrilo (6 vol) y se añadió (MeCN)₂PdCl₂ (15 mol%) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se desgasificó usando N₂ con ventilación durante aproximadamente 30 min. A continuación, la mezcla de reacción se agitó a 80°C bajo una capa de N₂ durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se filtró a través de una almohadilla de Celite y se lavó la torta con acetonitrilo (1 vol). El filtrado resultante se concentró a vacío y se disolvió de nuevo en EtOAc (5 vol). Deloxano-II THP (5% en peso basado en el rendimiento teórico de N-benciglicolado-5-amino-2-(2-benciloxi-1,1-dimetiletilo)-6-fluoroindol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Después, la mezcla se filtró a través de una almohadilla de sílice (2,5 pulgadas de profundidad, filtro de 6

65

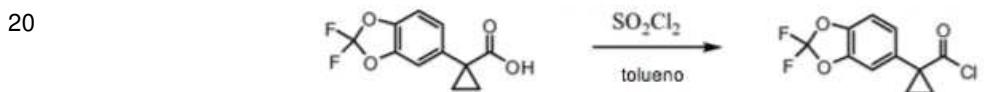
pulgadas de diámetro) y se lavó con EtOAc (4 vol). El filtrado se concentró hasta un residuo de color marrón oscuro, y se utiliza como tal en la siguiente reacción.

Repurificación de N-Benciglicolado-5-amino-2-(2-benciloxi-1,1-dimetiletilo)-6-fluoroindol crudo:

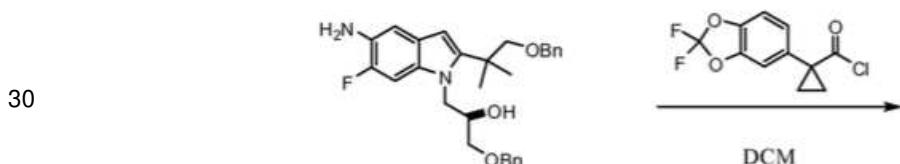
- 5 El N-Benciglicolado-5-amino-2-(2-benciloxi-1,1-dimetiletilo)-6-fluoroindol crudo se disolvió en diclorometano (-1,5 vol) y se filtró a través de una almohadilla de sílice usando inicialmente 30% EtOAc/heptano donde se descartaron las impurezas. A continuación, la almohadilla de sílice se lavó con 50% EtOAc/heptano para aislar 5-amino-2-N-Benciglicolado-(2-benciloxi-1,1-dimetiletilo)-6-fluoroindol hasta que se observó el color débil en el filtrado. Este filtrado se concentró a vacío para proporcionar un aceite marrón que se cristalizó en reposo a temperatura ambiente.
 10 ^1H RMN (400 MHz, DMSO) δ 7,38-7,34 (m, 4 H), 7,32-7,23 (m, 6 H), 7,21 (d, 1 H, J = 12,8 Hz), 6,77 (d, 1 H, J = 9,0 Hz), 6,06 (s, 1 H), 5,13 (d, 1 H, J = 4,9 Hz), 4,54 (s, 2 H), 4,46 (br. s, 2 H), 4,45 (s, 2 H), 4,33 (d, 1 H, J = 12,4 Hz), 4,9 a 4,4 (m, 2 H), 3,63 (d, 1 H, J = 9,2 Hz), 3,56 (d, 1 H, J = 9,2 Hz), 3,49 (dd, 1 H, J = 9,8, 4,4 Hz), 3,43 (dd, 1 H, J = 9,8, 5,7 Hz), 1,40 (s, 6 H).

15 **Síntesis del Compuesto 1**

Síntesis de Compuesto 1 de bencilo protegido.



25



35



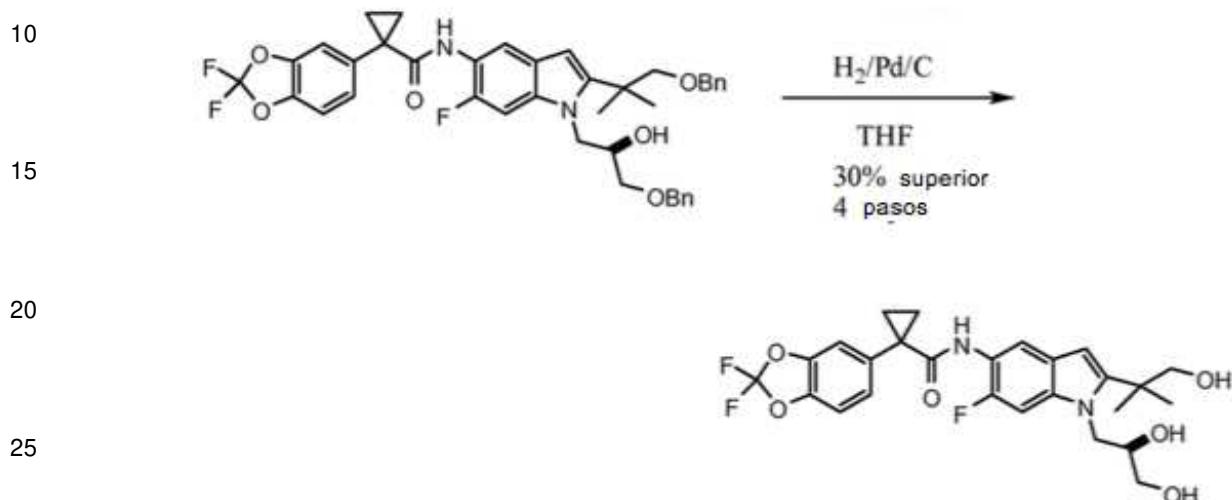
45 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-ácido ciclopropanocarboxílico (1,3 equiv) se suspendió en tolueno (2,5 vol, basado en 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-ciclopropanocarboxílico) y la mezcla se calentó a 60°C. Se añadió SOCl_2 (1,7 equiv) a través de un embudo de adición. La mezcla resultante se agitó durante 2 hr. El tolueno y el exceso de SOCl_2 se separaron por destilación usando rotavop. Se añadió tolueno adicional (2,5 vol, basado en 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-ilo)-ciclopropano-ácido carboxílico) y se destila de nuevo. El cloruro de ácido bruto se disolvió en diclorometano (2 vol) y se añadió a través de un embudo de adición a una mezcla de N-benciglicolado-5-amino-2-(2-benciloxi-1,1-dimetiletilo)-6-fluoroindol (1,0 equiv), y trietilamina (2,0 equiv) en diclorometano (7 vol), mientras que se mantiene de 0-3°C (temperatura interna). La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 4 horas y después se calentó a temperatura ambiente durante la noche. El agua destilada (5 vol) se añadió a la mezcla de reacción y se agitó durante NLT 30 min y las capas se separaron. La fase orgánica se lavó con 20% en peso de K_2CO_3 (4 vol x 2) seguido de un lavado con salmuera (4 vol) y se concentró para proporcionar Compuesto 1 de bencilo crudo protegido como un aceite marrón espeso, que se purificó adicionalmente usando filtración de almohadilla de sílice.

60 Filtración de almohadilla de gel de sílice: Compuesto protegido de bencilo en bruto 1 se disolvió en acetato de etilo (3 vol) en presencia de carbón activado Darco-G (10% en peso, basado en el rendimiento teórico de Compuesto 1) de bencilo protegido y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. A esta mezcla se añadió heptano (3 vol) y se filtró a través de una almohadilla de gel de sílice (2x peso de bencilo bruto protegida Compuesto 1). La almohadilla de sílice se lavó con acetato de etilo/heptano (1:1, 6 vol) o hasta que se detectó poco color en el filtrado. El filtrado se concentró a vacío para proporcionar Compuesto 1 de bencilo protegido como aceite de marrón rojizo viscosa, y se usó directamente en la siguiente etapa.

65 Repurificación: El Compuesto 1 de bencilo protegido se disolvió de nuevo en diclorometano (1 vol, en base

al rendimiento teórico de Compuesto 1) de bencilo protegido y se cargó sobre una almohadilla de gel de sílice (2x peso de Compuesto 1) de bencilo bruto protegido. La almohadilla de sílice se lavó con diclorometano (2 vol, en base al rendimiento teórico de Compuesto 1) de bencilo protegido y el filtrado se descartó. La almohadilla de sílice se lavó con 30% de acetato de etilo/heptano (5 vol) y el filtrado se concentró a vacío para proporcionar Compuesto 1 de bencilo protegido como aceite naranja rojizo viscoso, y se usó directamente en la siguiente etapa.

Síntesis del Compuesto 1.



30 Método A

Una autoclave 20 L se purgó tres veces con gas nitrógeno y después se cargó con paladio sobre carbono (Evonik E 101 NN/W, 5% de Pd, 60% de humedad, 200 g, 0,075 mol, 0,04 equiv). La autoclave se purgó con nitrógeno tres veces. Una solución de Compuesto 1 de bencilo bruto protegido (1,3 kg, de ~1,9 mol) en THF (8 L, 6 vol) se añadió a la autoclave por medio de succión. El recipiente se tapó y después se lavó tres veces con gas nitrógeno. Con agitación suave, el recipiente se purgó tres veces con gas hidrógeno, evacuando a atmósfera mediante la dilución con nitrógeno. La autoclave se presurizó a 3 bar con hidrógeno y la tasa de agitación se aumentó a 800 rpm. Se observó una absorción de hidrógeno rápida (disolución). Una vez que se calmó la captación, el recipiente se calentó a 50°C.

Por razones de seguridad, el termostato se apaga al final de cada jornada de trabajo. El recipiente se presurizó a 4 bar con hidrógeno y después se aisló a partir del depósito de hidrógeno.

Después de 2 días completos de reacción, se añadió más Pd/C (60 g, 0,023 mol, 0,01 equiv) a la mezcla. Esto se hizo mediante el lavado tres veces con gas nitrógeno, añadiendo después el catalizador a través del puerto de adición de sólidos. La reanudación de la reacción se realizó como antes. Después de 4 días completos, la reacción se consideró completa por HPLC por la desaparición de no sólo el material de partida, sino también del pico correspondiente a un mono-bencillado intermedio.

La mezcla de reacción se filtró a través de una almohadilla de Celite. El recipiente y la torta de filtro se lavaron con THF (2 L, 1,5 vol). A continuación, la almohadilla de Celite se humedeció con agua y la torta se descartó adecuadamente. El filtrado combinado y el lavado THF se concentraron usando un evaporador rotatorio, produciendo el producto bruto como un aceite negro, 1 kg.

55 Los equivalentes y volúmenes en la siguiente purificación se basan en 1 kg de material bruto. El aceite negro bruto se disolvió en 1:1 acetato-heptano de etilo. La mezcla se cargó en un lecho de gel de sílice (1,5 kg, 1,5 en peso equiv.) En un embudo sinterizado que se había saturado con 1:1 acetato-heptano de etilo. La almohadilla de sílice se lavó primero con 1:1 acetato-heptano de etilo (6 L, 6 vol) y después con acetato de etilo puro (14 L, 14 vol). El eluyente se recogió en 4 fracciones que se analizaron por HPLC.

Los equivalentes y volúmenes en la siguiente purificación se basan en 0,6 kg de material en bruto. La fracción 3 se concentró por evaporación rotatoria para dar una espuma marrón (600 g) y después se volvió a disolver en MTBE (1,8 L, 3 vol). La solución marrón oscura se agitó durante la noche a temperatura ambiente, tiempo durante el cual se produjo la cristalización. Se añadió heptano (55 ml, 0,1 vol) y la mezcla se agitó durante la noche. La mezcla se filtró usando un embudo Buchner y la torta de filtro se lavó con 3:1 MTBE-heptano (900 ml, 1,5

vol). La torta de filtración se secó al aire durante 1 h y después se secó al vacío a temperatura ambiente durante 16 h, suministrando 253 g de VXc-661 en forma de un sólido de color blanco.

Los equivalentes y los volúmenes para la siguiente purificación se basan en 1,4 kg de material bruto. Las fracciones 2 y 3 de la filtración por encima de gel de sílice, así como material de una reacción anterior se combinaron y se concentraron para dar 1,4 kg de un aceite negro. La mezcla se volvió a presentar a la filtración en gel de sílice (1,5 kg de gel de sílice, eluido con 3,5 L, 2,3 vol de 1:1 acetato-heptano de etilo a continuación, 9 L, 6 vol de acetato de etilo puro) descrito anteriormente, dando la concentración un sólido espumoso de color cuero (390 g).

Los equivalentes y los volúmenes para la siguiente purificación se basan en 390 g de material bruto. El sólido de color cuero era insoluble en MTBE, por lo que se disolvió en metanol (1,2 L, 3 vol). El uso de un reactor de 4 L Morton equipado con una cabeza de destilación de recorrido largo, la mezcla se destiló hasta 2 vol. Se añadió MTBE (1,2 L, 3 vol) y la mezcla se destiló de nuevo a 2 vol. Se añadió una segunda porción de MTBE (1,6 L, 4 vol) y la mezcla se destiló de nuevo a 2 vol. Se añadió una tercera porción de MTBE (1,2 L, 3 vol) y la mezcla se destiló de nuevo a 3 vol. El análisis del destilado por GC reveló que consistía en ~6% de metanol. El termostato se fijó a 48°C (por debajo de la temperatura de ebullición del azeótropo MTBE-metanol, que es 52°C). La mezcla se enfrió a 20°C durante 2 h, tiempo durante el cual se produjo una cristalización relativamente rápida. Despues de agitarse la mezcla durante 2 h, se añadió, heptano (20 ml, 0,05 vol) y la mezcla se agitó durante la noche (16 h). La mezcla se filtró usando un embudo Buchner y la torta de filtro se lavó con 3:1 MTBE- heptano (800 ml, 2 vol). La torta de filtración se secó al aire durante 1 h y después se secó al vacío a temperatura ambiente durante 16 h, suministrando 130 g de Compuesto 1 en forma de un sólido de color blanco.

Método B

El Compuesto 1 de bencilo protegido se disolvió y se lavó con THF (3 vol) para eliminar cualquier disolvente residual restante. El Compuesto 1 de bencilo protegido se volvió a disolver en THF (4 vol) y se añade al hidrogenador que contiene 5% en peso de Pd/C (2,5% en moles, 60% húmedo, Degussa E5 E101 NN/W). La temperatura interna de la reacción se ajustó a 50°C, y se purgó con N₂ (x5), seguido por hidrógeno (x3). La presión hidrogenadora se ajustó a 3 bares de hidrógeno y la mezcla se agitó rápidamente (> 1100 rpm). Al final de la reacción, el catalizador se filtró a través de una almohadilla de Celite y se lavó con THF (1 vol). El filtrado se concentró en vacío para obtener un residuo espumoso de color marrón. El residuo resultante se disolvió en MTBE (5 vol) y se añadieron solución de HCl 0,5 N (2 vol) y agua destilada (1 vol). La mezcla se agitó durante NLT 30 min y las capas resultantes se separaron. La fase orgánica se lavó con solución de 10% en peso K₂CO₃ (2 vol x2) seguido de un lavado con salmuera. Se añadió la fase orgánica a un matraz que contenía gel de sílice (25% en peso), Deloxano-THP-II (5% en peso, 75% húmedo), y Na₂SO₄ y se agitó durante la noche. La mezcla resultante se filtró a través de un lecho de Celite y se lavó con 10% de THF/MTBE (3 vol). El filtrado se concentró a vacío para proporcionar el Compuesto 1 bruto como espuma de color cuero.

Recuperación de Compuesto 1 del licor madre: Opción A.

La filtración de almohadilla de gel de sílice: El licor madre se concentró al vacío para obtener una espuma de color marrón, se disolvió en diclorometano (2 vol), y se filtró a través de una almohadilla de sílice (3 x peso del Compuesto 1 en bruto). La almohadilla de sílice se lavó con acetato de etilo/heptano (1:1, 13 vol) y el filtrado se descartó. La almohadilla de sílice se lavó con 10% THF/acetato de etilo (10 vol) y el filtrado se concentró a vacío para producir el Compuesto 1 como espuma de color cuero. El procedimiento de cristalización se siguió para aislar el Compuesto 1 restante.

Recuperación de Compuesto 1 del licor madre: Opción B.

Cromatografía en columna de gel de sílice: Después de la cromatografía sobre gel de sílice (50% acetato de etilo/hexanos a 100% de acetato de etilo), el compuesto deseado se aisló en forma de espuma de color cuero. El procedimiento de cristalización se siguió para aislar el Compuesto 1 restante.

La Figura 1 muestra un patrón de difracción de polvo de rayos X del Compuesto 1. Una traza DSC del Compuesto 1 se muestra en la Figura 2. La traza de DSC en la Figura 2 indica que el Compuesto 1 no es una fase sólida pura. Un pico extra en 119°C existe en comparación con la forma A de Compuesto 1 (véase la Figura 6). Una traza de TGA del Compuesto 1 se muestra en la Figura 3.

El Compuesto 1 también se pueden preparar por una de varias rutas sintéticas descritas en la solicitud de patente de Estados Unidos US20090131492.

Síntesis de Forma A de Compuesto 1

65 Método de suspensión

5 Para EtOAc, MTBE, acetato de isopropilo, o DCM, se añadieron aproximadamente 40 mg de Compuesto 1 a un vial junto con 1-2 ml de cualquiera de los disolventes anteriores. La suspensión se agitó a temperatura ambiente de 24 h a 2 semanas y la forma A de Compuesto 1 se recogió por centrifugación de la suspensión (con filtro). La Figura 5 describe un patrón de XRPD de la Forma A de Compuesto 1 obtenido por este método con DCM como disolvente.

10 Para EtOH/soluciones de agua, se añadieron aproximadamente 40 mg de Compuesto 1 a tres viales separados. En el primer vial, se añadieron 1,35 ml de EtOH y 0,15 ml de agua. En el segundo vial, se añadieron 0,75 ml de EtOH y 0,75 ml de agua. En el tercer vial, se añadieron 0,15 ml de EtOH y 1,35 ml de agua. Todos los tres viales se agitaron a temperatura ambiente durante 24 h. Después, cada suspensión se centrifugó por separado (con filtro) para recoger Forma A de Compuesto 1.

15 Para las soluciones de alcohol de isopropilo/agua, se añadieron aproximadamente 40 mg de Compuesto 1 a tres viales separados. En el primer vial, se añadieron 1,35 ml de alcohol isopropílico y 0,15 ml de agua. En el segundo vial, se añadieron 0,75 ml de alcohol isopropílico y 0,75 ml de agua. En el tercer vial, se añadieron 0,15 ml de alcohol isopropílico y 1,35 ml de agua. Todos los tres viales se agitaron a temperatura ambiente durante 24 h. Después, cada suspensión se centrifugó por separado (con filtro) para recoger Forma A de Compuesto 1.

20 Para las soluciones de metanol/agua, se añadieron aproximadamente 40 mg de Compuesto 1 a un vial. Se añadieron 0,5 ml de metanol y 1 ml de agua y la suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La suspensión se centrifugó (con filtro) para recoger Forma A de Compuesto 1.

25 Para acetonitrilo, se añadieron aproximadamente 50 mg de Compuesto 1 a un vial junto con 2,0 ml de acetonitrilo. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y la Forma A de Compuesto 1 se recogió por centrifugación (con filtro).

30 Para las soluciones de acetonitrilo/agua, se disolvió aproximadamente 50 mg de Compuesto 1 en 2,5 ml de acetonitrilo para producir una solución clara después de la sonicación. La solución se filtró y se retiró 1 ml a un vial. Se añadieron 2,25 ml de agua para dar una suspensión turbia. La suspensión se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y la Forma A de Compuesto 1 se recogió por centrifugación (con filtro).

Método de evaporación lenta

35 Se disolvieron aproximadamente 55 mg de Compuesto 1 en 0,5 ml de acetona para dar una solución clara después de la sonicación. La solución se filtró y 0,2 ml se retiró a un vial. El vial se cubre con parafilm con un agujero y se deja reposar. La Forma A de Compuesto 1 recristalizado se recogió mediante filtración.

Método de evaporación rápida

40 Para alcohol isopropílico, se disolvió aproximadamente 43 mg de Compuesto 1 en 2,1 ml de alcohol isopropílico para dar una solución clara después de la sonicación. La solución se filtró en un vial y se dejó reposar sin cubrir. La Forma A de Compuesto 1 recristalizado se recogió mediante filtración.

45 Para el metanol, se disolvió aproximadamente 58 mg de Compuesto 1 en 0,5 ml de metanol para dar una solución clara después de la sonicación. La solución se filtró y 0,2 ml se retiró a un vial sin tapar y se dejó reposar. La Forma A de Compuesto 1 recristalizado se recogió mediante filtración.

50 Para acetonitrilo, aproximadamente 51 mg de Compuesto 1 se disolvió en 2,5 ml de acetonitrilo para dar una solución clara después de la sonicación. La solución se filtró y la mitad de la solución se retiró a un vial sin tapar y se dejó reposar. La Forma A de Compuesto 1 recristalizado se recogió mediante filtración. La Figura 7 describe un patrón de XRPD de la Forma A de Compuesto 1 preparado por este método.

Método anti-disolvente

55 Para EtOAc/heptano, se disolvió aproximadamente 30 mg de Compuesto 1 en 1,5 ml de EtOAc para dar una solución clara después de sonicación. La solución se filtró y se añadió 2,0 ml de heptano a la solución filtrada, mientras se agitaba lentamente. La solución se agitó durante 10 minutos adicionales y se dejó reposar. La Forma A de Compuesto 1 recristalizado se recogió mediante filtración. La Figura 8 describe un patrón de XRPD de la Forma A de Compuesto 1 preparado por este método.

65 Para el alcohol isopropílico/agua, se disolvió aproximadamente 21 mg de Compuesto 1 en 1,0 ml de alcohol isopropílico para dar una solución clara después de tratamiento con ultrasonidos. La solución se filtró para dar 0,8 ml de solución. Se añadieron 1,8 ml de agua mientras se agita lentamente. Se añadieron 0,2 ml adicionales de agua para dar una suspensión turbia. Se detuvo la agitación durante 5 minutos para dar una solución clara. La solución se

agitó durante 2 minutos y se dejó reposar. La Forma A de Compuesto 1 recristalizado se recogió mediante filtración.

5 Para etanol/agua, se disolvió aproximadamente 40 mg de Compuesto 1 en 1,0 ml de etanol para dar una solución clara después de sonicación. La solución se filtró y se añadió 1,0 ml de agua. La solución se agitó durante 1 día a temperatura ambiente. La Forma A de Compuesto 1 recristalizado se recogió mediante filtración.

10 Para acetona/agua, se disolvió aproximadamente 55 mg de Compuesto 1 en 0,5 ml de acetona para dar una solución clara después de sonicación. La solución se filtró y 0,2 ml se retiró a un vial. Se añadieron 1,5 ml de agua, y después un adicional 0,5 ml de agua para dar una suspensión turbia. La suspensión se agitó durante 1 día a temperatura ambiente. La Forma A de Compuesto 1 se recogió mediante filtración.

La Tabla 2 a continuación resume las diversas técnicas para formar la forma A de Compuesto 1.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 2.

Vehículo	Método de recristalización	Resultados de sólido residual
ACN	Evaporación rápida	Forma A
metanol	Evaporación rápida	Forma A
Etanol	No aplicable	No aplicable
IPA	Evaporación rápida	Forma A
Acetona	Evaporación lenta	Forma A
EtOAc	Suspensión	Forma A
DCM	Suspensión	Forma A
MTBE	Suspensión	Forma A
acetato de isopropilo	Suspensión	Forma A
Agua / Etanol 1: 9	No aplicable	No aplicable
Agua / Etanol 1: 1	Suspensión	Forma A
Agua / Etanol 9: 1	Suspensión	Forma A
Agua / ACN 9: 4	Suspensión	Forma A
Agua / Metanol 2: 1	Suspensión	Forma A
Agua / IPA 1: 9	No aplicable	No aplicable
Agua / IPA 9: 1	Suspensión	Forma A
Agua / IPA 7: 3	Suspensión	Forma A
Metanol / Agua 4: 3	Suspensión	Forma A
EtOAc / Heptano 3: 4	Anti-disolvente	Forma A
IPA / Agua 2: 5	Anti-disolvente	Forma A
Etanol / Agua 1: 1	Anti-disolvente	Forma A
Acetona / agua 1:10	Anti-disolvente	Forma A
Etanol / Agua 5: 6	Anti-disolvente	No aplicable
Tolueno	No aplicable	No aplicable
MEK	No aplicable	No aplicable
Agua	No aplicable	No aplicable

Un modelo de difracción de rayos X calculado a partir de una sola estructura cristalina de Forma A de Compuesto 1 se muestra en la Figura 4. La Tabla 3 enumera los picos calculados para la Figura 1.

Tabla 3.

Rango de pico	2\ Ángulo [grados]	Intensidad relativa [%]
1	19,4	100,0
2	21,6	81,9
3	17,1	71,4
4	5,0	56,1
5	20,3	49,6
6	18,8	43,4
7	24,7	36,6
8	18,4	33,9
9	10,0	31,2
10	24,2	24,0
11	14,0	20,7
12	20,9	19,9
13	8,4	18,4
14	14,7	18,2
15	18,0	16,0
16	12,4	14,9

Un modelo de difracción de polvo de rayos X real de Forma A de Compuesto 1 se muestra en la Figura 5. La Tabla 4 enumera los picos reales de la Figura 5.

Tabla 4.

Rango de pico	2\ Ángulo [grados]	Intensidad relativa [%]
1	19,5	100,0
2	21,7	88,2
3	17,1	85,1
4	20,4	80,9
5	18,8	51,0
6	24,7	40,8
7	10,0	40,7
8	5,0	39,0
9	24,2	35,4
10	18,5	35,0
11	18,0	29,0
12	20,9	27,0
13	14,8	19,9
14	14,1	19,2
15	12,4	18,2
16	8,4	14,1

La traza de DSC de la Forma A de Compuesto 1 se muestra en la Figura 6. El punto de fusión para Forma A de Compuesto 1 se produce en aproximadamente 172-178°C.

Se obtuvieron los datos de cristal único para la forma A de Compuesto 1, que proporciona detalles adicionales acerca de la estructura cristalina, incluyendo el tamaño de celosía y el embalaje.

Preparación de cristal

Los cristales de Forma A de Compuesto 1 se obtuvieron por evaporación lenta de una solución concentrada de metanol (10 mg/ml). Se seleccionó un cristal incoloro de Forma A de Compuesto 1 con unas dimensiones de 0,20

X 0,05 X 0,05 mm, limpiado mediante el uso de aceite mineral, montado en un MicroMount y centrado en un difractómetro Bruker APEXII. Se obtuvieron tres lotes de 40 cuadros separados en el espacio recíproco para proporcionar una matriz de orientación y parámetros de las células iniciales. Parámetros de células finales se obtuvieron y se refinaron en base al conjunto de datos completo.

5

Experimental

Un conjunto de datos de difracción de espacio recíproco se obtuvo a una resolución de 0,83 Å usando 0,5° pasos con exposición de 30 s de cada imagen. Los datos se recogieron a temperatura ambiente [295 (2) K]. La integración de intensidades y refinamiento de parámetros de la célula se llevaron a cabo utilizando el software APEXII. La observación del cristal después de la recogida de datos no mostró signos de descomposición.

10

Tabla 5. Datos de Cristal para Forma A de Compuesto 1

15

<chem>C26H27F3N2O6</chem>	$F(000) = 1088$
$M_r = 520,50$	$D_x = 1,397 \text{ Mg m}^{-3}$
Monoclínico, C2	Radiación Cu $K\alpha$, $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$
Símbolo hall: C 2y	Parámetros de célula de reflecciones 3945
$a = 21,0952 (16) \text{ \AA}$	$\theta = 2,5^\circ$
$b = 6,6287 (5) \text{ \AA}$	$\mu = 0,97 \text{ mm}^{-1}$
$c = 17,7917 (15) \text{ \AA}$	$T = 295 \text{ K}$
$\beta = 95,867 (6)^\circ$	Prisma
$V = 2474,8 (3) \text{ \AA}^3$	0,20 X 0,05 X 0,05 mm
Z=4	

20

25

30

Geometría: Todos los esds (salvo el esd en el ángulo diedro entre dos planos l.s.) se estiman utilizando la matriz de covarianza completa. Los esds celulares se tienen en cuenta de forma individual en la estimación de los ESD en distancias, ángulos y ángulos de torsión; correlaciones entre esds en parámetros celulares solamente se utilizan cuando son definidos por la simetría del cristal. Un tratamiento aproximado (isotrópico) de esds celulares se utiliza para estimar esds que involucran planos l.s.

35

Tabla 6. Parámetros de recopilación de datos para la Forma A de Compuesto 1 cristal.

40

45

Difractómetro APEX II	$R_{int} = 0,027$
Fuente de radiación: Tubo sellado de enfoque fino	$\theta_{\max} = 67,8^\circ$, $\theta_{\min} = 2,5^\circ$
grafito	$h = -25 \rightarrow 24$
reflecciones medidas 8766	$k = -7 \rightarrow 7$
reflecciones independientes 3945	$l = -19 \rightarrow 16$
reflecciones 3510 con $I > 2\sigma(I)$	

50

55

La recolección de datos: Apex II; refinamiento celular: Apex II; reducción de datos: Apex II; programa que se utiliza para resolver la estructura: SHELXS97 (Sheldrick, 1990); programa que se utiliza para refinar la estructura: SHELXL97 (Sheldrick, 1997); de gráficos moleculares: Mercury; software utilizado para preparar el material para su publicación: publCIF.

60

65

Tabla 7. Parámetros de refinamiento para la Forma A de Compuesto 1 cristal.

5	Refinamiento en F2	Ubicación del sitio de hidrógeno: inferido de sitios vecinos
10	Matriz cuadrada: lleno	H tratados por una mezcla de refinamiento independiente y restringido
15	R[F2 > 2σ(F2)] = 0.043 wR(F2) = 0.119 S = 1.05 reflecciones 3945 parámetros 443 restricción 1 limitaciones 0	w = $[(\sigma_2(F_2) + (0.0821P)^2 + 0.2233P)]$ donde P = $(F_2 + 2Fc^2)/3$ $(\Delta/\sigma)_{\text{max}} < 0.001$ $\Delta_{\text{max}} = 0.14 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$ $\Delta_{\text{max}} = -0.13 \text{ e } \text{\AA}^{-3}$ Corrección de extinción: SHELXL, $F_c^* = kFc[1 + 0.001xFc^2\lambda^3/\sin(2\theta)]^{1/4}$ Coeficiente de extinción: 0.00016 (15) Estructura absoluta: Flack H D (1983), Acta Cryst. A39, 876-881
20	Ubicación del sitio del átomo primario: métodos directos de estructura invariantes	Parámetro flack: 0.00 (18)
25	Emplazamiento secundario del átomo: diferencia Mapa de Fourier	

30 El refinamiento: Refinamiento de F2 contra todas las reflexiones. El wR R-factor ponderado y la aptitud del ajuste S se basan en F^2 , R-factores R convencionales se basan en F, con F fijada en cero por F^2 negativo. La expresión umbral de $F^2 > 2\sigma(F^2)$ se utiliza sólo para el cálculo de factores R (gt), etc., y no es relevante para la elección de las reflexiones para el refinamiento. R-factores basados en F^2 son estadísticamente aproximadamente de dos veces tan grandes como los basados en F y R-factores en base a todos los datos serán aún más grandes.

35 Imágenes conformacionales de la Forma A de Compuesto 1 en base a análisis de rayos X de cristal único se muestran en las Figuras 9 y 10. Los grupos -OH terminales están conectados a través de redes de enlaces de hidrógeno para formar un clúster tetramérico con cuatro moléculas adyacentes (Figura 10). El otro grupo hidroxilo actúa como un donador de enlace de hidrógeno para formar un enlace de hidrógeno con un grupo carbonilo de una molécula adyacente. La estructura cristalina revela un empaquetamiento denso de las moléculas. La Forma A de Compuesto 1 es monoclínico, grupo espacial C2, con las siguientes dimensiones de la unidad celular: $a = 21,0952$ (16) \AA , $b = 6,6287$ (5) \AA , $c = 17,7917$ (15) \AA , $\beta = 95,867$ (6) $^\circ$, $\gamma = 90^\circ$.

40 45 Un espectro de ^{13}C RMN de estado sólido de Forma A de Compuesto 1 se muestra en la Figura 11. Tabla 8 proporciona desplazamientos químicos de los picos relevantes.

50

55

60

65

Tabla 8.

Forma A de Compuesto 1 ^{13}C Despl. Químicos		
Pea k#	F1 [ppm]	Intensidad
1	175,3	2,9
2	155,4	0,54
3	153,3	0,81
4	144,3	3,35
5	143,7	4,16
6	143,0	4,24
7	139,0	2,86
8	135,8	5,19
9	128,2	5,39
10	123,3	5,68
11	120,0	4,55
12	115,8	2,66
13	114,9	4,2
14	111,3	5,17
15	102,8	5,93
16	73,8	10
17	69,8	7,06
18	64,5	8,29
19	51,6	4,96
20	39,1	9,83
21	30,5	7,97
22	26,8	6,94
23	24,4	9,19
24	16,3	5,58
25	15,3	6,33

Un espectro ^{19}F RMN de estado sólido de la Forma A de Compuesto 1 se muestra en la Figura 12. Los picos con un asterisco denotan bandas laterales giratorias. La Tabla 9 proporciona desplazamientos químicos de los picos relevantes.

Tabla 9.

Forma A de Compuesto 1 ^{19}F Despl. Químicos		
Pea k#	F1 [ppm]	Intensidad
1	-45,9	9,48
2	-51,4	7,48
3	-53,3	4,92
4	-126,5	11,44
5	-128,4	12,5

Síntesis de la Forma A de Compuesto 1 amorfa

Método evaporación rotatoria

La Forma A de Compuesto 1 amorfó tambié se logró mediante evaporación rotatoria. El Compuesto 1 (aproximadamente 10 g) se disolvió en 180 ml de MeOH y se evaporó por rotación en un 50°C baño hasta una espuma. DSC (Figura 14) y XRPD (Figura 13) confirmaron forma amorfá del Compuesto 1. La Figura 15 describe una traza TGA de la Forma A de Compuesto 1 amorfá preparada por este método.

5

Método atomizado

9.95g de succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa de grado HG (HPMCAS-HG) se pesó en un vaso de 500 ml, junto con 50 mg de sulfato de laurilo de sodio (SLS). MeOH (200 ml) se mezcló con el sólido. El material se dejó en agitación durante 4 h. Para asegurar la máxima disolución, después de 2 h de agitación, la solución se sonicó durante 5 minutos, a continuación se permitió que continuase la agitación durante las restantes 2 h. Una suspensión muy fina de HPMCAS permaneció en solución. Sin embargo, la observación visual determinó que ninguna parte de goma se mantuvieron en las paredes de la vasija o se pegaban a la parte inferior después de inclinar el recipiente.

15

La Forma A de Compuesto 1 (10 g) se vertió en el vaso de precipitados de 500 ml, y se dejó que el sistema siguiese agitándose.

	Formulación Descripción:	Forma A de Compuesto
20	Buchi Mini Spray	1/HPMCAS/SLS (50/49,5/0,5)
	Entrada T (punto establecido)	145 °C
25	Salida T (comienzo)	75 °C
	Salida T (final)	55 °C
	Presión de nitrógeno	75 psi
30	Aspirador	100%
	Bomba	35%
	Rotámetro	40 mm
	Presión de filtro	65 mbar
	Temp. Condensador	-3 °C
	Tiempo de funcionamiento	1 h

35

Se recuperó aproximadamente 16 g de la Forma A de Compuesto 1 amorfá (80% de rendimiento). Forma A de Compuesto 1 amorfá se confirmó mediante XRPD (Figura 16) y DSC (Figura 17).

Un espectro de ¹³C RMN en estado sólido de la Forma A de Compuesto 1 amorfá se muestra en la Figura 18. La Tabla 10 proporciona desplazamientos químicos de los picos relevantes.

40

Tabla 10.

	Forma amorfá de Compuesto 1 ¹³ C Despl. Químicos		
	Pico #	F1 [ppm]	Intensidad
45	1	171,6	26,33
	2	147,9	41,9
50	3	144,0	100
	4	135,8	70,41
	5	127,3	38,04
	6	123,8	62,66
55	7	119,8	42,09
	8	111,2	68,11
	9	102,4	37,01
60	10	97,5	37,47
	11	70,0	65,02
	12	64,7	37,94
65	13	48,3	38,16
	14	39,1	80,54
	15	31,1	92,01
	16	25,1	58,68
	17	16,5	78,97

- 5 Un espectro ^{19}F RMN de estado sólido de la Forma A de Compuesto 1 amorfá se muestra en la Figura 19.
 Los picos marcados con un asterisco denotan bandas laterales giratorias. La Tabla 11 proporciona desplazamientos químicos de los picos relevantes.

Tabla 11.

Forma amorfá de Compuesto 1 ^{19}F Despl. Químicos		
Pico #	F1 [ppm]	Intensidad
1	-46,1	100
2	-53,1	94,9
3	-139,4	76,05

- 20 La Tabla 12 a continuación recita datos analíticos adicionales para el Compuesto 1.

Tabla 12.

Nº de Compuesto	LC/MS M+1	LC/RT min	NMR
1	521,5	1,69	1H NMR (400.0 MHz, CD ₃ CN) d 7.69 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 1.7, 8.3 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.27 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 12.0 Hz, 1H), 6.34 (s, 1 H), 4.32 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 4.15 - 4.09 (m, 1 H), 3.89 (dd, J = 6.0,
			11.5 Hz, 1H), 3.63 - 3.52 (m, 3H), 3.42 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 3.21 (dd, J = 6.2, 7.2 Hz, 1H), 3.04 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 1.59 (dd, J = 3.8, 6.8 Hz, 2H), 1.44 (s, 3H), 1.33 (s, 3H) and 1.18 (dd, J = 3.7, 6.8 Hz, 2H) ppm.

ENSAYOS

Los ensayos para la detección y medición de propiedades de corrección ΔF508-RTFQ de Compuestos

- 40 Métodos ópticos de potencial de membrana para propiedades de modulación de compuestos de ensayo ΔF508-RTFQ

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

50 Estos ensayos sensibles a voltaje se basan en el cambio en la transferencia de energía de fluorescencia de resonancia (FRET) entre el colorante de membrana soluble, sensible al voltaje, DiSBAC₂(3), y un fosfolípido fluorescente, CC2-DMPE, que se adjunta al folíolo exterior de la membrana plasmática y actúa como donador de FRET. Los cambios en el potencial de membrana (Vm) provocan que el DiSBAC₂(3) cargado negativamente se redistribuya a través de la membrana plasmática y la cantidad de transferencia de energía de CC2-DMPE cambie en consecuencia. Los cambios en la emisión de fluorescencia se monitorearon utilizando VIPR™ II, el cual es un manipulador de líquidos y detector fluorescente integrado diseñado para realizar pantallas basadas en células en placas de 96 o 384 placas de microtitulación de pocillos.

60 1. Identificación de Compuestos de Corrección

Para identificar pequeñas moléculas que corrigen el defecto asociado con el tráfico de ΔF508-RTFQ; se desarrolló un formato de ensayo HTS de una sola adición. Las células se incubaron en medio libre de suero durante 16 horas a 37°C en presencia o ausencia (control negativo) de compuesto de ensayo. Como control positivo, las

células se incubaron en placas de 384 pocillos durante 16 horas a 27°C a "temperatura correcta" ΔF508-RTFQ. Las células se aclararon posteriormente 3X con solución de Krebs Ringers y se cargaron con los tintes sensibles al voltaje. Para activar ΔF508-RTFQ, 10 μM de forskolina y el potenciador de RTFQ, genisteína (20 μM), se añadieron junto con medio libre de Cl⁻ a cada pocillo. La adición de medio libre de Cl⁻ promovió flujo de Cl⁻ en respuesta a la activación ΔF508-RTFQ y la despolarización de la membrana resultante se controló ópticamente usando los tintes de sensor de voltaje en base a FRET.

2. Identificación de Compuestos Potenciadores

Para identificar potenciadores de ΔF508-RTFQ, se desarrolló un formato de ensayo de doble adición de HTS. Durante la primera adición, un medio libre de Cl⁻ con o sin compuesto de ensayo se añadió a cada pocillo. Después de 22 segundos, una segunda adición de medio libre Cl⁻ que contiene 2 - 10 μM forskolina se añadió para activar ΔF508-RTFQ. La concentración de Cl⁻ extracelular siguiendo ambas adiciones era de 28 mM, que promovió flujo Cl⁻ en respuesta a la activación ΔF508-RTFQ y la despolarización de la membrana resultante se controló ópticamente usando los tintes de voltaje-sensor basados en FRET.

3. Soluciones

Solución de baño nº1: (en mM)	NaCl 160, K14.5, CaCl ₂ 2, MgCl ₂ 1, HEPES 10, pH 7,4 con NaOH.	20
Solución de baño libre de cloruro:	Las sales de cloruro en la solución de baño nº 1 se sustituyen con sales de gluconato.	
CC2-DMPE:	Se preparó como una solución de reserva de 10 mM en DMSO y se almacenó a -20°C.	
DiSBAC ₂ (3):	Se preparó como una reserva de 10 mM en DMSO y se almacenó a -20°C.	25

4. Cultivo de la célula

Fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan establemente ΔF508-RTFQ se utilizan para las mediciones ópticas del potencial de membrana. Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO₂ 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/strep, y 25 mM HEPES en frascos de cultivo de 175 cm². Para todos los ensayos ópticos, las células se sembraron a 30.000/pocillo en placas recubiertas de matriz de 384 pocillos y se cultivaron durante 2 horas a 37°C antes de cultivarse a 27°C durante 24 horas para el ensayo de 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 ensayar las propiedades de modulación de compuestos ΔF508-RTFQ

1. Ensayo de Cámara de Ussing

Experimentos en cámara de Ussing se realizaron en células epiteliales polarizadas que expresan ΔF508-RTFQ para caracterizar adicionalmente los moduladores ΔF508-RTFQ identificados en los ensayos ópticos. Las células epiteliales FRT^{ΔF508-RTFQ} 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 sufrían cortocircuitos continuamente utilizando un sistema de fijación de voltaje (Departamento de Bioingeniería, Universidad de Iowa, IA, y, Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA). La resistencia transepitelial se midió mediante la aplicación de un pulso de 2 mV. En estas condiciones, los epitelios de FRT demostraron resistencias de 4 KΩ/cm² o más. Las soluciones se mantuvieron a 27°C y se burbujearon con aire. El potencial de compensación de electrodos y la resistencia fluida se corrigieron usando un inserto sin células. En estas condiciones, la corriente refleja el flujo de Cl⁻ a través de ΔF508-RTFQ expresado en la membrana apical. El I_{sc} fue adquirido digitalmente usando una interfaz MP100A-CE y el software AcqKnowledge (v3.2.6; BIOPAC Systems, Santa Bárbara, CA).

2. Identificación de los compuestos de corrección

El protocolo típico utilizaba un gradiente de concentración Cl⁻ de membrana basolateral a apical. Para configurar este gradiente, se usó ringer normal sobre la membrana basolateral, mientras que NaCl apical fue reemplazado por gluconato sódico equimolar (valorado a pH 7,4 con NaOH) para producir un gran gradiente de concentración de Cl⁻ a través del epitelio. Todos los experimentos se realizaron con monocapas intactas. Para activar completamente ΔF508-RTFQ, forskolina (10 μM) y el inhibidor de PDE, IBMX (100 μM), se aplicaron seguido de la adición del potenciador RTFQ, la genisteína (50 μM).

Como se observa en otros tipos de células, la incubación a bajas temperaturas de células FRT que

expresan $\Delta F508$ -RTFQ de forma estable aumenta la densidad funcional de RTFQ en la membrana plasmática. Para determinar la actividad de los compuestos de corrección, las células se incubaron con 10 μM del compuesto de ensayo durante 24 horas a 37°C y posteriormente se lavaron 3X antes de la grabación. El I_{sc} mediado por cAMP y genisteína en las células tratadas con el compuesto se normalizó a los controles de 27°C y 37°C y se expresaron como porcentaje de actividad. La preincubación de las células con el compuesto de corrección aumentó significativamente el I_{sc} mediado por cAMP y genisteína por comparación con los controles de 37°C.

3. Identificación de compuestos potenciadores

El protocolo típico utilizaba un gradiente de concentración Cl⁻ de la membrana basolateral a apical. Para configurar este gradiente, ringer normales se utilizó en la membrana basolateral y se permeabilizaron con nistatina (360 $\mu g/ml$), mientras que NaCl apical fue reemplazado por gluconato sódico equimolar (valorado a pH 7,4 con NaOH) para dar una gran gradiente de concentración de Cl⁻ a través del epitelio. Todos los experimentos se realizaron 30 min después de la permeabilización de la nistatina. Forskolina (10 mM) y todos los compuestos de ensayo se añaden a ambos lados de los insertos de cultivo celular. La eficacia de los potenciadores putativos $\Delta F508$ -RTFQ se comparó con la del potenciador conocido, genisteína.

4. Soluciones

Solución basolateral (en mM): NaCl (135), CaCl₂ (1,2), MgCl₂ (1,2), K₂HPO₄ (2,4), KHPO₄ (0,6), N-2-ácido hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfónico (HEPES) (10) y dextrosa (10). La solución se ajustó a pH 7,4 con NaOH.
 Solución apical (en mM): Al igual que la solución basolateral con NaCl reemplazado con Na Gluconato (135).

5. Cultivo de la célula

Se utilizaron células Fisher epiteliales de rata (FRT) que expresan $\Delta F508$ -RTFQ (FRT $^{\Delta F508\text{-RTFQ}}$) para los experimentos de cámara de Ussing para los moduladores ex F508-RTFQ putativos identificados a partir de nuestros ensayos ópticos. Las células fueron cultivadas en Costar Snapwell insertos de cultivo de células y se cultivaron durante cinco días a 37°C y 5% de CO₂ en modificado F-12 medio de Coon de Ham suplementado con suero de ternera fetal al 5%, 100 U/ml de penicilina, y 100 mg/ml estreptomicina. Antes de su uso para la caracterización de la actividad potenciador de los compuestos, las células se incubaron a 27°C durante 16 - 48 horas para corregir el $\Delta F508$ -RTFQ. 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.

6. Registros de células enteras

La corriente macroscópica $\Delta F508$ -RTFQ ($I_{\Delta F508}$) en células NIH3T3 con corrección de compuestos de prueba y temperatura que expresan establemente $\Delta F508$ -RTFQ se monitorearon mediante el parche perforado, células enteras de grabación. Brevemente, los registros de fijación de voltaje de $I_{\Delta F508}$ se realizaron a temperatura ambiente usando un amplificador de pinza de parche Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). Todos los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y filtrados a paso bajo a 1 kHz. Las pipetas tenían una resistencia de 5-6 M Ω cuando se llenaron con la solución intracelular. Bajo estas condiciones de grabación, el potencial de inversión calculado para Cl⁻(E_{C1}) a temperatura ambiente era de -28 mV. Todos los registros tuvieron un sello de resistencia > 20 G Ω y una resistencia en serie <15 M Ω . La generación de pulsos, la adquisición de datos y el análisis se realizaron usando un PC equipado con un interfaz Digidata 1320 A/D junto con Clampex 8 (Axon Instruments Inc.). El baño contenía <250 μl de solución salina y se perfundieron continuamente a una velocidad de 2 ml/min usando un sistema de perfusión por gravedad.

7. Identificación de compuestos de corrección

Para determinar la actividad de los compuestos de corrección para aumentar la densidad de $\Delta F508$ -RTFQ funcional en la membrana plasmática, se utilizaron las técnicas de registro de parche perforado descritas anteriormente para medir la densidad de corriente después de un tratamiento de 24 horas con los compuestos de corrección. Para activar completamente $\Delta F508$ -RTFQ, forskolina 10 μM y genisteína 20 μM se añadieron a las células. Bajo nuestras condiciones de grabación, la densidad de corriente después de la incubación de 24 horas a 27°C era mayor que la observada después de la incubación de 24 horas a 37°C. Estos resultados son consistentes con los efectos conocidos de incubación a baja temperatura sobre la densidad de $\Delta F508$ -RTFQ en la membrana plasmática. Para determinar los efectos de los compuestos de corrección en la densidad de corriente RTFQ, las células fueron incubadas con 10 μM del compuesto de ensayo durante 24 horas a 37°C y la densidad de corriente se comparó con controles de 27°C y 37°C (% de actividad). Antes del registro, las células se lavaron 3X con medio de registro extracelular para retirar cualquier compuesto de ensayo restante. La preincubación con 10 μM de los compuestos de corrección aumentó significativamente el cAMP y la genisteína dependiente actual en comparación con los controles de 37°C.

8. Identificación de compuestos potenciadores

La capacidad de los potenciadores $\Delta F508$ -RTFQ para aumentar la corriente $\Delta F508$ -RTFQ Cl^- macroscópica ($I_{\Delta F508}$) en células NIH₃T3 que expresan establemente $\Delta F508$ -RTFQ También se investigó el uso de técnicas de registro-parche-perforado. Los potenciadores identificados a partir de los ensayos ópticos evocaron un aumento dependiente de la dosis en $I_{\Delta F508}$ con una potencia similar y eficacia observada en los ensayos ópticos. En todas las células examinadas, el potencial de inversión antes y durante la aplicación de potenciador era de alrededor de -30 mV, que es el E_{C1} calculado (-28 mV).

9. Soluciones

Solución intracelular (en mM): Cs-aspartato (90), de CsCl (50), MgCl₂ (1), HEPES (10), y 240 mg/ml amfotericina- B (pH ajustado a 7,35 con CsOH).

Solución extracelular (en mM): N-metilo-D-glucamina (NMDG)-Cl (150), MgCl₂ (2), CaCl₂ (2), HEPES (10) (pH ajustado a 7,35 con HCl).

10. Cultivo de la célula

Fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan establemente $\Delta F508$ -RTFQ se utilizan para los registros de células enteras. Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO₂ 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/strep, y 25 mM HEPES en frascos de cultivo de 175 cm². Para registros de células enteras, 2.500 - 5.000 células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24 - 48 horas a 27°C antes de su uso para probar la actividad de los potenciadores; y se incubaron con o sin el compuesto de corrección a 37°C para medir la actividad de los correctores.

11. Registros monocanales

Las actividades monocanales de $\Delta F508$ -RTFQ corregida por temperatura establemente expresadas en células NIH3T3 y se observaron actividades de compuestos potenciadores usando parche de membrana extirpado de dentro a fuera. Brevemente, los registros de fijación de voltaje de la actividad monocanal se realizaron a temperatura ambiente con un amplificador de pinza de parche Axopatch 200B (Axon Instruments Inc.). Todos los registros se adquirieron a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y filtrados de paso bajo a 400 Hz. Las pipetas de parche fueron fabricadas a partir de Corning Kovar Sealing #7052 vidrio (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) y tenían una resistencia de 5 - 8 MΩ cuando se llena con la solución extracelular. El $\Delta F508$ -RTFQ se activó después de la escisión, mediante la adición de 1 mM Mg-ATP, y 75 nM de la proteína quinasa dependiente de AMPc, subunidad catalítica (PKA; Promega Corp. Madison, WI). Después de la actividad del canal estabilizado, el parche se perfundió usando un sistema de microperfusión por gravedad. La afluencia fue colocada adyacente al parche, dando como resultado el intercambio de solución completa dentro de 1-2 seg. Para mantener la actividad $\Delta F508$ -RTFQ durante la rápida perifusion, se añadió el inhibidor de la fosfatasa F no específica (10mM NaF) a la solución del baño. Bajo estas condiciones de registro, la actividad del canal permaneció constante durante toda la duración del registro de parche (hasta 60 min). Las corrientes producidas por la carga positiva en movimiento de las soluciones intra a extracelulares (aniones que se mueven en la dirección opuesta) se muestran como corrientes positivas. El potencial de la pipeta (V_p) se mantuvo a 80 mV.

La actividad del canal se analizó a partir de parches de membrana que contienen ≤ 2 canales activos. El número máximo de aberturas simultáneas determinó el número de canales activos durante el transcurso de un experimento. Para determinar la amplitud de la corriente de un solo canal, los datos registrados a partir de 120 segundos de la actividad $\Delta F508$ -RTFQ se filtró "fuera de líneal" a 100 Hz y después se utilizaron para construir histogramas de amplitud de todos puntos que fueron equipados con funciones multigaussianas utilizando software de análisis Bio-Patch (Bio-Logic Comp. Francia). La probabilidad actual y abierta microscópica total (P_o) se determinó a partir de 120 segundos de la actividad del canal. El P_o se determinó utilizando el software de Bio-Patch o de la relación $P_o = I/i (N)$, donde I = corriente media, i = amplitud de corriente monocanal, y N = número de canales activos en el parche.

12. Soluciones

Solución extracelular (en mM): NMDG (150), ácido aspártico (150), CaCl₂ (5), MgCl₂ (2), y HEPES (10) (pH ajustado a 7,35 con base Tris).

Solución intracelular (en mM): NMDG-Cl (150), MgCl₂ (2), EGTA (5), TES (10), y base Tris (14) (pH ajustado a 7,35 con HCl).

13. Cultivo de célula

5 Fibroblastos de ratón NIH₃T3 que expresan establemente ΔF508-RTFQ se utilizan para registros de pinza
de parche de membrana extirpada. Las células se mantuvieron a 37°C en 5% de CO₂ 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/strep, y 25 mM HEPES en frascos de cultivo de 175 cm². Para los registros de canales individuales, 2.500 -
10 5.000 células fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24 - 48 horas a
27°C antes de su uso.

Usando los procedimientos descritos anteriormente, la actividad, es decir, CE50, del Compuesto 1 se ha
medido y se muestra en la Tabla 13.

15

Tabla 13

20

IC50/EC50 Agr.: +++ <= 2,0 < ++ <= 5,0 < +		
centActividad Agr.: + <= 25,0 < ++ <= 100,0 < +++		
Nº de compuesto,	EC50Agr.	EficaciaMáximaAgr.
1	+++	+++

25

30

35

40

45

50

55

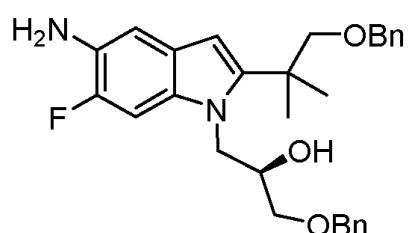
60

65

REIVINDICACIONES

5 **1.** Un compuesto de la fórmula:

10

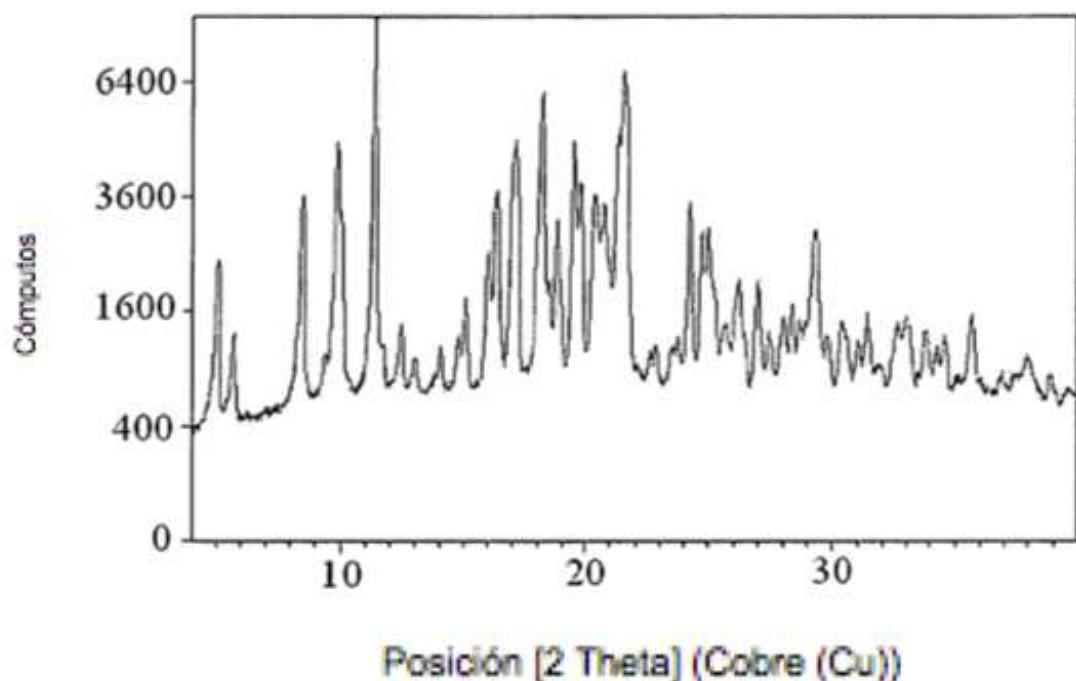


15

o una sal del mismo.

20

Figura 1



ES 2 804 202 T3

Figura 2

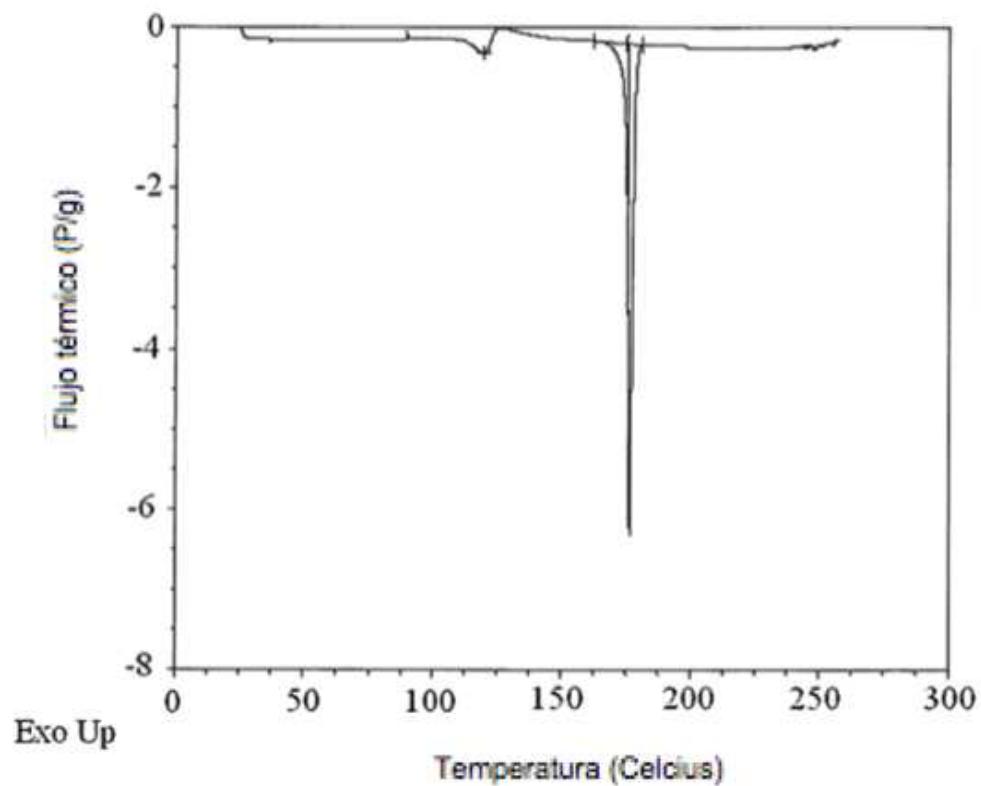
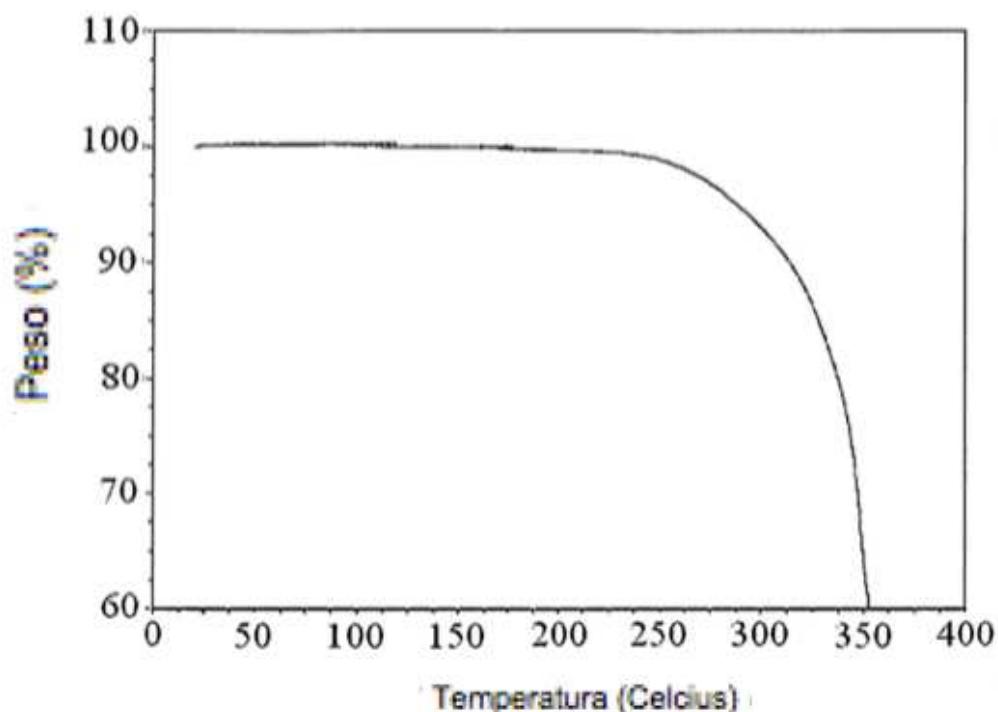
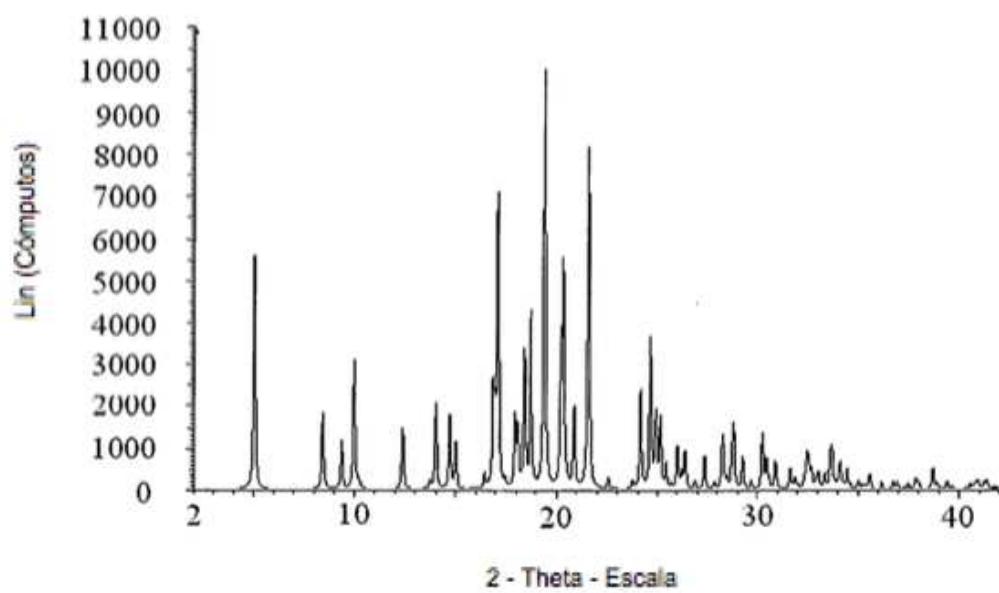


Figura 3



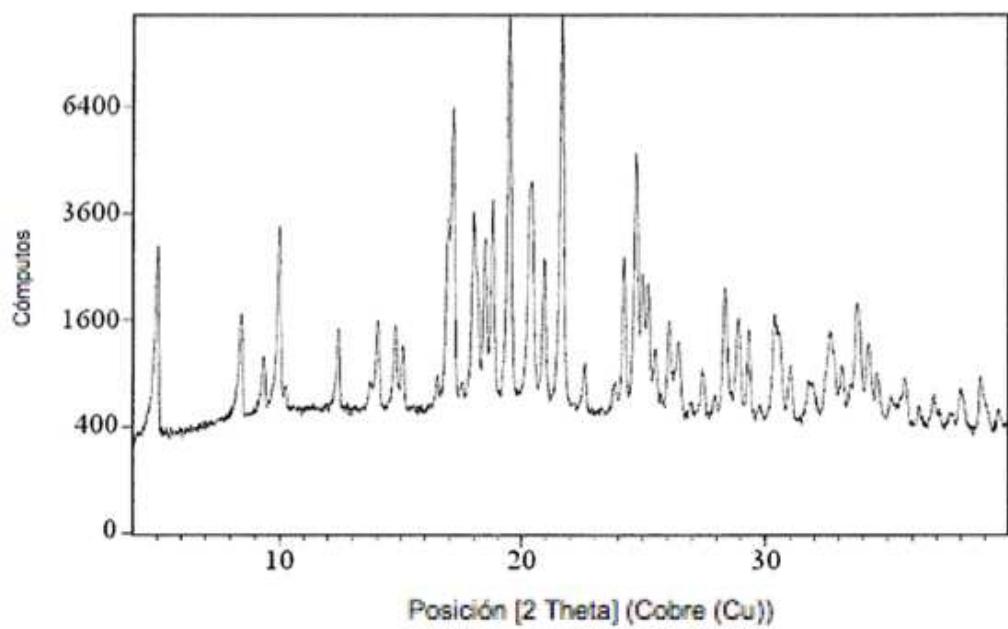
ES 2 804 202 T3

Figura 4



ES 2 804 202 T3

Figura 5



ES 2 804 202 T3

Figura 6

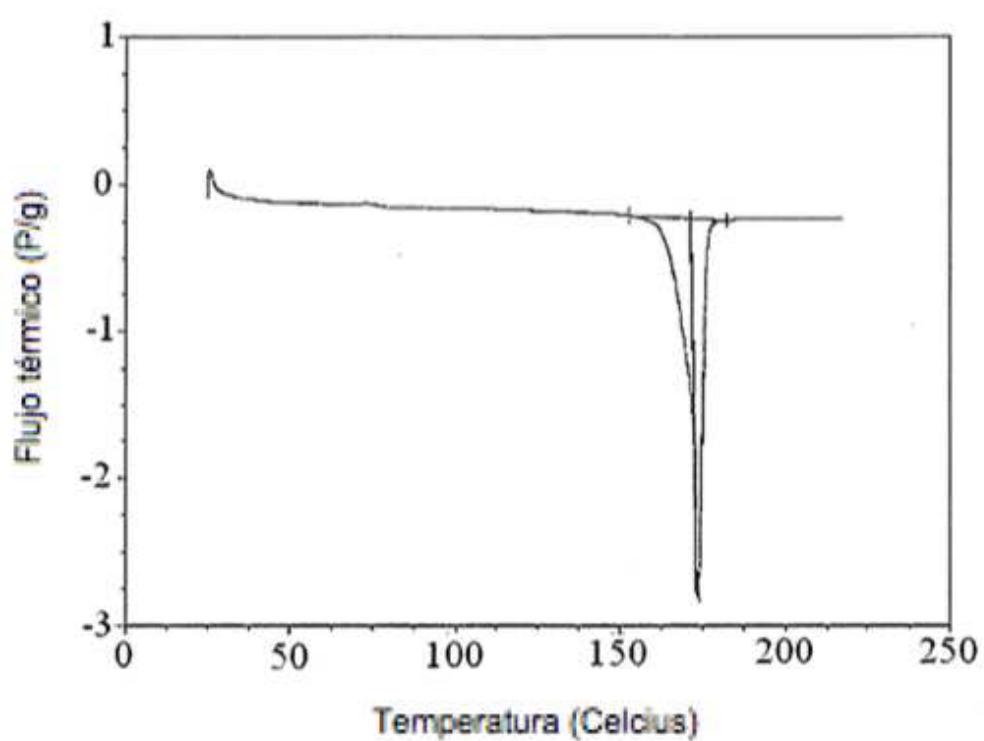
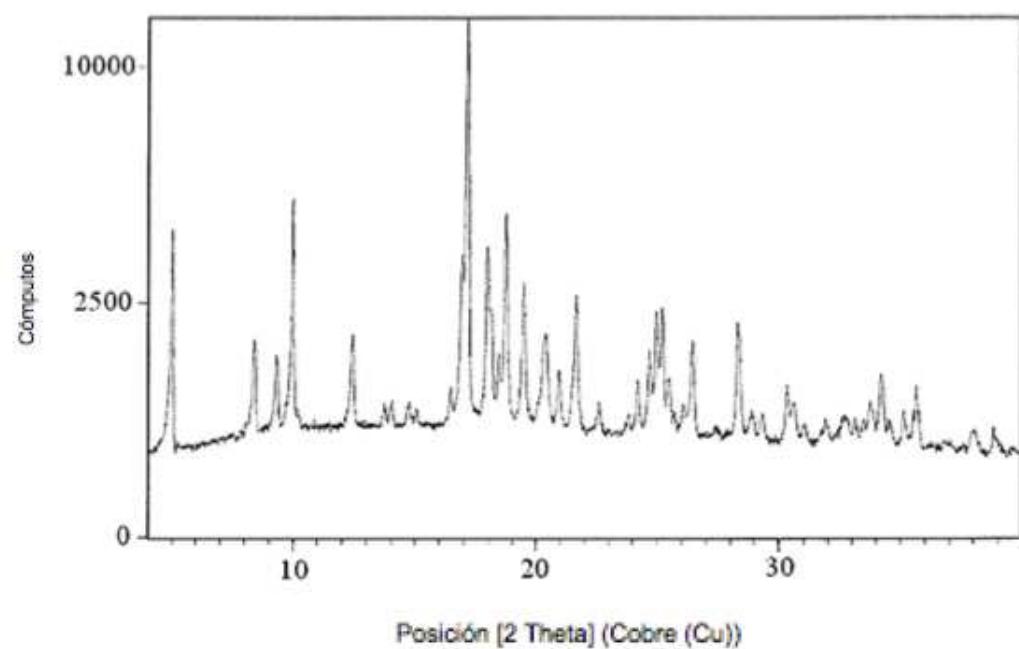


Figura 7



ES 2 804 202 T3

Figura 8

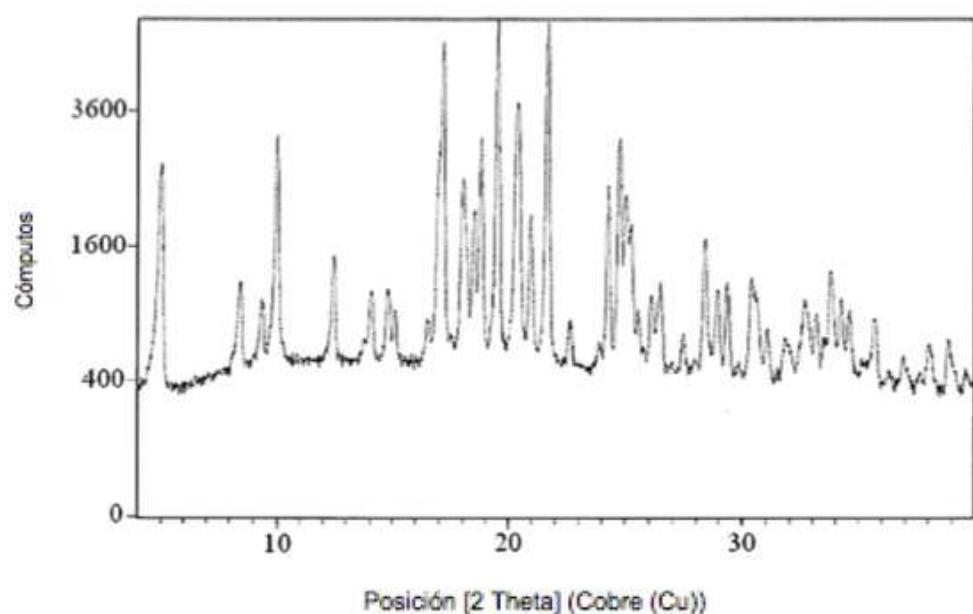


Figura 9

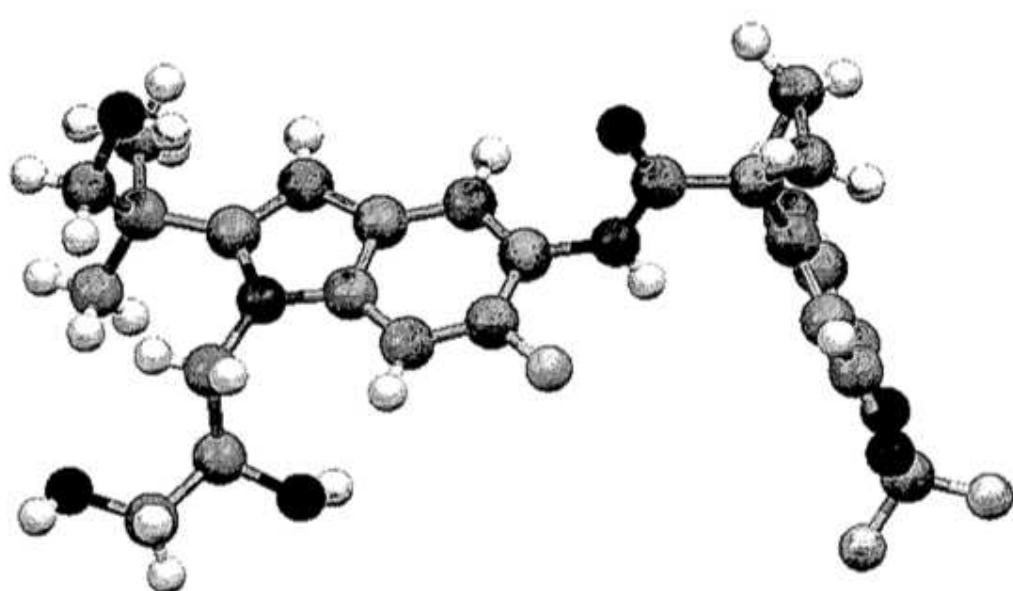


Figura 10

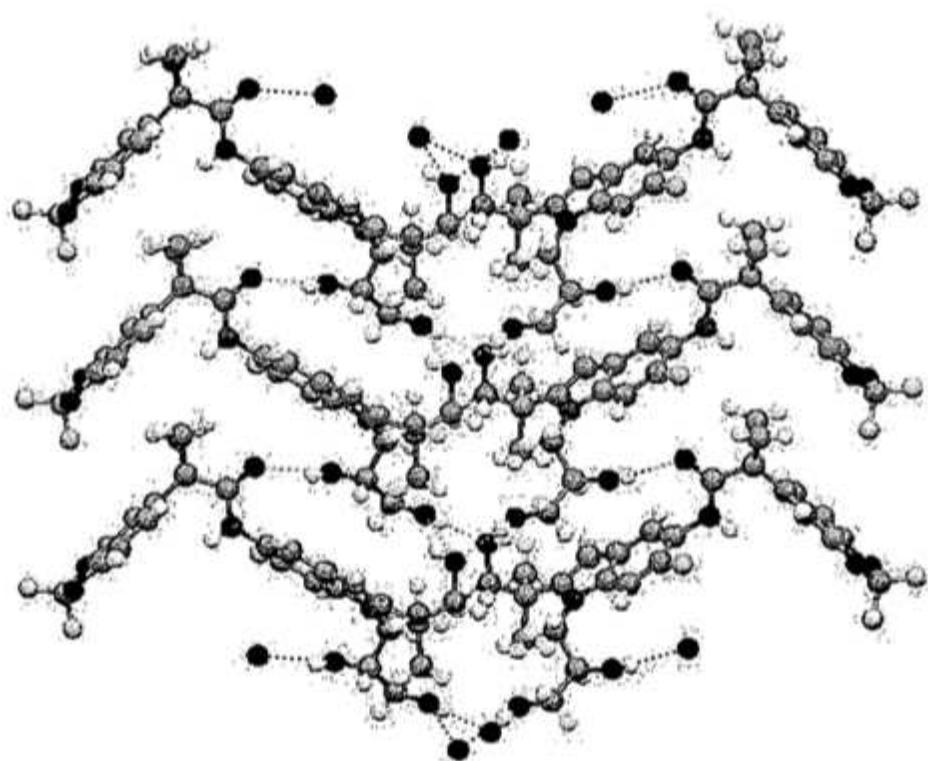


Figura 11

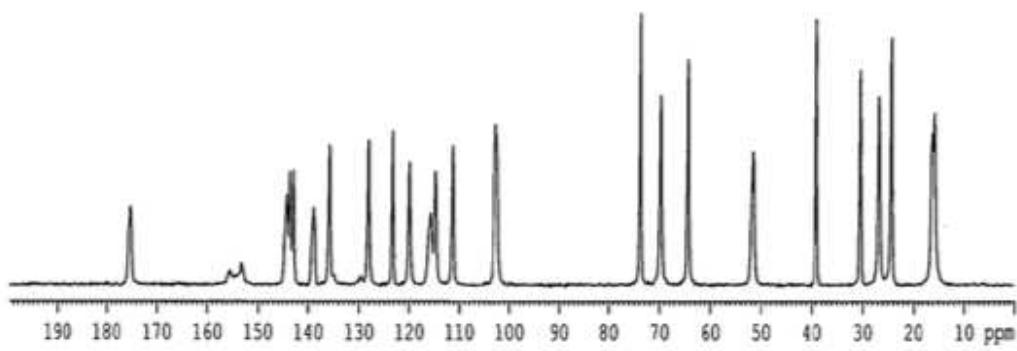


Figura 12

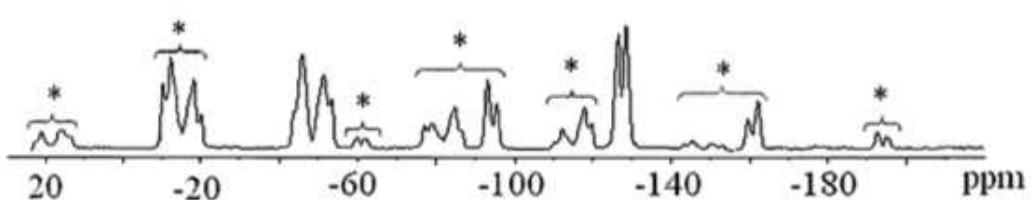


Figura 13

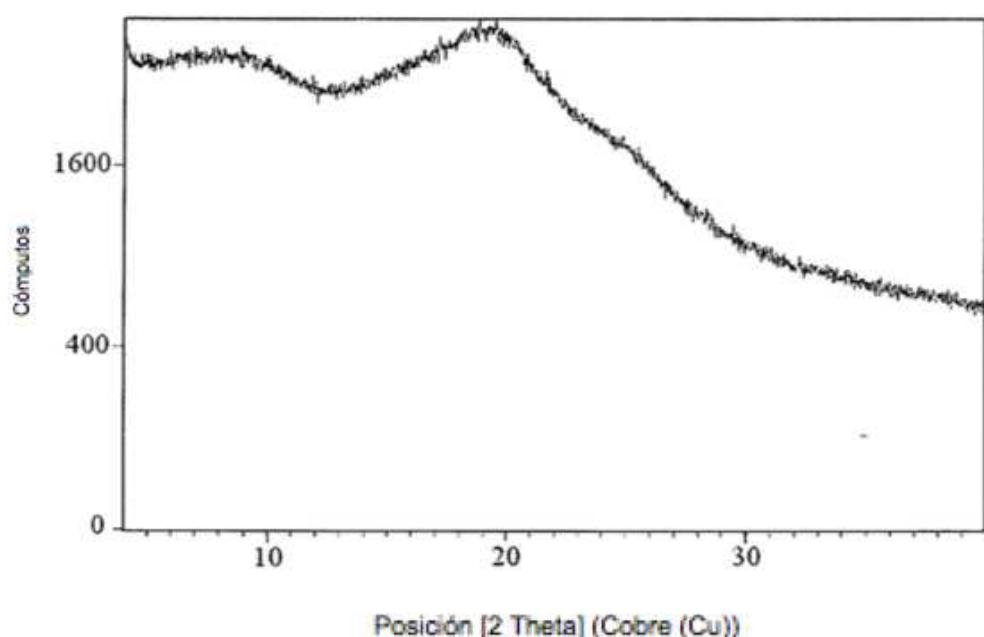


Figura 14

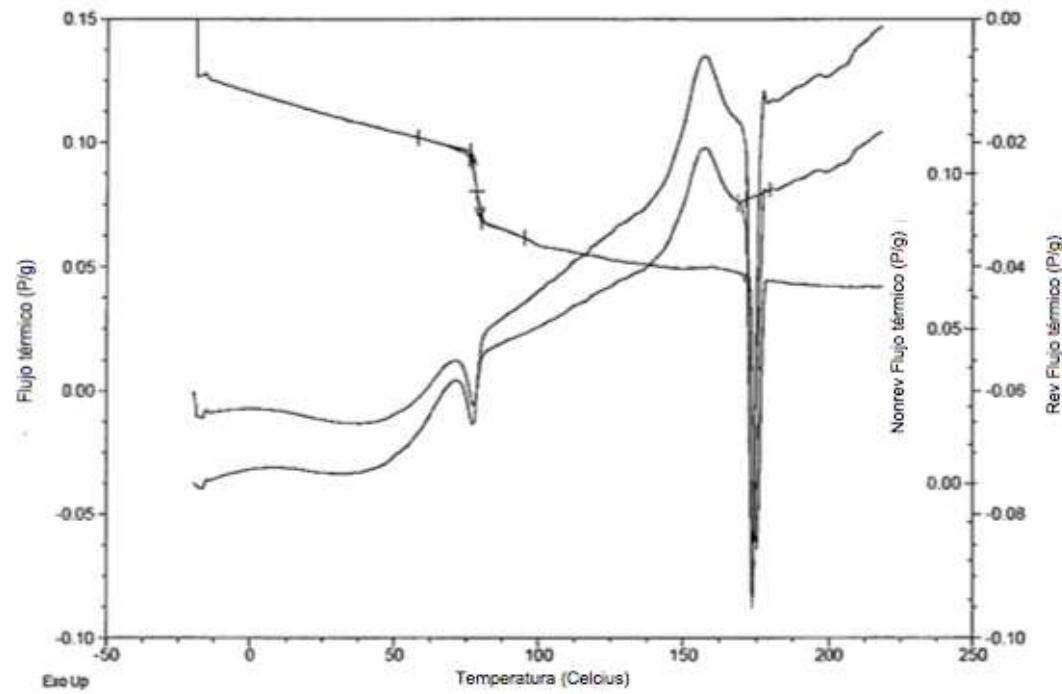
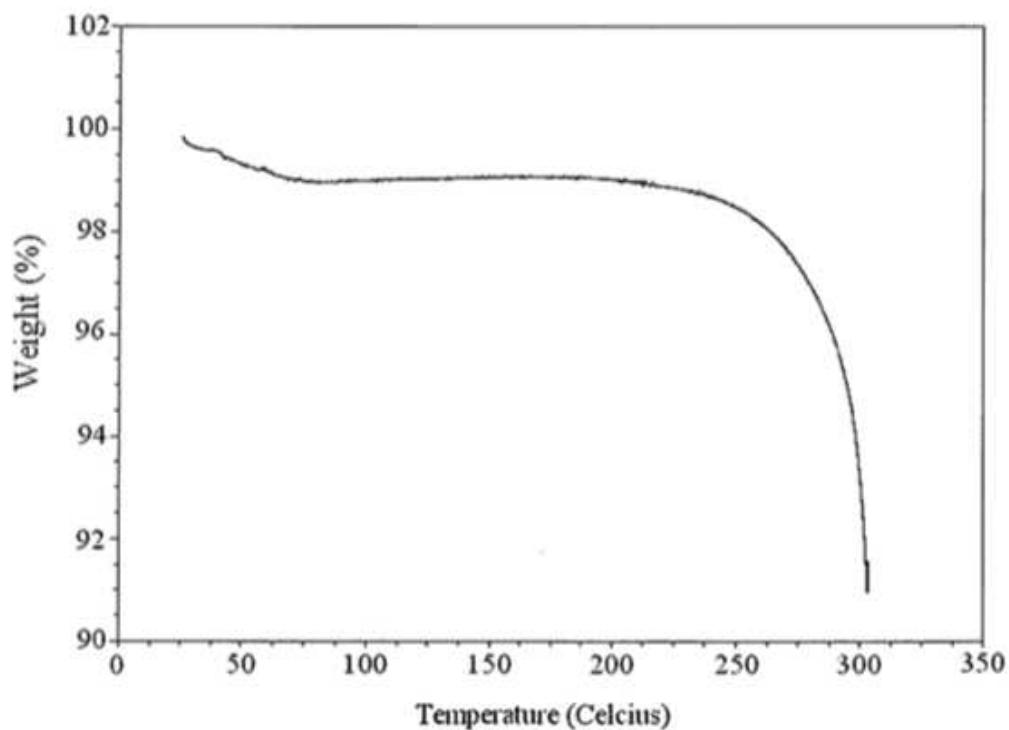
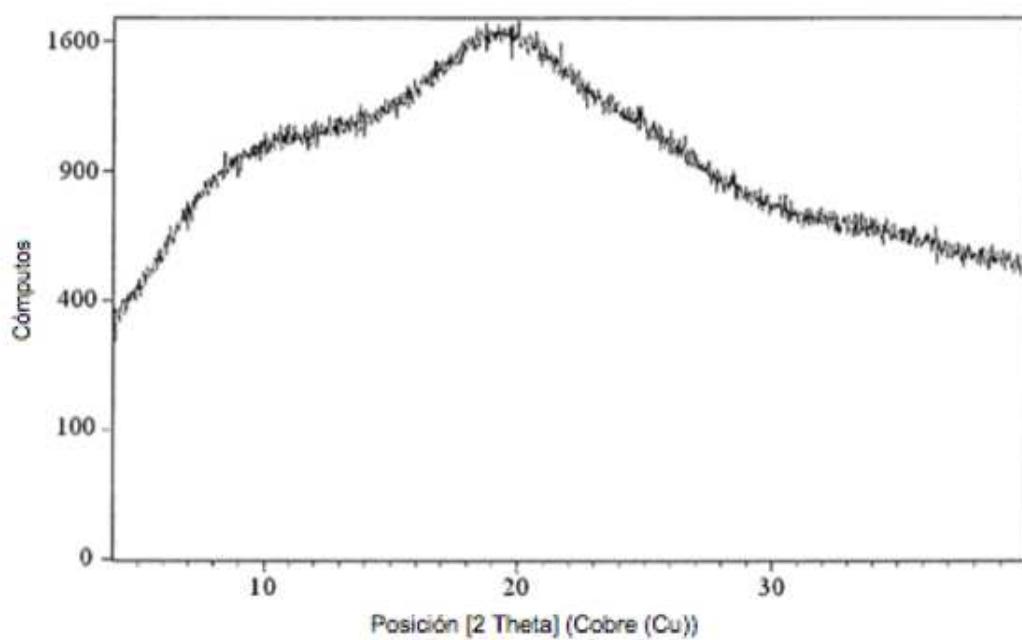


Figura 15



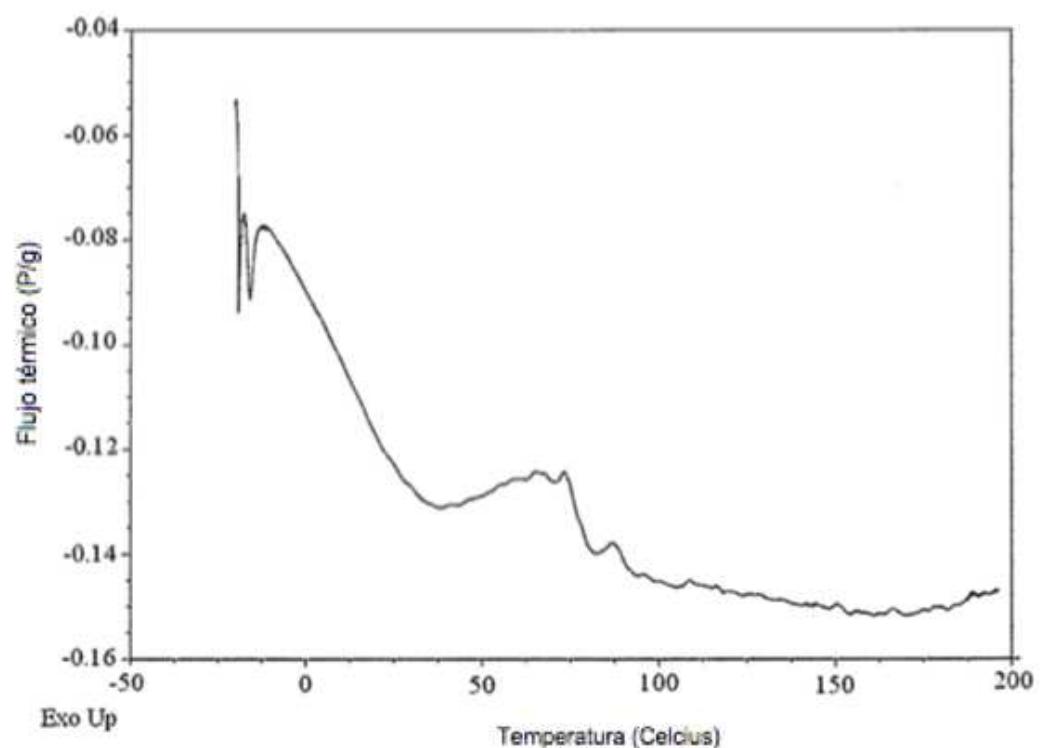
ES 2 804 202 T3

Figura 16



ES 2 804 202 T3

Figura 17



ES 2 804 202 T3

Figura 18

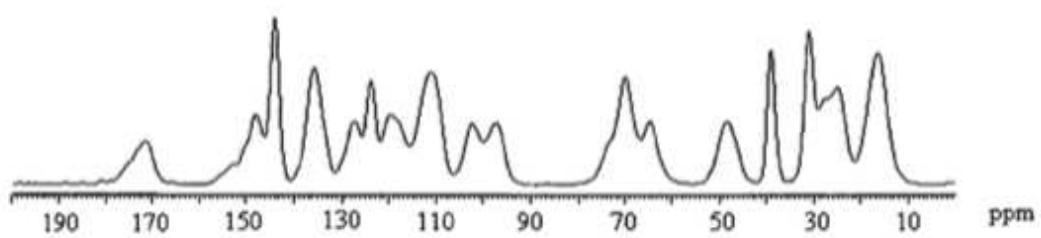
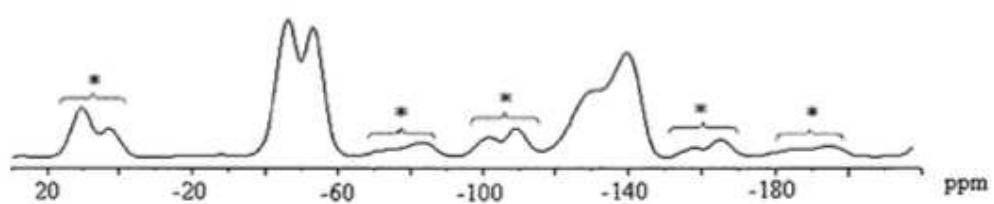


Figura 19



10237207.1