

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 993 060**

51 Int. Cl.:

C07D 405/12	(2006.01) A61P 7/04	(2006.01)
A61K 31/443	(2006.01) A61P 7/12	(2006.01)
A61P 11/00	(2006.01) A61P 9/00	(2006.01)
A61K 31/4709	(2006.01) A61P 13/12	(2006.01)
A61P 1/18	(2006.01) A61P 15/00	(2006.01)
A61P 3/00	(2006.01) A61P 19/08	(2006.01)
A61P 3/06	(2006.01) A61P 25/00	(2006.01)
A61P 3/10	(2006.01) A61P 25/28	(2006.01)
A61P 5/16	(2006.01) A61P 27/04	(2006.01)
A61P 5/50	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2008** **E 20157902 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2024** **EP 3683218**

54 Título: **Formas solidas de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il) benzoico**

30 Prioridad:

07.12.2007 US 12162 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.12.2024

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KESHAVARZ-SHOKRI, ALI;
ZHANG, BEILI y
KRAWIEC, MARIUSZ**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 993 060 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formas solidas de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a formas de dosificación sólidas para administración oral que comprenden formas cristalinas sólidas de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico, formas de dosificación sólidas de la invención para su uso en métodos para tratar la fibrosis quística en un humano, y el uso de formas de dosificación solidas de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar la fibrosis quística en un humano.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El CFTR es un canal de aniones mediado por cAMP/ATP que se expresa en diversos tipos de células, incluyendo las células epiteliales de absorción o secreción, donde 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 del CFTR es crucial para el mantenimiento del transporte de electrolitos a través del cuerpo, incluyendo los tejidos respiratorios y digestivos. El CFTR se compone de aproximadamente 1480 aminoácidos que codifican una proteína compuesta de una repetición en tándem de dominios transmembrana (o segmentos transmembrana), de manera que cada uno de ellos contiene seis hélices transmembrana y un dominio de unión de nucleótidos. Los dos dominios transmembrana están unidos mediante un dominio de regulación (R) grande y polar con múltiples sitios de fosforilación que regulan la actividad del canal y el tráfico celular.

Se ha identificado y secuenciado el gen que codifica el CFTR (ver Gregory, R. J. Et al. (1990) Nature 347:382-386; Rich, D. P. et al. (1990) Nature 347:358-362), (Riordan, J. R. et al. (1989) Science 245:1066-1073). Un defecto en este gen provoca mutaciones en el CFTR que causan fibrosis quística (FQ), la enfermedad genética mortal más común en humanos. La fibrosis quística afecta, aproximadamente, a un niño de cada 2500 en los Estados Unidos. Dentro de la población total de Estados Unidos, hasta 10 millones de personas son portadoras de una única copia del gen defectuoso sin que presenten síntomas aparentes de enfermedad. Por el contrario, los individuos con dos copias del gen asociado con la FQ padecen los efectos debilitantes y mortales de la FQ, incluyendo enfermedad pulmonar crónica.

En los pacientes con fibrosis quística, las mutaciones en el CFTR que se expresan de manera endógena en los epitelios respiratorios provocan una reducción de la secreción apical de aniones que causa un desequilibrio en el transporte de iones y fluidos. La disminución resultante en el transporte de aniones contribuye a aumentar la acumulación de mucosidad en el pulmón y las consiguientes infecciones microbianas que finalmente provocan la muerte en los pacientes de FQ. Además de enfermedades respiratorias, los pacientes con FQ sufren habitualmente problemas gastrointestinales e insuficiencia pancreática que, en el caso de no ser tratados, provocan la muerte. Además, la mayoría de varones con fibrosis quística son estériles y la fertilidad se ve disminuida entre las mujeres con fibrosis quística. A diferencia de los efectos severos de dos copias del gen asociado con la FQ, los individuos con una sola copia del gen asociado con la FQ muestran un aumento en la resistencia al cólera y a la deshidratación resultante de la diarrea -lo que tal vez explique la frecuencia relativamente alta del gen de la FQ en la población-.

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

La eliminación del residuo 508 en $\Delta F508$ -CFTR impide que la proteína naciente se pliegue correctamente. Esto provoca la incapacidad de la proteína mutante para abandonar el retículo endoplasmático (RE) y ser transportada a la membrana plasmática. Como resultado, el número de canales presentes en la membrana es muy inferior al observado en células que expresan el CFTR de tipo natural. Además de un tráfico alterado, la mutación provoca un funcionamiento defectuoso de los canales. Conjuntamente, el número reducido de canales en la membrana y el funcionamiento defectuoso dan lugar a un transporte reducido de aniones a través del epitelio, lo que provoca un transporte defectuoso de iones y de fluidos. (Quinton, P. M. (1990), FASEB J. 4: 2709-2727). No obstante, los estudios han demostrado que el número reducido de $\Delta F508$ -CFTR en la membrana es funcional, aunque menos que el CFTR de tipo natural. (Dalemans et al. (1991), Nature Lond. 354: 526-528; Denning et al., supra; Pasyk y Foskett (1995), J. Cell. Biochem. 270: 12347-50). Además del $\Delta F508$ -CFTR, otras mutaciones en el CFTR que provocan enfermedades y que provocan un tráfico, una síntesis y/o un funcionamiento defectuosos de los

canales se podrían regular hacia arriba o hacia abajo para alterar la secreción aniónica y modificar la progresión y/o gravedad de la enfermedad.

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

Estos elementos funcionan conjuntamente para conseguir el transporte direccional a través del epitelio por medio de su expresión selectiva y su posición dentro de la célula. La absorción de cloruro tiene lugar gracias a la actividad coordinada del ENaC y el CFTR presentes en la membrana apical, en la bomba de $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ y en los canales de Cl^- expresados en la superficie basolateral de la célula. El transporte activo secundario de cloruro desde la parte luminal provoca una acumulación de cloruro intracelular, que posteriormente puede abandonar pasivamente la célula a través de los canales de Cl^- , dando como resultado un transporte vectorial. La disposición del cotransportador de $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$, la bomba de $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasa}$ y los canales de K^+ de la membrana basolateral en la superficie basolateral y del CFTR en la parte luminal coordina la secreción de cloruro a través del CFTR en la parte luminal. Debido a que, probablemente, el agua misma nunca se transporta activamente, su flujo a través del epitelio depende de pequeños gradientes osmóticos transepiteliales generados por el flujo a granel de sodio y cloruro.

Tal y como se ha explicado previamente, se cree que la eliminación del residuo 508 en el ΔF508 -CFTR impide que la proteína naciente se pliegue correctamente, lo que da como resultado la incapacidad de esta proteína mutante para abandonar el retículo endoplasmático y ser transportada a la membrana plasmática. Como consecuencia de esto, hay presentes cantidades insuficientes de la proteína madura en la membrana plasmática y el transporte de cloruro dentro de los tejidos epiteliales se ve reducido de manera significativa. De hecho, se ha demostrado que este fenómeno celular de procesamiento defectuoso en el retículo endoplasmático de los transportadores de ABC por la maquinaria del retículo endoplasmático es la base subyacente no sólo de la enfermedad de la FQ, sino de un amplio espectro de otras enfermedades aisladas y hereditarias. Las dos formas por las que los mecanismos del retículo endoplasmático pueden funcionar mal son las siguientes: la pérdida de acoplamiento al exportador de las proteínas en el retículo endoplasmático que da lugar a la degradación, o la acumulación en el retículo endoplasmático de estas proteínas defectuosas/mal plegadas [Aridor M, et al, *Nature Med.*, 5(7), págs. 745-751 (1999); Shastry, B.S., et al., *Neurochem. International*, 43, págs. 1-7 (2003); Rutishauser, J., et al., *Swiss Med Wkly*, 132, págs. 211-222 (2002); Morello, JP et al., *TIPS*, 21, págs. 466- 469 (2000); Bross P., et al., *Human Mut.*, 14, págs. 186-198 (1999)].

El ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico en forma de sal se desvela en la Publicación PCT Internacional WO 2007056341 como un modulador de la actividad del CFTR y que, por lo tanto, es útil para tratar las enfermedades reguladas por el CFTR como la fibrosis quística. Sin embargo, existe una necesidad de formas sólidas y estables de dicho compuesto que puedan usarse en composiciones farmacéuticas aptas para uso terapéutico.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona una forma de dosificación sólida para administración oral que comprende ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il)benzoico caracterizada como la Forma I y por lo menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, en donde la Forma I se caracteriza como una forma cristalina que tiene un sistema cristalino monoclínico, un grupo espacial $\text{P2}_1/\text{n}$, y las siguientes dimensiones celulares unitarias:

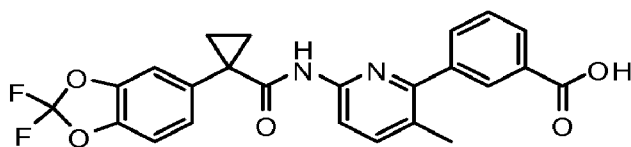
$$\begin{array}{ll} a = 4.9626 \text{ (7) \AA} & \alpha = 90^\circ \\ b = 12.2994 \text{ (18) \AA} & \beta = 93.938 \text{ (9)^\circ} \\ c = 33.075 \text{ (4) \AA} & \gamma = 90^\circ, \text{ y/o} \end{array}$$

en donde la Forma I se caracteriza por uno o más picos a $15.4 \text{ grados} \pm 0.2 \text{ grados}$, $16.3 \text{ grados} \pm 0.2 \text{ grados}$ y $14.5 \text{ grados} \pm 0.2 \text{ grados}$ en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación Cu K alfa a 40 kV, 35 mA.

La presente invención también proporciona una forma de dosificación sólida de la invención para su uso en un método para tratar la fibrosis quística en un humano.

La presente invención también proporciona el uso de una forma de dosificación sólida de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar la fibrosis quística en un humano.

El ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il)benzoico (en los sucesivo, 'Compuesto 1') tiene la estructura siguiente:



Compuesto 1.

El Compuesto 1 y las composiciones farmacéuticamente aceptables del mismo son útiles para tratar o disminuir la gravedad de la fibrosis quística. En la invención, el Compuesto 1 está en una forma sustancialmente cristalina y libre de sal referida como Forma I como se describe y se caracteriza en la presente.

Los procesos que se describen en el presente texto pueden utilizarse para preparar composiciones de esta invención que comprenden la Forma I. Las cantidades y las características de los componentes utilizados en dichos procesos serán las que se describen en el presente texto.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es un patrón o modelo de difracción de rayos X calculado a partir de una única estructura de cristal del Compuesto 1 en la Forma I.

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

La Figura 3 es una transparencia de un patrón de difracción de rayos X calculado a partir de un único cristal del Compuesto 1 en la Forma I, y un patrón real de difracción de rayos X por el método de polvo del Compuesto 1 en la Forma I.

La Figura 4 es una calorimetría diferencial de barrido (DSC) del Compuesto 1 en la Forma I.

La Figura 5 es una imagen conformacional del Compuesto 1 en la Forma I basada en un análisis mediante rayos X de un solo cristal.

La Figura 6 es una imagen conformacional del Compuesto 1 en la Forma I basada en un análisis mediante rayos X de un solo cristal, como un dímero formado en los grupos de ácido carboxílico.

La Figura 7 es una imagen conformacional del Compuesto 1 en la Forma I basada en un análisis mediante rayos X de un solo cristal que muestra que las moléculas están apiladas unas encima de otras.

La Figura 8 es una imagen conformacional del Compuesto 1 en la Forma I basada en un análisis mediante rayos X de un solo cristal que muestra una vista diferente (abajo a).

La Figura 9 es un análisis por ^1H NMR del Compuesto 1 en la Forma I en una suspensión de 50 mg/mL, 0,5 metil celulosa-polisorbato 80 a T(0).

La Figura 10 es un análisis por ^1H NMR del Compuesto 1 en la Forma I en una suspensión de 50 mg/mL, 0,5 metil celulosa-polisorbato 80 conservada a temperatura ambiente durante 24 horas.

La Figura 11 es un análisis por ^1H NMR del Compuesto 1 • estándar HCl.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Tal y como se utilizan en el presente texto, se tendrán en cuenta las siguientes definiciones a menos que se indique lo contrario.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'CFTR' significa 'regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística' o una mutación cuya capaz de funcionar como regulador de la actividad, incluyendo -pero sin limitarse a- ΔF508 CFTR y G551D CFTR (para las mutaciones del CFTR, ver, por ejemplo, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/>).

Tal y como se utiliza en el presente texto, 'cristalino(a)' hace referencia a los compuestos o composiciones en los que las unidades estructurales están dispuestas en redes o patrones geométricos fijos, de manera que los

sólidos cristalinos tienen un orden de largo alcance rígido. Las unidades estructurales que componen la estructura de cristal pueden ser átomos, moléculas o iones. Los sólidos cristalinos muestran puntos de fusión definidos.

Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'modular' significa aumentar o disminuir, por ejemplo, la actividad, en una cantidad medible.

En la invención, el ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico se caracteriza como la Forma I.

La presente invención proporciona una forma de dosificación sólida para administración oral que comprende ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il)benzoico caracterizada como la Forma I y por lo menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, en donde la Forma I se caracteriza como una forma cristalina que tiene un sistema cristalino monoclinico, un grupo espacial P2₁/n, y las siguientes dimensiones celulares unitarias:

$$\begin{array}{ll} a = 4.9626 (7) \text{ \AA} & \alpha = 90^\circ \\ b = 12.2994 (18) \text{ \AA} & \beta = 93.938 (9)^\circ \\ c = 33.075 (4) \text{ \AA} & \gamma = 90^\circ, \text{ y/o} \end{array}$$

en donde la Forma I se caracteriza por uno o más picos a 15.4 grados \pm 0.2 grados, 16.3 grados \pm 0.2 grados y 14.5 grados \pm 0.2 grados en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación Cu K alfa a 40 kV, 35 mA.

En una realización, la Forma I se caracteriza por mostrar uno o más picos a 15,2-15,6 grados, 16,1-16,5 grados y 14,3-14,7 grados en una difracción de rayos X por el método de polvo obtenida usando radiación alfa Cu K.

En otra realización, la Forma I se caracteriza por mostrar uno o más picos a 15,4; 16,3 y 14,5 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a entre 14,6 y 15,0 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a 14,8 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a entre 17,6 y 18,0 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a 17,8 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a entre 16,4 y 16,8 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a entre 16,4 y 16,8 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a 16,6 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a entre 7,6 y 8,0 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a 7,8 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a entre 25,8 y 26,2 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a 26,0 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a entre 21,4 y 21,8 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a 21,6 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a entre 23,1 y 23,5 grados.

En otra realización, la Forma I se caracteriza además por mostrar un pico a 23,3 grados.

En algunas realizaciones, la Forma I se caracteriza por mostrar un patrón de difracción sustancialmente similar al de la Figura 1.

En algunas realizaciones, la Forma I se caracteriza por mostrar un patrón de difracción sustancialmente similar al de la Figura 2.

La distribución del tamaño de las partículas de D90 puede ser de alrededor de 82 μ m o menos para la Forma I.

La distribución del tamaño de las partículas de D50 puede ser de alrededor de 30 μm o menos para la Forma I.

La presente invención proporciona formas de dosificación sólidas para administración oral que comprenden la Forma I y por lo menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable inerte.

En un aspecto, la presente invención presenta la forma de dosificación sólida de la invención para su uso en un método para tratar la fibrosis quística en un humano que comprende administrar al humano una cantidad eficaz de la Forma I.

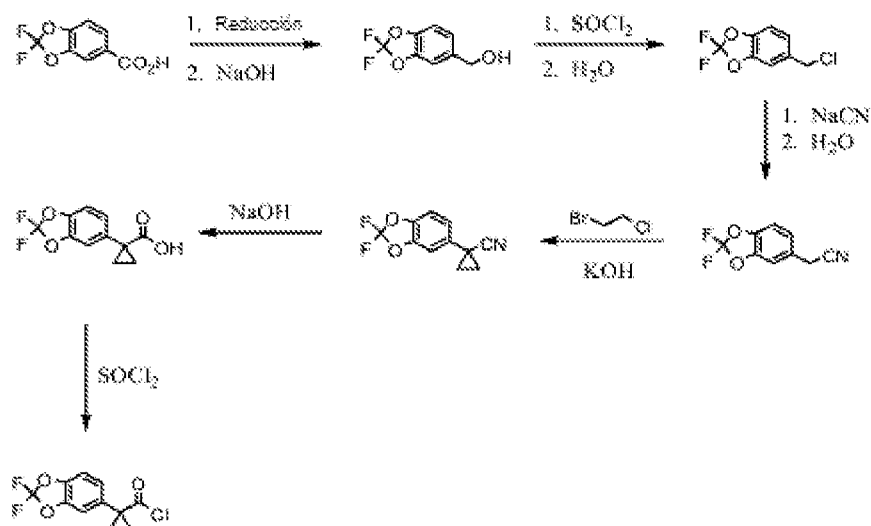
En algunas realizaciones, el método comprende administrar un agente terapéutico adicional.

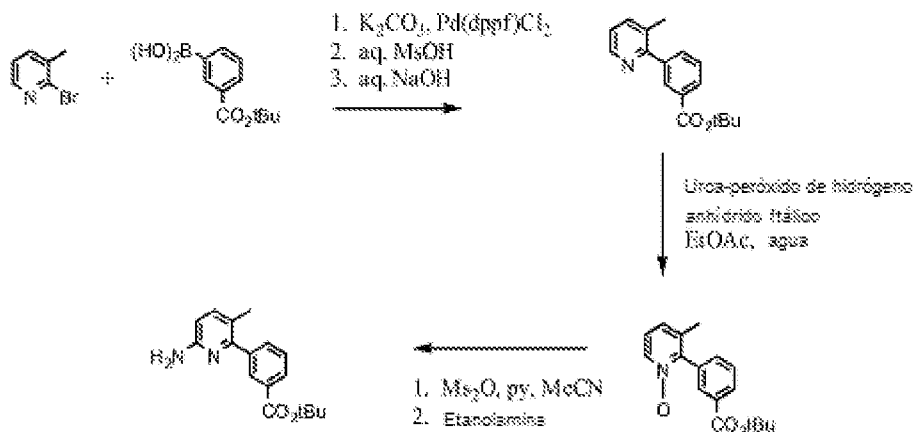
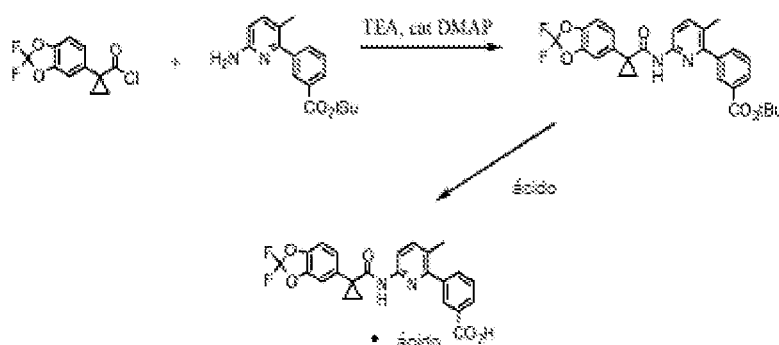
En un aspecto, la invención presenta una forma de cristal del ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico que tiene un sistema de cristal monoclinico, que tiene un grupo espacial $P2_1/n$, y cuyas celdas unidad tienen las siguientes dimensiones: $a = 4,9626$ (7) Å, $b = 12,2994$ (18) Å, $c = 33,075$ (4) Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 93,938$ (9)°, y $\gamma = 90^\circ$.

Métodos para preparar la Forma I.

La Forma I puede prepararse dispersando o disolviendo una forma salina, como HCl, de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico en un disolvente adecuado durante un periodo de tiempo eficaz. La Forma I puede prepararse dispersando una forma salina, como HCl, de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico en un disolvente adecuado durante un periodo de tiempo eficaz. La Forma I puede formarse directamente a partir de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il)-t-butilbenzoato y un ácido adecuado, como el ácido fórmico. La forma salina de HCl del ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico puede ser el punto de partida y puede prepararse uniendo un segmento o fracción de cloruro de acilo con una fracción de amina de acuerdo con los esquemas 1-3.

Esquema 1. Síntesis del segmento o fracción de cloruro de acilo (o cloruro de ácido).



Esquema 2. Síntesis del segmento o fracción de amina.**Esquema 3.** Formación de una sal ácida de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico.

Usando, por ejemplo, la forma salina de HCl del ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico como punto de inicio o punto de partida, la Forma I puede producirse en grandes cantidades dispersando o disolviendo la forma salina de HCl del ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico en un disolvente adecuado durante un periodo de tiempo efectivo. Pueden usarse otras formas salinas de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico como, por ejemplo, otras formas ácidas minerales u orgánicas. Las otras formas salinas son el resultado de la hidrólisis del t-butil éster con el correspondiente ácido. Otras formas ácidas o salinas incluyen nitrógeno, sulfúrico, fosfórico, bórico, acético, benzoico, malónico y similares. La forma salina del ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico puede ser soluble o no dependiendo del disolvente utilizado, pero la falta de solubilidad no impide la formación de la Forma I. Por ejemplo, el disolvente adecuado puede ser agua o una mezcla alcohol/agua como una mezcla al 50% de metanol/agua, a pesar de que la forma salina de HCl del ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico sólo es ligeramente soluble en agua. El disolvente adecuado puede ser agua.

El periodo de tiempo efectivo para la formación de la Forma I a partir de la forma salina del ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico puede ser de entre 2 y 24 horas o mayor. Normalmente, no se necesitan más de 24 horas para obtener un alto rendimiento (~98%), pero algunos disolventes pueden requerir periodos de tiempo más largos. También se sabe que el periodo de tiempo que se necesita es inversamente proporcional a la temperatura. Es decir, cuanto mayor es la temperatura menor es el tiempo necesario para provocar la disociación del ácido y formar la Forma I. Cuando el disolvente es agua, removiendo la dispersión durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente se obtiene la Forma I con un rendimiento del 98% aproximadamente. Si se requiere una solución de la forma salina del ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico por necesidades del proceso, puede utilizarse una temperatura elevada. Después de remover la solución durante un periodo de tiempo efectivo a una temperatura elevada, la recrystalización por enfriamiento produce formas básicamente puras de la Forma I. 'Básicamente puro' puede referirse a más de alrededor el 90% de pureza. 'Básicamente puro' puede referirse a más de alrededor el 95% de pureza. 'Básicamente puro' puede referirse a más de alrededor el 98% de pureza. 'Básicamente puro' puede referirse a más de alrededor el 99% de pureza. La temperatura escogida depende en

parte del disolvente utilizado, y determinarla se encuentra dentro del rango de capacidades de una persona con conocimientos y habilidades comunes en la materia. La temperatura puede estar entre la temperatura ambiente y alrededor de 80°C. La temperatura puede estar entre la temperatura ambiente y alrededor de 40°C. La temperatura puede estar entre alrededor de 40° y alrededor de 60°C. La temperatura puede estar entre alrededor de 60° y alrededor de 80°C.

La Forma I puede depurarse aún más mediante la recristalización a partir de un disolvente orgánico. Los ejemplos de disolventes orgánicos incluyen -pero no se limitan a- tolueno, cumeno, anisol, 1-butanol, isopropilacetato, butil acetato (o acetato de butilo), isobutil acetato, metil t-butil éter, metil isobutil cetona, o 1-propanol/agua (en diferentes proporciones). La temperatura puede utilizarse tal y como se ha descrito previamente. Por ejemplo, la Forma I puede disolverse en 1-butanol a 75°C hasta que esté completamente disuelta. Si se enfría la solución a 10°C a un ritmo de 0,2°C/min, se obtienen cristales de la Forma I que pueden aislarse mediante filtrado.

Usos, Formulación y Administración

Composiciones farmacéuticamente aceptables

En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan formas de dosificación sólidas para administración oral, en donde estas composiciones comprenden la Forma I como se describe en la presente, y comprenden por lo menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable inerte. En ciertas realizaciones, estas composiciones comprenden además opcionalmente uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Tal y como se ha descrito previamente, las formas de dosificación sólidas de la presente invención comprenden, adicionalmente, un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable. El excipiente, adyuvante o vehículo, tal y como se utiliza en el presente texto, incluye todos y cada uno de los disolventes, diluyentes u otros vehículos líquidos, agentes de dispersión o suspensión, agentes de superficie activos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, ajustados a la dosis particular deseada. Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980) desvela diversos portadores que se usan para preparar composiciones farmacéuticamente aceptables y conocidas técnicas para su preparación. A no ser que el medio del portador convencional sea incompatible con los compuestos de la invención, como, por ejemplo, produciendo un efecto biológico no deseado o interactuando de cualquier otro modo de forma perjudicial con cualquier otro componente de la composición farmacéuticamente aceptable, se considera que su uso está dentro del alcance de la presente invención. Algunos ejemplos de los materiales que pueden utilizarse como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen -pero no se limitan a- intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, como albúmina sérica humana, sustancias reguladoras o amortiguadoras como fosfatos, glicina, ácido sórbico, o sorbato de potasio, mezclas parciales de glicéridos de ácidos vegetales grasos saturados, agua, sales o electrolitos, como sulfato de protamina, disodio hidrógeno fosfato, potasio hidrógeno fosfato, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinil pirrolidona, poliacrilatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, grasa de lana, azúcares como lactosa, glucosa y sucrosa; almidones como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados como celulosa de sodio carboximetilo, celulosa de etilo y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites 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, como propilenglicol o polietilenglicol; ésteres como etil oleato y etil laurato; agar-agar; agentes amortiguadores como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; y soluciones tampón de fosfato, así como otros lubricantes compatibles no tóxicos como sodio lauril sulfato y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes endulzantes, saborizantes y para perfumar; los conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en la composición, de acuerdo con el criterio de la persona que realice la preparación.

Usos de los Compuestos y Composiciones Farmacéuticamente Aceptables

En otro aspecto más, la presente invención proporciona la forma de dosificación sólida de la invención para su uso en un método para tratar la fibrosis quística en un humano.

Tal y como se utiliza en el presente texto, una 'enfermedad mediada o regulada por el CFTR' es una enfermedad seleccionada entre la fibrosis quística, el enfisema hereditario, la hemocromatosis hereditaria, las deficiencias de coagulación-fibrinólisis, como la deficiencia de proteína C, el angioedema hereditario de Tipo 1, las deficiencias en el procesamiento de lípidos, como la hipercolesterolemia familiar, la quilomicronemía de Tipo 1, la abetalipoproteinemia, las enfermedades relacionadas con el almacenamiento de los lisosomas, como la enfermedad de células I/pseudo-Hurler, las mucopolisacaridosis, Sandhof/Tay-Sachs, Crigler-Najjar de Tipo II, la poliendocrinopatía/hiperinsulemia, la Diabetes mellitus, el síndrome de Laron, la deficiencia de mieloperoxidasa, el hipoparatiroidismo primario, el melanoma, la glicanosis CDG de tipo 1, el enfisema hereditario, el hipertiroidismo congénito, la osteogénesis imperfecta, la hipofibrinogenemia hereditaria, la deficiencia de ACT, la Diabetes insipidus

(DI), la DI neurofiseal, la DI nefrogénica, el síndrome de Charcot-Marie Tooth, la enfermedad de Perlizaeus-Merzbacher, las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la parálisis supranuclear progresiva, la enfermedad de Pick, diversos desórdenes neurológicos de la poliglutamina como la enfermedad de Huntington, la ataxia espinocerebelar de tipo I, la atrofia muscular espinal y bulbar, la atrofia dentato-rubro-pálido-luisiana, y la distrofia miotónica, así como las encefalopatías espongiiformes, como la enfermedad hereditaria de Creutzfeldt-Jakob, la enfermedad de Fabry, el síndrome de Straussler-Scheinker, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), el síndrome del ojo seco y el síndrome de Sjögren.

De acuerdo con la invención, 'una cantidad eficaz' de la Forma I o una composición farmacéuticamente aceptable de esta es aquella cantidad que resulta efectiva o eficaz para tratar o paliar la gravedad de cualquiera de las enfermedades arriba enumeradas.

La Forma I o una composición farmacéuticamente aceptable de esta puede administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración que sean efectivas para tratar o paliar la gravedad de una o más de las enfermedades previamente enumeradas.

Las formas de dosificación sólidas que comprenden la Forma I descrita en el presente texto son útiles para tratar o paliar la gravedad de la fibrosis quística en pacientes que muestran actividad del CFTR residual en la membrana apical de los epitelios respiratorios y no respiratorios. La presencia de actividad del CFTR residual en la superficie epitelial puede detectarse fácilmente usando métodos conocidos en este campo, por ejemplo, técnicas electrofisiológicas, bioquímicas o histoquímicas estándares. Estos métodos identifican la actividad del CFTR usando técnicas electrofisiológicas 'in vivo' o 'ex vivo', mediciones de las concentraciones de Cl⁻ en el sudor o la saliva, o técnicas bioquímicas o histoquímicas 'ex vivo' para monitorizar la densidad de la superficie de la célula. Usando dichos métodos, se puede detectar con facilidad la actividad del CFTR residual en pacientes heterocigóticos u homocigóticos con diversas mutaciones diferentes, incluyendo pacientes homocigóticos o heterocigóticos con la mutación más habitual: $\Delta F508$.

Las formas de dosificación sólidas que comprenden la Forma I descrita en el presente texto son útiles para tratar o paliar la gravedad de la fibrosis quística en pacientes con ciertos genotipos que muestran actividad del CFTR residual, por ejemplo, mutaciones de clase III (regulación o apertura y cierre alterados), mutaciones de clase IV (conductancia alterada) o mutaciones de clase V (síntesis reducida) (Lee R. Choo-Kang, Pamela L., Zeitlin, 'Type I, II, III, IV, and V cystic fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Defects and Opportunities of Therapy'; Current Opinion in Pulmonary Medicine 6:521 – 529, 2000). Los genotipos de otros pacientes que muestran actividad del CFTR residual incluyen pacientes homocigóticos con una o más de estas clases y pacientes heterocigóticos con cualquier otra clase de mutación, incluyendo mutaciones de clase I y II o una mutación sin clasificar.

Las formas de dosificación sólidas que comprenden la Forma I descrita en el presente texto son útiles para tratar o paliar la gravedad de la fibrosis quística en pacientes con ciertos fenotipos clínicos, por ejemplo, un fenotipo clínico entre leve y moderado que normalmente se corresponde con la cantidad de actividad del CFTR residual en la membrana apical de los epitelios. Estos fenotipos incluyen pacientes que muestran insuficiencia pancreática o pacientes diagnosticados con pancreatitis idiopática y ausencia congénita bilateral del conducto deferente, o enfermedad pulmonar leve.

La cantidad exacta requerida varía de sujeto a sujeto dependiendo de la especie, la edad y la condición general del sujeto, la gravedad de la infección, el agente particular y su modo de administración. Tal y como se utiliza en el presente texto, la expresión 'forma de dosificación unitaria' o 'dosis unitaria' hace referencia a una unidad físicamente discreta de un agente adecuado para el paciente que se ha de tratar. Sin embargo, debe entenderse que el uso total diario de los compuestos y composiciones de la presente invención se decidirá atendiendo a los criterios del médico y dentro del alcance del buen juicio médico. El nivel de dosis efectivo específico para cualquier paciente particular u organismo dependerá de diversos factores, incluyendo el desorden tratado y la gravedad de dicho desorden; la actividad del compuesto específico utilizado; la composición específica utilizada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración, la vía de administración y el ritmo de excreción del compuesto específico utilizado; la duración del tratamiento; los fármacos utilizados en combinación o de manera simultánea con el compuesto específico empleado, y factores similares que son bien conocidos en el ámbito médico. Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'paciente' significa animal, preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un humano.

Las formas de dosificación sólidas de la presente invención pueden administrarse a los humanos y a otros animales de forma oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, ungüentos o gotas) o bucal; mediante un espray oral o nasal; y de otras formas similares, dependiendo de la gravedad de la infección que se está tratando. En ciertas realizaciones, los compuestos de la invención pueden administrarse de forma oral con unos niveles de dosificación de entre alrededor de 0,01 mg/kg y alrededor de 50 mg/kg, y preferiblemente de entre alrededor de 1 mg/kg y alrededor de 25 mg/kg, en relación con el peso corporal del sujeto y por cada día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

En algunas realizaciones, la cantidad de la dosificación de la Forma I en la forma de dosificación sólida va de 100 mg a 1000 mg. En otra realización, la cantidad de la dosis de la Forma I va de 200 mg a 900 mg. En otra realización, la cantidad de la dosis de la Forma I va de 300 mg a 800 mg. En otra realización, la cantidad de la dosis de la Forma I va de 400 mg a 700 mg. En otra realización, la cantidad de la dosis de la Forma I va de 500 mg a 600 mg.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, las suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables y esterilizadas, pueden prepararse de acuerdo con las técnicas y métodos conocidos utilizando agentes humectantes o de dispersión adecuados y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión estéril inyectable en un disolvente o diluyente no tóxico y parenteralmente aceptable, por ejemplo, como solución en 1,3-butanediol. Entre los vehículos aceptables y los disolventes que pueden emplearse están el agua, la solución de Ringer, una solución U.S.P. y una solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos y estériles se utilizan habitualmente como disolventes o como medio de suspensión. Para este propósito se puede utilizar cualquier aceite fijo suave, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico se utilizan en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtrado a través de un filtro de retención bacteriana, o añadiendo agentes esterilizadores en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua esterilizada o en otro medio esterilizado inyectable antes de su uso.

Preferiblemente, las composiciones para una administración rectal o vaginal son supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos de la presente invención o excipientes o portadores adecuados y no irritantes como mantequilla de cacao, polietilenglicol o cera para supositorios, que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se derriten en el recto o en la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

Las formas de dosificación sólida usadas para la administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos. En estas dosis en forma sólida, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o portador inerte y farmacéuticamente aceptable, como el citrato de sodio o el fosfato de dicalcio; y/o a) rellenos o expansores como almidones, lactosa, sucrosa, glucosa, manitol y ácido silícico; b) aglutinantes como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sucrosa y acacia; c) humectantes como glicerol; d) agentes desintegrantes como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, algunos silicatos y carbonato de sodio; e) agentes retardantes como parafina; f) acelerantes de la absorción como los compuestos de amonios cuaternarios; g) agentes para humedecer como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; h) absorbentes como caolinita y arcilla de bentonita; e i) lubricantes como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, y mezclas de estos compuestos. En el caso de las cápsulas, comprimidos y pastillas, la dosis también puede incluir agentes amortiguadores.

Las composiciones sólidas similares también se pueden usar como relleno para cápsulas de gelatina blandas o duras utilizando excipientes como lactosa o azúcar lácteo, así como polietilenglicoles con un alto peso molecular y similares. Las dosis en forma -sólida- de comprimidos, grageas, cápsulas, pastillas y gránulos pueden prepararse utilizando revestimientos y carcasas como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en el campo de las preparaciones farmacéuticas. Opcionalmente, pueden contener agentes opacantes y también pueden tener una composición que hace que liberen los ingredientes activos sólo, o preferentemente, en ciertas partes del tracto intestinal y, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones aislantes que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas similares también pueden utilizarse como relleno en cápsulas de gelatina duras y blandas usando excipientes como lactosa o azúcar lácteo, así como polietilenglicoles con un elevado peso molecular.

Los componentes activos también pueden estar en forma de microcápsulas, con uno o más excipientes, tal y como se ha explicado previamente. Las dosis en forma -sólida- de comprimidos, grageas, cápsulas, pastillas y gránulos pueden prepararse utilizando revestimientos y carcasas como revestimientos entéricos, revestimientos que controlan la liberación y otros revestimientos bien conocidos en el campo de las preparaciones farmacéuticas. En estas dosis en forma sólida, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte como sucrosa, lactosa o almidón. Estas dosis también pueden incluir, como normalmente sucede en la práctica, sustancias adicionales además de los diluyentes inertes, como, por ejemplo, lubricantes para la formación de comprimidos y otros compuestos para la formación de comprimidos como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las pastillas, las dosis también pueden contener agentes amortiguadores. Opcionalmente, pueden contener agentes opacantes y también pueden tener una composición que hace que liberen los ingredientes activos sólo, o preferentemente, en ciertas partes del tracto intestinal y, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones aislantes que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

También se apreciará que la Forma I descrita en el presente texto o una composición farmacéuticamente aceptable de esta puede emplearse en combinación con otras terapias; es decir, la Forma I puede administrarse junto con, antes de o después de una o más terapias o procedimientos médicos deseados. Para la combinación

específica de las terapias (tratamientos y procedimientos médicos) que se van a usar en un régimen conjunto se deberá tener en cuenta la compatibilidad de los tratamientos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico que se desea obtener. También debe entenderse que con las terapias utilizadas puede obtenerse el efecto deseado para el mismo desorden (por ejemplo, un compuesto de la invención puede administrarse conjuntamente con otro agente usado para tratar el mismo desorden) o pueden obtenerse efectos diferentes (por ejemplo, control de cualquier efecto adverso). Tal y como se utilizan en el presente texto, los agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar o prevenir una enfermedad o afección particular se conocen como 'adecuados para la enfermedad o afección que se está tratando'.

En una realización, el agente adicional se selecciona de entre un agente mucolítico, un broncodilatador, un antibiótico, un agente antiinfeccioso, un agente antiinflamatorio, un modulador del CFTR aparte de los compuestos de la presente invención, o un agente nutricional.

En otra realización, el agente adicional es un compuesto seleccionado entre gentamicina, curcumina, ciclofosfamida, 4-fenilbutirato, miglustat, felodipina, nimodipina, Philoxin B, geniesteína, Apigenina, moduladores de cAMP/cGMP como rolipram, sildenafil, milrinona, tadalafil, amrinona, isoproterenol, albuterol, y almeterol, deoxispergualina, inhibidores de HSP 90, inhibidores de HSP 70, inhibidores de la proteosoma como epoxomicina, lactacistina, etc.

En otra realización, el agente adicional es un compuesto que se desvela en WO 2004028480, WO 2004110352, WO 2005094374, WO 2005120497, o WO 2006101740.

En otra realización, el agente adicional es un derivado de benzo(c)quinolizinio que muestra actividad de modulación del CFTR o un derivado del benzopirano que muestra actividad de modulación del CFTR.

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

En otra realización, el agente adicional es un compuesto que se desvela en WO2004080972, WO2004111014, WO2005035514, WO2005049018, WO2006002421, WO2006099256, WO2006127588, o WO2007044560.

En otra realización, el agente adicional se selecciona entre los compuestos desvelados en la Solicitud de Patente de EE UU Serial No. 11/165,818, publicada como Solicitud de Patente Publicada en EE UU No. 2006/0074075, presentada el 24 de junio de 2005. En otra realización, el agente adicional es N-(5-hidroxi-2,4-ditert-butil-fenil)-4-oxo-1H-quinolina-3-carboxamida. Estas combinaciones son útiles para tratar las enfermedades descritas en el presente texto, incluyendo la fibrosis quística. Estas combinaciones también son útiles para los kits descritos en el presente texto.

La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las formas de dosificación sólidas de esta invención no será mayor que la cantidad que normalmente se administraría en una composición que contiene ese agente terapéutico como único agente activo. Preferiblemente, la cantidad de agente terapéutico adicional en las composiciones desveladas en el presente texto oscilará entre el 50% y el 100% de la cantidad que normalmente está presente en una composición que contiene ese agente como el único agente terapéuticamente activo.

La Forma I descrita en el presente texto o una composición farmacéuticamente aceptable de esta puede añadirse a composiciones para revestir un dispositivo médico implantable, como prótesis, válvulas artificiales, injertos vasculares, stents y catéteres. Los revestimientos adecuados y la preparación general de los dispositivos implantables revestidos se describen en las Patentes de EE UU 6,099,562; 5,886,026; y 5,304,121. Normalmente, los revestimientos son materiales poliméricos biocompatibles, como un polímero de hidrogel, polimetildisiloxano, policaprolactona, polietilenglicol, ácido poliláctico, etilvinil acetato, y mezclas de estos compuestos. Además, de manera opcional, los revestimientos pueden estar cubiertos de una última capa adecuada de fluorosilicona, polisacáridos, polietilenglicol, fosfolípidos o combinaciones de estos compuestos para conferir a la composición las propiedades adecuadas de liberación controlada.

Con el objeto de que la invención descrita en el presente texto se comprenda de manera más completa, se expondrán los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos solo tienen un propósito ilustrativo y no debe interpretarse que limitan esta invención en modo alguno.

EJEMPLOS

Métodos y materiales

Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

Los datos de la Calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la Forma I se recogieron utilizando un DSC Q100 V9.6 Build 290 (TA Instruments, New Castle, DE, EE UU). La temperatura se reguló usando indio y la capacidad térmica se reguló usando zafiro. Se pesaron muestras de 3-6 mg en bandejas de aluminio que se habían corrugado usando tapas con un agujero para clavijas. Las muestras se analizaron desde 25°C hasta 350°C a un ritmo de calentamiento de 1,0°C/min y con una purga de gas nitrógeno de 50 ml/min. Los datos se recogieron mediante un software Thermal Advantage Q Series™ versión 2.2.0.248 y se analizaron con un software Universal Analysis versión 4.1D (TA Instruments, New Castle, DE, EE UU). Los números que se ofrecen representan análisis únicos.

(Difracción de rayos X por el método de polvo) XRPD

Los datos de la difracción de rayos X (XRD) de la Forma I se recogieron en un difractómetro de polvo Bruker D8 DISCOVER con un detector bidimensional HI-STAR y un monocromador de grafito plano. Se usó un tubo sellado con Cu con una radiación K α a 40 kV, 35mA. Las muestras se depositaron en placas u obleas de sílice a 25°C. Para cada muestra, se recogieron dos marcos de datos a 120 segundos cada uno y a 2 ángulos θ_2 diferentes: 8° y 26°. Los datos se integraron con software GADDS y se fusionaron o combinaron con software DIFFRACT^{plus}EVA. Las incertidumbres para los picos de posición obtenidos son de $\pm 0,2$ grados.

Se adquirió Vitride® (sodio bis(2-metoxietoxi)aluminio hidruro [$\text{NaAlH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$], solución en tolueno de 65% de porcentaje de peso) en Aldrich Chemicals.

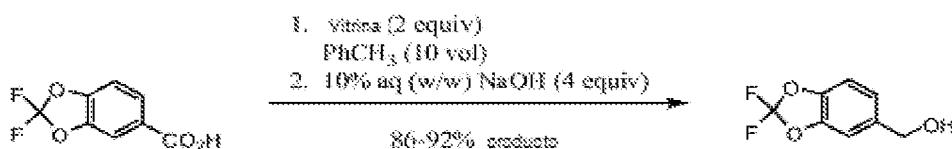
Se adquirió ácido 2,2-Difluoro-1,3-benzodioxole-5-carboxílico en Saltigo (una filial de Lanxess Corporation).

En el caso de que en la presente aplicación el nombre de un compuesto no describa correctamente la estructura de dicho compuesto, la estructura prevalecerá y reemplazará al nombre.

Síntesis de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il) benzoico • HCl.

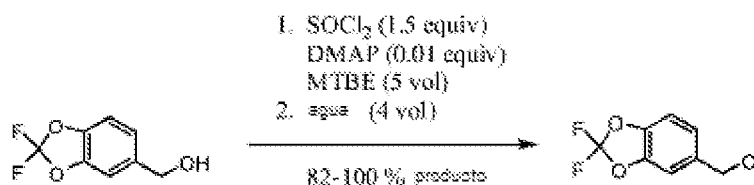
Segmento o fracción de cloruro de ácido

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



El ácido 2,2-difluoro-1,3-benzodioxole-5-carboxílico (1,0 eq) (disponible comercialmente) se mezcla con tolueno (10 vol.). Se añade Vitride® (2 eq) mediante un embudo de adición a un ritmo que permita mantener la temperatura a 15-25°C. Al finalizar este proceso de adición se aumenta la temperatura hasta 40°C durante 2 h; después, se añade cuidadosamente una disolución acuosa de NaOH (10% de porcentaje en peso; 4,0 eq) utilizando el embudo de adición y manteniendo la temperatura a 40-50°C. Después de remover durante 30 minutos adicionales, se deja que las capas se separen a 40°C. La fase orgánica se enfría hasta 20°C y después se lava con agua (2 x 1,5 vol), se seca, se filtra y se concentra para obtener (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-yl)-metanol crudo, que se usará directamente en el siguiente paso.

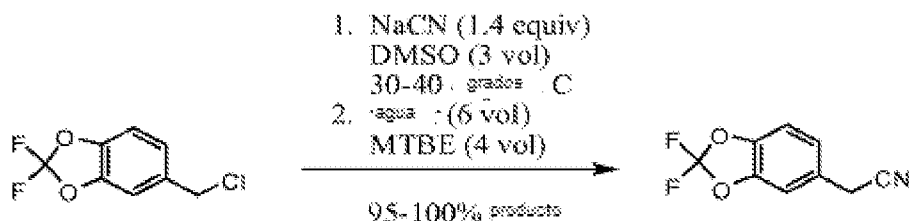
Síntesis de 5-clorometil-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol.



Se disuelve (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-metanol (1,0 eq) en MTBE (5 vol). Se añade una cantidad catalítica de DMAP (1 mol %), y se añade SOCl₂ (1,2 eq) mediante el embudo de adición. El SOCl₂ se añade a un ritmo adecuado para mantener la temperatura en el reactor a 15-25°C. La temperatura se aumenta hasta 30°C durante 1 hora y después se enfría hasta 20°C; posteriormente, se añade agua (4 vol) con el embudo de adición manteniendo la temperatura a menos de 30°C. Después de remover durante 30 minutos adicionales, se deja que las

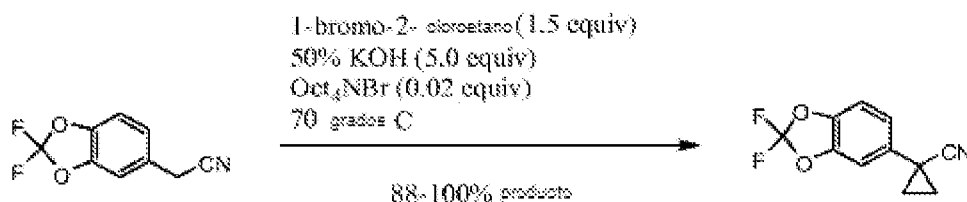
capas se separen. Se remueve la capa orgánica y se añade una solución acuosa de NaOH (10% de peso en volumen o 10% p/v; 4,4 vol). Después de remover durante 15-20 minutos, se deja que las capas se separen. Después, se seca la fase orgánica (Na_2SO_4), se filtra y se concentra para obtener 5-clorometil-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol crudo, que se usará directamente en el siguiente paso.

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



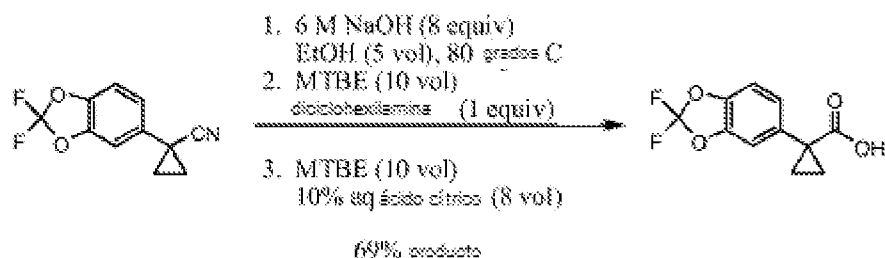
Se añade una solución de 5-clorometil-2,2-difluoro-1,3-benzodioxol (1 eq) en DMSO (1,25 vol) a una suspensión o lechada de NaCN (1,4 eq) en DMSO (3 vol) manteniendo la temperatura entre 30 y 40°C. Se remueve la mezcla durante 1 hora y después se añade agua (6 vol) seguida de MTBE (4 vol). Después de remover durante 30 min, las capas se separan. La capa acuosa se extrae con MTBE (1,8 vol). Las capas orgánicas combinadas se lavan con agua (1,8 vol), se secan (Na_2SO_4), se filtran y se concentran para obtener (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-acetonitrilo (95%), que se usará directamente en el siguiente paso.

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



Una mezcla de (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-acetonitrilo (1,0 eq), una solución acuosa (50% de porcentaje de peso) de KOH (5,0 eq) y 1-bromo-2-cloroetano (1,5 eq), y Oct_4NBr (0,02 eq) se calientan a 70°C durante 1 h. Después, la mezcla de la reacción se enfría y se prepara con MTBE y agua. La fase orgánica se lava con agua y salmuera, y después se extrae el solvente para obtener (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo.

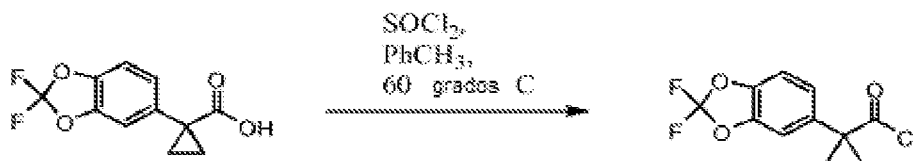
Síntesis de ácido 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarboxílico.



El (2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonitrilo se hidroliza usando 6 M de NaOH (8 equiv.) en etanol (5 vol) a 80°C durante la noche. La mezcla se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente y se evapora el etanol al vacío. El residuo o sobrante se pone en agua y MTBE, se añade 1 M de HCl y las capas se separan. Después se trata la capa de MTBE con diclohexilamina (0,97 equiv). La lechada se enfría hasta 0°C, se filtra y se lava con heptano para obtener la correspondiente sal de DCHA. La sal se pone en MTBE y 10% de ácido cítrico, y se remueve hasta que se disuelvan todos los sólidos. Se separan las capas y la capa de MTBE se lava con agua y salmuera. Si se intercambia el solvente al heptano y después se filtra, se obtiene ácido 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarboxílico después de secar en una estufa u horno de vacío a 50°C durante la noche.

Síntesis de 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarbonil cloruro.

5

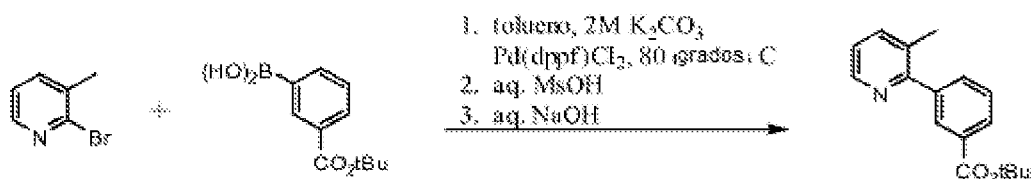


10 El ácido 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-5-il)-ciclopropanocarboxílico (1,2 eq) se pone en tolueno (2,5 vol), y la mezcla se calienta hasta 60°C. Se añade SOCl_2 (1,4 eq) con un embudo de adición. El tolueno y el SOCl_2 se destilan de la mezcla de reacción después de 30 minutos. Se añade tolueno adicional (2,5 vol) y se destila de nuevo.

El segmento o fracción de amina

15 **Síntesis de *tert*-butil-3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato.**

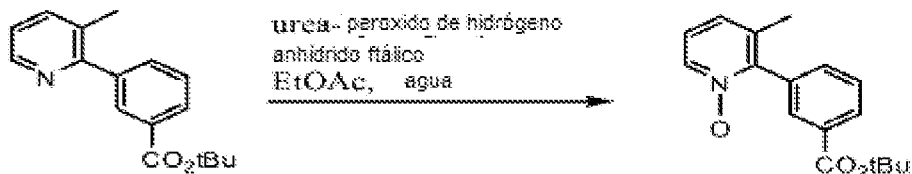
20



25 Se disuelve 2-Bromo-3-metilpiridina (1,0 eq) en tolueno (12 vol). Se añade K_2CO_3 (4,8 eq) seguido de agua (3,5 vol), y la mezcla se calienta hasta 65°C bajo un chorro de N_2 durante 1 hora. Después, se añaden ácido 3-(*t*-Butoxicarbonil)fenilborónico (1,05 eq) y $\text{Pd(dppf)Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$ (0,015 eq), y la mezcla se calienta hasta 80°C. Después de 2 horas, se detiene el calor, se añade agua (3,5 vol) y se deja que las capas se separen. Después se lava la fase orgánica con agua (3,5 vol) y se extrae con una solución acuosa (10%) de ácido metanosulfónico (2 eq de MsOH; 7,7 vol). Se hace que la fase acuosa sea básica con una solución acuosa (50%) de NaOH (2 eq) y se extrae con EtOAc (8 vol). Después se concentra la capa orgánica para obtener *tert*-butil-3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato crudo (82%), que se usa directamente en el siguiente paso.

35 **Síntesis de 2-(3-(*tert*-butoxicarbonil)fenil)-3-metilpiridina-1-óxido.**

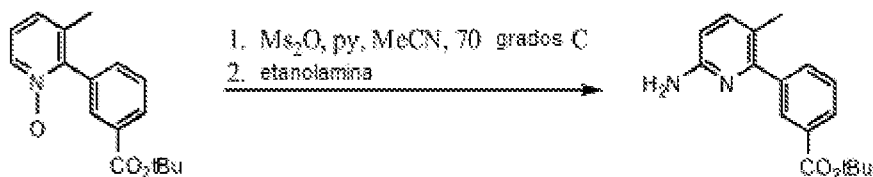
40



45 Se disuelve *tert*-Butil-3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato (1,0 eq) en EtOAc (6 vol). Se añade agua (0,3 vol) seguido de peróxido de hidrógeno de urea (3 eq). Se añade anhídrido ftálico (3 eq) en partes como sólido para mantener la temperatura en el reactor por debajo de 45°C. Después de completar la adición de anhídrido ftálico, la mezcla se calienta hasta 45°C. Después de remover durante 4 horas más, se detiene el calor. Se añade una solución acuosa (10% de porcentaje en peso) de Na_2SO_3 (1,5 eq) con un embudo de adición. Después de completar la adición de Na_2SO_3 , se remueve la mezcla durante 30 minutos más y las capas se separan. Se remueve la capa orgánica y se añade una disolución acuosa (10% de porcentaje en peso) de Na_2CO_3 (2 eq). Después de remover durante 30 minutos, se deja que las capas se separen. La fase orgánica se lava con una solución acuosa (13% de peso en volumen [p/v]) de NaCl. Después, se filtra la fase orgánica y se concentra para obtener 2-(3-(*tert*-butoxicarbonil)fenil)-3-metilpiridina-1-óxido crudo (95%), que se usa directamente en el siguiente paso.

55 **Síntesis de *tert*-butil-3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato.**

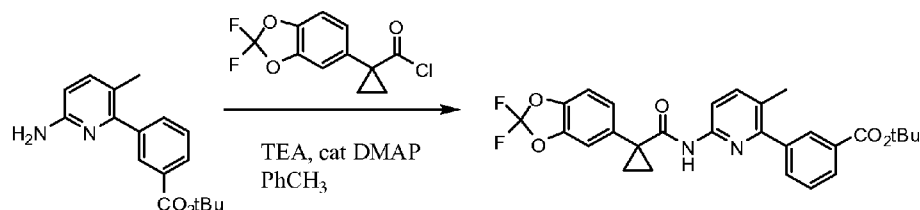
60



65 Se calienta una solución de 2-(3-(*tert*-butoxicarbonil)fenil)-3-metilpiridina-1-óxido (1 eq) y piridina (4 eq) en

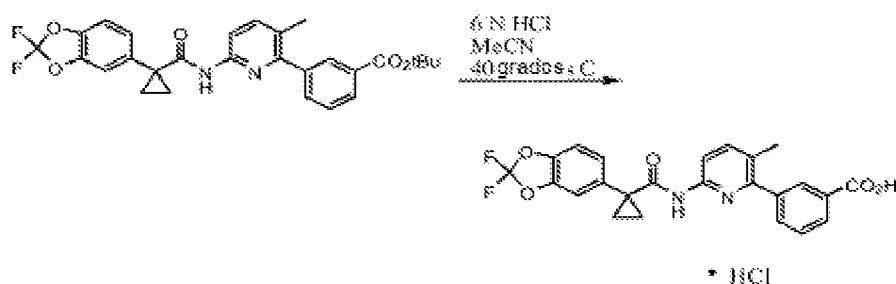
MeCN (8 vol) a 70°C. Se añade una solución de anhídrido metanosulfónico (1,5 eq) en MeCN (2 vol) durante 50 min con el embudo de adición, manteniendo la temperatura a menos de 75°C. La mezcla se remueve durante 0,5 horas más después de completar la adición. Después se deja que la mezcla se enfríe hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se añade etanolamina (10 eq) con el embudo de adición. Después de remover durante 2 horas, se añade agua (6 vol) y la mezcla se enfría hasta 10°C. Después de remover durante no menos de 3 horas, se recoge el sólido mediante filtrado y se lava con agua (3 vol), 2:1 de MeCN/agua (3 vol), y MeCN (2 x 1,5 vol). Después, se seca el sólido a un peso constante (<1% de diferencia) en un horno de vacío a 50°C con una ligera purga de N₂ para obtener *tert*-butil-3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato en forma de sólido rojo/amarillo (53% de rendimiento).

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



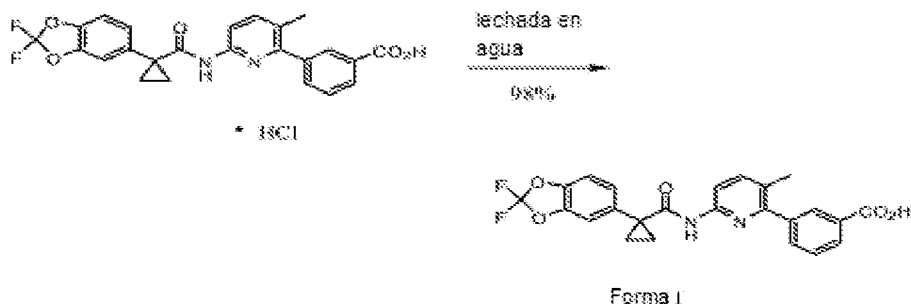
El cloruro de ácido crudo se disuelve en tolueno (2,5 vol, basado en cloruro de ácido) y se añade con un embudo de adición a una mezcla de *tert*-butil-3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato (1 eq), dimetilaminopiridina (DMAP, 0,02 eq), y trietilamina (3,0 eq) en tolueno (4 vol, basado en *tert*-butil-3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato). Después de 2 horas, se añade agua (4 vol, basado en *tert*-butil-3-(6-amino-3-metilpiridin-2-il)benzoato) a la mezcla de reacción. Después de remover durante 30 minutos, se separan las capas. Se filtra la fase orgánica y se concentra para obtener un aceite espeso de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridin-2-il)-*t*-butilbenzoato (rendimiento crudo cuantitativo). Se añade MeCN (3 vol, basado en el producto crudo) y se destila hasta que ocurra la cristalización. Se añade agua (2 vol, basado en el producto crudo) y se remueve la mezcla durante 2 h. Se recoge el sólido mediante filtrado, se lava con 1:1 (en volumen) de MeCN/agua (2 x 1 vol, basado en el producto crudo) y se seca parcialmente en el filtro al vacío. El sólido se seca para alcanzar un peso constante (<1% de diferencia) en un horno de vacío a 60°C con una ligera purga de N₂ para obtener 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il)-*t*-butilbenzoato en forma de sólido marrón.

Síntesis de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridin-2-il)benzoico • Sal de HCL.



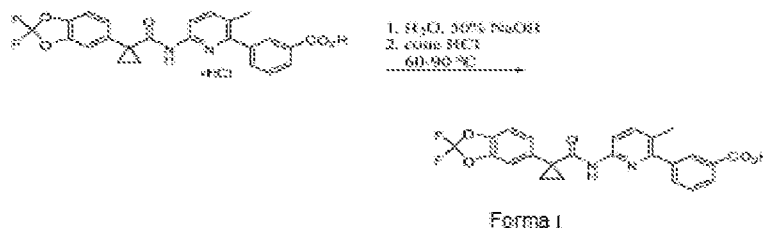
A una lechada de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridina-2-il)-*t*-butilbenzoato (1,0 eq) en MeCN (3,0 vol) se le añade agua (0,83 vol) seguida de una solución acuosa concentrada de HCl (0,83 vol). Se calienta la mezcla a 45 ± 5°C. Después de remover durante 24-48 horas la reacción se ha completado, y se deja que la mezcla se enfríe hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se añade agua (1,33 vol) y se remueve la mezcla. Se recoge el sólido mediante filtrado, se lava con agua (2 x 0,3 vol) y se seca parcialmente en el filtro al vacío. Se seca el sólido hasta alcanzar un peso constante (<1% de diferencia) en un horno de vacío a 60°C con una ligera purga de N₂ para obtener ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridin-2-il)benzoico • Sal de HCL en forma de sólido blanquecino.

Síntesis de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Forma I).



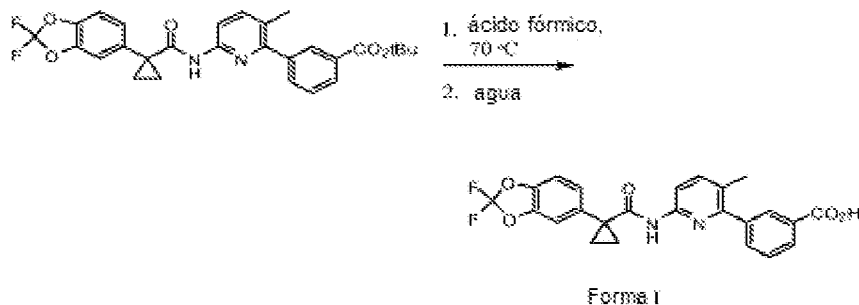
Una lechada o suspensión de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarbonylamida)-3-metilpiridin-2-il)benzoico • HCL (1 eq) en agua (10 vol) se remueve a temperatura ambiente. Se toma una muestra después de remover durante 24 horas. Se filtra la muestra y el sólido se lava con agua (2 veces). La mezcla sólida se somete a un análisis de DSC. Cuando el análisis de DSC indica una conversión completa a la Forma I, se recoge el sólido mediante filtrado, se lava con agua (2 x 1,0 vol) y se seca parcialmente en el filtro al vacío. Se seca el sólido hasta alcanzar un peso constante (<1% de diferencia) en un horno de vacío a 60°C con una ligera purga de N₂ para obtener la Forma I en forma de sólido blanquecino (98% de rendimiento). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) 9,14 (s, 1H); 7,99-7,93 (m, 3H); 7,80-7,78 (m, 1H); 7,74-7,72 (m, 1H); 7,60-7,55 (m, 2H); 7,41-7,33 (m, 2H); 2,24 (s, 3H), 1,53-1,51 (m, 2H); 1,19-1,17 (m, 2H).

Síntesis de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarbonylamida)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Forma I) usando agua y una base.



A una suspensión de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarbonylamida)-3-metilpiridin-2-il)benzoico • HCL (1 eq) en agua (10 vol) removida a temperatura ambiente se le añade una solución acuosa (50% p/p) de NaOH (2,5 eq). Se remueve la mezcla durante no menos de 15 min o hasta que se obtenga una solución homogénea. Se añade HCl concentrado (4 eq) para cristalizar la Forma I. Se calienta la mezcla hasta 60°C ó 90°C si es necesario para reducir el nivel de éster de t-butilbenzoato. Se calienta la mezcla hasta que el análisis mediante HPLC (o 'cromatografía líquida de alta eficacia') indique no más de 0,8% ('AUC' o 'ABC': área bajo la curva) de éster de t-butilbenzoato. Después, la mezcla se enfría hasta alcanzar la temperatura ambiente, y se recoge el sólido mediante filtrado, se lava con agua (3 x 3,4 vol) y se seca parcialmente en el filtro al vacío. Se seca el sólido hasta alcanzar un peso constante (<1% de diferencia) en un horno de vacío a 60°C con una ligera purga de N₂ para obtener la Forma I en forma de sólido blanquecino (97% de rendimiento).

Síntesis de ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarbonylamida)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Forma I) directamente a partir de benzoato.



Una solución de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarbonylamida)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato (1,0 eq) en ácido fórmico (3,0 vol) se calienta hasta 70°C ± 10°C. Se deja proseguir la reacción hasta que se complete (no más de 1,0% de AUC de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarbonylamida)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato) o se calienta durante no más de 8 h. Se deja que la

mezcla se enfríe hasta alcanzar la temperatura ambiente. Se añade la solución a agua (6 vol) calentada a 50°C y se remueve la mezcla. Después se calienta la mezcla hasta $70 \pm 10^\circ\text{C}$ hasta que el nivel de 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il) ciclopropanocarboxamida)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato es de no más de 0,8% (AUC). Se recoge el sólido mediante filtrado, se lava con agua (2 x 3 vol) y se seca parcialmente en el filtro al vacío. Se seca el sólido hasta que tenga un peso constante (<1% de diferencia) en un horno de vacío a 60°C con una leve purga de N_2 para obtener el Compuesto 1 en la Forma I en forma de sólido blanquecino.

En la Figura 1 se muestra un patrón de difracción de rayos X calculado a partir de una única estructura de cristal del Compuesto 1 en la Forma I. La Tabla 1 enumera los picos calculados para la Figura 1.

Tabla 1.

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

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

Tabla 2.

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

En la Figura 3 se muestra una transparencia de un patrón de difracción de rayos X calculado a partir de una estructura de un único cristal del Compuesto 1 en la Forma I, y también se muestra un patrón real de difracción de rayos X por el método de polvo del Compuesto 1 en la Forma I. La transparencia muestra una concordancia adecuada entre los picos de posición calculados y reales, ya que la diferencia tan solo es de alrededor de 0,15 grados.

En la Figura 4 se muestra el análisis o rastreo mediante DSC del Compuesto 1 en la Forma I. El punto de fusión del Compuesto 1 en la Forma I es de alrededor de 204°C.

En las Figuras 5-8 se muestran imágenes o dibujos conformacionales del Compuesto 1 en la Forma I basados en análisis mediante rayos X de un solo cristal. Las Figuras 6-8 muestran el enlace de hidrógeno entre los grupos de ácido carboxílico de un dímero y el consiguiente 'apilamiento' que tiene lugar en el cristal. La estructura del cristal revela una densa compactación de las moléculas. El Compuesto 1 en la Forma I es monoclinico, $P2_1/n$, y sus celdas unidad tienen las siguientes dimensiones: $a = 4,9626(7) \text{ \AA}$; $b = 12,299(2) \text{ \AA}$; $c = 33,075(4) \text{ \AA}$; $\beta = 93,938(9)^\circ$; $V = 2014,0 \text{ \AA}^3$; $Z = 4$. La densidad del Compuesto 1 en la Forma I calculada a partir de los datos estructurales es de $1,492 \text{ g/cm}^3$ a 100 K.

En las Figuras 9-11 se muestran los espectros de ^1H NMR del Compuesto 1 (las Figuras 9 y 10 representan el Compuesto 1 en la Forma I en una suspensión de 50 mg/mL, 0,5 metil celulosa-polisorbato 80, y la Figura 11 representa el Compuesto 1 en forma de sal de HCl).

La Tabla 3 de más abajo enumera los datos analíticos adicionales del Compuesto 1.

Tabla 3.

Nº de Compuesto	LC/MS M+1	LC/RT min	NMR
1	453,3	1,93	H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) 9,14 (s, 1 H); 7,99-7,93 (m, 3H); 7,80-7,78 (m, 1H); 7,74-7,72 (m, 1H); 7,60-7,55 (m, 2H); 7,41-7,33 (m, 2H); 2,24 (s, 3H); 1,53-1,51 (m, 2H); 1,19-1,17 (m, 2H)

ENSAYOS / ANÁLISIS**Ensayos para Detectar y Medir las Propiedades de Corrección de los Compuestos sobre $\Delta F508$ -CFTR**5 **Métodos ópticos del potencial de la membrana para evaluar las propiedades de modulación de los compuestos sobre $\Delta F508$ -CFTR**

El ensayo o análisis óptico sobre el potencial de la membrana utilizó los sensores FRET sensibles a la tensión descritos por Gonzalez y Tsien (Ver: Gonzalez, J. E. y R. Y. Tsien (1995) 'Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells'; Biophys J 69(4): 1272-80; y Gonzalez, J. E. y R. Y. Tsien (1997) 'Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer'; Chem Biol 4(4): 269-77) conjuntamente con el instrumental para medir los cambios de fluorescencia, como el VIPR (Lector de la sonda de tensión/ion) (Ver: Gonzalez, J. E., K. Oades, et al. (1999); 'Cell-based assays and instrumentation for screening ion-channel targets'; Drug Discov Today 4(9): 431-439).

Estos ensayos sensibles a la tensión (o voltaje) se basan en los cambios en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) entre el tinte o colorante sensible a la tensión y soluble en la membrana, DiSBAC₂(3), y un fosfolípido fluorescente, CC2-DMPE, que está unido al foliolo externo de la membrana de plasma y funciona como donante de FRET. Los cambios en el potencial de la membrana (V_m) provocan que el DiSBAC₂(3), cargado negativamente, se redistribuya por la membrana de plasma, y la cantidad de transferencia de energía desde CC2-DMPE cambia en la misma medida. Los cambios en la emisión de fluorescencia se monitorizaron usando VIPR™ II, que es un dispositivo integrado para manipular líquidos y un detector de fluorescencia diseñado para controlar pantallas basadas en células en placas microtituladoras de 96 ó 384 pocillos.

25 **1. Identificación de los compuestos de Corrección**

Para identificar pequeñas moléculas que corrigen el defecto de tráfico asociado con $\Delta F508$ -CFTR, se desarrolló un formato de ensayo HTS de una sola adición. Las células se incubaron en un medio sin suero durante 16 h a 37°C en presencia o ausencia (control negativo) del compuesto testado. Como control positivo, las células colocadas en las placas de 384 pocillos se incubaron durante 16 h a 27°C para 'corregir térmicamente' el $\Delta F508$ -CFTR. Posteriormente, las células se enjuagaron 3 veces con una solución de Krebs-Ringer y se cargaron con el tinte sensible a la tensión. Para activar el $\Delta F508$ -CFTR, se añadieron a cada pocillo 10 μ M de forskolina y el potenciador de CFTR, y genisteína (20 μ M), junto con un medio libre de Cl⁻. La adición del medio libre de Cl⁻ provocó un flujo en respuesta a la activación del $\Delta F508$ -CFTR, y la consiguiente despolarización de la membrana se monitorizó ópticamente usando tintes sensibles a la tensión y basados en la FRET.

2. Identificación de los Compuestos Potenciadores

Para identificar los potenciadores de $\Delta F508$ -CFTR, se desarrolló un formato de ensayo HTS de doble adición. Durante la primera adición, se añadió a cada pocillo un medio libre de Cl⁻ con o sin el compuesto de prueba. Tras 22 s, se realizó una segunda adición de medio libre de Cl⁻ que contenía 2-10 μ M de forskolina para activar el $\Delta F508$ -CFTR. Después de ambas adiciones, la concentración extracelular de Cl⁻ fue de 28 mM, lo que provocó un flujo de Cl⁻ en respuesta a la activación de $\Delta F508$ -CFTR, y la consiguiente despolarización de la membrana se monitorizó ópticamente usando tintes sensibles a la tensión y basados en la FRET.

3. Soluciones

Solución de Baño #1: (en mM)	NaCl 160, KCl 4,5, CaCl ₂ 2, MgCl ₂ 1, HEPES 10, pH 7,4 con NaOH.
Solución de baño libre de cloruros	Las sales de cloruro de la Solución de Baño #1 se sustituyen con sales de gluconato
CC2-DMPE	Preparada como una solución madre de 10mM en DMSO y conservada a -20°C
DiSBAC ₂ (3):	Preparada como una solución madre de 10mM en DMSO y conservada a -20°C

4. Cultivo celular

Para las mediciones ópticas del potencial de la membrana se utilizan fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan de manera estable el $\Delta F508$ -CFTR. Las células se mantienen a 37°C, con un 5% de CO₂ y un 90% de humedad, en un medio Eagle modificado de Dulbecco, complementado con 2mM de glutamina, 10% de suero

bovino fetal, 1 NEEA, β -ME, 1 pen/strep, y 25 mM de HEPES en frascos de cultivo de 175 cm². Para todos los ensayos ópticos, las células se distribuyeron en 30 000 por pocillo en placas de 384 pocillos recubiertas con matrigel y se cultivaron durante 2 h a 37°C antes de cultivarlas a 27°C durante 24 h para el ensayo potenciador. Para los ensayos de corrección, las células se cultivan a 27°C ó 37°C con o sin los compuestos durante 16-24 horas.

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

1. Ensayo con una Cámara de Ussing

Los experimentos con una Cámara de Ussing se realizaron con células epiteliales polarizadas que expresaban el $\Delta F508$ -CFTR para describir más en profundidad los moduladores de $\Delta F508$ -CFTR identificados en los ensayos ópticos. Las células epiteliales de FRT ^{$\Delta F508$ -CFTR} cultivadas en insertos de cultivo celular de Costar Snapwell se colocaron en una Cámara de Ussing (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA, EE UU), y las monocapas se cortocircuitaron continuamente usando un sistema de mantenimiento de tensión (Department of Bioengineering, University of Iowa, IA; y Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA, EE UU). La resistencia transepitelial se midió aplicando un pulso de 2 mV. En estas condiciones, el epitelio de FRT mostró resistencias de 4 K Ω /cm² o más. Las soluciones se conservaron a 27°C y se les inyectó aire. El potencial 'offset' (o potencial de compensación) de los electrodos y la resistencia a los fluidos se corrigieron usando un inserto libre de células. En estas condiciones, la corriente refleja el flujo de Cl⁻ a través del $\Delta F508$ -CFTR expresado en la membrana apical. El I_{SC} se obtuvo digitalmente usando una interfaz MP100A-CE y un software AcqKnowledge (v3.2.6; BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA, EE UU).

2. Identificación de los Compuestos de Corrección

El protocolo habitual utilizó un gradiente de concentración de Cl⁻ de una membrana basolateral-apical. Para establecer este gradiente, se usó una solución de Ringer normal en la membrana basolateral, mientras que el NaCl apical se sustituyó con gluconato de sodio equimolar (titulado a un pH de 7,4 con NaOH) para obtener un gradiente con una gran concentración de Cl⁻ a lo largo del epitelio. Todos los experimentos se llevaron a cabo con monocapas intactas. Para activar completamente el $\Delta F508$ -CFTR, se aplicó forskolina (10 μ M) y el inhibidor de PDE, IBMX (100 μ M), seguidos de una adición del potenciador de CFTR, genisteína (50 μ M).

Tal y como se ha observado en otros tipos de células, la incubación a bajas temperaturas de células FRT que expresan de manera estable el $\Delta F508$ -CFTR aumenta la densidad de CFTR en la membrana plasmática. Para determinar la actividad de los compuestos correctores, las células se incubaron con 10 μ M del compuesto de prueba durante 24 horas a 37°C y, posteriormente, se lavaron 3 veces antes de la grabación. El I_{SC} regulado por cAMP y genisteína de las células tratadas con los compuestos se normalizó para los controles a 27°C y a 37°C, y se expresó como actividad porcentual. En comparación con los controles a 37°C, la preincubación de las células con el compuesto corrector aumentó significativamente el I_{SC} regulado por cAMP y genisteína.

3. Identificación de los Compuestos Potenciadores

El protocolo habitual utilizó un gradiente de concentración de Cl⁻ de una membrana basolateral-apical. Para establecer este gradiente, se usó una solución de Ringer normal en la membrana basolateral y se permeabilizó con nistatina (360 μ g/ml), mientras que el NaCl apical se sustituyó con gluconato de sodio equimolar (titulado a un pH de 7,4 con NaOH) para obtener un gradiente con una gran concentración de Cl⁻ a lo largo del epitelio. Todos los experimentos se realizaron 30 min después de la permeabilización con nistatina. Se añadieron todos los compuestos de prueba y forskolina (10 μ M) a ambos lados de los insertos de cultivo celular. La eficacia de los supuestos potenciadores de $\Delta F508$ -CFTR se comparó con la de la genisteína, un conocido potenciador.

4. Soluciones

Solución basolateral (en mM): NaCl (135), CaCl₂ (1,2), MgCl₂ (1,2), K₂HPO₄ (2,4), KHPO₄ (0,6), ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) (10), y dextrosa (10). La solución se tituló a un pH de 7,4 con NaOH.

Solución apical (en mM): Lo mismo que la solución basolateral, pero sustituyendo el NaCl con Na Gluconato (135).

5. Cultivo celular

Las células epiteliales FRT (de rata de Fisher o 'Fisher rat') que expresan el $\Delta F508$ -CFTR (FRT ^{$\Delta F508$ -CFTR}) se usaron para los experimentos con una Cámara de Ussing realizados con los supuestos moduladores de $\Delta F508$ -CFTR identificados en nuestros ensayos ópticos. Las células se cultivaron en insertos de cultivo celular de Costar Snapwell y se cultivaron durante cinco días a 37°C y con un 5% de CO₂ en un medio F-12 de Ham modificado (de

Coon), complementándolo con un 5% de suero fetal de ternero, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Antes de usarse para describir la actividad potenciadora de los compuestos, las células se incubaron a 27°C durante 16-48 h para corregir el $\Delta F508$ -CFTR. Para determinar la actividad correctora de los compuestos, las células se incubaron durante 24 horas a 27°C ó 37°C con y sin los compuestos.

6. Registros de célula entera

Las células NIH3T3 corregidas con la corriente macroscópica de $\Delta F508$ -CFTR ($I_{\Delta F508}$) y los compuestos de prueba que expresaban de manera estable el $\Delta F508$ -CFTR se monitorizaron usando el registro de parche perforado y de célula entera. Brevemente, los registros de fijación de tensión de $I_{\Delta F508}$ se llevaron a cabo a temperatura ambiente usando un Axopatch 200B, un amplificador de la técnica de fijación de membranas (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, EE UU). Todos los registros o grabaciones se obtuvieron a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y se filtraron con un filtro de paso bajo a 1 kHz. Las pipetas tenían una resistencia de 5 - 6 MΩ cuando se rellenaban con solución intracelular. En estas condiciones, el potencial de reversión calculado del Cl⁻ (E_{Cl}) a temperatura ambiente fue de -28 mV. Todos los registros tenían una resistencia de sellado mayor a 20 GΩ y una resistencia en serie menor a 15 MΩ. La generación de pulsos, la obtención de datos y los análisis se realizaron usando un PC equipado con una interfaz Digidata 1320 A/D junto con Clampex 8 (Axon Instruments Inc.). El baño contenía menos de 250 µl de solución salina y se perfundió continuamente a un ritmo de 2 ml/min usando un sistema de perfusión controlado por gravedad.

7. Identificación de los Compuestos Correctores

Para determinar la actividad de los compuestos correctores para aumentar la densidad de $\Delta F508$ -CFTR funcional en la membrana plasmática, utilizamos las técnicas de grabación de parche perforado previamente descritas con el objeto de medir la densidad de corriente tras un tratamiento de 24 h con los compuestos correctores. Para activar completamente el $\Delta F508$ -CFTR, se añadió a las células 10 µM de forskolina y 20 µM de genisteína. Bajo nuestras condiciones de registro o grabación, la densidad de corriente tras una incubación de 24 h a 27°C fue más elevada que la que se observó tras una incubación de 24 h a 37°C. Estos resultados son coherentes con los efectos conocidos que tiene una incubación a baja temperatura sobre la densidad de $\Delta F508$ -CFTR en la membrana plasmática. Para determinar los efectos de los compuestos correctores sobre la densidad de corriente del CFTR, las células se incubaron con 10 µM del compuesto de prueba durante 24 h a 37°C y la densidad de corriente se comparó con los controles realizados a 27°C y a 37°C (% de actividad). Antes del registro o grabación, las células se lavaron 3 veces con un medio de registro extracelular para eliminar cualquier resto de los compuestos de prueba. La preincubación con 10 µM de compuestos correctores aumentó significativamente la corriente dependiente de cAMP y genisteína en comparación con los controles a 37°C.

8. Identificación de los Compuestos Potenciadores

La capacidad de los potenciadores de $\Delta F508$ -CFTR para aumentar la corriente de Cl⁻ macroscópica de $\Delta F508$ -CFTR ($I_{\Delta F508}$) en las células NIH3T3 que expresan de manera estable el $\Delta F508$ -CFTR también se investigó utilizando técnicas de grabación de parche perforado. Los potenciadores identificados en los ensayos ópticos mostraron en $I_{\Delta F508}$ un incremento -que dependía de la dosis- con una potencia y una eficacia similares a las observadas en los ensayos ópticos. En todas las células examinadas, el potencial de reversión antes y durante la aplicación potenciadora fue de alrededor de -30 mV, que es el E_{Cl} (-28 mV) calculado.

9. Soluciones

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

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

10. Cultivo celular

Para los registros 'whole-cell' (o grabaciones 'de células enteras') se utilizan fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan de manera estable el $\Delta F508$ -CFTR. Las células se mantienen a 37°C, con un 5% de CO₂ y un 90% de humedad, en un medio Eagle modificado de Dulbecco, complementado con 2mM de glutamina, 10% de suero bovino fetal, 1 NEEA, β-ME, 1 pen/strep, y 25 mM de HEPES en frascos de cultivo de 175 cm². Para los registros 'whole-cell', se colocaron 2500-5000 células en cubreobjetos de cristal recubiertos con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24-48 horas a 27°C antes usarse para analizar la actividad de los potenciadores; y se incubaron con o sin compuesto corrector a 37°C para medir la actividad de los correctores.

11. Grabaciones de un solo canal

Las actividades monocanal (o de un solo canal) del $\Delta F508$ -CFTR -con la temperatura corregida- expresado establemente en células NIH3T3 y las actividades de los compuestos potenciadores se observaron utilizando un parche de membrana invertido extirpado. Brevemente, los registros de fijación de tensión de la actividad monocanal se llevaron a cabo a temperatura ambiente usando un Axopatch 200B, un amplificador de la técnica de fijación de membranas (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, EE UU). Todos los registros o grabaciones se obtuvieron a una frecuencia de muestreo de 10 kHz y se filtraron con un filtro de paso bajo a 1 kHz. Las pipetas para el parche se fabricaron a partir de cristal #7052 de Corning Kovar Sealing (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, EE UU) y tenían una resistencia de 5 - 8 M Ω cuando se rellenaban con solución extracelular. Después de la extirpación o eliminación, el $\Delta F508$ -CFTR se activó añadiendo 1 mM de Mg-ATP, y 75 nM de proteína kinasa dependiente de cAMP, subunidad catalítica (PKA; Promega Corp. Madison, WI, EE UU). Tras estabilizar la actividad del canal, el parche se perfundió usando un sistema de microperfusión controlado mediante gravedad. La entrada o afluencia se situó junto al parche, lo que provocó un intercambio completo de solución en 1-2 s. Para mantener la actividad del $\Delta F508$ -CFTR durante la rápida perfusión, se añadió el inhibidor de fosfatasa no específico de F⁻ (10 mM de NaF) a la solución de baño. En estas condiciones de grabación, la actividad del canal se mantuvo constante durante toda la duración de la grabación del parche (hasta 60 min). Las corrientes producidas por la carga positiva que se movía de la solución intracelular a la solución extracelular (aniones moviéndose en 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 contenían ≤ 2 canales activos. El número máximo de aberturas simultáneas determinaba el número de canales activos durante un experimento. Para determinar la amplitud de corriente monocanal, los datos recogidos a partir de 120 s de la actividad del $\Delta F508$ -CFTR se filtraron 'off-line' a 100 Hz y después se usaron para crear histogramas de todos los datos de amplitud que se combinaron con funciones multigaussianas utilizando software de Bio-Patch Analysis (Bio-Logic Comp., Francia). La corriente microscópica total y la probabilidad abierta (P_o) se determinaron a partir de 120 s de la actividad del canal. La P_o se determinó usando el software de Bio-Patch o a partir 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 celular

Para los registros de fijación de membranas extirpadas se utilizan fibroblastos de ratón NIH3T3 que expresan de manera estable el $\Delta F508$ -CFTR. Las células se mantienen a 37°C, con un 5% de CO₂ y un 90% de humedad, en un medio Eagle modificado de Dulbecco, complementado con 2mM de glutamina, 10% de suero bovino fetal, 1 NEEA, β -ME, 1 pen/strep, y 25 mM de HEPES en frascos de cultivo de 175 cm². Para los registros monocanal, se colocaron 2500-5000 células en cubreobjetos de cristal recubiertos con poli-L-lisina y se cultivaron durante 24-48 horas a 27°C antes de usarse.

Usando los procedimientos descritos previamente, se ha medido la actividad, esto es, EC50s, del Compuesto 1 y se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4.

Datos clasificados de IC50/EC50: +++ $\leq 2,0$ < ++ $\leq 5,0$ < +		
Datos clasificados de Actividad porcentual: + $\leq 25,0$ < ++ $\leq 100,0$ < +++		
Número de Compuesto	EC50 medido	Eficacia máxima medida
1	+++	+++

REIVINDICACIONES

1. Una forma de dosificación sólida para administración oral que comprende ácido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]dioxol-5-il)ciclopropano-carboxamido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico caracterizado como la Forma I y por lo menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, inerte, en donde la Forma I se caracteriza como una forma cristalina que tiene un sistema cristalino monoclinico, un grupo espacial $P2_1/n$ y las siguientes dimensiones de celda unitaria:

$$\begin{array}{ll} a = 4.9626 \text{ (7) \AA} & \alpha = 90^\circ \\ b = 12.2994 \text{ (18) \AA} & \beta = 93.938 \text{ (9)^\circ} \\ c = 33.075 \text{ (4) \AA} & \gamma = 90^\circ, \text{ y/o} \end{array}$$

en donde la Forma I **se caracteriza por** uno o más picos a 15.4 ± 0.2 grados, 16.3 ± 0.2 grados y 14.5 ± 0.2 grados en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación alfa Cu K a 40 kV, 35 mA.

2. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 1, en donde la forma de dosificación sólida es un comprimido.

3. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde la forma de dosificación sólida comprende además un agente adicional seleccionado entre un agente mucolítico, un broncodilatador, un antibiótico, un agente antiinfeccioso, un agente antiinflamatorio, un modulador del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) o un agente nutricional.

4. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 3, en donde el agente adicional es un modulador de CFTR que es N-(5-hidroxi-2,4-diterc-butil-fenil)-4-oxo-1H-quinolina-3-carboxamida.

5. Una forma de dosificación sólida de cualquier reivindicación anterior para su uso en un método de tratamiento de la fibrosis quística en un humano.

6. El uso de una forma de dosificación sólida de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la fabricación de un medicamento para tratar la fibrosis quística en un humano.

7. La forma de dosificación sólida para el uso de la reivindicación 5, o el uso de la reivindicación 6, en donde el humano tiene una mutación $\Delta F508$ en el gen de CFTR.

8. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 1, en donde la Forma I se caracteriza como una forma cristalina que tiene un sistema cristalino monoclinico, un grupo espacial $P2_1/n$ y las siguientes dimensiones de célula unitaria:

$$\begin{array}{ll} a = 4.9626 \text{ (7) \AA} & \alpha = 90^\circ \\ b = 12.2994 \text{ (18) \AA} & \beta = 93.938 \text{ (9)^\circ} \\ c = 33.075 \text{ (4) \AA} & \gamma = 90^\circ. \end{array}$$

9. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 1, en donde la Forma I **se caracteriza por** uno o más picos a 15.4 ± 0.2 grados, 16.3 ± 0.2 grados y 14.5 ± 0.2 grados en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación alfa Cu K a 40 kV, 35 mA.

10. La forma de dosificación sólida de la reivindicación 1, en donde la Forma I se caracteriza como una forma cristalina que tiene un sistema cristalino monoclinico, un grupo espacial $P2_1/n$ y las siguientes dimensiones de celda unitaria:

$$\begin{array}{ll} a = 4.9626 \text{ (7) \AA} & \alpha = 90^\circ \\ b = 12.2994 \text{ (18) \AA} & \beta = 93.938 \text{ (9)^\circ} \\ c = 33.075 \text{ (4) \AA} & \gamma = 90^\circ, \text{ y} \end{array}$$

en donde la Forma I se caracteriza por uno o más picos a 15.4 ± 0.2 grados, 16.3 ± 0.2 grados y 14.5 ± 0.2 grados en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación alfa Cu K a 40 kV, 35 mA.

11. La forma de dosificación sólida de cualquiera de las reivindicaciones 1 u 8-10, en donde la Forma I **se caracteriza por** picos a 15.4 ± 0.2 grados, 16.3 ± 0.2 grados y 14.5 ± 0.2 grados en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación alfa Cu K a 40 kV, 35 mA.

12. La forma de dosificación sólida de cualquiera de las reivindicaciones 1 u 8-11, en donde la Forma I **se caracteriza** además por un pico a 14.8 ± 0.2 grados y/o en donde la Forma I **se caracteriza** además por un pico a 17.8 ± 0.2 grados en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación alfa Cu K a 40 kV, 35 mA.

13. La forma de dosificación sólida de cualquiera de las reivindicaciones 1 u 8-12, en donde la Forma I **se caracteriza** además por un pico a 16,6 grados \pm 0,2 grados, y/o en donde la Forma I **se caracteriza** además por un pico a 7,8 grados \pm 0,2 grados en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación alfa Cu K a 40 kV, 35 mA.

14. La forma de dosificación sólida de cualquiera de las reivindicaciones 1 u 8-13, en donde la Forma I **se caracteriza** además por un pico a 26,0 grados \pm 0,2 grados, y/o en donde la Forma I **se caracteriza** además por un pico a 21,6 grados \pm 0,2 grados, y/o en donde la Forma I **se caracteriza** además por un pico a 23,3 grados \pm 0,2 grados en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación alfa Cu K a 40 kV, 35 mA.

15. La forma de dosificación sólida de cualquiera de las reivindicaciones 1 u 8-14, en donde la Forma I **se caracteriza** además por un pico a 14,8 grados \pm 0,2 grados, 17,8 grados \pm 0,2 grados, 16,6 grados \pm 0,2 grados, 7,8 grados \pm 0,2 grados, 26,0 grados \pm 0,2 grados, 21,6 grados \pm 0,2 grados y 23,3 grados \pm 0,2 grados en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación alfa Cu K a 40 kV, 35 mA.

16. La forma de dosificación sólida de cualquiera de las reivindicaciones 1 u 8-14, en donde la Forma I **se caracteriza** además por los siguientes picos en una difracción de rayos X calculada a partir de una estructura monocristalina:

Ángulo 2 θ [grados]	Intensidad Relativa [%]
14.41	48.2
14.64	58.8
15.23	100.0
16.11	94.7
17.67	81.9
19.32	61.3
21.67	76.5
23.40	68.7
23.99	50.8
26.10	67.4
28.54	50.1

17. La forma de dosificación sólida de cualquiera de las reivindicaciones 1 u 8-14, en donde la Forma I **se caracteriza** además por los siguientes picos \pm 0,2 grados en una difracción de rayos X de polvo obtenida usando radiación Cu K alfa a 40 kV, 35 mA:

Ángulo 2 θ [grados]	Intensidad Relativa [%]
7.83	37.7
14.51	74.9
14.78	73.5
15.39	100.0
16.26	75.6
16.62	42.6
17.81	70.9
21.59	36.6
23.32	34.8
24.93	26.4
25.99	36.9

FIGURA 1

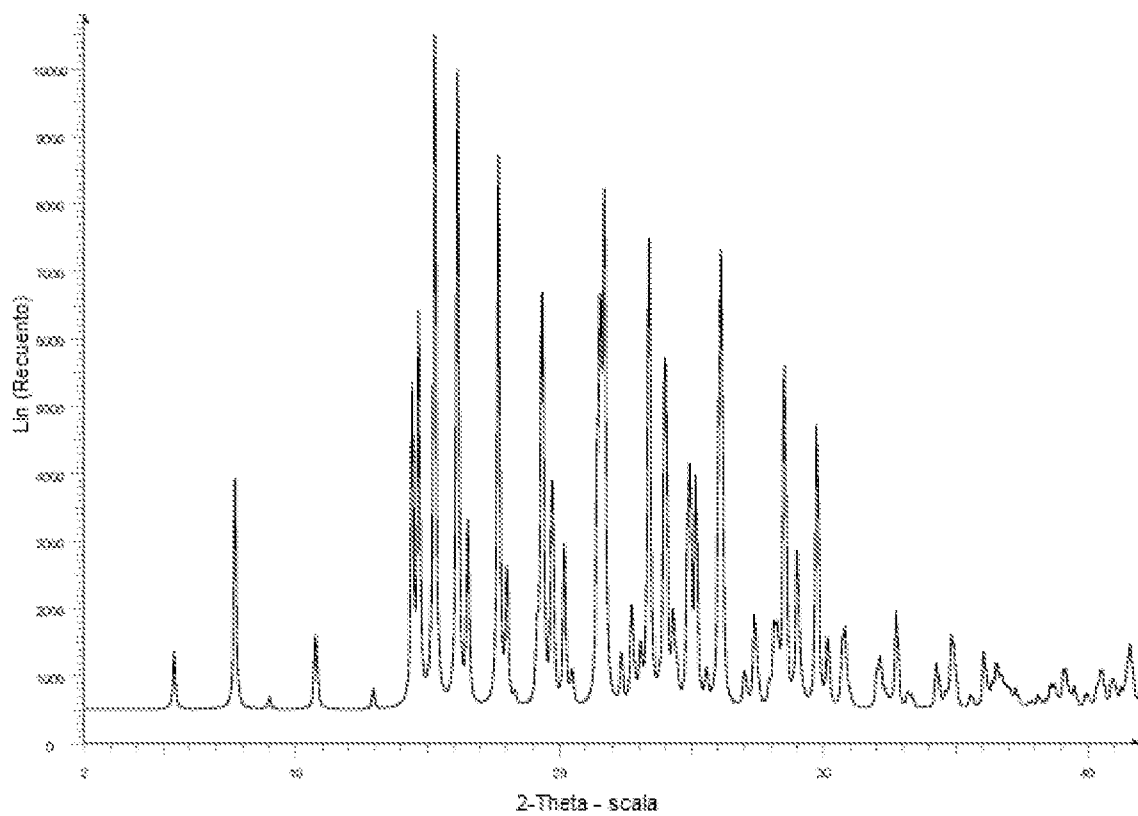


FIGURA 2

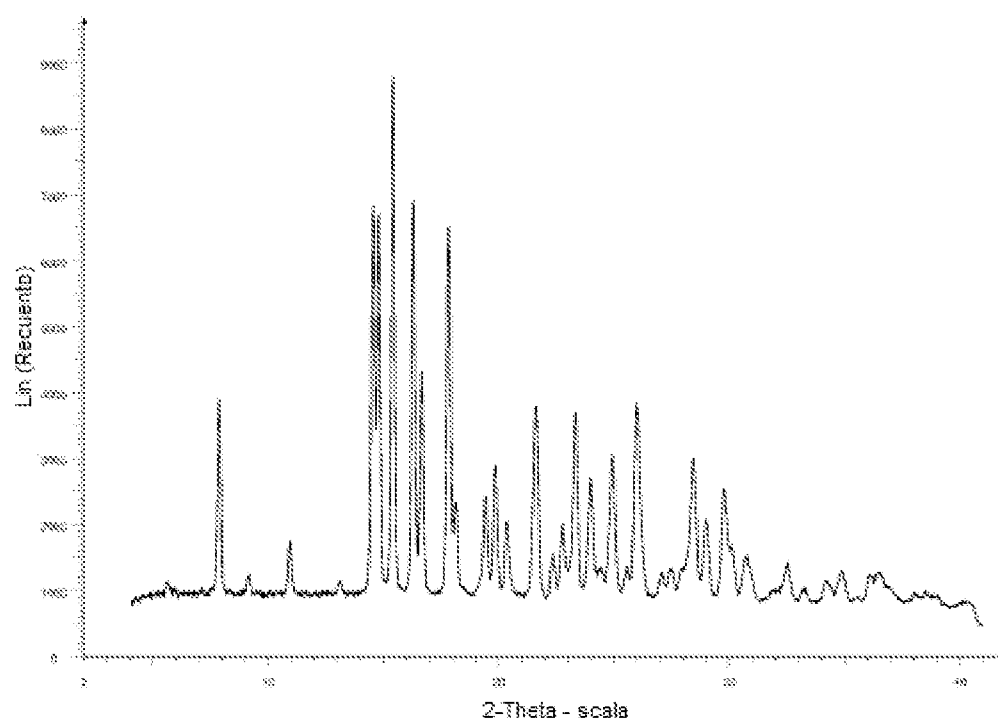


FIGURA 3

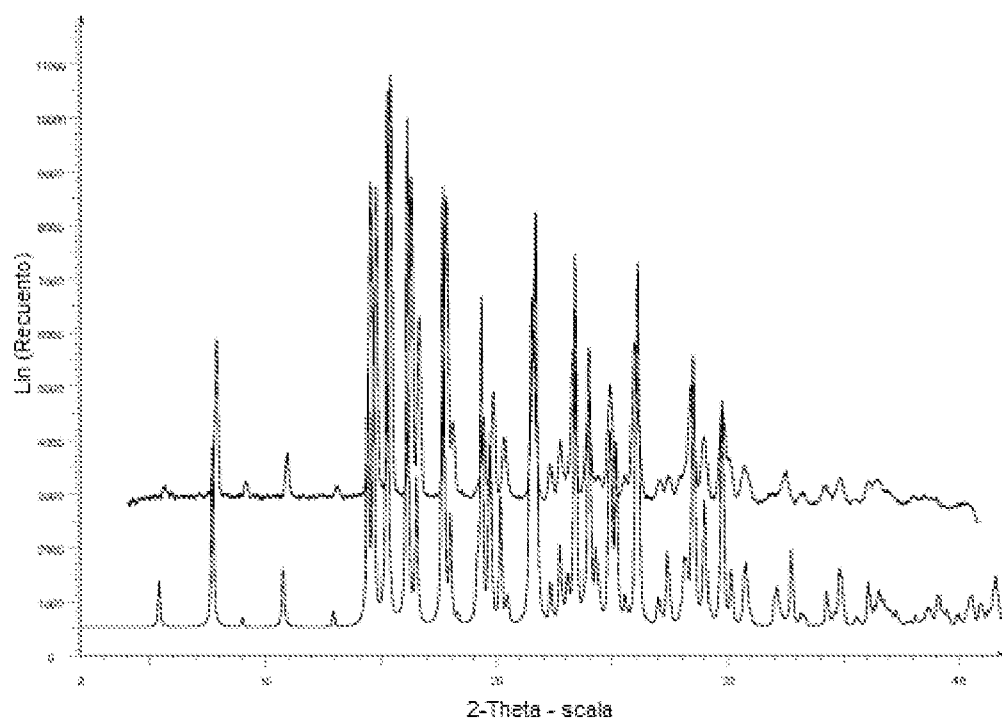


FIGURA 4

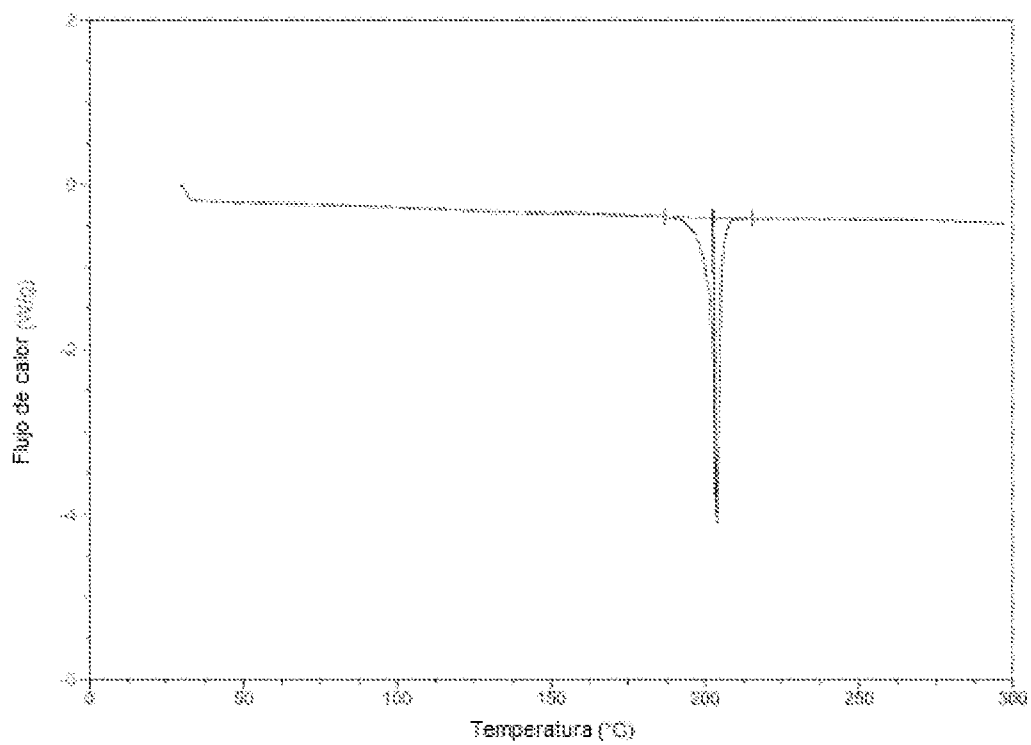


FIGURA 5

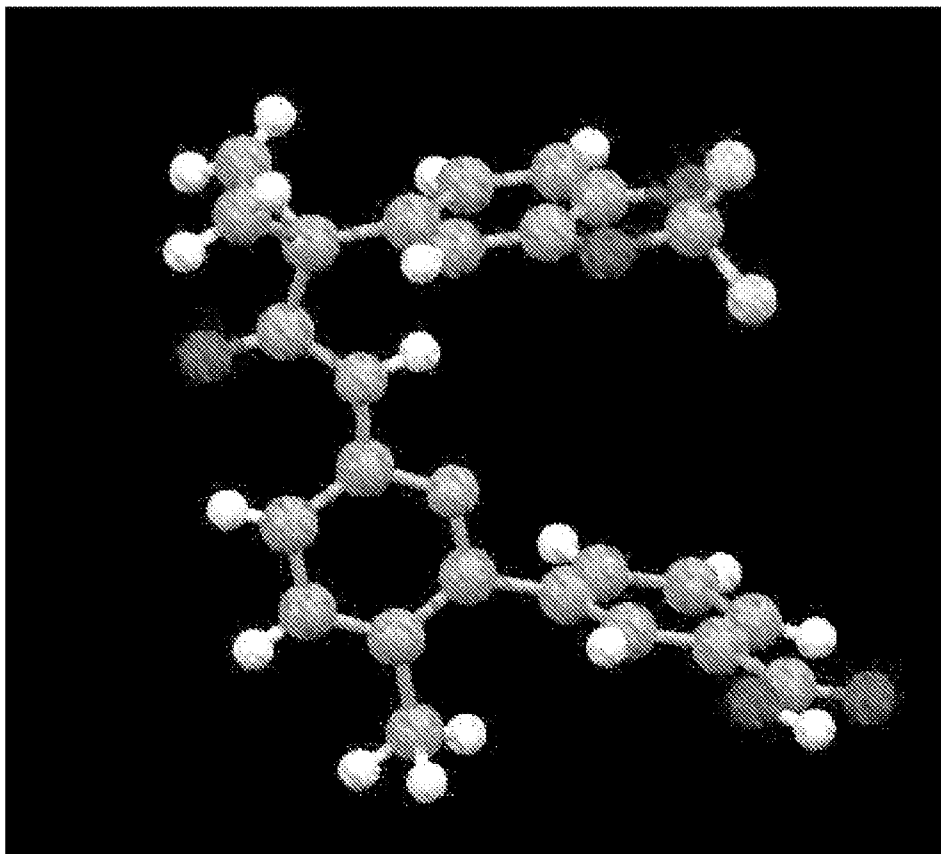


FIGURA 6

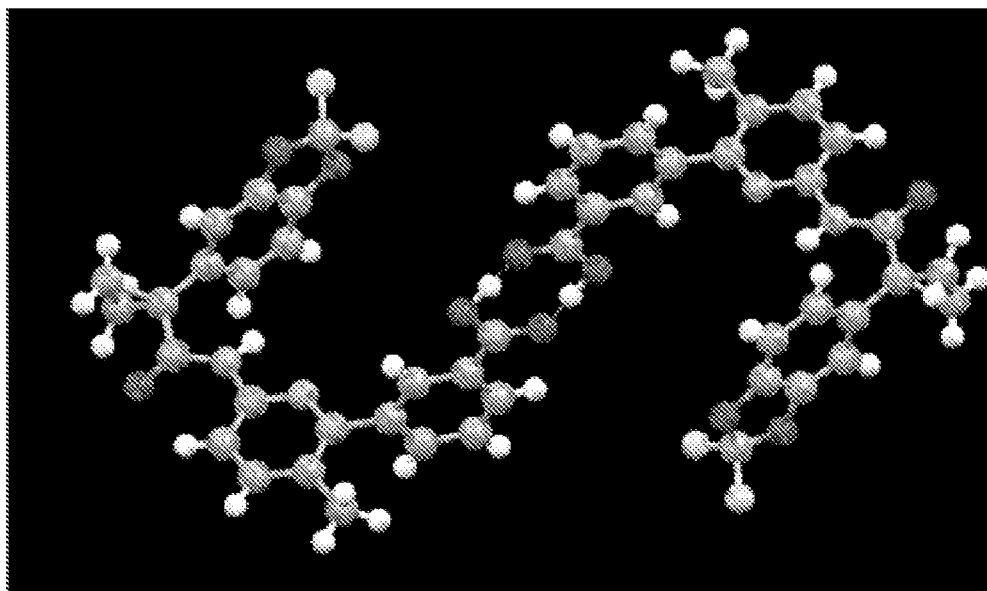


FIGURA 7

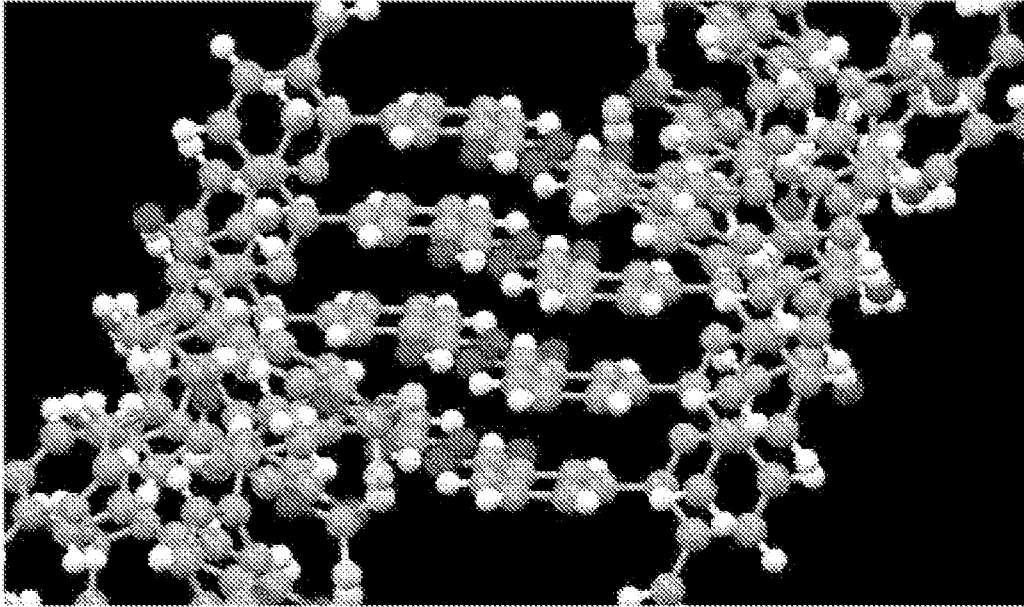


FIGURA 8

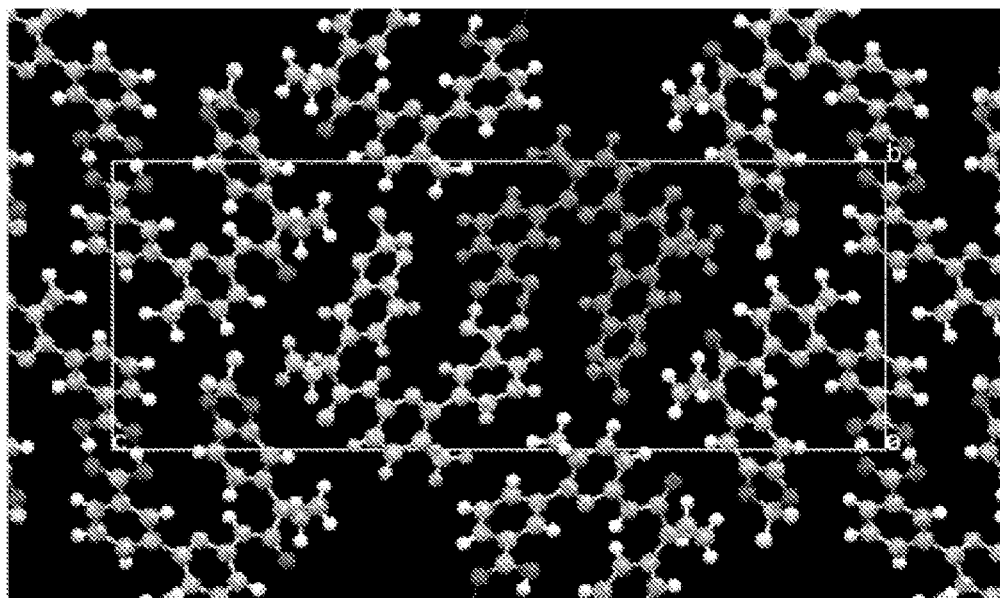


FIGURA 9

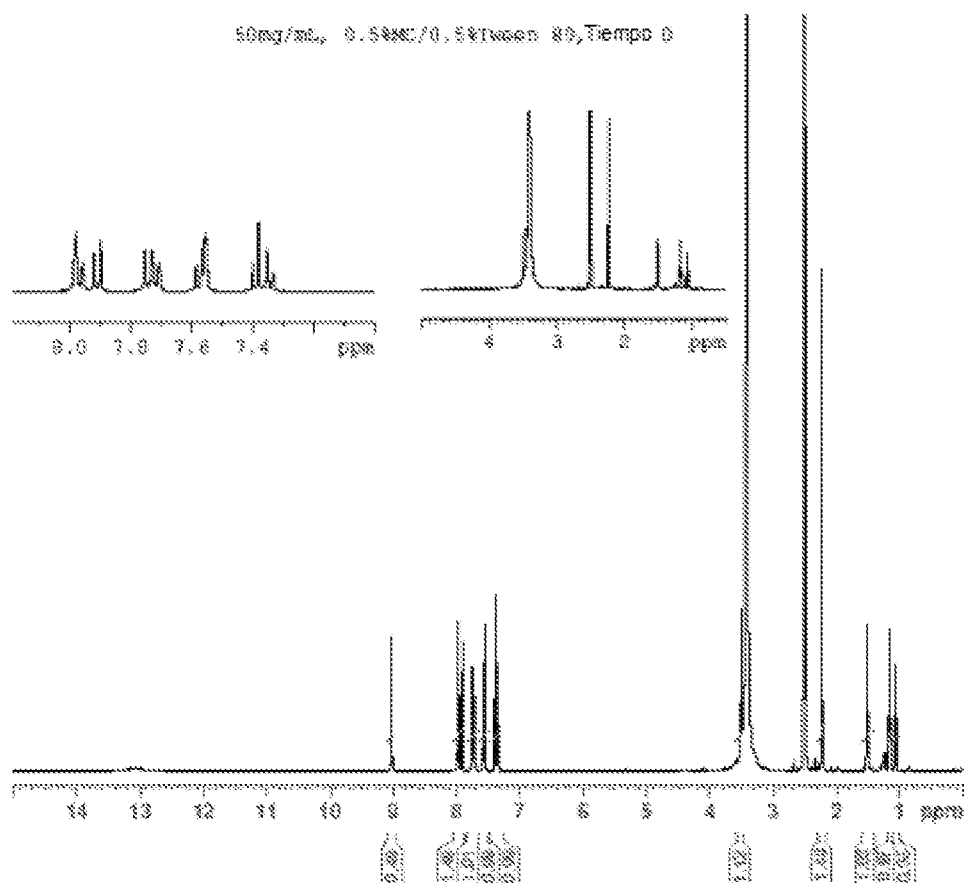


FIGURA 10

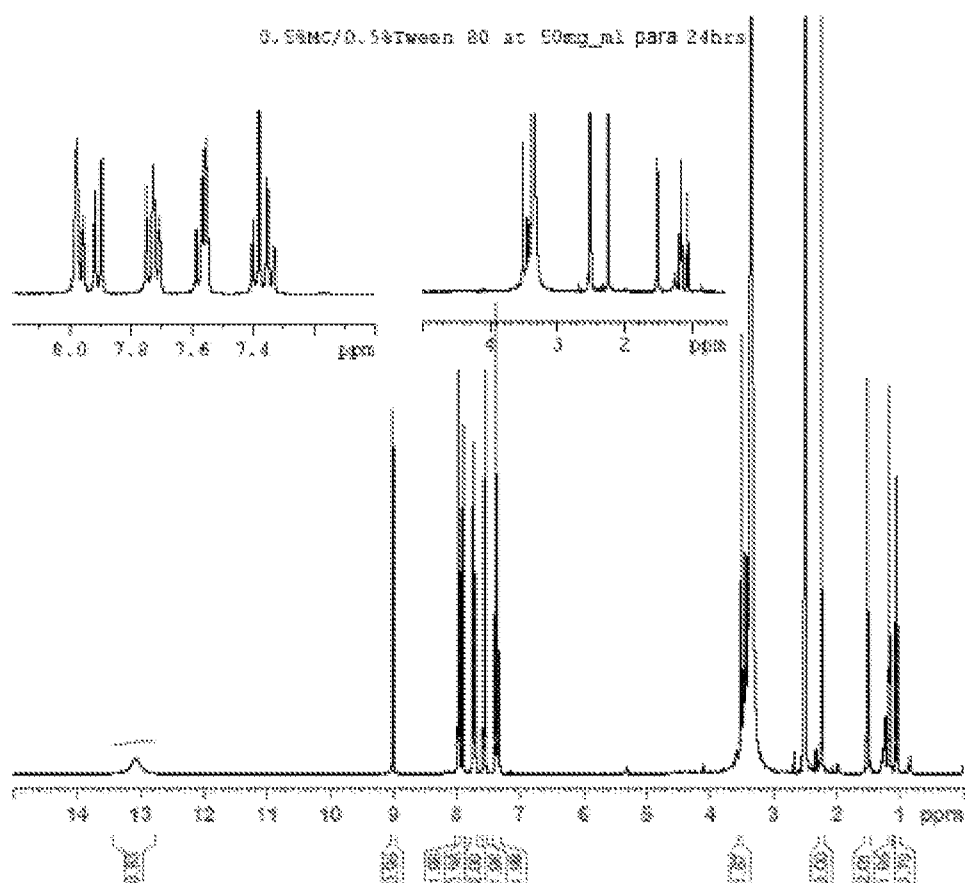


FIGURA 11

