

SIB EX6527R

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo n. 3150198

domanda n. 16185289.2

a nome di:

Vertex Pharmaceuticals Incorporated

“COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE DI ACIDO 3-(6-(1-(2,2-DIFLUOROBENZO[D][1,3]DIOSOL-5-IL) CICLOPROPANOCARBOSSAMMIDO)-3-METILPIRIDIN-2-IL) BENZOICO E SOMMINISTRAZIONE DELLE STESSE”

Jacopo de Benedetti  
USBM-043R B

## DESCRIZIONE

### CAMPO TECNICO DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda composizioni farmaceutiche comprendenti acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzod[[1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Composto 1), metodi per la produzione di tali composizioni e metodi per la somministrazione di composizioni farmaceutiche comprendenti lo stesso.

### FONDAMENTO

Il CFTR è un canale anionico cAMP/ATP-mediato che è espresso in una varietà di tipi cellulari, incluse cellule epiteliali assorbenti e secretorie, dove esso regola il flusso di anioni attraverso la membrana, come pure l'attività di altri canali ionici e proteine. Nelle cellule epiteliali, un funzionamento normale di CFTR è critico per il mantenimento del trasporto di elettroliti in tutto il corpo, incluso tessuto respiratorio e digestivo. CFTR è composto da approssimativamente 1480 amminoacidi che codificano per una proteina costituita da una ripetizione in tandem di domini transmembrana, ognuno contenente sei eliche transmembrana e un dominio di legame dei nucleotidi. I due domini transmembrana sono collegati mediante un grande dominio regolatorio (R) polare con siti di fosforilazione multipli che regolano attività del canale e trafficking cellulare.

Il gene codificante per CFTR è stato identificato e sequenziato (Si veda 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 difetto in questo gene causa mutazioni in CFTR che portano alla fibrosi cistica ("CF"), la più comune malattia genetica fatale negli esseri umani. La fibrosi cistica colpisce approssimativamente uno ogni 2500 bambini minori di 1 anno negli Stati Uniti. Nella popolazione generale statunitense, fino a 10 milioni di persone portano una singola copia del gene difettivo senza effetti negativi apparenti. In contrasto,

individui con due copie del gene associato a CF soffrono degli effetti debilitanti e fatali della CF, inclusa malattia polmonare cronica.

Nei pazienti con fibrosi cistica, mutazioni in CFTR espresso endogenamente in epitelii respiratori portano a ridotta secrezione apicale di anioni causando uno squilibrio nel trasporto degli ioni e dei fluidi. La risultante diminuzione nel trasporto degli anioni contribuisce a accrescere l'accumulo di muco nel polmone e le infezioni microbiche associate che alla fine causano la morte in pazienti con CF. Oltre alla malattia respiratoria, pazienti con CF tipicamente soffrono di problemi gastrointestinali e di insufficienza pancreatica che, se lasciati non trattati, portano a morte. Inoltre, la maggioranza dei maschi con fibrosi cistica sono sterili e la fertilità è diminuita tra le femmine con fibrosi cistica. In contrasto agli effetti severi di due copie del gene associato a CF, individui con una singola copia del gene associato a CF esibiscono aumentata resistenza a colera e a disidratazione derivante da diarrea -- spiegando forse la frequenza relativamente alta del gene associato a CF all'interno della popolazione.

L'analisi di sequenza del gene di CFTR di cromosomi associati a CF ha rivelato una varietà di mutazioni causanti la malattia (Cutting, G. R. *et al.* (1990) *Nature* 346:366-369; Dean, M. *et al.* (1990) *Cell* 61:863-870; e Kerern, B-S. *et al.* (1989) *Science* 245:1073-1080; Kerem, B-S *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8447-8451). Ad oggi, sono state identificate più di 1000 mutazioni causanti la malattia nel gene associato a CF come riportato dalla letteratura medica e scientifica. La mutazione più prevalente è una delezione di fenilalanina in posizione 508 della sequenza amminoacidica di CFTR, ed è comunemente riferita come  $\Delta F508$ -CFTR. Questa mutazione si verifica in approssimativamente il 70 per cento dei casi di fibrosi cistica ed è associata con una malattia severa. Altre mutazioni includono la R117H e la G551D.

La delezione di residuo 508 in  $\Delta F508$ -CFTR impedisce alla proteina nascente di ripiegarsi correttamente. Questo ha come risultato l'incapacità della proteina mutante di uscire dall'ER, e di procedere al trafficking verso la membrana plasmatica. Come risultato, il numero di canali presenti nella membrana è molto inferiore di quanto osservato in cellule esprimenti CFTR wild-type. Oltre al trafficking compromesso, la mutazione ha come risultato un gating di canale difettivo. Insieme, il ridotto numero di canali nella membrana e il gating difettivo portano a ridotto trasporto degli anioni attraverso gli epitelii conducendo a trasporto difettivo degli ioni e dei fluidi. (Quinton, P. M. (1990), *FASEB J.* 4: 2709-2727). Studi hanno mostrato, tuttavia, che i ridotti numeri di  $\Delta F508$ -CFTR nella membrana sono funzionali, sebbene meno del CFTR wild-type. (Dalemans et al. (1991), *Nature Lond.* 354: 526-528; Denning et al., supra; Pasyk and Foskett (1995), *J. Cell. Biochem.* 270: 12347-50). Oltre a  $\Delta F508$ -CFTR, altre mutazioni causanti malattia in CFTR che danno come risultato trafficking, sintesi, e/o gating di canale difettivi potrebbero essere up- oppure down-regolate per alterare la secrezione di anioni e modificare la progressione e/o la severità della malattia. Sebbene il CFTR trasporti una varietà di molecole oltre a anioni, è chiaro che questo ruolo (il trasporto di anioni) rappresenta un solo elemento in un importante meccanismo di trasporto di ioni e acqua attraverso l'epitelio. Gli altri elementi includono il canale per  $\text{Na}^+$  epiteliale, ENaC, il co-trasportatore di  $\text{Na}^+ / 2\text{Cl}^- / \text{K}^+$ , la pompa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasi}$  e i canali per  $\text{K}^+$  della membrana basolaterale, che sono responsabili dell'incorporazione di cloruro nella cellula.

Questi elementi lavorano insieme per ottenere un trasporto direzionale attraverso l'epitelio per mezzo della loro espressione e localizzazione selettiva all'interno della cellula. L'assorbimento di cloruro ha luogo mediante l'attività coordinata di ENaC e CFTR presenti sulla membrana apicale e della pompa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPasi}$  e dei canali per  $\text{Cl}^-$  espressi sulla superficie basolaterale della cellula. Il trasporto attivo secondario di cloruro dal lato luminale

porta all'accumulo di cloruro intracellulare, che può poi lasciare passivamente la cellula attraverso canali per  $\text{Cl}^-$ , con il risultato di un trasporto vettoriale. L'assetto di co-trasportatore  $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ , pompa  $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPasi}$  e dei canali per  $\text{K}^+$  della membrana basolaterale sulla superficie basolaterale e di CFTR sul lato luminale coordinano la secrezione di cloruro attraverso CFTR sul lato luminale. Poiché l'acqua probabilmente non è mai trasportata attivamente di per sé, il suo flusso attraverso gli epitelii dipende da piccoli gradienti osmotici transepiteliali generati dal flusso di massa di sodio e cloruro.

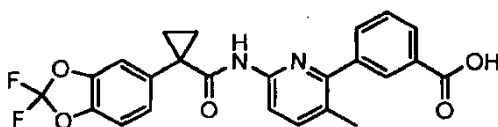
Come discusso sopra, si ritiene che la delezione di residuo 508 in  $\Delta\text{F508-CFTR}$  impedisca alla proteina nascente di ripiegarsi correttamente, con il risultato della incapacità di questa proteina mutante di uscire dall'ER, e di procedere al trafficking verso la membrana plasmatica. Come risultato, insufficienti quantità della proteina matura sono presenti a livello della membrana plasmatica e il trasporto di cloruro all'interno di tessuti epiteliali è significativamente ridotto. In realtà, è stato mostrato che questo fenomeno cellulare di processamento nel reticolo endoplasmatico (ER) difettivo di trasportatori a cassetta legante ATP (ABC) mediante l'apparato dell'ER, è la base sottostante non soltanto per la malattia di CF, ma per un ampio range di altre malattie isolate e ereditarie. Le due vie per cui l'apparato dell'ER può funzionare male è o per perdita di accoppiamento all'esportazione dall'ER delle proteine conducendo a degradazione, o per l'accumulo nell'ER di queste proteine difettive/mal ripiegate [Aridor M, et al., *Nature Med.*, 5(7), pp 745- 751 (1999); Shastry, B.S., et al., *Neurochem. International*, 43, pp 1-7 (2003); Rutishauser, J., et al., *Swiss Med Wkly*, 132, pp 211-222 (2002); Morello, JP et al., *TIPS*, 21, pp. 466- 469 (2000); Bross P., et al., *Human Mut.*, 14, pp. 186-198 (1999)].

L'acido 3-(6-(1-(2,2-Difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il) benzoico in forma di sale è descritto nella Pubblicazione PCT Internazionale WO 2007056341 come un modulatore di attività di CFTR e pertanto come un

trattamento utile per malattie mediate da CFTR quale la fibrosi cistica. La Forma I di acido 3-(6-(1-(2,2-Difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il) benzoico, che è una forma sostanzialmente cristallina e priva di sale nota come Composto 1 Forma I, è descritta nella Domanda di Brevetto degli Stati Uniti 12/327,902, depositata il 4 Dicembre, 2008. La Forma II e sale di HCl Forma A di acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il) benzoico, Composto 1 Forma II e Composto 1 sale di HCl Forma A, rispettivamente, sono descritte nella Domanda di Brevetto degli Stati Uniti Provvisoria 61/321,729, depositata il 7 Aprile, 2010. Tutte le domande sono incorporate nella loro interezza per riferimento nella presente. Rimane, tuttavia, una necessità di composizioni farmaceutiche comprendenti Forma I, Forma II, oppure sale di HCl Forma A di Composto 1 che siano facilmente preparate e che siano adatte per uso come prodotti terapeutici.

#### SOMMARIO

L'invenzione riguarda composizioni farmaceutiche, preparazioni farmaceutiche, e forme di dosaggio solide comprendenti acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Composto 1) che ha la struttura sotto:



1

In un aspetto, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente:

- a. Composto 1;
- b. un riempitivo;
- c. un disgregante;
- d. un tensioattivo;

- e. un diluente;
- f. un lubrificante; e
- g. almeno uno di un glidante e un legante.

In altre forme di realizzazione, Composto 1 è in sostanzialmente una delle sue forme solide cristalline. In una forma di realizzazione, Composto 1 è in sostanzialmente forma cristallina I (Composto 1 Forma I). In una forma di realizzazione, Composto 1 è in sostanzialmente forma cristallina II (Composto 1 Forma II). In una forma di realizzazione, Composto 1 è in sostanzialmente forma di sale di HCl cristallina (Composto 1 Sale di HCl Forma A). Si comprende che il termine "Composto 1", come usato dappertutto, include, tra le altre forme, incluse forme non-cristalline, le seguenti forme allo stato solido: Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, e/o Composto 1 sale di HCl Forma A.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende da 25 mg a 400 mg. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende 25 mg di Composto 1. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende 50 mg di Composto 1. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende 100 mg di Composto 1. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende 125 mg di Composto 1. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende 150 mg di Composto 1. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende 200 mg di Composto 1. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende 250 mg di Composto 1. In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende 400 mg di Composto 1.

In un aspetto, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli Compattazione mediante Rulli	(% p/p)
---	---------

Composto 1	20-40
Cellulosa microcristallina	30-50
Mannitolo	10-30
Croscarmellosa sodica	1-5
Sodio Lauril Solfato	0.1-2
Silice colloidale	0.1-1
Magnesio Stearato	1-3
Composizione di Compresa (100 mg dose)	(% p/p)
Miscela di Granuli Compattazione mediante Rulli	99-99.9
Magnesio Stearato	0.1-1

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli Compattazione mediante Rulli	(% p/p)
Composto 1 Forma I	30
Cellulosa microcristallina	42.3
Mannitolo	21.2
Croscarmellosa sodica	3
Sodio Lauril Solfato	1

Silice colloidale	0.5
Magnesio Stearato	2
Composizione di Compresa (100 mg dose, 335mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli Compattazione mediante Rulli	99.5
Magnesio Stearato	0.5

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
Composto 1 Forma I	40-80
Cellulosa microcristallina	20-40
Mannitolo	10-15
Croscarmellosa sodica	1-5
Polivinilpirrolidone	1-10
Sodio Lauril Solfato	0.1-2
Acqua (rimossa durante essiccamento)	25-40% rispetto ai solidi
Composizione di Compresa (100mg dose)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	95-99
Croscarmellosa sodica	1-4

Magnesio Stearato	0.1-1
-------------------	-------

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
Composto 1 Forma I	50
Cellulosa microcristallina	30
Mannitolo	13
Croscarmellosa sodica	2
Polivinilpirrolidone	4
Sodio Lauril Solfato	1
Acqua (rimossa durante essiccamento)	25-40% rispetto ai solidi
Composizione di Compresa (100 mg dose, 205 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	97.5
Croscarmellosa sodica	2.0
Magnesio Stearato	0.5

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
-----------------------------------	---------

Composto 1 Forma I	60
Cellulosa microcristallina	20
Mannitolo	13
Croscarmellosa sodica	2
Polivinilpirrolidone	4
Sodio Lauril Solfato	1
Acqua (rimossa durante essiccamento)	25-40% rispetto ai solidi
Composizione di Compresa (100mg dose, 171 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	97.5
Croscarmellosa sodica	2.0
Magnesio Stearato	0.5

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
Composto 1 Forma I	60
Cellulosa microcristallina	20
Mannitolo	13
Croscarmellosa sodica	2
Polivinilpirrolidone	4

Sodio Lauril Solfato	1
Acqua (rimossa durante essiccamento)	25-40% rispetto ai solidi
Composizione di Compresa (200 mg dose, 402 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	83
Cellulosa microcristallina	14
Croscarmellosa sodica	2
Magnesio Stearato	1

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	mg
Composto 1 Forma I	200
Cellulosa microcristallina	66
Mannitolo	43
Croscarmellosa sodica	7
Polivinilpirrolidone	13
Sodio Lauril Solfato	3
Composizione di Compresa Nucleo (200 mg dose, 400 mg immagine)	mg
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	332

Cellulosa microcristallina	56
Croscarmellosa sodica	8
Magnesio Stearato	4
Compressa Rivestita con Film (200 mg dose, 412 mg immagine)	mg
Composizione di Compressa Nucleo	400
Film di Rivestimento	12
Cera	0.04

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	mg
Composto 1 Forma I	200
Cellulosa microcristallina	67
Mannitolo	45
Croscarmellosa sodica	7
Polivinilpirrolidone	10.4
Sodio Lauril Solfato	2.6
Composizione di Compressa Nucleo (200 mg dose, 400 mg immagine)	mg
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	332
Cellulosa microcristallina	56

Croscarmellosa sodica	8
Magnesio Stearato	4
Compressa Rivestita con Film (200 mg dose, 412 mg immagine)	mg
Composizione di Compressa Nucleo	400
Film di Rivestimento	12
Cera	0.04

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
Composto 1 Forma I	70
Cellulosa microcristallina	12
Mannitolo	11
Croscarmellosa sodica	2
Polivinilpirrolidone	4
Sodio Lauril Solfato	1
Acqua (rimossa durante essiccamento)	25-40% rispetto ai solidi
Composizione di Compressa (100 mg dose, 147 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	97.5

Croscarmellosa sodica	2.0
Magnesio Stearato	0.5

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
Composto 1 Forma I oppure Forma II	61
Cellulosa microcristallina	20.3
Mannitolo	13.2
Croscarmellosa sodica	2
Polivinilpirrolidone	2.7
Sodio Lauril Solfato	0.7
Composizione di Compresa (100 mg dose, 197 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	83
Cellulosa microcristallina	14
Croscarmellosa sodica	2
Magnesio Stearato	1

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente i seguenti componenti:

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	mg
-----------------------------------	----

Composto 1 Forma I oppure Forma II	100
Cellulosa microcristallina	33.3
Mannitolo	21.7
Croscarmellosa sodica	3.3
Polivinilpirrolidone	4.4
Sodio Lauril Solfato	1.1
Composizione di Compresa Nucleo (100 mg dose, 197 mg immagine)	mg
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	163.9
Cellulosa microcristallina	27.6
Croscarmellosa sodica	3.9
Magnesio Stearato	2.0

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica nella forma di una compressa che comprende Composto 1, e uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili, per esempio, un riempitivo, un disgregante, un tensioattivo, un diluente, un legante, un glidante, e un lubrificante e qualunque combinazione degli stessi, dove la compressa ha una dissoluzione di almeno circa 50% in circa 30 minuti. In un'altra forma di realizzazione, il tasso di dissoluzione è almeno circa 75% in circa 30 minuti. In un'altra forma di realizzazione, il tasso di dissoluzione è almeno circa 90% in circa 30 minuti.

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica costituita da una compressa che comprende una miscela di polveri oppure granuli comprendenti Composto 1; e, uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili, per esempio, un riempitivo, un

disgregante, un tensioattivo, un diluente, un legante, un glidante, e un lubrificante, in cui la compressa ha una durezza di almeno circa 5 kP (kP = kiloPond; 1 kP = ~9.8 N). In un'altra forma di realizzazione, la compressa ha una friabilità target minore di 1.0% dopo 400 giri. In un altro aspetto, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica costituita da una compressa che comprende una miscela di polveri oppure granuli comprendenti Composto 1 Forma II, Composto 1; e, uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili, per esempio, un riempitivo, un disgregante, un tensioattivo, un diluente, un legante, un glidante, e un lubrificante, in cui la compressa ha una durezza di almeno circa 5 kP (kP = kiloPond; 1 kP = ~9.8 N). In un'altra forma di realizzazione, la compressa ha una friabilità target minore di 1.0% dopo 400 giri.

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica come descritta nella presente comprendente inoltre un agente terapeutico supplementare. In alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico supplementare è N-(5-idrossi-2,4-ditert-butil-fenil)-4-osso-1H-chinolina-3-carbossammide.

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce un metodo di trattamento di una malattia mediata da CFTR in un mammifero comprendente somministrare al mammifero una quantità efficace di una composizione farmaceutica come descritta nella presente. In alcune forme di realizzazione, la malattia mediata da CFTR è fibrosi cistica, enfisema, BPCO, oppure osteoporosi. In altre forme di realizzazione, la malattia mediata da CFTR è fibrosi cistica. Questo metodo può inoltre comprendere somministrare un agente terapeutico supplementare, in cui in alcune forme di realizzazione, l'agente terapeutico supplementare è N-(5-idrossi-2,4-ditert-butil-fenil)-4-osso-1H-chinolina-3-carbossammide.

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce un procedimento per la produzione delle composizioni farmaceutiche descritte nella presente mediante un processo di compattazione mediante rulli comprendente i passi di setacciare e pesare Composto 1 e eccipienti; mescolare

Composto 1 e eccipienti per una quantità di tempo adatta; compattare mediante rulli la miscela in scaglie e macinare le scaglie in granuli; mescolare i granuli con eccipienti extra-granulari per una quantità di tempo adatta; comprimere la miscela in compresse; rivestire le compresse; e, facoltativamente, stampare un monogramma su una o su ambedue le facce della compressa.

In un altro aspetto, l'invenzione fornisce un procedimento per la produzione delle composizioni farmaceutiche descritte nella presente mediante un processo di granulazione ad alto taglio comprendente i passi di setacciare e pesare Composto 1 e eccipienti; mescolare Composto 1 e eccipienti aggiungendo frattanto un liquido di granulazione comprendente tensioattivo e un legante ad una velocità di mescolamento adatta per una quantità di tempo adatta e frantumare la miscela in granuli; essiccare i granuli; mescolare i granuli con eccipienti extra-granulari per una quantità di tempo adatta; comprimere la miscela in compresse; rivestire le compresse; e, facoltativamente, stampare un monogramma su una o su ambedue le facce della compressa.

#### BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La **Figura 1** è un pattern di diffrazione di raggi X calcolato da una struttura di cristallo singolo di Composto 1 Forma I.

La **Figura 2** è un reale pattern di diffrazione di raggi X da polveri di Composto 1 Forma I.

La **Figura 3** è un pattern di diffrazione di raggi X da polveri di Composto 1 Forma II.

La **Figura 4** fornisce i pattern di diffrazione di raggi X di Forme II di Composto 1 selezionate tra:

- 1) Composto 1 Forma II, Solvato con Metanolo;
- 2) Composto 1 Forma II, Solvato con Etanolo;
- 3) Composto 1 Forma II, Solvato con Acetone;
- 4) Composto 1 Forma II, Solvato con 2-Propanolo;

- 5) Composto 1 Forma II, Solvato con Acetonitrile;
- 6) Composto 1 Forma II, Solvato con Tetraidrofurano;
- 7) Composto 1 Forma II, Solvato con Acetato di Metile;
- 8) Composto 1 Forma II, Solvato con 2-Butanone;
- 9) Composto 1 Forma II, Solvato con Formiato di Etile; e
- 10) Composto 1 Forma II, Solvato con 2-Metiltetraidrofurano.

La **Figura 5** fornisce un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Forma II, Solvato con Metanolo.

La **Figura 6** fornisce un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Forma II, Solvato con Etanolo.

La **Figura 7** fornisce un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 **Forma II**, Solvato con Acetone.

La **Figura 8** fornisce un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 **Forma II**, Solvato con 2-Propanolo.

La **Figura 9** fornisce un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Forma II, Solvato con Acetonitrile.

La **Figura 10** fornisce un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Forma II, Solvato con Tetraidrofurano.

La **Figura 11** fornisce un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Forma II, Solvato con Acetato di Metile.

La **Figura 12** fornisce un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Forma II, Solvato con 2-Butanone.

La **Figura 13** fornisce un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Forma II, Solvato con Formiato di Etile.

La **Figura 14** fornisce un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Forma II, Solvato con 2-Metiltetraidrofurano.

La **Figura 15** è un tracciato di calorimetria differenziale a scansione (DSC) di Composto 1 Forma II, Solvato con Acetone.

La **Figura 16** è un grafico di analisi termogravimetrica (TGA) di Composto 1 Forma II, Solvato con Acetone.

La **Figura 17** è una rappresentazione conformazionale di Composto 1 Forma II, Solvato con Acetone sulla base di analisi ai raggi X su cristallo singolo.

La **Figura 18** è una rappresentazione conformazionale del dimero di Composto 1 Sale di HCl Forma A.

La **Figura 19** è un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Sale di HCl Forma A calcolato dalla struttura cristallina.

La **Figura 20** è uno spettro  $^1\text{H}$ NMR di Composto 1.

La **Figura 21** è uno spettro  $^1\text{H}$ NMR di Composto 1 sale di HCl.

La **Figura 22** è un tracciato di calorimetria differenziale a scansione (DSC) di Composto 1 Forma I.

La **Figura 23** è una raffigurazione conformazionale di Composto 1 Forma I sulla base di analisi ai raggi X su cristallo singolo.

La **Figura 24** è una rappresentazione conformazionale di Composto 1 Forma II, Solvato con Acetone, sulla base di analisi ai raggi X su cristallo singolo.

La **Figura 25** è uno spettro  $^{13}\text{C}$  NMR allo stato solido (15.0 kHz spinning) di Composto 1 Forma II, Solvato con Acetone.

La **Figura 26** è uno spettro  $^{19}\text{F}$  NMR allo stato solido (12.5 kHz spinning) di Composto 1 Forma II, Solvato con Acetone.

La **Figura 27** è un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Sale di HCl Forma A calcolato dalla struttura cristallina.

### DESCRIZIONE DETTAGLIATA

#### **DEFINIZIONI**

Come usato nella presente, il termine "ingrediente farmaceutico attivo" oppure "API" si riferisce a un composto biologicamente attivo. API esemplari includono acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzod[1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Composto 1).

I termini "forma solida", "forme solide" e termini correlati, quando usati nella presente per riferirsi a acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzod[1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il) benzoico (Composto 1), si riferiscono a una forma solida ad esempio cristalli e simili, comprendente Composto 1 che non è prevalentemente in un uno stato liquido oppure gassoso.

Come usato nella presente, il termine "sostanzialmente amorfo" si riferisce a un materiale solido avente poco o nessun ordine a lungo raggio nella posizione delle sue molecole. Per esempio materiali, sostanzialmente amorfi hanno meno di circa 15% di cristallinità (ad esempio, meno di circa 10% di cristallinità o meno di circa 5% di cristallinità). Va anche notato che il termine "sostanzialmente amorfo" include il descrittore, "amorfo", che si riferisce a materiali con nessuna (0%) cristallinità.

Come usato nella presente, il termine "sostanzialmente cristallino" (come nella frase composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A sostanzialmente cristallini) si riferisce a un materiale solido avente prevalentemente un ordine a lungo raggio nella posizione delle sue molecole. Per esempio, materiali sostanzialmente cristallini hanno più di circa 85% di cristallinità (ad esempio, più di circa

90% di cristallinità o più di circa 95% di cristallinità). Va anche notato che il termine “sostanzialmente cristallino” include il descrittore, “cristallino”, che si riferisce a materiali con 100% di cristallinità.

Il termine "cristallino" e termini correlati usati nella presente, quando usati per descrivere una sostanza, un componente, un prodotto, oppure una forma, significa che la sostanza, il componente oppure il prodotto è sostanzialmente cristallino come determinato mediante diffrazione di raggi X. (Si veda, ad esempio, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>a</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (2003); The United States Pharmacopeia, 23<sup>a</sup> ed., 1843-1844 (1995)).

Come usato nella presente, il termine "composizione" generalmente si riferisce a una composizione di due o più componenti, solitamente uno o più farmaci (ad esempio, un farmaco (ad esempio, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A)) e uno o più eccipienti farmaceutici.

Come usato nella presente, il termine "forma di dosaggio solida" generalmente si riferisce a una composizione farmaceutica, che quando usata in una modalità orale di somministrazione include capsule, compresse, pillole, polveri e granuli. In tali forme di dosaggio solide, il composto attivo è miscelato con almeno un eccipiente oppure carrier farmaceuticamente accettabile inerte.

Come usato nella presente, un "eccipiente" include ingredienti funzionali e non funzionali in una composizione farmaceutica.

Come usato nella presente, un "disgregante" è un eccipiente che idrata una composizione farmaceutica e facilita la dispersione della compressa.

Come usato nella presente, un "diluente" oppure "riempitivo" è un eccipiente che aggiunge voluminosità a una composizione farmaceutica.

Come usato nella presente, un "tensioattivo" è un eccipiente che conferisce alle composizioni farmaceutiche accresciuta solubilità e/o bagnabilità.

Come usato nella presente, un "legante" è un eccipiente che conferisce a una composizione farmaceutica accresciuta coesione o resistenza a rottura (ad esempio, durezza).

Come usato nella presente, un "glidante" è un eccipiente che conferisce alle composizioni farmaceutiche proprietà di flusso migliorate.

Come usato nella presente, un "colorante" è un eccipiente che conferisce a una composizione farmaceutica un desiderato colore. Esempi di coloranti includono pigmenti disponibili in commercio quali FD&C Blue # 1 Aluminum Lake, FD&C Blue #2, altri colori FD&C Blue, diossido di titanio, ossido di ferro, e/o combinazioni degli stessi. In una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica fornita dall'invenzione è viola.

Come usato nella presente, un "lubrificante" è un eccipiente che si aggiunge a composizioni farmaceutiche che sono pressate in compresse. Il lubrificante facilita la compattazione di granuli in compresse e l'espulsione di una compressa di una composizione farmaceutica da una pressa a matrice.

Come usato nella presente, "centimetro cubo" e "cc" si usano intercambiabilmente per rappresentare una unità di volume. Si noti che 1 cc = 1 mL.

Come usato nella presente, "kiloPond" e "kP" si usano intercambiabilmente e si riferiscono alla misura di forza dove un kP = approssimativamente 9.8 Newton.

Come usato nella presente, "friabilità" si riferisce alla proprietà di una compressa di rimanere intatta e mantenere la sua forma malgrado una forza esterna di pressione. La friabilità può essere quantificata usando l'espressione matematica presentata nella equazione 1:

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

in cui  $W_0$  è il peso iniziale della compressa e  $W_f$  è il peso finale della compressa dopo che essa è fatta passare nel friabilometro. La friabilità si misura usando un apparato di prova USP standard che fa ruotare le compresse sperimentali per 100 oppure 400 giri. Alcune compresse dell'invenzione hanno una friabilità minore di 5.0%. In un'altra forma di realizzazione, la friabilità è minore di 2.0%. In un'altra forma di realizzazione, la friabilità target è minore di 1.0% dopo 400 giri.

Come usato nella presente, "diametro medio di particella" è il diametro medio di particella come misurato usando tecniche quali diffusione di luce laser, analisi di immagini, oppure analisi mediante setacci. In una forma di realizzazione, i granuli usati per preparare le composizioni farmaceutiche fornite dall'invenzione hanno un diametro medio di particella minore di 1.0 mm.

Come usato nella presente, la "densità di bulk" è la massa di particelle di materiale divisa per il volume totale che le particelle occupano. Il volume totale include volume delle particelle, volume di vuoto inter-particelle e volume interno di pori. La densità di bulk non è una proprietà intrinseca di un materiale; essa può variare a seconda di come il materiale è processato. In una forma di realizzazione, i granuli usati per preparare le composizioni farmaceutiche fornite dall'invenzione hanno una densità di bulk di circa 0.5-0.7 g/cc.

Una quantità efficace oppure "quantità terapeuticamente efficace" di un composto farmaceutico dell'invenzione può variare secondo fattori quali lo stato di malattia, l'età, e il peso del soggetto, e la capacità del composto dell'invenzione di suscitare una desiderata risposta nel soggetto. I regimi posologici possono essere aggiustati per fornire la risposta terapeutica ottimale. Una quantità efficace è anche una in cui qualunque effetto tossico oppure dannoso (ad esempio, effetti collaterali) del composto dell'invenzione è superato dagli effetti terapeuticamente benefici.

Come usato nella presente, e eccetto se altrimenti specificato, i termini "quantità terapeuticamente efficace" e "quantità efficace" di un composto significano una quantità sufficiente per fornire un beneficio terapeutico nel trattamento oppure nella gestione di una malattia oppure di un disordine, oppure per ritardare oppure ridurre al minimo uno o più sintomi associati con la malattia oppure con il disordine. Una "quantità terapeuticamente efficace" e "quantità efficace" di un composto significano una quantità di agente terapeutico, singolarmente oppure in combinazione con uno o più altri agenti, che fornisce un beneficio terapeutico nel trattamento oppure nella gestione della malattia oppure del disordine. I termini "quantità terapeuticamente efficace" e "quantità efficace" possono comprendere una quantità che migliora la terapia complessiva, riduce oppure evita sintomi oppure cause di malattia oppure di disordine, oppure accresce l'efficacia terapeutica di un altro agente terapeutico.

"Sostanzialmente puro" come usato nella frase "Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A sostanzialmente puri", significa più di circa 90% di purezza. In un'altra forma di realizzazione, sostanzialmente puro si riferisce a più di circa 95% di purezza. In un'altra forma di realizzazione, sostanzialmente puro si riferisce a più di circa 98% di purezza. In un'altra forma di realizzazione, sostanzialmente puro si riferisce a più di circa 99% di purezza.

Rispetto al composto 1 (ad esempio, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, Composto 1 Sale di HCl Forma A), i termini "circa" e "approssimativamente", quando usati relativamente a dosi, quantità, oppure percentuale in peso di ingredienti di una composizione oppure di una forma di dosaggio, significano una dose, una quantità, oppure una percentuale in peso che è riconosciuto da uno di ordinaria esperienza nella tecnica che fornisce un effetto farmacologico equivalente a quello ottenuto dalla dose, dalla quantità, oppure dalla percentuale in peso specificata. Nello specifico il termine "circa" oppure

"approssimativamente" significa un errore accettabile per un particolare valore come determinato da uno di ordinaria esperienza nella tecnica, che dipende in parte da come il valore è misurato oppure determinato. In certe forme di realizzazione, il termine "circa" oppure "approssimativamente" significa all'interno di 1, 2, 3, o 4 deviazioni standard. In certe forme di realizzazione, il termine "circa" oppure "approssimativamente" significa all'interno di 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1%, oppure 0.05% di un dato valore oppure range.

Eccetto se altrimenti specificato, il termine "Composto 1" include, ma non vi è limitato, le forme solide di Composto 1 come descritte nella presente, ad esempio composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A, come pure combinazioni delle stesse.

#### **COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE**

L'invenzione fornisce composizioni farmaceutiche, formulazioni farmaceutiche e forme di dosaggio solide comprendenti Composto 1 che può essere in forma sostanzialmente cristallina. In alcune forme di realizzazione, Composto 1 è in forma cristallina I (Composto 1 Forma I). In alcune forme di realizzazione, Composto 1 è in forma cristallina II (Composto 1 Forma II). In alcune forme di realizzazione, Composto 1 è in forma di sale di HCl cristallina (Composto 1 Sale di HCl Forma A). In alcune forme di realizzazione di questo aspetto, la quantità di Composto 1 che è presente nella composizione farmaceutica è 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, oppure 400 mg. In alcune forme di realizzazione di questo aspetto, la percentuale relativa peso/peso di Composto 1 che è presente nella composizione farmaceutica è da 10 a 75 percento. In queste e in altre forme di realizzazione, acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico è presente come Composto 1 sostanzialmente puro. "Sostanzialmente puro" significa più di novanta percento puro;

preferibilmente più di 95 percento puro; più preferibilmente più di 99.5 percento puro (cioè, non miscelato con altre forme cristalline di Composto 1).

Pertanto in un aspetto, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente:

- a. Composto 1;
- b. un riempitivo;
- c. un disgregante;
- d. un tensioattivo;
- e. un diluente;
- f. un lubrificante; e
- g. e almeno uno di un glidante e un legante.

In una forma di realizzazione di questo aspetto, la composizione farmaceutica comprende 25 mg di Composto 1. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto, la composizione farmaceutica comprende 50 mg di Composto 1. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto, la composizione farmaceutica comprende 100 mg di Composto 1. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto, la composizione farmaceutica comprende 125 mg di Composto 1. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto, la composizione farmaceutica comprende 150 mg di Composto 1. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto, la composizione farmaceutica comprende 200 mg di Composto 1. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto, la composizione farmaceutica comprende 250 mg di Composto 1. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto, la composizione farmaceutica comprende 400 mg di Composto 1.

In alcune forme di realizzazione, le composizioni farmaceutiche comprendono Composto 1, in cui Composto 1 è presente in una quantità di almeno 15% in peso (ad esempio, almeno 20% in peso, almeno 30% in peso, almeno 40% in peso, almeno 50% in peso, oppure almeno 60% in peso) rispetto al peso della composizione.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende Composto 1, un riempitivo, un diluente, un disgregante, un tensioattivo, un glidante, e un lubrificante. In questa forma di realizzazione, la composizione comprende da circa 20% in peso a circa 50% in peso (ad esempio, circa 25-35% in peso) di Composto 1 rispetto al peso della composizione, e più tipicamente, da 25% in peso a circa 45% in peso (ad esempio, circa 28-32% in peso) di Composto 1 rispetto al peso della composizione.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende Composto 1, un riempitivo, un diluente, un disgregante, un tensioattivo, un legante, e un lubrificante. In questa forma di realizzazione, la composizione comprende da circa 30% in peso a circa 60% in peso (ad esempio, circa 40-55% in peso) di Composto 1 rispetto al peso della composizione, e più tipicamente da 35% in peso a circa 70% in peso (ad esempio, circa 45-55% in peso) di Composto 1 rispetto al peso della composizione.

La concentrazione di Composto 1 nella composizione dipende da diversi fattori quali la quantità di composizione farmaceutica necessaria per fornire una desiderata quantità di Composto 1 e il desiderato profilo di dissoluzione della composizione farmaceutica.

In un'altra forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende Composto 1, in cui Composto 1 nella sua forma solida ha un diametro medio di particella, misurato mediante diffusione della luce (ad esempio, usando un Malvern Mastersizer disponibile da Malvern Instruments in Inghilterra) da 0.1 micron a 10 micron. In un'altra forma di realizzazione, la dimensione di particella di Composto 1 è da 1 micron a 5 micron. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 ha una dimensione di particella D50 di 2.0 micron.

Come indicato, oltre a composto 1, in alcune forme di realizzazione dell'invenzione, le composizioni farmaceutiche che sono formulazioni orali comprendono anche uno o più eccipienti quali riempitivi, disgreganti, tensioattivi, diluenti, leganti, glidanti, lubrificanti, coloranti, oppure profumi e qualunque combinazione degli stessi.

Riempitivi adatti per l'invenzione sono compatibili con gli ingredienti della composizione farmaceutica, cioè, essi non riducono sostanzialmente la solubilità, la durezza, la stabilità chimica, la stabilità fisica, oppure l'attività biologica della composizione farmaceutica. Riempitivi esemplari includono: cellulose, cellulose modificate, (ad esempio sodio carbossimetilcellulosa, etilcellulosa idrossimetilcellulosa, idrossipropilcellulosa), acetato di cellulosa, cellulosa microcristallina, calcio fosfati, calcio fosfato dibasico, amidi (ad esempio amido di mais, amido di patata), zuccheri (ad esempio, sorbitolo) lattosio, saccarosio, o simili), oppure qualunque combinazione degli stessi.

Pertanto, in una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende almeno un riempitivo in una quantità di almeno 5% in peso (ad esempio, almeno circa 20% in peso, almeno circa 30% in peso, oppure almeno circa 40% in peso) rispetto al peso della composizione. Per esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 10% in peso a circa 60% in peso (ad esempio, da circa 20% in peso a circa 55% in peso, da circa 25% in peso a circa 50% in peso, oppure da circa 27% in peso a circa 45% in peso) di riempitivo, rispetto al peso della composizione. In un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende almeno circa 20% in peso (ad esempio, almeno 30% in peso oppure almeno 40% in peso) di cellulosa microcristallina, per esempio MCC Avicel PH102, rispetto al peso della composizione. In ancora un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 10% in peso a circa 60% in peso (ad esempio, da circa 20% in peso a circa 55% in peso oppure da circa 25% in peso a circa 45% in peso) di microcellulosa, rispetto al peso della composizione.

Disgreganti adatti per l'invenzione accrescono la dispersione della composizione farmaceutica e sono compatibili con gli ingredienti della composizione farmaceutica, cioè, essi non riducono sostanzialmente la stabilità chimica, la stabilità fisica, la durezza, oppure

l'attività biologica della composizione farmaceutica. Disgreganti esemplari includono croscarmellosa sodica, sodio amido glicolato, oppure una combinazione degli stessi.

Pertanto, in una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende disgregante in una quantità di circa 10% in peso o minore (ad esempio, circa 7% in peso o minore, circa 6% in peso o minore, oppure circa 5% in peso o minore) rispetto al peso della composizione. Per esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 1% in peso a circa 10% in peso (ad esempio, da circa 1.5% in peso a circa 7.5% in peso oppure da circa 2.5% in peso a circa 6% in peso) di disgregante, rispetto al peso della composizione. In un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende circa 10% in peso o minore (ad esempio, 7% in peso o minore, 6% in peso o minore, oppure 5% in peso o minore) di croscarmellosa sodica, rispetto al peso della composizione. In ancora un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 1% in peso a circa 10% in peso (ad esempio, da circa 1.5% in peso a circa 7.5% in peso oppure da circa 2.5% in peso a circa 6% in peso) di croscarmellosa sodica, rispetto al peso della composizione. In alcuni esempi, la composizione farmaceutica comprende da circa 0.1% a circa 10% in peso (ad esempio, da circa 0.5% in peso a circa 7.5% in peso oppure da circa 1.5% in peso a circa 6% in peso) di disgregante, rispetto al peso della composizione. In ancora altri esempi, la composizione farmaceutica comprende da circa 0.5% a circa 10% in peso (ad esempio, da circa 1.5% in peso a circa 7.5% in peso oppure da circa 2.5% in peso a circa 6% in peso) di disgregante, rispetto al peso della composizione.

Tensioattivi adatti per l'invenzione accrescono la bagnabilità della composizione farmaceutica e sono compatibili con gli ingredienti della composizione farmaceutica, cioè, essi non riducono sostanzialmente la stabilità chimica, la stabilità fisica, la durezza, oppure l'attività biologica della composizione farmaceutica. Tensioattivi esemplari includono sodio

lauril solfato (SLS), sodio stearil fumarato (SSF), poliossietilene 20 sorbitan mono-oleato (ad esempio, Tween™), qualunque combinazione degli stessi, o simili.

Pertanto, in una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende un tensioattivo in una quantità di circa 10% in peso o minore (ad esempio, circa 5% in peso o minore, circa 2% in peso o minore, circa 1% in peso o minore, circa 0.8% in peso o minore, oppure circa 0.6% in peso o minore) rispetto al peso della composizione. Per esempio, la composizione farmaceutica include da circa 10% in peso a circa 0.1% in peso (ad esempio, da circa 5% in peso a circa 0.2% in peso oppure da circa 2% in peso a circa 0.3% in peso) di tensioattivo, rispetto al peso della composizione. In un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende 10% in peso o minore (ad esempio, circa 5% in peso o minore, circa 2% in peso o minore, circa 1% in peso o minore, circa 0.8% in peso o minore, oppure circa 0.6% in peso o minore) di sodio lauril solfato, rispetto al peso della composizione. In ancora un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 10% in peso a circa 0.1% in peso (ad esempio, da circa 5% in peso a circa 0.2% in peso oppure da circa 2% in peso a circa 0.3% in peso) di sodio lauril solfato, rispetto al peso della composizione.

Leganti adatti per l'invenzione accrescono la resistenza della compressa della composizione farmaceutica e sono compatibili con gli ingredienti della composizione farmaceutica, cioè, essi non riducono sostanzialmente la stabilità chimica, la stabilità fisica, oppure l'attività biologica della composizione farmaceutica. Leganti esemplari includono polivinilpirrolidone, calcio fosfato dibasico, saccarosio, amido di mais (granoturco), cellulosa modificata (ad esempio, idrossimetilcellulosa), oppure qualunque combinazione degli stessi.

Pertanto, in una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende un legante in una quantità di almeno circa 0.1% in peso (ad esempio, almeno circa 1% in peso, almeno circa 3% in peso, almeno circa 4% in peso, oppure almeno circa 5% in peso) rispetto al peso

della composizione. Per esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 0.1% in peso a circa 10% in peso (ad esempio, da circa 1% in peso a circa 10% in peso oppure da circa 2% in peso a circa 7% in peso) di legante, rispetto al peso della composizione. In un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende almeno circa 0.1% in peso (ad esempio, almeno circa 1% in peso, almeno circa 2% in peso, almeno circa 3% in peso, oppure almeno circa 4% in peso) di polivinilpirrolidone, rispetto al peso della composizione. In ancora un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende un glidante in una quantità che va da circa 0.1% in peso a circa 10% in peso (ad esempio, da circa 1% in peso a circa 8% in peso oppure da circa 2% in peso a circa 5% in peso) di polivinilpirrolidone, rispetto al peso della composizione.

Diluenti adatti per l'invenzione possono aggiungere volume necessario a una formulazione per preparare compresse della desiderata dimensione e sono generalmente compatibili con gli ingredienti della composizione farmaceutica, cioè, essi non riducono sostanzialmente la solubilità, la durezza, la stabilità chimica, la stabilità fisica, oppure l'attività biologica della composizione farmaceutica. Diluenti esemplari includono: zuccheri, per esempio, zucchero a velo, zucchero comprimibile, destrati, destrina, destrosio, lattosio, mannitolo, sorbitolo, cellulosa, e cellulose modificate, per esempio, cellulosa polverizzata, talco, calcio fosfato, amido, oppure qualunque combinazione degli stessi.

Pertanto, in una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende un diluente in una quantità di 40% in peso o minore (ad esempio, 35% in peso o minore, 30% in peso o minore, oppure 25% in peso o minore, oppure 20% in peso o minore, oppure 15% in peso o minore, oppure 10% in peso o minore) rispetto al peso della composizione. Per esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 40% in peso a circa 1% in peso (ad esempio, da circa 35% in peso a circa 5% in peso oppure da circa 30% in peso a circa 7% in peso, da circa 25% in peso a circa 10% in peso, da circa 20% in peso a circa 15% in peso) di diluente,

rispetto al peso della composizione. In un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende 40% in peso o minore (ad esempio, 35% in peso o minore, 25% in peso o minore, oppure 15% in peso o minore) di mannitolo, rispetto al peso della composizione. In ancora un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 35% in peso a circa 1% in peso (ad esempio, da circa 30% in peso a circa 5% in peso oppure da circa 25% in peso a circa 10% in peso) di mannitolo, rispetto al peso della composizione.

Glidanti adatti per l'invenzione migliorano le proprietà di flusso della composizione farmaceutica e sono compatibili con gli ingredienti della composizione farmaceutica, cioè, essi non riducono sostanzialmente la solubilità, la durezza, la stabilità chimica, la stabilità fisica, oppure l'attività biologica della composizione farmaceutica. Glidanti esemplari includono biossido di silicio colloidale, talco, oppure una combinazione degli stessi.

Pertanto, in una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende un glidante in una quantità di 2% in peso o minore (ad esempio, 1.75% in peso, 1.25% in peso o minore, oppure 1.00% in peso o minore) rispetto al peso della composizione. Per esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 2% in peso a circa 0.05% in peso (ad esempio, da circa 1.5% in peso a circa 0.07% in peso oppure da circa 1.0% in peso a circa 0.09% in peso) di glidante, rispetto al peso della composizione. In un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende 2% in peso o minore (ad esempio, 1.75% in peso, 1.25% in peso o minore, oppure 1.00% in peso o minore) di biossido di silicio colloidale, rispetto al peso della composizione. In ancora un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 2% in peso a circa 0.05% in peso (ad esempio, da circa 1.5% in peso a circa 0.07% in peso oppure da circa 1.0% in peso a circa 0.09% in peso) di biossido di silicio colloidale, rispetto al peso della composizione.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica può includere una forma di dosaggio farmaceutica solida orale che può comprendere un lubrificante che può prevenire

adesione di una miscela di microsferi di granulato a una superficie (ad esempio, una superficie di un recipiente di mescolamento, una matrice e/o un punzone di compressione). Un lubrificante può anche ridurre l'attrito interparticelle all'interno del granulato e migliorare la compressione e l'espulsione di composizioni farmaceutiche compresse da una pressa a matrice. Il lubrificante è compatibile anche con gli ingredienti della composizione farmaceutica, cioè, esso non riduce sostanzialmente la solubilità, la durezza, oppure l'attività biologica della composizione farmaceutica. Lubrificanti esemplari includono magnesio stearato, calcio stearato, zinco stearato, sodio stearato, acido stearico, alluminio stearato, leucina, glicerile beenato, olio vegetale idrogenato oppure qualunque combinazione degli stessi. In una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende un lubrificante in una quantità di 5% in peso o minore (ad esempio, 4.75% in peso, 4.0% in peso o minore, oppure 3.00% in peso o minore, oppure 2.0% in peso o minore) rispetto al peso della composizione. Per esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 5% in peso a circa 0.10% in peso (ad esempio, da circa 4.5% in peso a circa 0.5% in peso oppure da circa 3% in peso a circa 1% in peso) di lubrificante, rispetto al peso della composizione. In un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende 5% in peso o minore (ad esempio, 4.0% in peso o minore, 3.0% in peso o minore, oppure 2.0% in peso o minore, oppure 1.0% in peso o minore) di magnesio stearato, rispetto al peso della composizione. In ancora un altro esempio, la composizione farmaceutica comprende da circa 5% in peso a circa 0.10% in peso (ad esempio, da circa 4.5% in peso a circa 0.15% in peso oppure da circa 3.0% in peso a circa 0.50% in peso) di magnesio stearato, rispetto al peso della composizione. Composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono facoltativamente comprendere uno o più coloranti, aromi, e/o fragranze per migliorare l'impatto visivo, il sapore, e/o il profumo della composizione. Coloranti, aromi, oppure fragranze adatti sono compatibili con gli ingredienti della composizione farmaceutica, cioè, essi non riducono sostanzialmente la

solubilità, la stabilità chimica, la stabilità fisica, la durezza, oppure l'attività biologica della composizione farmaceutica. In una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica comprende un colorante, un aroma, e/o una fragranza. In una forma di realizzazione, le composizioni farmaceutiche fornite dall'invenzione sono viola.

In alcune forme di realizzazione, la composizione farmaceutica include o può essere fatta in compresse e le compresse possono essere rivestite con un colorante e facoltativamente contrassegnate con un logo, un'altra immagine e/o un testo usando un inchiostro adatto. In ancora altre forme di realizzazione, la composizione farmaceutica include o può essere fatta in compresse e le compresse possono essere rivestite con un colorante, trattate con cera, e facoltativamente contrassegnate con un logo, un'altra immagine e/o un testo usando un inchiostro adatto. I coloranti e gli inchiostri adatti sono compatibili con gli ingredienti della composizione farmaceutica, cioè, essi non riducono sostanzialmente la solubilità, la stabilità chimica, la stabilità fisica, la durezza, oppure l'attività biologica della composizione farmaceutica. I coloranti e gli inchiostri adatti possono essere di qualunque colore e sono a base acquosa oppure a base di solventi. In una forma di realizzazione, compresse prodotte dalla composizione farmaceutica sono rivestite con un colorante e poi contrassegnate con un logo, un'altra immagine, e/o un testo usando un inchiostro adatto. Per esempio, compresse comprendenti composizione farmaceutica come descritta nella presente possono essere rivestite con circa 3% in peso (ad esempio, meno di circa 6% in peso o meno di circa 4% in peso) di un rivestimento a film comprendente un colorante. Le compresse colorate possono essere contrassegnate con un logo e un testo che indica la concentrazione dell'ingrediente attivo nella compressa usando un inchiostro adatto. In un altro esempio, compresse comprendenti composizione farmaceutica come descritta nella presente possono essere rivestite con circa 3% in peso (ad esempio, meno di circa 6% in peso o meno di circa 4% in peso) di un rivestimento a film comprendente un colorante.

In un'altra forma di realizzazione, compresse prodotte dalla composizione farmaceutica sono rivestite con un colorante, trattate con cera, e poi contrassegnate con un logo, un'altra immagine, e/o un testo usando un inchiostro adatto. Per esempio, compresse comprendenti composizione farmaceutica come descritta nella presente possono essere rivestite con circa 3% in peso (ad esempio, meno di circa 6% in peso o meno di circa 4% in peso) di rivestimento a film comprendente un colorante. Le compresse colorate possono essere trattate con cera con polvere di cera Carnauba pesata nella quantità di circa 0.01% p/p rispetto al peso del nucleo della compressa di partenza. Le compresse trattate con cera possono essere contrassegnate con un logo e un testo indicante la concentrazione dell'ingrediente attivo nella compressa usando un inchiostro adatto. In un altro esempio, compresse comprendenti composizione farmaceutica come descritta nella presente possono essere rivestite con circa 3% in peso (ad esempio, meno di circa 6% in peso o meno di circa 4% in peso) di un rivestimento a film comprendente un colorante. Le compresse colorate possono essere trattate con cera con polvere di cera Carnauba pesata nella quantità di circa 0.01% p/p rispetto al peso del nucleo della compressa di partenza. Le compresse trattate con cera possono essere contrassegnate con un logo e un testo indicante la concentrazione dell'ingrediente attivo nella compressa usando un inchiostro di grado farmaceutico quale un inchiostro nero (ad esempio, Opacode® S-1-17823, un inchiostro a base di solventi, disponibile in commercio da Colorcon, Inc. di West Point, PA.).

Una composizione farmaceutica esemplare comprende da circa 15% in peso a circa 70% in peso (ad esempio, da circa 15% in peso a circa 60% in peso, da circa 15% in peso a circa 50% in peso, oppure da circa 15% in peso a circa 40% in peso, oppure da circa 20% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 30% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 40% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 50% in peso a circa 70% in peso) di Composto 1, rispetto al peso della composizione. Le suddette composizioni possono includere anche

uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili, per esempio, da circa 20% in peso a circa 50% in peso di un riempitivo; da circa 1% in peso a circa 5% in peso di un disgregante; da circa 2% in peso a circa 0.3% in peso di un tensioattivo; da circa 0.1% in peso a circa 5% in peso di un legante; da circa 1% in peso a circa 30% in peso di un diluente; da circa 2% in peso a circa 0.05% in peso di un glidante; e da circa 5% in peso a circa 0.1% in peso di un lubrificante. Oppure, la composizione farmaceutica comprende una composizione contenente da circa 15% in peso a circa 70% in peso (ad esempio, da circa 20% in peso a circa 40% in peso, da circa 25% in peso a circa 60% in peso, oppure da circa 30% in peso a circa 55% in peso) di Composto 1, rispetto al peso della composizione; e uno o più eccipienti, per esempio, da circa 20% in peso a circa 50% in peso di un riempitivo; da circa 1% in peso a circa 5% in peso di un disgregante; da circa 2% in peso a circa 0.3% in peso di un tensioattivo; da circa 0.1% in peso a circa 5% in peso di un legante; da circa 1% in peso a circa 30% in peso di un diluente; da circa 2% in peso a circa 0.05% in peso di un glidante; e da circa 5% in peso a circa 0.1% in peso di un lubrificante.

Un'altra composizione farmaceutica esemplare comprende da circa 15% in peso a circa 70% in peso (ad esempio, da circa 15% in peso a circa 60% in peso, da circa 15% in peso a circa 50% in peso, oppure da circa 15% in peso a circa 40% in peso oppure da circa 20% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 30% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 40% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 50% in peso a circa 70% in peso) di Composto 1 rispetto al peso della composizione, e uno o più eccipienti, per esempio, da circa 20% in peso a circa 50% in peso di un riempitivo; da circa 1% in peso a circa 5% in peso di un disgregante; da circa 2% in peso a circa 0.3% in peso di un tensioattivo; da circa 0.1% in peso a circa 5% in peso di un legante; da circa 1% in peso a circa 30% in peso di un diluente; da circa 2% in peso a circa 0.05% in peso di un glidante; e da circa 2% in peso a circa 0.1% in peso di un lubrificante.

Un'altra composizione farmaceutica esemplare comprende da circa 15% in peso a circa 70% in peso (ad esempio, da circa 15% in peso a circa 60% in peso, da circa 15% in peso a circa 50% in peso, oppure da circa 15% in peso a circa 40% in peso oppure da circa 20% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 30% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 40% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 50% in peso a circa 70% in peso) di Composto 1 rispetto al peso della composizione, e uno o più eccipienti, per esempio, da circa 20% in peso a circa 50% in peso di un riempitivo; da circa 1% in peso a circa 5% in peso di un disgregante; da circa 2% in peso a circa 0.3% in peso di un tensioattivo; da circa 0.1% in peso a circa 5% in peso di un legante; da circa 1% in peso a circa 30% in peso di un diluente; da circa 2% in peso a circa 0.05% in peso di un glidante; e da circa 2% in peso a circa 0.1% in peso di un lubrificante.

Un'altra composizione farmaceutica esemplare comprende da circa 15% in peso a circa 70% in peso (ad esempio, da circa 15% in peso a circa 60% in peso, da circa 15% in peso a circa 50% in peso, oppure da circa 15% in peso a circa 40% in peso oppure da circa 20% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 30% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 40% in peso a circa 70% in peso, oppure da circa 50% in peso a circa 70% in peso) di Composto 1 e uno o più eccipienti, per esempio, da circa 20% in peso a circa 50% in peso di un riempitivo; da circa 1% in peso a circa 5% in peso di un disgregante; da circa 2% in peso a circa 0.3% in peso di un tensioattivo; da circa 0.1% in peso a circa 5% in peso di un legante; da circa 1% in peso a circa 30% in peso di un diluente; da circa 2% in peso a circa 0.05% in peso di un glidante; e da circa 2% in peso a circa 0.1% in peso di un lubrificante.

In una forma di realizzazione, l'invenzione è una composizione farmaceutica granulare comprendente:

- a. circa 30% in peso di Composto 1 rispetto al peso della composizione;
- b. circa 42% in peso di cellulosa microcristallina rispetto al peso della composizione;

- c. circa 21% in peso di mannitolo rispetto al peso della composizione;
- d. circa 3% in peso di sodio croscarmellosa sodica rispetto al peso della composizione;
- e. circa 1% in peso di sodio lauril solfato rispetto al peso della composizione;
- f. circa 2% in peso di magnesio stearato rispetto al peso della composizione; e
- g. circa 0.5% in peso di silice colloidale rispetto al peso della composizione.

Un'altra composizione granulare formulata in una formulazione orale dell'invenzione comprende:

- a. circa 50% in peso di Composto 1;
- b. circa 30% in peso di cellulosa microcristallina rispetto al peso della composizione;
- c. circa 13% in peso di mannitolo rispetto al peso della composizione;
- d. circa 2% in peso di sodio croscarmellosa sodica rispetto al peso della composizione;
- e. circa 4% in peso di polivinilpirrolidone rispetto al peso della composizione; e
- f. circa 1% in peso di sodio lauril solfato rispetto al peso della composizione.

In una forma di realizzazione, una formulazione orale farmaceutica dell'invenzione comprende:

- a. circa 30% in peso di un composto 1 rispetto al peso della composizione;
- b. circa 42% in peso di cellulosa microcristallina rispetto al peso della composizione;
- c. circa 21% in peso di mannitolo rispetto al peso della composizione;
- d. circa 3% in peso di sodio croscarmellosa sodica rispetto al peso della composizione;
- e. circa 1% in peso di sodio lauril solfato rispetto al peso della composizione;
- f. circa 2.5% in peso di magnesio stearato rispetto al peso della composizione; e
- g. circa 0.5% in peso di silice colloidale rispetto al peso della composizione.

Un'altra formulazione orale farmaceutica dell'invenzione comprende:

- a. circa 50% in peso di un composto 1 rispetto al peso della composizione;
- b. circa 30% in peso di cellulosa microcristallina rispetto al peso della composizione;

- c. circa 13% in peso di mannitolo rispetto al peso della composizione;
- d. circa 4% in peso di sodio croscarmellosa sodica rispetto al peso della composizione;
- e. circa 4% in peso di polivinilpirrolidone rispetto al peso della composizione
- f. circa 1% in peso di sodio lauril solfato rispetto al peso della composizione; e
- g. circa 0.5% in peso di magnesio stearato rispetto al peso della composizione.

Un'altra formulazione orale farmaceutica dell'invenzione comprende:

- a. circa 60% in peso di un composto 1 rispetto al peso della composizione;
- b. circa 20% in peso di cellulosa microcristallina rispetto al peso della composizione;
- c. circa 13% in peso di mannitolo rispetto al peso della composizione;
- d. circa 4% in peso di sodio croscarmellosa sodica rispetto al peso della composizione;
- e. circa 4% in peso di polivinilpirrolidone rispetto al peso della composizione
- f. circa 1% in peso di sodio lauril solfato rispetto al peso della composizione; e
- g. circa 0.5% in peso di magnesio stearato rispetto al peso della composizione.

Un'altra formulazione orale farmaceutica dell'invenzione comprende:

- a. da circa 150 a 250 mg di Composto 1;
- b. da circa 40 a 50 mg di mannitolo;
- c. da circa 120 a 130 mg di cellulosa microcristallina;
- d. da circa 10 a 20 mg di croscarmellosa sodica;
- e. da circa 10 a 20 mg di polivinilpirrolidone;
- f. da circa 1 a 5 mg di sodio lauril solfato; e
- g. da circa 1 a 5 mg di magnesio stearato.

Un'altra formulazione orale farmaceutica dell'invenzione comprende:

- a. circa 200 mg di Composto 1;
- b. circa 43 mg di mannitolo;
- c. circa 123 mg di cellulosa microcristallina;

- d. circa 15 mg di croscarmellosa sodica;
- e. circa 13 mg di polivinilpirrolidone;
- f. circa 3 mg di sodio lauril solfato; e
- g. circa 4 mg di magnesio stearato.

Un'altra formulazione orale farmaceutica dell'invenzione comprende:

- a. circa 200 mg di Composto 1;
- b. circa 45 mg di mannitolo;
- c. circa 123 mg di cellulosa microcristallina;
- d. circa 15 mg di croscarmellosa sodica;
- e. circa 10.4 mg di polivinilpirrolidone;
- f. circa 2.6 mg di sodio lauril solfato; e
- g. circa 4 mg di magnesio stearato.

Un'altra formulazione orale farmaceutica dell'invenzione comprende:

- a. circa 70% in peso di un composto 1 rispetto al peso della composizione;
- b. circa 12% in peso di cellulosa microcristallina rispetto al peso della composizione;
- c. circa 11% in peso di mannitolo rispetto al peso della composizione;
- d. circa 4% in peso di sodio croscarmellosa sodica rispetto al peso della composizione;
- e. circa 4% in peso di polivinilpirrolidone rispetto al peso della composizione
- f. circa 1% in peso di sodio lauril solfato rispetto al peso della composizione; e
- g. circa 0.5% in peso di magnesio stearato rispetto al peso della composizione.

Le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono essere processate in una forma di compressa, una forma di capsula, una forma di bustina, una forma di losanga, oppure in un'altra forma solida che è adatta per somministrazione orale. Pertanto in alcune forme di realizzazione, le composizioni farmaceutiche sono in forma di compressa.

In ancora un'altra formulazione orale farmaceutica dell'invenzione, una composizione di compressa farmaceutica formata avente una durezza iniziale di 5-21 kP  $\pm$  20 percento comprende: circa 30% in peso di Composto 1; circa 42% in peso di cellulosa microcristallina rispetto al peso della composizione; circa 21% in peso di mannitolo rispetto al peso della composizione; circa 3% in peso di sodio croscarmellosa sodica rispetto al peso della composizione; circa 1% in peso di sodio lauril solfato rispetto al peso della composizione; circa 2.5% in peso di magnesio stearato rispetto al peso della composizione; e circa 0.5% in peso di silice colloidale in peso della composizione. In cui la quantità di Composto 1 nella compressa farmaceutica formata varia da circa 25 mg a circa 250 mg, per esempio, 50 mg, oppure 75 mg, oppure 100 mg, oppure 150 mg, 200 mg, oppure 250 mg di Composto 1 per compressa.

In ancora un'altra formulazione orale farmaceutica dell'invenzione, una composizione di compressa farmaceutica formata avente una durezza iniziale di 5-21 kP  $\pm$  20 percento comprende: circa 49% in peso di un Composto 1; circa 29% in peso di cellulosa microcristallina rispetto al peso della composizione; circa 12.6% in peso di mannitolo rispetto al peso della composizione; circa 4% in peso di sodio croscarmellosa sodica rispetto al peso della composizione; circa 4% in peso di polivinilpirrolidone rispetto al peso della composizione; circa 1% in peso di sodio lauril solfato rispetto al peso della composizione; e circa 0.5% in peso di magnesio stearato rispetto al peso della composizione. La quantità di Composto 1 nella compressa farmaceutica formata varia da circa 25 mg a circa 250 mg, per esempio, 50 mg, oppure 75 mg, oppure 100 mg, oppure 150 mg, 200 mg, oppure 250 mg Composto 1 per compressa.

In certe forme di realizzazione, la compressa farmaceutica formata contiene circa 100 mg di Composto 1. In certe forme di realizzazione, the compressa farmaceutica formata contiene circa 200 mg di Composto 1.

Un altro aspetto dell'invenzione fornisce una formulazione farmaceutica costituita da una compressa oppure una capsula che include un Composto 1 e altri eccipienti (ad esempio, un riempitivo, un disgregante, un tensioattivo, un legante, un glidante, un colorante, un lubrificante, oppure qualunque combinazione degli stessi), ognuno dei quali è descritto sopra e negli esempi sotto, in cui la compressa ha una dissoluzione di almeno circa 50% (ad esempio, almeno circa 60%, almeno circa 70%, almeno circa 80%, almeno circa 90%, oppure almeno circa 99%) in circa 30 minuti. In un esempio, la composizione farmaceutica è costituita da una compressa che include Composto 1 in una quantità che va da 25 mg a 250 mg, per esempio, 25 mg, oppure 50 mg, oppure 75 mg, oppure 100 mg, oppure 150 mg, 200 mg, oppure 250 mg e uno o più eccipienti (ad esempio, un riempitivo, un disgregante, un tensioattivo, un legante, un glidante, un colorante, un lubrificante, oppure qualunque combinazione degli stessi), ognuno dei quali è descritto sopra e negli esempi sotto, in cui la compressa ha una dissoluzione di da circa 50% a circa 100% (ad esempio, da circa 55% a circa 95% oppure da circa 60% a circa 90%) in circa 30 minuti. In un altro esempio, la composizione farmaceutica è costituita da una compressa che comprende una composizione comprendente Composto 1; e uno o più eccipienti tra: un riempitivo, un diluente, un disgregante, un tensioattivo, un legante, un glidante, e un lubrificante, in cui la compressa ha una dissoluzione di almeno circa 50% (ad esempio, almeno circa 60%, almeno circa 70%, almeno circa 80%, almeno circa 90%, oppure almeno circa 99%) in circa 30 minuti.

In una forma di realizzazione, la compressa comprende una composizione comprendente almeno circa 25 mg (ad esempio, almeno circa 30 mg, almeno circa 40 mg, oppure almeno circa 50 mg) di Composto 1; e uno o più eccipienti tra: un riempitivo, un diluente, un disgregante, un tensioattivo, un legante, un glidante, e un lubrificante. In un'altra forma di realizzazione, la compressa comprende una composizione comprendente almeno circa 25 mg (ad esempio, almeno circa 30 mg, almeno circa 40 mg, almeno circa 50 mg, almeno circa

100 mg, oppure almeno 150 mg) di Composto 1 e uno o più eccipienti tra: un riempitivo, un diluente, un disgregante, un tensioattivo, un legante, un glidante, e un lubrificante.

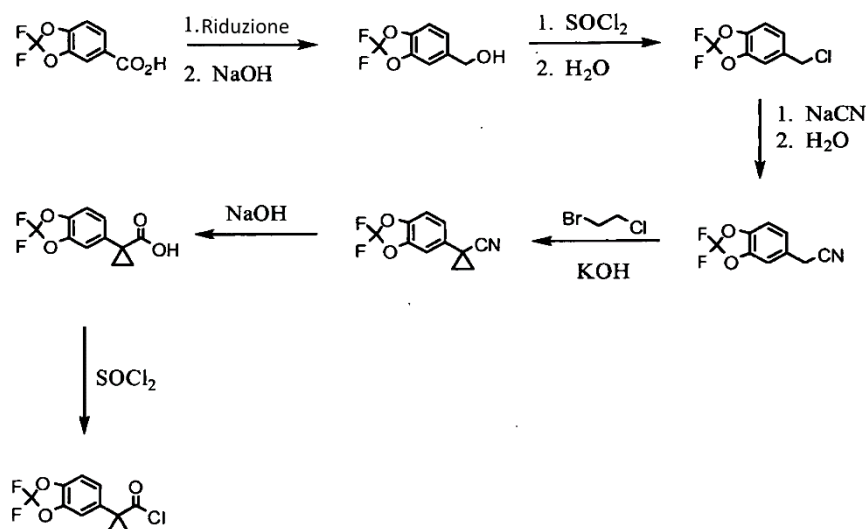
La dissoluzione può essere misurata con un apparato Tipo II USP standard che impiega un mezzo di dissoluzione di CTAB 0.1% disciolto in 900 mL di acqua DI, tamponato a pH 6.8 con fosfato di potassio monobasico 50 mM, agitando a circa 50-75 rpm ad una temperatura di circa 37°C. Una singola compressa sperimentale è testata in ciascun recipiente di prova dell'apparato. La dissoluzione può essere misurata anche con un apparato Tipo II USP standard che impiega un mezzo di dissoluzione di sodio lauril solfato 0.7% disciolto in 900 mL di tampone fosfato di sodio 50 mM (pH 6.8), agitando a circa 65 rpm ad una temperatura di circa 37°C. Una singola compressa sperimentale è testata in ciascun recipiente di prova dell'apparato. La dissoluzione può anche essere misurata con un apparato Tipo II USP standard che impiega un mezzo di dissoluzione di sodio lauril solfato 0.5% disciolto in 900 mL di tampone fosfato di sodio 50 mM (pH 6.8), agitando a circa 65 rpm ad una temperatura di circa 37°C. Una singola compressa sperimentale è testata in ogni recipiente di prova dell'apparato.

#### **METODI PER LA PRODUZIONE DI COMPOSTO 1, COMPOSTO 1 FORMA I, COMPOSTO 1 FORMA II, COMPOSTO 1 SALE DI HCl FORMA A**

##### Composto 1

Il Composto 1 è usato come il punto di partenza per le altre forme allo stato solido e può essere preparato mediante accoppiamento di una porzione cloruro acido con una porzione ammina secondo gli Schemi 1-4.

##### **Schema 1. Sintesi della porzione cloruro acido.**

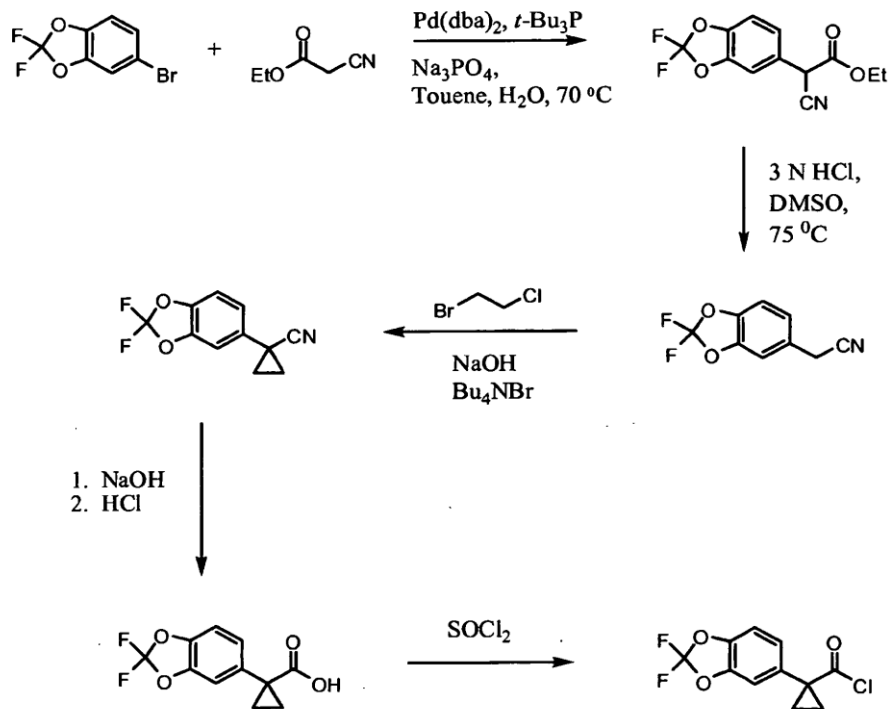


Lo Schema 1 rappresenta la preparazione di 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbonilcloruro, che si usa nello Schema 3 per creare il legame ammidico di Composto 1.

Il materiale di partenza, acido 2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossolo-5-carbossilico, è disponibile in commercio da Saltigo (un affiliato della Lanxess Corporation). La riduzione della porzione acido carbossilico in acido 2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossolo-5-carbossilico nell'alcol primario, seguita da conversione nel corrispondente cloruro usando cloruro di tionile ( $\text{SOCl}_2$ ), fornisce 5-(clorometil)-2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossolo, che è successivamente convertito in 2-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)acetonitrile usando cianuro di sodio. Il trattamento di 2-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)acetonitrile con base e 1-bromo-2-cloroetano fornisce 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbonitrile. La porzione nitrile in 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbonitrile è convertita in un acido carbossilico usando una base per dare

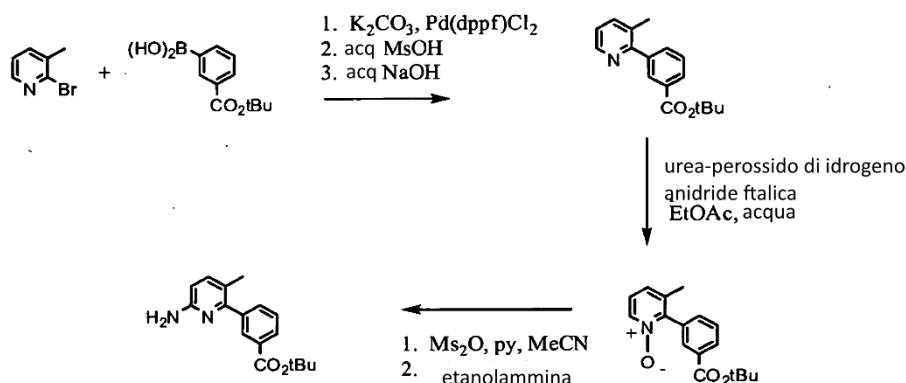
acido 1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossilico, che è convertito nel cloruro acido desiderato usando cloruro di tionile.

**Schema 2. Sintesi alternativa della porzione cloruro acido.**



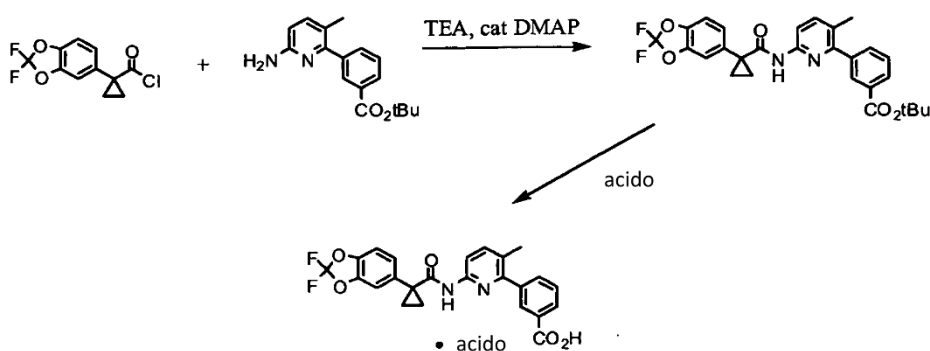
Lo Schema 2 rappresenta una sintesi alternativa del cloruro acido richiesto. 5-bromometil-2,2-difluoro-1,3-benzodiossolo è accoppiato con cianoacetato di etile in presenza di un catalizzatore di palladio per formare il corrispondente alfa ciano etil estere. La saponificazione della porzione estere nell'acido carbossilico dà il cianoetile composto. L'alchilazione del cianoetile composto con 1-bromo-2-cloro etano in presenza di base dà il cianociclopropile composto. Trattamento del cianociclopropile composto con base dà il sale carbossilato, che è convertito nell'acido carbossilico mediante trattamento con acido. La conversione dell'acido carbossilico nel cloruro acido è poi realizzata usando un agente di clorurazione quale cloruro di tionile o simili.

**Schema 3. Sintesi della porzione ammina.**



Lo Schema 3 rappresenta la preparazione del 3-(6-ammino-3-metilpiridin-2-il)benzoato di tert-butile richiesto, che è accoppiato con 1-(2,2-difluorobenzod[1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbonilcloruro nello Schema 3 per dare Composto 1. Accoppiamento catalizzato da palladio di 2-bromo-3-metilpiridina con acido 3-(tert-butossicarbonil)fenilboronico dà 3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato di tert-butile, che è successivamente convertito nel composto desiderato.

**Schema 4. Formazione di un sale acido di acido 3-(6-(1-difluorobenzod[1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico.**



Lo Schema 4 rappresenta l'accoppiamento di 1-(2,2-difluorobenzod[[1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbonilcloruro con 3-(6-ammino-3-metilpiridin-2-il)benzoato di tert-butile usando trietilammina e 4-dimetilamminopiridina per fornire inizialmente il tert-butil estere di Composto 1.

#### Composto 1 Forma I

Composto 1 Forma I è preparata disperdendo oppure dissolvendo una forma di sale, quale il sale di HCl, di Composto 1 in un appropriato solvente per una quantità efficace di tempo. Trattamento del tert-butil estere con un acido quale HCl, dà il sale di HCL di Composto 1, che è tipicamente un solido cristallino. Composto 1 Forma I può anche essere preparata direttamente dal precursore t-butil estere mediante trattamento con un acido appropriato, quale acido formico.

Il sale di HCl di acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzod[[1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il) benzoico può essere usato per produrre la Forma I disperdendo oppure dissolvendo il sale di HCl di acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzod[[1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico in un appropriato solvente per una quantità efficace di tempo. Si possono usare altri sali di acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzod[[1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico, quali, per esempio, sali derivati da altri acidi minerali oppure organici. Gli altri sali derivano da idrolisi mediata da acido della porzione t-butil estere. Sali derivati da altri acidi possono includere, per esempio, nitrico, solforico, fosforico, borico, acetico, benzoico e malonico. Queste forme di sale di acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzod[[1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico possono essere solubili oppure possono non essere solubili, a seconda del solvente usato, ma la mancanza di solubilità non impedisce la formazione di Forma I. Per esempio, in una forma di realizzazione, il solvente appropriato può essere acqua

oppure una miscela alcol/acqua quale miscela metanolo 50%/acqua, malgrado la forma di sale di HCl di acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il) benzoico sia soltanto scarsamente solubile in acqua. In una forma di realizzazione, il solvente appropriato è acqua.

La quantità efficace di tempo per la formazione di Forma I dal sale di acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico può essere in qualunque tempo tra 2 e 24 ore o maggiore. E' riconosciuto che la quantità di tempo necessaria è inversamente proporzionale alla temperatura. Cioè, più è alta la temperatura meno tempo è necessario per realizzare la dissociazione di acido per formare Forma I. Quando il solvente è acqua, l'agitazione della dispersione per approssimativamente 24 ore a temperatura ambiente fornisce Forma I in una resa di approssimativamente 98%. Se si desidera una soluzione del sale di acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico ai fini del processo, si può usare una elevata temperatura. Dopo agitazione della soluzione per una quantità efficace di tempo alla temperatura elevata, la ricristallizzazione su raffreddamento fornisce Forma I sostanzialmente pura. In una forma di realizzazione, sostanzialmente puro si riferisce a più di circa 90% di purezza. In un'altra forma di realizzazione, sostanzialmente puro si riferisce a più di circa 95% di purezza. In un'altra forma di realizzazione, sostanzialmente puro si riferisce a più di circa 98% di purezza. In un'altra forma di realizzazione, sostanzialmente puro si riferisce a più di circa 99% di purezza. La temperatura selezionata dipende in parte dal solvente usato ed è ben all'interno delle capacità di determinazione di uno di ordinaria esperienza nella tecnica. In una forma di realizzazione, la temperatura è tra temperatura ambiente e circa 80°C. In un'altra forma di realizzazione, la temperatura è tra temperatura ambiente e circa 40°C. In un'altra forma di realizzazione, la temperatura è tra circa 40°C e circa 60°C. In un'altra forma di realizzazione, la temperatura è tra circa 60°C e circa 80°C.

Composto 1 Forma I può anche essere formata direttamente da 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzod[[1,3]diossal-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)-*t*-butilbenzoato (cf. Schema 3), che è un precursore al sale di Composto 1. Pertanto, 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzod[[1,3]diossal-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)-*t*-butilbenzoato è lasciato andare incontro a reazione con un acido appropriato, quale, per esempio, acido formico sotto condizioni di reazione appropriate per dare Composto 1 Forma I.

Composto 1 Forma I può essere ulteriormente purificata mediante ricristallizzazione da un solvente organico. Esempi di solventi organici includono, ma non vi si limitano, toluene, cumene, anisolo, 1-butanolo, acetato di isopropile, acetato di butile, acetato di isobutile, metil *t*-butil etere, metil isobutil chetone e miscele 1-propanolo-acqua. La temperatura può essere come descritto sopra. Per esempio, la Forma I è disciolta in 1-butanolo a 75°C finché è completamente disciolta. Il raffreddamento della soluzione a 10°C ad un tasso di 0.2°C/min dà cristalli di Forma I che possono essere isolati mediante filtrazione.

In una forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è caratterizzata da uno o più picchi a da 15.2 a 15.6 gradi, da 16.1 a 16.5 gradi, e da 14.3 a 14.7 gradi in una diffrazione di raggi X da polveri ottenuta usando Cu K alfa radiazione. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è caratterizzata da uno o più picchi a 15.4, 16.3, e 14.5 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a da 14.6 a 15.0 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a 14.8 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a da 17.6 a 18.0 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a 17.8 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a da 16.4 a 16.8 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a da 16.4 a 16.8 gradi.

In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a 16.6 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a da 7.6 a 8.0 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a 7.8 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a da 25.8 a 26.2 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a 26.0 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a da 21.4 a 21.8 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a 21.6 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a da 23.1 a 23.5 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma I è inoltre caratterizzata da un picco a 23.3 gradi. In alcune forme di realizzazione, Composto 1 Forma I è caratterizzata da un pattern di diffrazione sostanzialmente simile a quello di Figura 1. In alcune forme di realizzazione, Composto 1 Forma I è caratterizzata da un pattern di diffrazione sostanzialmente simile a quello di Figura 2.

In alcune forme di realizzazione, la distribuzione della dimensione delle particelle di D90 è circa 82  $\mu\text{m}$  o minore per Composto 1 Forma I. In alcune forme di realizzazione, la distribuzione della dimensione delle particelle di D50 è circa 30  $\mu\text{m}$  o minore per Composto 1 Forma I.

#### Composto 1 Forma II

Composto 1 Forma II è preparata risospendendo Composto 1 Forma I in un solvente appropriato ad una concentrazione sufficiente per un tempo sufficiente. La sospensione è poi filtrata mediante centrifugazione oppure sotto vuoto ed essiccata in condizioni ambientali per sufficiente tempo per dare Composto 1 Forma II.

In alcune forme di realizzazione, da circa 20 a 40 mg di Composto 1 Forma I sono risospesi in circa da 400 a 600  $\mu\text{L}$  di un solvente appropriato. In un'altra forma di realizzazione, da

circa 25 a 35 mg di Composto 1 Forma I è risospeso in circa da 450 a 550  $\mu\text{L}$  di un solvente appropriato. In un'altra forma di realizzazione, circa 30 mg di Composto 1 Forma I è risospeso in circa 500  $\mu\text{L}$  di un solvente appropriato.

In alcune forme di realizzazione, il tempo che Composto 1 Forma I è lasciata risospendere con il solvente è da 1 ora a quattro giorni. Più in particolare, il tempo che Composto 1 Forma I è lasciata risospendere con il solvente è da 1 a 3 giorni. Più in particolare, il tempo è 2 giorni.

In alcune forme di realizzazione, il solvente appropriato è selezionato tra un solvente organico di sufficiente dimensione per inserirsi nei vuoti nel reticolo cristallino di Composto 1 Forma II. In altre forme di realizzazione, il solvato è di sufficiente dimensione per inserirsi nei vuoti che misurano circa  $100 \text{ \AA}^3$ .

In altre forme di realizzazione, il solvente è selezionato dal gruppo composto da metanolo, etanolo, acetone, 2-propanolo, acetonitrile, tetraidrofurano, acetato di metile, 2-butanone, formiato di etile, e 2-metiltetraidrofurano.

In altre forme di realizzazione, una miscela di due o più di questi solventi può essere usata per ottenere Composto 1 Forma II. In alternativa, Composto 1 Forma II può essere ottenuta da una miscela comprendente uno o più di questi solventi e acqua.

In alcune forme di realizzazione, la quantità di tempo efficace per essiccare Composto 1 Forma II è da 1 a 24 ore. Più in particolare, il tempo è da 6 a 18 ore. Più in particolare, il tempo è circa 12 ore.

In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è preparata disperdendo oppure dissolvendo una forma di sale di Composto 1, quale un sale di HCl di Composto 1 in un solvente appropriato per una quantità di tempo efficace.

Composto 1 Forma II come descritta nella presente comprende un reticolo cristallino di Composto 1 in cui i vuoti nel reticolo cristallino sono liberi, oppure occupati, oppure

parzialmente occupati da una o più molecole di un solvente adatto. Solventi adatti includono, ma non vi si limitano, metanolo, etanolo, acetone, 2-propanolo, acetonitrile, tetraidrofurano, acetato di metile, 2-butanone, formiato di etile, e 2-metiltetraidrofurano. Certe caratteristiche fisiche di forme di solvato isostrutturali di Composto 1, quali diffrazione di raggi X da polveri, punto di fusione e DSC, non sono sostanzialmente influenzate dalla particolare molecola di solvente in questione.

In una forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è caratterizzata da uno o più picchi a da 21.50 a 21.90 gradi, da 8.80 a 9.20 gradi, e da 10.80 a 11.20 gradi in una diffrazione di raggi X da polveri ottenuta usando Cu K alfa radiazione. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è caratterizzata da uno o più picchi a da 21.50 a 21.90 gradi, da 8.80 a 9.20 gradi, da 10.80 a 11.20 gradi, da 18.00 a 18.40 gradi, e da 22.90 a 23.30 gradi in una diffrazione di raggi X da polveri ottenuta usando Cu K alfa radiazione. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è caratterizzata da uno o più picchi a 21.70, 8.98, e 11.04 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è caratterizzata da uno o più picchi a 21.70, 8.98, 11.04, 18.16, e 23.06 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è caratterizzata da un picco a da 21.50 a 21.90 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a 21.70 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a da 8.80 a 9.20 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a 8.98 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a da 10.80 a 11.20 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a 11.04. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a da 18.00 a 18.40 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a 18.16 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre

caratterizzata da un picco a da 22.90 a 23.30 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a 23.06 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a da 20.40 a 20.80 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a 20.63 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a da 22.00 a 22.40 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a 22.22 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a da 18.40 a 18.80 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a 18.57 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a da 16.50 a 16.90 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a 16.66 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a da 19.70 a 20.10 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II è inoltre caratterizzata da un picco a 19.86 gradi.

In alcune forme di realizzazione, Composto 1 Forma II è caratterizzata da un pattern di diffrazione sostanzialmente simile a quello della Figura 3. In alcune forme di realizzazione, Composto 1 Forma II è caratterizzata da pattern di diffrazione sostanzialmente simili a quelli forniti nella Figura 4.

In un'altra forma di realizzazione, il solvato che forma Composto 1 Forma II è selezionato dal gruppo composto da metanolo, etanolo, acetone, 2-propanolo, acetonitrile, tetraidrofurano, acetato di metile, 2-butanone, formiato di etile, e 2-metiltetraidrofurano. I patterns di diffrazione sono forniti per il seguente Composto 1 Forma II: metanolo (Figura 5), etanolo (Figura 6), acetone (Figura 7), 2-propanolo (Figura 8), acetonitrile (Figura 9),

tetraidrofurano (Figura 10), acetato di metile (Figura 11), 2-butanone (Figura 12), formiato di etile (Figura 13), e 2-metiltetraidrofurano (Figura 14).

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce Composto 1 Forma II che esibisce due o più transizioni di fase come determinato mediante DSC oppure un metodo analitico similare noto al tecnico esperto. In alcune forme di realizzazione, la DSC di Composto 1 Forma II è sostanzialmente similare al tracciato DSC rappresentato nella Figura 15. In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto, la DSC dà due transizioni di fase. In un'altra forma di realizzazione, la DSC dà tre transizioni di fase. In un'altra forma di realizzazione, una delle transizioni di fase avviene tra 200 e 207°C. In un'altra forma di realizzazione, una delle transizioni di fase avviene tra 204 e 206°C. In un'altra forma di realizzazione, una delle transizioni di fase avviene tra 183 e 190°C. In un'altra forma di realizzazione, una delle transizioni di fase avviene tra 185 e 187°C. In un'altra forma di realizzazione, il punto di fusione di Composto 1, Solvato Forma A è tra 183°C e 190 °C. In un'altra forma di realizzazione, il punto di fusione di Composto 1, Solvato Forma A è tra 185°C e 187°C.

In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II comprende da 1 a 10 per cento in peso (% in peso) di solvato come determinato mediante TGA. In alcune forme di realizzazione, il tracciato TGA di Composto 1 Forma II è sostanzialmente similare al tracciato TGA rappresentato nella Figura 16. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II comprende da 2 a 5% in peso di solvato come determinato mediante TGA oppure un similare metodo analitico noto al tecnico esperto.

In un'altra forma di realizzazione, la conformazione di Composto 1 Forma II solvato con acetone è sostanzialmente similare a quella rappresentata nella Figura 17, che si basa su analisi a raggi X singolo.

In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 Forma II solvato con acetone ha un gruppo spaziale  $P2_1/n$ , e le seguenti dimensioni di cella unitaria:

$$a = 16.5235 (10) \text{ \AA} \quad \alpha = 90^\circ$$

$$b = 12.7425 (8) \text{ \AA} \quad \beta = 103.736 (4)^\circ$$

$$c = 20.5512 (13) \text{ \AA} \quad \gamma = 90^\circ.$$

#### Composto 1 Sale di HCl Forma A

Composto 1 Sale di HCl Forma A può essere preparato dal sale di HCl di Composto 1, dissolvendo il sale di HCl di Composto 1 in un minimo di solvente e rimuovendo il solvente mediante lenta evaporazione. In un'altra forma di realizzazione, il solvente è un alcol. In un'altra forma di realizzazione, il solvente è etanolo. La lenta evaporazione è generalmente effettuata impedendo l'evaporazione del solvente. Per esempio, in una forma di realizzazione, la lenta evaporazione implica dissolvere il sale di HCl di Composto 1 in una fiala e coprire la fiala con parafilm che contiene un foro in esso.

In una forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è caratterizzata da uno o più picchi a da 8.80 a 9.20 gradi, da 17.30 a 17.70 gradi, e da 18.20 a 18.60 gradi in una diffrazione di raggi X da polveri ottenuta usando Cu K alfa radiazione. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è caratterizzata da uno o più picchi a da 8.80 a 9.20 gradi, da 17.30 a 17.70 gradi, da 18.20 a 18.60 gradi, da 10.10 a 10.50, e da 15.80 a 16.20 gradi in una diffrazione di raggi X da polveri ottenuta usando Cu K alfa radiazione. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è caratterizzata da uno o più picchi a 8.96, 17.51, e 18.45 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è caratterizzata da uno o più picchi a 8.96, 17.51, 18.45, 10.33, e 16.01 gradi. In un'altra forma di realizzazione Composto 1 sale di HCl Forma A è caratterizzata da un picco a da 8.80 a 9.20 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è caratterizzata da un picco a 8.96 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a da 17.30 a 17.70 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è caratterizzata da un

picco a 17.51 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a da 18.20 a 18.60 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a 18.45 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a da 10.10 a 10.50 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a 10.33 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a da 15.80 a 16.20 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a 16.01 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a da 11.70 a 12.10 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a 11.94 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a da 7.90 a 8.30 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a 8.14 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a da 9.90 a 10.30 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a 10.10 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a da 16.40 a 16.80 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a 16.55 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a da 9.30 a 9.70 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a 9.54 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre caratterizzata da un picco a da 16.40 a 16.80 gradi. In un'altra forma di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è inoltre

caratterizzata da un picco a 16.55 gradi. In alcune forme di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è caratterizzata come un dimero come rappresentato nella Figura 18.

In alcune forme di realizzazione, Composto 1 sale di HCl Forma A è caratterizzata da un pattern di diffrazione sostanzialmente simile a quello della Figura 19.

In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione presenta composto 1 Sale di HCl Forma A cristallina avente un gruppo spaziale P-1, e le seguenti dimensioni di cella unitaria:

$$a = 10.2702 (2) \text{ \AA} \quad \alpha = 67.0270 (10)^\circ$$

$$b = 10.8782 (2) \text{ \AA} \quad \beta = 66.1810 (10)^\circ$$

$$c = 12.4821 (3) \text{ \AA} \quad \gamma = 72.4760 (10)^\circ.$$

#### **METODI PER LA PRODUZIONE DELLE COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE**

Le forme unitarie di dosaggio dell'invenzione possono essere prodotte compattando oppure comprimendo una miscela oppure una composizione, per esempio, una polvere oppure granuli, sotto pressione per formare una forma tridimensionale stabile (ad esempio, una compressa). Come usato nella presente, "compressa" include forme unitarie di dosaggio farmaceutiche compresse di tutte le forme e dimensioni, rivestite oppure non rivestite.

L'espressione "forma unitaria di dosaggio" come usato nella presente si riferisce a una unità fisicamente discreta di agente appropriata per il paziente da trattare. In generale, una miscela compattata ha una densità maggiore di quella della miscela prima della compattazione. Una forma unitaria di dosaggio dell'invenzione può avere quasi qualunque forma includente facce concave e/o convesse, angoli arrotondati o angolati, e una forma da arrotondata a rettilinea. In alcune forme di realizzazione, le forme di dosaggio compresse dell'invenzione comprendono una compressa arrotondata avente facce piane. Le forme di dosaggio farmaceutiche solide dell'invenzione possono essere preparate mediante qualunque metodo di compattazione e compressione noto a persone di ordinaria esperienza nella tecnica di

formazione di forme di dosaggio farmaceutiche solide compresse. In particolari forme di realizzazione, le formulazioni fornite nella presente possono essere preparate usando metodi convenzionali noti a quelli esperti nel campo della formulazione farmaceutica, come descritti, ad esempio, in libri di testo pertinenti. Si veda, ad esempio, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21<sup>a</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (2003); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms And Drug Delivery Systems, 7<sup>a</sup> Edizione, Lippincott Williams & Wilkins, (1999); The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4<sup>a</sup> edizione, Rowe et al., Eds., American Pharmaceuticals Association (2003); Gibson, Pharmaceutical Preformulation And Formulation, CRC Press (2001).

#### Granulazione e Compressione

In alcune forme di realizzazione, forme solide, includenti polveri comprendenti l'agente attivo Composto 1 e gli eccipienti farmaceuticamente accettabili inclusi (ad esempio riempitivo, diluente, disgregante, tensioattivo, glidante, legante, lubrificante, oppure qualunque combinazione degli stessi) possono essere sottoposte a un processo di granulazione a secco. Il processo di granulazione a secco fa sì che la polvere si agglomeri in particelle più grandi aventi una dimensione adatta per ulteriore processamento. La granulazione a secco può migliorare la scorrevolezza di una miscela al fine di essere capaci di produrre compresse che rispettano la richiesta di variazione di massa oppure uniformità di contenuto.

Formulazioni come descritte nella presente possono essere prodotte usando uno o più passi di mescolamento e granulazione a secco. L'ordine e il numero dei passi di mescolamento e granulazione non sembra essere critico. Tuttavia, almeno uno degli eccipienti e Composto 1 possono essere stati sottoposti a granulazione a secco oppure a granulazione a umido a alto taglio prima della compressione in compresse. La granulazione a secco di Composto 1 e degli eccipienti fatta insieme prima della compressione in compresse sembra, sorprendentemente,

essere un modo semplice, non costoso e efficiente di fornire stretto contatto fisico tra gli ingredienti delle presenti composizioni e formulazioni e quindi porta a una formulazione di compresse con buone proprietà di stabilità. La granulazione a secco può essere effettuata mediante un processo meccanico, che trasferisce energia alla miscela senza alcun uso di alcuna sostanza liquida (nella forma di soluzioni acquose, soluzioni a base di soluti organici, oppure miscele degli stessi) in contrasto a processi di granulazione a umido, anche contemplati nella presente. Generalmente, il processo meccanico richiede compattazione quale quella fornita da compattazione mediante rulli. Un esempio di un metodo alternativo per granulazione a secco è lo slugging.

In alcune forme di realizzazione, la compattazione mediante rulli è un processo di granulazione comprendente compattazione meccanica altamente intensa di una o più sostanze. In alcune forme di realizzazione, una composizione farmaceutica comprendente una miscela di polveri è compressa, cioè compattata mediante rulli, tra 2 rulli controrotanti per produrre un foglio solido che è successivamente frantumato in un setaccio per formare un materiale particellare. In questo materiale particellare, si può ottenere uno stretto contatto meccanico tra gli ingredienti. Un esempio di apparecchiatura di compattazione mediante rulli è Minipactor® un Gerteis 3W-Polygran da Gerteis Maschinen+Processengineering AG.

In alcune forme di realizzazione, la compressione in compresse secondo l'invenzione può avvenire senza alcun uso di alcuna sostanza liquida (nella forma di soluzioni acquose, soluzioni a base di soluti organici, oppure miscele degli stessi), cioè con un processo di granulazione a secco. In una tipica forma di realizzazione il nucleo oppure la compressa risultante ha una resistenza a compressione nel range da 1 a 15 kP; quale da 1.5 a 12.5 kP, preferibilmente nel range da 2 a 10 kP.

#### Breve Procedura di Produzione

In alcune forme di realizzazione, gli ingredienti sono pesati secondo la formula stabilita nella presente. Poi, tutti gli ingredienti intragranulari sono setacciati e ben mescolati. Gli ingredienti possono essere lubrificati con un lubrificante adatto, per esempio, magnesio stearato. Il passo successivo può comprendere compattazione/slugging della miscela di polveri e separazione per dimensione degli ingredienti. Poi, le miscele compattate oppure sottoposte a slugging sono macinate in granuli e setacciate per ottenere la dimensione desiderata. Poi, i granuli possono essere ulteriormente lubrificati con, per esempio, magnesio stearato. Poi la composizione granulare dell'invenzione può essere compressa su adatti punzoni in varie formulazioni farmaceutiche in accordo con l'invenzione. Facoltativamente le compresse possono essere rivestite con un film, un colorante oppure un altro rivestimento. Un altro aspetto dell'invenzione fornisce un metodo per la produzione di una composizione farmaceutica comprendente fornire una miscela di una composizione comprendente Composto 1 e uno o più eccipienti selezionati tra: un riempitivo, un diluente, un legante, un glidante, un tensioattivo, un lubrificante, un disgregante, e comprimere la composizione in una compressa avente una dissoluzione di almeno circa 50% in circa 30 minuti.

In un'altra forma di realizzazione, si compie un processo di granulazione ad umido per produrre la formulazione farmaceutica dell'invenzione da una miscela di ingredienti polverizzati e liquidi. Per esempio, una composizione farmaceutica comprendente una miscela di una composizione comprendente Composto 1 e uno o più eccipienti selezionati tra: un riempitivo, un diluente, un legante, un glidante, un tensioattivo, un lubrificante, un disgregante, sono pesati come per la formula stabilita nella presente. Poi, tutti gli ingredienti intragranulari sono setacciati e mescolati in un granulatore ad alto taglio oppure a basso taglio usando acqua oppure acqua con un tensioattivo oppure acqua con un legante oppure acqua con un tensioattivo e un legante per granulare la miscela di polveri. Un liquido diverso da acqua può anche essere usato con oppure senza tensioattivo e/o legante per granulare la

miscela di polveri. Poi, i granuli umidi possono facoltativamente essere macinati usando un mulino adatto. Poi, l'acqua può facoltativamente essere rimossa dalla miscela essiccando gli ingredienti in qualunque modo adatto. Poi, i granuli essiccati possono facoltativamente essere macinati nella dimensione richiesta. Poi, eccipienti extragranulari possono essere aggiunti mediante mescolamento (per esempio un riempitivo, un diluente, e un disgregante). Poi, i granuli separati per dimensione possono essere inoltre lubrificati con magnesio stearato e un disgregante, per esempio, croscarmellosa sodica. Poi la composizione granulare dell'invenzione può essere setacciata per un tempo sufficiente a ottenere la corretta dimensione e poi compressa su punzoni adatti in varie formulazioni farmaceutiche in accordo con l'invenzione. Facoltativamente, le compresse possono essere rivestite con un film, un colorante oppure un altro rivestimento.

Ognuno degli ingredienti di questa miscela esemplare è descritto sopra e negli esempi sotto. Inoltre, la miscela può comprendere additivi facoltativi, quali, uno o più coloranti, uno o più aromi, e/o una o più fragranze come descritti sopra e negli esempi sotto. In alcune forme di realizzazione, le concentrazioni relative (ad esempio, % in peso) di ognuno di questi ingredienti (e qualunque additivo facoltativo) nella miscela sono presentate anche sopra e negli esempi sotto. Gli ingredienti che costituiscono la miscela possono essere forniti sequenzialmente oppure in qualunque combinazione di aggiunte; e, gli ingredienti oppure la combinazione di ingredienti possono essere forniti in qualunque ordine. In una forma di realizzazione, il lubrificante è l'ultimo componente aggiunto alla miscela.

In un'altra forma di realizzazione, la miscela comprende una composizione di Composto 1, e uno qualunque o più degli eccipienti; un legante, un glidante, un tensioattivo, un diluente, un lubrificante, un disgregante, e un riempitivo, in cui ognuno di questi ingredienti è fornito in una forma di polvere (ad esempio, fornito come particelle aventi una media o un diametro medio, misurato mediante diffusione della luce, di 250  $\mu\text{m}$  o minore (ad esempio, 150  $\mu\text{m}$  o

minore, 100  $\mu\text{m}$  o minore, 50  $\mu\text{m}$  o minore, 45  $\mu\text{m}$  o minore, 40  $\mu\text{m}$  o minore, oppure 35  $\mu\text{m}$  o minore)). Per esempio, la miscela comprende una composizione di Composto 1, un diluente, un glidante, un tensioattivo, un lubrificante, un disgregante, e un riempitivo, in cui ognuno di questi ingredienti è fornito in una forma di polvere (ad esempio, fornito come particelle aventi un diametro medio, misurato mediante diffusione della luce, di 250  $\mu\text{m}$  o minore (ad esempio, 150  $\mu\text{m}$  o minore, 100  $\mu\text{m}$  o minore, 50  $\mu\text{m}$  o minore, 45  $\mu\text{m}$  o minore, 40  $\mu\text{m}$  o minore, oppure 35  $\mu\text{m}$  o minore)). In un altro esempio, la miscela comprende una composizione di Composto 1, un diluente, un legante, un tensioattivo, un lubrificante, un disgregante, e un riempitivo, in cui ognuno di questi ingredienti è fornito in una forma di polvere (ad esempio, fornito come particelle aventi un diametro medio, misurato mediante diffusione della luce, di 250  $\mu\text{m}$  o minore (ad esempio, 150  $\mu\text{m}$  o minore, 100  $\mu\text{m}$  o minore, 50  $\mu\text{m}$  o minore, 45  $\mu\text{m}$  o minore, 40  $\mu\text{m}$  o minore, oppure 35  $\mu\text{m}$  o minore))

In un'altra forma di realizzazione, la miscela comprende una composizione di Composto 1, e qualunque combinazione di: un legante, un glidante, un diluente, un tensioattivo, un lubrificante, un disgregante, e un riempitivo, in cui ognuno di questi ingredienti è sostanzialmente privo di acqua. Ognuno degli ingredienti comprende meno di 5% in peso (ad esempio, meno di 2% in peso, meno di 1% in peso, meno di 0.75% in peso, meno di 0.5% in peso, o meno di 0.25% in peso) di acqua rispetto al peso dell'ingrediente. Per esempio, la miscela comprende una composizione di Composto 1, un diluente, un glidante, un tensioattivo, un lubrificante, un disgregante, e un riempitivo, in cui ognuno di questi ingredienti è sostanzialmente privo di acqua. In alcune forme di realizzazione, ognuno degli ingredienti comprende meno di 5% in peso (ad esempio; meno di 2% in peso, meno di 1% in peso, meno di 0.75% in peso, meno di 0.5% in peso, o meno di 0.25% in peso) di acqua rispetto al peso dell'ingrediente.

In un'altra forma di realizzazione, la compressione della miscela in una compressa è realizzata riempiendo una forma (ad esempio, uno stampo) con la miscela e applicando pressione alla miscela. Questo può essere realizzato usando una pressa a matrice oppure un altro apparato simile. In alcune forme di realizzazione, la miscela di Composto 1 e eccipienti può essere innanzitutto processata in forma granulare. I granuli possono poi essere separati per dimensione e compressi in compresse oppure formulati per incapsulamento secondo metodi noti nella tecnica farmaceutica. Va anche notato che l'applicazione di pressione alla miscela nella forma può essere ripetuta usando la stessa pressione durante ciascuna compressione oppure usando pressioni differenti durante le compressioni. In un altro esempio, la miscela di ingredienti polverizzati oppure granuli può essere compressa usando una pressa a matrice che applica sufficiente pressione per formare una compressa avente una dissoluzione di circa 50% o più a circa 30 minuti (ad esempio, circa 55% o più a circa 30 minuti oppure circa 60% o più a circa 30 minuti). Per esempio, la miscela è compressa usando una pressa a matrice per produrre una durezza di compressa di almeno circa 5 kP (almeno circa 5.5 kP, almeno circa 6 kP, almeno circa 7 kP, almeno circa 10 kP, oppure almeno 15 kP). In alcuni casi, la miscela è compressa per produrre una durezza di compressa di tra circa 5 e 20 kP.

In alcune forme di realizzazione, compresse comprendenti una composizione farmaceutica come descritta nella presente possono essere rivestite con circa 3.0% in peso di un rivestimento a film comprendente un colorante rispetto al peso della compressa. In certi casi, la sospensione oppure la soluzione di colorante usata per rivestire le compresse comprende circa 20% p/p di solidi rispetto al peso della sospensione oppure della soluzione di colorante. In ancora ulteriori casi, le compresse rivestite possono essere marcate con un logo, un'altra immagine oppure un testo.

In un'altra forma di realizzazione, il metodo per la produzione di una composizione farmaceutica comprende fornire una miscela di forme solide, ad esempio una miscela di ingredienti polverizzati e/o liquidi, la miscela comprendendo Composto 1 e uno o più eccipienti selezionati tra: un legante, un glidante, un diluente, un tensioattivo, un lubrificante, un disgregante, e un riempitivo; mescolare la miscela finché la miscela è sostanzialmente omogenea, e comprimere oppure compattare la miscela in una forma granulare. Poi la composizione granulare comprendente Composto 1 può essere compressa in compresse oppure essere formulata in capsule come descritto sopra oppure negli esempi sotto. In alternativa, metodi per la produzione di una composizione farmaceutica comprendono fornire una miscela di Composto 1, e uno o più eccipienti, ad esempio un legante, un glidante, un diluente, un tensioattivo, un lubrificante, un disgregante, e un riempitivo; mescolare la miscela finché la miscela è sostanzialmente omogenea, e comprimere/compattare la miscela in una forma granulare usando un compattatore mediante rulli usando una composizione di granulazione a secco come esposta negli esempi sotto oppure in alternativa, compressa/compattata in granuli usando un processo di compattazione di granuli ad umido ad alto taglio come esposto negli esempi sotto. Formulazioni farmaceutiche, per esempio una compressa come descritta nella presente, possono essere prodotte usando i granuli preparati incorporando Composto 1 oltre agli eccipienti selezionati descritti nella presente.

In alcune forme di realizzazione, la miscela è mescolata mediante agitazione, mescolamento, scuotimento, o simili usando mescolamento a mano, un agitatore, un mescolatore, qualunque combinazione degli stessi, o simili. Quando ingredienti oppure combinazioni di ingredienti sono aggiunti sequenzialmente, il mescolamento può avvenire tra successive aggiunte, continuativamente per tutta l'aggiunta di ingredienti, dopo l'aggiunta di tutti gli ingredienti oppure le combinazioni di ingredienti, oppure qualunque combinazione degli stessi. La miscela è mescolata finché ha una composizione sostanzialmente omogenea.

In un'altra forma di realizzazione, la presente invenzione comprende macinazione a getto di Composto 1, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, Composto 1 sale di HCl Forma A in un apparato di macinazione convenzionale adatto, usando pressione dell'aria adatta per produrre particelle aventi una significativa frazione di dimensione di particella tra 0.1 micron e 50 micron. In un'altra forma di realizzazione, la dimensione di particella è tra 0.1 micron e 20 micron. In un'altra forma di realizzazione, la dimensione di particella è tra 0.1 micron e 10 micron. In un'altra forma di realizzazione, la dimensione di particella è tra 1.0 micron e 5 micron. In ancora un'altra forma di realizzazione, Composto 1, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, Composto 1 sale di HCl Forma A ha una dimensione di particella D50 di 2.0 micron.

In varie forme di realizzazione, un secondo agente terapeutico può essere formulato insieme con Composto 1 per formare una forma di dose singola oppure unitaria, per esempio, una compressa oppure una capsula.

Forme di dosaggio preparate come sopra possono essere sottoposte a valutazioni della dissoluzione in vitro secondo il Test 711 "Dissolution" in United States Pharmacopoeia 29, United States Pharmacopoeial Convention, Inc., Rockville, Md., 2005 ("USP"), per determinare il tasso in cui la sostanza attiva è rilasciato dalle forme di dosaggio. Il contenuto di sostanza attiva e i livelli di impurezza sono convenientemente misurati mediante tecniche quale cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).

In alcune forme di realizzazione, l'invenzione include l'uso di materiali di confezionamento quali contenitori e chiusure di polietilene ad alta densità (HDPE), polietilene a bassa densità (LDPE) e oppure polipropilene e/o vetro, foglio patinato trasparente, bustine di alluminio, e blister oppure strip composti da alluminio oppure polivinil cloruro ad alta densità (PVC), facoltativamente includenti un essiccante, polietilene (PE), polivinilidene dicloruro (PVDC), PVC/PE/PVDC, e simili. Questi materiali di confezionamento possono essere usati per

conservare le varie composizioni e formulazioni farmaceutiche in una modalità sterile dopo appropriata sterilizzazione della confezione e del suo contenuto usando tecniche di sterilizzazione chimiche oppure fisiche comunemente impiegate nelle tecniche farmaceutiche.

#### **METODI PER LA SOMMINISTRAZIONE DELLE COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE**

In un aspetto, le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono essere somministrate a un paziente una volta al giorno oppure circa ogni ventiquattro ore. In alternativa, le composizioni farmaceutiche dell'invenzione possono essere somministrate a un paziente due volte al giorno oppure circa ogni dodici ore. Queste composizioni farmaceutiche sono somministrate come formulazioni orali contenenti circa 25 mg, 50 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, oppure 400 mg di Composto 1. In questo aspetto, oltre a composto 1, le composizioni farmaceutiche comprendono un riempitivo; un diluente; un disgregante; un tensioattivo; almeno uno di un legante e un glidante; e un lubrificante. Per esempio, una dose di 400 mg di Composto 1, può comprendere due compresse dell'invenzione ognuna contenente 200 mg di Composto 1, oppure quattro compresse dell'invenzione ognuna contenente 100 mg di Composto 1.

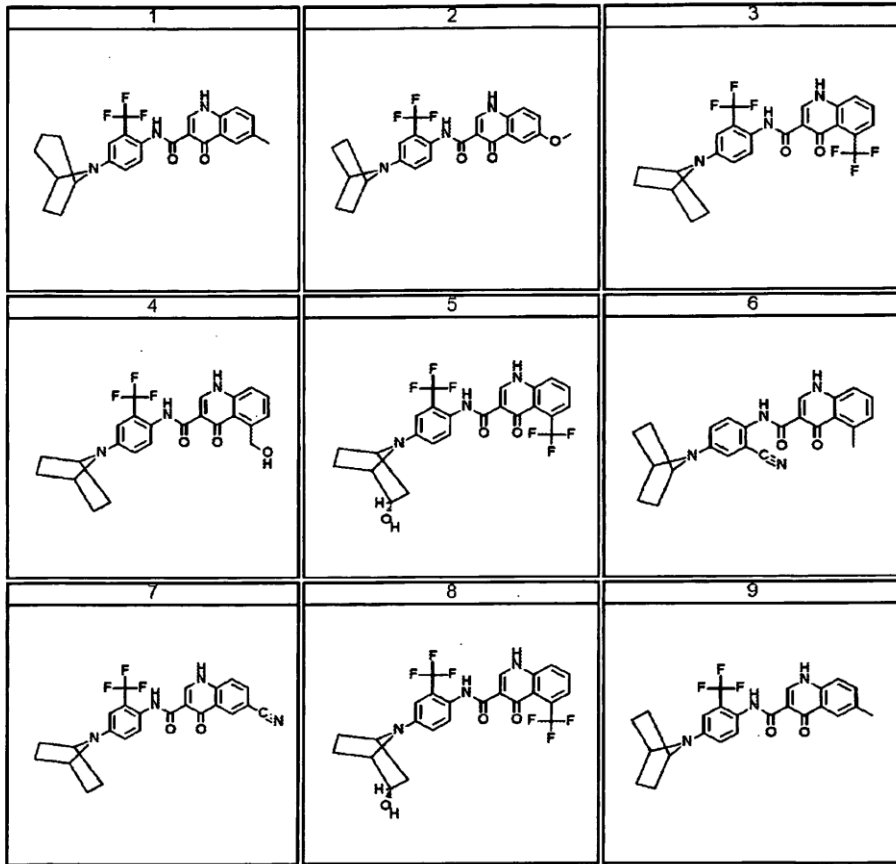
Ci si renderà inoltre conto che il composto e le composizioni farmaceuticamente accettabili e le formulazioni dell'invenzione possono essere impiegati in terapie di combinazione; cioè, Composto 1 e composizioni farmaceuticamente accettabili dello stesso possono essere somministrati simultaneamente con, prima di, oppure successivamente a, uno o più altri prodotti terapeutici oppure procedure mediche desiderati. La particolare combinazione di terapie (prodotti terapeutici oppure procedure) da impiegare in un regime di combinazione terrà conto della compatibilità dei prodotti terapeutici e/o delle procedure desiderati e dell'effetto terapeutico desiderato da ottenere. Ci si renderà inoltre conto che le terapie

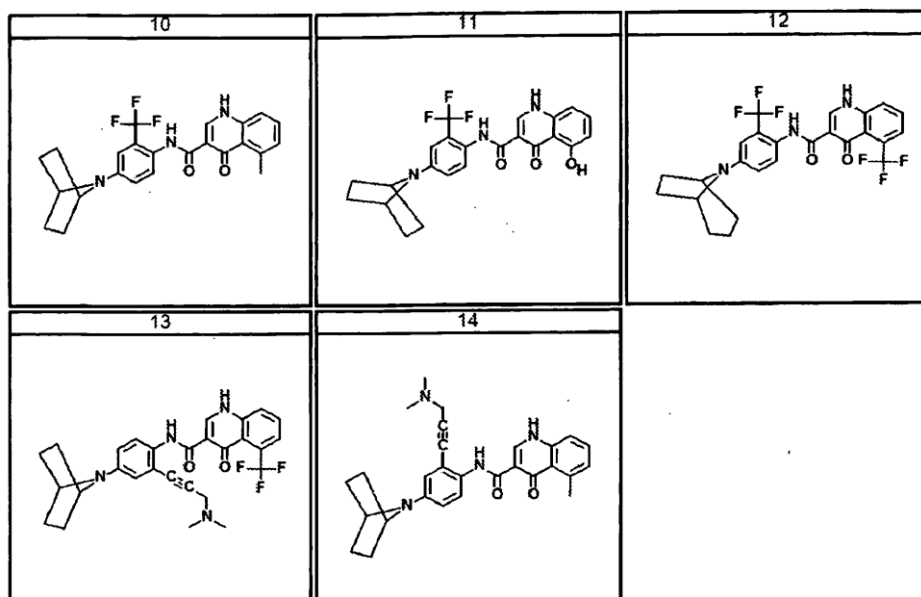
impiegate possono ottenere un effetto desiderato per lo stesso disordine (per esempio, un composto inventivo può essere somministrato simultaneamente con un altro agente usato per trattare lo stesso disordine), oppure esse possono ottenere effetti diversi (ad esempio, controllo di qualunque effetto avverso). Come usato nella presente, agenti terapeutici supplementari che sono normalmente somministrati per trattare oppure prevenire una particolare malattia, per esempio, una malattia, oppure una condizione, mediata da CFTR sono noti come "appropriati per la malattia oppure la condizione che è trattata".

In una forma di realizzazione, l'agente terapeutico supplementare è selezionato tra un agente mucolitico, un broncodilatatore, un antibiotico, un agente antifettivo, un agente antinfiammatorio, un modulatore del CFTR diverso da Composto 1 dell'invenzione, oppure un agente nutrizionale.

In una forma di realizzazione, l'agente supplementare è (*R*)-1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)-N-(1-(2,3-diidrossipropil)-6-fluoro-2-(1-idrossi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarbossammide. In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è N-(5-idrossi-2,4-ditert-butil-fenil)-4-osso-1H-chinolina-3-carbossammide. In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è selezionato dalla Tabella 1:

Tabella 1.





In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è qualunque combinazione dei suddetti agenti. Per esempio, la composizione può comprendere Composto 1, (R)-1-(2,2-difluorobenzod[[1,3]diossol-5-il)-N-(1-(2,3-diidrossipropil)-6-fluoro-2-(1-idrossi-2-metilpropan-2-il)-1H-indol-5-il)ciclopropanocarbossammide, e N-(5-idrossi-2,4-ditert-butil-fenil)-4-osso-1H-chinolina-3-carbossammide. In un altro esempio, la composizione può comprendere Composto 1, N-(5-idrossi-2,4-ditert-butil-fenil)-4-osso-1H-chinolina-3-carbossammide, e uno qualunque dei composti dalla Tabella 1, cioè composti da 1 a 14 della Tabella 1, oppure qualunque combinazione degli stessi.

In una forma di realizzazione, l'agente terapeutico supplementare è un antibiotico. Antibiotici esemplari utili nella presente includono tobramicina, inclusa tobramicina polvere inalatoria (TIP), azitromicina, aztreonam, inclusa la forma aerosolica di aztreonam, amikacina, incluse formulazioni liposomiali dello stesso, ciprofloxacina, incluse formulazioni dello stesso adatte per somministrazione per inalazione, levoflaxacina, incluse formulazioni aerosoliche dello stesso, e combinazioni di due antibiotici, ad esempio, fosfomicina e tobramicina.

In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è un mucolitico. Mucolitici esemplari utili nella presente includono Pulmozyme®.

In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è un broncodilatatore. Broncodilatatori esemplari includono albuterolo, metaprotenerolo solfato, pirbuterolo acetato, salmeterolo, oppure tetrabulina solfato.

In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è efficace nel ripristinare il liquido superficiale delle vie respiratorie polmonari. Tali agenti migliorano il movimento di sale dentro e fuori delle cellule, permettendo al muco nella via respiratoria polmonare di essere più idratato e, perciò, eliminato più facilmente. Tali agenti esemplari includono soluzione salina ipertonica, denufosol tetrasodico ([[(3S,5R)-5-(4-ammino-2-ossopirimidin-1-il)-3-idrossiosolan-2-il]metossi-idrossifosforil] [[[2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-diossopirimidin-1-il)-3,4-diidrossiosolan-2-il]metossi-idrossifosforil]ossi-idrossifosforil]idrogeno fosfato), oppure bronchitolo (formulazione inalatoria di mannitolo).

In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è un agente antinfiammatorio, cioè, un agente che può ridurre l'infiammazione nei polmoni. Tali agenti esemplari utili nella presente includono ibuprofene, acido docosaesanoico (DHA), sildenafil, glutazione inalatorio, pioglitazone, idrossiclorochina, oppure simvastatina.

In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è un modulatore di CFTR diverso da Composto 1, cioè, un agente che ha l'effetto di modulare l'attività di CFTR. Tali agenti esemplari includono ataluren ("PTC124®"; acido 3-[5-(2-fluorofenil)-1,2,4-ossadiazol-3-il]benzoico), sinapultide, lancovutide, depelestat (un inibitore di elastasi dei neutrofili umana ricombinante), e cobiprostone (acido 7-[(2R, 4aR, 5R, 7aR)-2-[(3S)-1,1-difluoro-3-metilpentil]-2-idrossi-6-ossoottaidrociclopenta[b]piran-5-il] eptanoico).

In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è un agente nutrizionale. Agenti nutrizionali esemplari includono pancrelipasi (sostituzione enzimatica pancreatica),

includente Pancrease®, Pancrecarb®, Ultrase®, oppure Creon®, Liprotomase® (già Trizyte®), Aquadeks®, oppure glutazione inalatorio. In una forma di realizzazione, l'agente supplementare è pancrelipasi.

In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è un composto selezionato tra gentamicina, curcumina, ciclofosfamide, 4-fenilbutirrato, miglustat, felodipina, nimodipina, Philoxin B, geniesteina, Apigenina, modulatori di cAMP/cGMP quale rolipram, sildenafil, milrinone, tadalafil, amrinone, isoproterenolo, albuterolo, e almeterolo, deossispergualina, inibitori di HSP 90, inibitori di HSP 70, inibitori del proteasoma quali epoxomicina, lactacistina, etc.

In altre forme di realizzazione, l'agente supplementare è un composto descritto in WO 2004028480, WO 2004110352, WO 2005094374, WO 2005120497, oppure WO 2006101740. In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è un benzo[c]chinolizinio derivato che esibisce attività di modulazione di CFTR oppure un derivato benzopiranicico che esibisce attività di modulazione di CFTR. In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è un composto descritto in Brevetto U.S. No. 7,202,262, Brevetto U.S. No. 6,992,096, US20060148864, US20060148863, US20060035943, US20050164973, WO2006110483, WO2006044456, WO2006044682, WO2006044505, WO2006044503, WO2006044502, oppure WO2004091502. In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è un composto descritto in WO2004080972, WO2004111014, WO2005035514, WO2005049018, WO2006099256, WO2006127588, oppure WO2007044560. In un'altra forma di realizzazione, l'agente supplementare è N-(5-idrossi-2,4-ditert-butil-fenil)-4-osso-1H-chinolina-3-carbossammide.

In una forma di realizzazione, 400 mg di Composto 1 possono essere somministrati a un soggetto che ne necessita seguito da co-somministrazione di 150 mg di N-(5-idrossi-2,4-ditert-butil-fenil)-4-osso-1H-chinolina-3-carbossammide (Composto 2). In

un'altra forma di realizzazione, 400 mg di Composto 1 possono essere somministrati a un soggetto che ne necessita seguito da co-somministrazione di 250 mg di Composto 2. In queste forme di realizzazione, le quantità di dosaggio possono essere ottenute mediante somministrazione di una o più compresse dell'invenzione. Per esempio, somministrazione di 400 mg di Composto 1 può essere ottenuta mediante somministrazione di due compresse ognuna contenente 200 mg di Composto 1, oppure quattro compresse ognuna contenente 100 mg di Composto 1. Composto 2 può essere somministrato come una composizione farmaceutica comprendente Composto 2 e un carrier farmaceuticamente accettabile. La durata di somministrazione può proseguire finché si ottiene miglioramento della malattia oppure finché raccomandato da un medico del soggetto, ad esempio la durata di somministrazione può essere meno di una settimana, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane, oppure un mese o più lunga. Il periodo di co-somministrazione può essere preceduto da un periodo di somministrazione di semplicemente il solo Composto 1. Per esempio, vi potrebbe essere somministrazione di 400 mg di Composto 1 per 2 settimane seguita da co-somministrazione di 150 mg oppure 250 mg di Composto 2 per 1 settimana aggiuntiva.

In una forma di realizzazione, 400 mg di Composto 1 possono essere somministrati una volta al giorno a un soggetto che ne necessita seguito da co-somministrazione di 150 mg di Composto 2 una volta al giorno. In un'altra forma di realizzazione, 400 mg di Composto 1 possono essere somministrati una volta al giorno a un soggetto che ne necessita seguito da co-somministrazione di 250 mg di Composto 2 una volta al giorno. In queste forme di realizzazione, le quantità di dosaggio possono essere ottenute mediante somministrazione di una o più compresse dell'invenzione. Per esempio, somministrazione di 400 mg di Composto 1 può essere ottenuta mediante somministrazione di due compresse ognuna contenente 200 mg di Composto 1, oppure quattro compresse ognuna contenente 100 mg di Composto 1. Composto 2 può essere somministrato come una composizione farmaceutica comprendente

Composto 2 e un carrier farmaceuticamente accettabile. La durata di somministrazione può proseguire finché si ottiene miglioramento della malattia oppure finché raccomandato da un medico del soggetto, ad esempio la durata di somministrazione può essere meno di una settimana, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane, oppure un mese o più lunga. Il periodo di co-somministrazione può essere preceduto da un periodo di somministrazione di semplicemente solo Composto 1. Per esempio, vi potrebbe essere somministrazione di 400 mg di Composto 1 per 2 settimane seguito da co-somministrazione di 150 mg oppure 250 mg di Composto 2 per 1 settimana aggiuntiva.

In una forma di realizzazione, 400 mg di Composto 1 possono essere somministrati una volta al giorno a un soggetto che ne necessita seguito da co-somministrazione di 150 mg di Composto 2 ogni 12 ore. In un'altra forma di realizzazione, 400 mg di Composto 1 possono essere somministrati una volta al giorno a un soggetto che ne necessita seguito da co-somministrazione di 250 mg di Composto 2 ogni 12 ore. In queste forme di realizzazione, le quantità di dosaggio possono essere ottenute mediante somministrazione di una o più compresse dell'invenzione. Per esempio, somministrazione di 400 mg di Composto 1 può essere ottenuta mediante somministrazione di due compresse ognuna contenente 200 mg di Composto 1, oppure quattro compresse ognuna contenente 100 mg di Composto 1. Composto 2 può essere somministrato come una composizione farmaceutica comprendente Composto 2 e un carrier farmaceuticamente accettabile. La durata di somministrazione può proseguire finché si ottiene miglioramento della malattia oppure finché raccomandato da un medico del soggetto, ad esempio la durata di somministrazione può essere meno di una settimana, 1 settimana, 2 settimane, 3 settimane, oppure un mese o più lunga. Il periodo di co-somministrazione può essere preceduto da un periodo di somministrazione di semplicemente solo Composto 1. Per esempio, vi potrebbe essere somministrazione di 400 mg di Composto

1 per 2 settimane seguita da co-somministrazione di 150 mg oppure 250 mg di Composto 2 per 1 settimana aggiuntiva.

Queste combinazioni sono utili per il trattamento delle malattie descritte nella presente inclusa fibrosi cistica. Queste combinazioni sono utili anche nei kit descritti nella presente.

La quantità di agente terapeutico supplementare presente nelle composizioni della presente invenzione sarà non più della quantità che sarebbe normalmente somministrata in una composizione comprendente quell'agente terapeutico come l'unico agente attivo. Preferibilmente la quantità di agente terapeutico supplementare nelle composizioni attualmente descritte varierà da circa 50% a 100% della quantità normalmente presente in una composizione comprendente quell'agente come l'unico agente terapeuticamente attivo.

#### **USI TERAPEUTICI DELLA COMPOSIZIONE**

In certe forme di realizzazione, le composizioni farmaceuticamente accettabili comprendenti Composto 1 e facoltativamente un agente supplementare sono utili per il trattamento oppure l'attenuazione della severità di fibrosi cistica in pazienti che esibiscono attività di CFTR residua nella membrana apicale di epitelii respiratori e non respiratori. La presenza di attività di CFTR residua a livello della superficie epiteliale può essere facilmente rilevata usando metodi noti nella tecnica, ad esempio, tecniche elettrofisiologiche, biochimiche, oppure istochimiche standard. Tali metodi identificano attività di CFTR usando tecniche elettrofisiologiche *in vivo* oppure *ex vivo*, misurazione di concentrazioni di Cl<sup>-</sup> del sudore oppure salivari, oppure tecniche biochimiche oppure istochimiche *ex vivo* per monitorare la densità sulla superficie cellulare. Usando tali metodi, attività di CFTR residua può essere facilmente rilevata in pazienti eterozigoti oppure omozigoti per una varietà di mutazioni differenti, includenti pazienti omozigoti oppure eterozigoti per la più comune mutazione,  $\Delta F508$ , come pure per altre mutazioni quale la mutazione G551D, oppure la mutazione R117H.

In una forma di realizzazione, Composto 1, come descritto nella presente, oppure composizioni farmaceuticamente accettabili dello stesso, sono utili per il trattamento oppure l'attenuazione della severità di fibrosi cistica in pazienti all'interno di certi genotipi esibenti attività di CFTR residua, ad esempio, mutazioni di classe III (regolazione oppure gating compromessi), mutazioni di classe IV (conduttanza alterata), oppure mutazioni di classe V (sintesi ridotta) (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). Altri genotipi dei pazienti che esibiscono attività di CFTR residua includono pazienti omozigoti per una di queste classi oppure eterozigoti con qualunque altra classe di mutazioni, incluse mutazioni di classe I, mutazioni di classe II, oppure una mutazione che manca di classificazione.

In una forma di realizzazione, Composto 1, come descritto nella presente, oppure composizioni farmaceuticamente accettabili dello stesso, sono utili per il trattamento oppure l'attenuazione della severità di fibrosi cistica in pazienti all'interno di certi fenotipi clinici, ad esempio, un fenotipo clinico da moderato a lieve che tipicamente è correlato con la quantità di attività di CFTR residua nella membrana apicale di epitelii. Tali fenotipi includono pazienti esibenti insufficienza pancreatica oppure pazienti con diagnosi di pancreatite idiopatica e assenza bilaterale congenita dei dotti deferenti, oppure malattia polmonare lieve. L'esatta quantità necessaria varierà da soggetto un soggetto, secondo la specie, l'età, e la condizione generale del soggetto, la severità dell'infezione, il particolare agente, la sua modalità di somministrazione, e simili. I composti dell'invenzione sono preferibilmente formulati in forma unitaria di dosaggio per facilità di somministrazione e uniformità di dosaggio. L'espressione "forma unitaria di dosaggio" come usato nella presente si riferisce a una unità fisicamente discreta di agente appropriata per il paziente da trattare. Si comprenderà, tuttavia, che l'uso giornaliero totale dei composti e delle composizioni

dell'invenzione sarà deciso dal medico curante nell'ambito di un valido giudizio medico. Il livello di dose efficace specifico per qualunque particolare paziente oppure organismo dipenderà da una varietà di fattori includenti il disordine che è trattato e la severità del disordine; l'attività dello specifico composto impiegato; la specifica composizione impiegata; l'età, il peso corporeo, la salute generale, il sesso e la dieta del paziente; il tempo di somministrazione, la via di somministrazione, e il tasso di escrezione dello specifico composto impiegato; la durata del trattamento; farmaci usati in combinazione oppure in coincidenza con lo specifico composto impiegato, e simili fattori ben noti nelle tecniche mediche. Il termine "paziente", come usato nella presente, significa un animale, preferibilmente un mammifero, e il più preferibilmente un essere umano.

Ovunque nella presente domanda dove un nome di un composto può non descrivere correttamente la struttura del composto, la struttura sostituisce il nome e comanda.

#### **ESEMPI**

##### XRPD (diffrazione di raggi X da polveri)

I dati di diffrazione di raggi X (XRD) di Composto 1, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A sono stati raccolti su un diffrattometro di polveri Bruker D8 DISCOVER con rivelatore bidimensionale HI-STAR e un monocromatore di grafite piano. Tubo sigillato a Cu con radiazione  $K\alpha$  è stato usato a 40 kV, 35mA. I campioni sono stati posti su wafer di silicio a background zero a 25°C. Per ogni campione, due frame di dati sono stati raccolti a 120 secondi ognuno in 2 differenti angoli  $\theta_2$ : 8° e 26°. I dati sono stati integrati con software GADDS e fusi con software DIFFRACT<sup>plus</sup>EVA. Le incertezze per le posizioni riportate dei picchi sono  $\pm 0.2$  gradi.

##### Descrizione di Macinazione a Getto

Composto 1, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A non micronizzato è setacciato per disgregarlo prima di porlo nella tramoggia del

mulino a getto. Tutti i setacci sono monouso e sono stati puliti prima dell'uso. Composto 1, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A non micronizzato è aggiunto alla tramoggia del mulino a getto ad un tasso di alimentazione controllato usando gas azoto compresso. Il range di pressione del gas è 40-45/45-70 (Venturi/Mulino) PSI e il range del tasso di alimentazione è 0.5-1.6 Kg/Ora. Il composto 1, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A è micronizzato nel mulino attraverso collisioni particella-particella e particella-parete e il Composto 1, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A processato è svuotato nei contenitori per prodotto micronizzato. Si ritiene che uno di ordinaria esperienza nella tecnica possa anche ottenere Composto 1, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A con una dimensione di particella favorevole attraverso macinazione a dischi dentati basata in parte sulle condizioni descritte sopra.

#### Calorimetria Differenziale a Scansione (DSC)

I dati di calorimetria differenziale a scansione (DSC) di Composto 1, Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, oppure Composto 1 Sale di HCl Forma A sono stati raccolti usando un DSC Q100 V9.6 Build 290 (TA Instruments, New Castle, DE). La temperatura è stata calibrata con indio e la capacità termica è stata calibrata con zaffiro. Campioni di 3-6 mg sono stati pesati in coppe di alluminio che sono state aggraffate usando coperchi con 1 pin-hole. I campioni sono stati scannerizzati da 25°C a 350°C ad una velocità di riscaldamento di 1.0°C/min e con uno spurgo di gas azoto di 50 ml/min. I dati sono stati raccolti mediante software Thermal Advantage Q Series™ versione 2.2.0.248 e analizzati mediante Universal Analysis software versione 4.1D (TA Instruments, New Castle, DE). I numeri riportati rappresentano le singole analisi.

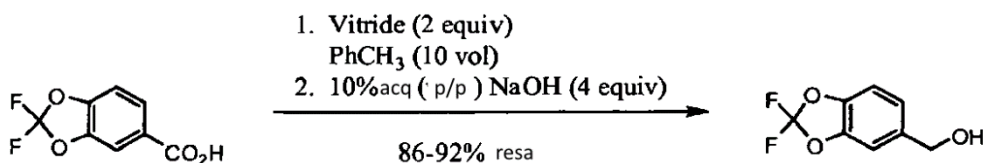
Determinazione di struttura di cristallo singolo di Composto 1 Forma I, Composto 1 Forma II, e Composto 1 Sale di HCl Forma A

I dati di diffrazione sono stati acquisiti su diffrattometro Bruker Apex II dotato di sorgente di K-alfa attraverso tubo sigillato a Cu e un Apex II CCD rivelatore. La struttura è stata risolta e affinata usando programma SHELX (Sheldrick, G.M., Acta Cryst., (2008) A64, 112-122). Sulla base delle assenze sistematiche e delle statistiche delle intensità la struttura è stata risolta e affinata in gruppo spaziale  $P2_1/n$ .

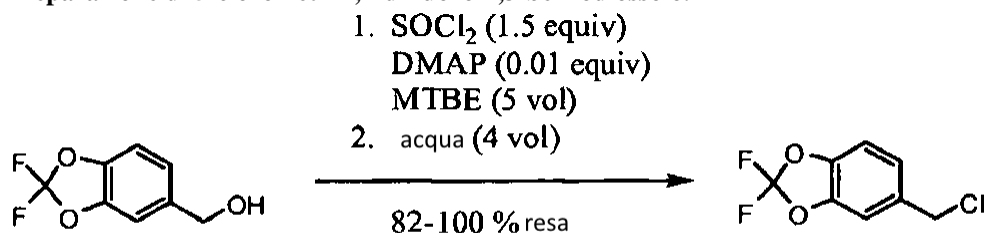
Vitride® (sodio bis(2-metossietossi)alluminio idruro [oppure  $\text{NaAlH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3)_2$ ], 65 wgt% soluzione in toluene) è stato acquistato da Aldrich Chemicals.

acido 2,2-Difluoro-1,3-benzodiossolo-5-carbossilico è stato acquistato da Saltigo (un affiliato della Lanxess Corporation).

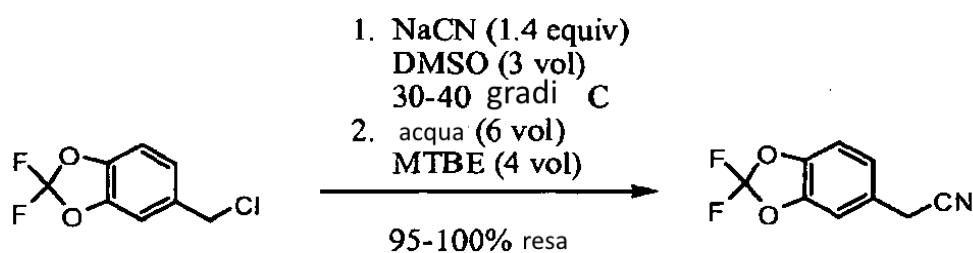
**Preparazione di (2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-metanolo.**



Acido 2,2-difluoro-1,3-benzodiossolo-5-carbossilico disponibile in commercio (1.0 eq) è stato risospeso in toluene (10 vol). Vitride® (2 eq) è stato aggiunto attraverso imbuto di aggiunta ad un tasso per mantenere la temperatura a 15-25°C. Alla fine dell'aggiunta, la temperatura è stata aumentata a 40°C per 2 ore (h), poi NaOH acquoso (acq) 10% (p/p) (4.0 eq) è stato attentamente aggiunto attraverso imbuto di aggiunta, mantenendo la temperatura a 40-50 °C. Dopo agitazione per altri 30 minuti (min), gli strati sono stati lasciati separare a 40°C. La fase organica è stata raffreddata a 20°C, poi lavata con acqua (2 x 1.5 vol), essiccata ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrata, e concentrata per fornire (2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-metanolo grezzo che è stato usato direttamente nel passo successivo.

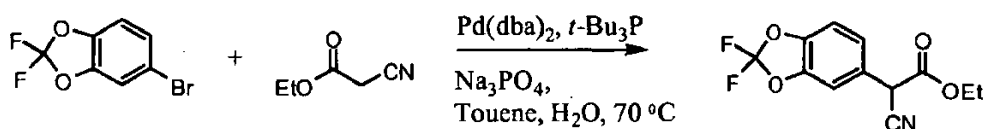
**Preparazione di 5-clorometil-2,2-difluoro-1,3-benzodiossolo.**

(2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-metanolo (1.0 eq) è stato disciolto in MTBE (5 vol). Una quantità catalitica di 4-(N,N-dimetil)amminopiridina (DMAP) (1 mol%) è stata aggiunta e  $\text{SOCl}_2$  (1.2 eq) è stato aggiunto attraverso imbuto di aggiunta. Il  $\text{SOCl}_2$  è stato aggiunto a un tasso per mantenere la temperatura nel reattore a 15-25°C. La temperatura è stata aumentata a 30°C per 1 h, e poi è stata raffreddata a 20°C. Acqua (4 vol) è stata aggiunta attraverso imbuto di aggiunta mantenendo frattanto la temperatura a meno di 30°C. Dopo agitazione per altri 30 min, gli strati sono stati lasciati separare. Lo strato organico è stato agitato e  $\text{NaOH}$  acq 10% (p/v) (4.4 vol) è stato aggiunto. Dopo agitazione per da 15 a 20 min, gli strati sono stati lasciati separare. La fase organica è stata poi essiccata ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrata, e concentrata per fornire 5-clorometil-2,2-difluoro-1,3-benzodiossolo grezzo che è stato usato direttamente nel passo successivo.

**Preparazione di (2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-acetonitrile.**

Una soluzione di 5-clorometil-2,2-difluoro-1,3-benzodiossolo (1 eq) in DMSO (1.25 vol) è stata aggiunta a una sospensione di NaCN (1.4 eq) in DMSO (3 vol), mantenendo frattanto la temperatura tra 30-40°C. La miscela è stata agitata per 1 h, e poi acqua (6 vol) è stata aggiunta, seguita da metil *tert*-butil etere (MTBE) (4 vol). Dopo agitazione per 30 min, gli strati sono stati separati. Lo strato acquoso è stato estratto con MTBE (1.8 vol). Gli strati organici combinati sono stati lavati con acqua (1.8 vol), essiccati (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrati, e concentrati per fornire (2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-acetonitrile grezzo (95%) che è stato usato direttamente nel passo successivo.

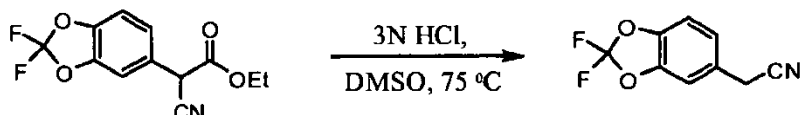
#### Sintesi di (2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-1-etilacetato-acetonitrile



Un reattore è stato spurgato con azoto e caricato con 900 mL di toluene. Il solvente è stato degassato attraverso spurgo di azoto per non meno di 16 h. Nel reattore è stato poi caricato Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (155.7 g, 949.5 mmol), seguito da bis(dibenzilideneacetone) palladio (0) (7.28 g, 12.66 mmol). Una soluzione 10% p/p di *tert*-butilfosfina in esani (51.23 g, 25.32 mmol) è stata caricata per 10 min a 23°C da un imbuto di aggiunta spurgato con azoto. La miscela è stata lasciata agitare per 50 min, nel qual tempo 5-bromo-2,2-difluoro-1,3-benzodiossolo (75 g, 316.5 mmol) è stato aggiunto nel corso di 1 min. Dopo agitazione per altri 50 min, la miscela è stata caricata con cianoacetato di etile (71.6 g, 633.0 mmol) per 5 min seguito da acqua (4.5 mL) in una aliquota. La miscela è stata riscaldata a 70°C nel corso di 40 min e analizzata mediante HPLC ogni 1 - 2 h per la percentuale di conversione del reattivo nel prodotto. Dopo che è stata osservata completa conversione (tipicamente 100% di conversione dopo 5 - 8 h), la miscela è stata raffreddata a 20 - 25°C e filtrata attraverso uno strato di celite. Lo strato di celite è stato sciacquato con toluene (2 X 450 mL) e gli strati organici combinati sono stati concentrati a 300 mL sotto vuoto a 60 - 65°C. Il concentrato è stato

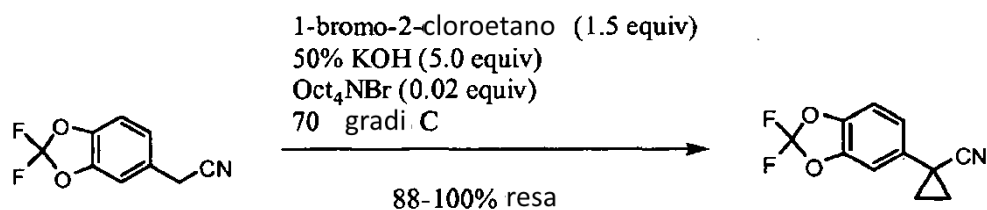
caricato con 225mL di DMSO e concentrato sotto vuoto a 70 - 80°C finché è cessata la distillazione attiva del solvente. La soluzione è stata raffreddata a 20 - 25°C e diluita a 900 mL con DMSO in preparazione per Passo 2.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.16 - 7.10 (m, 2H), 7.03 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 4.63 (s, 1H), 4.19 (m, 2H), 1.23 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H).

**Sintesi di (2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-acetonitrile.**



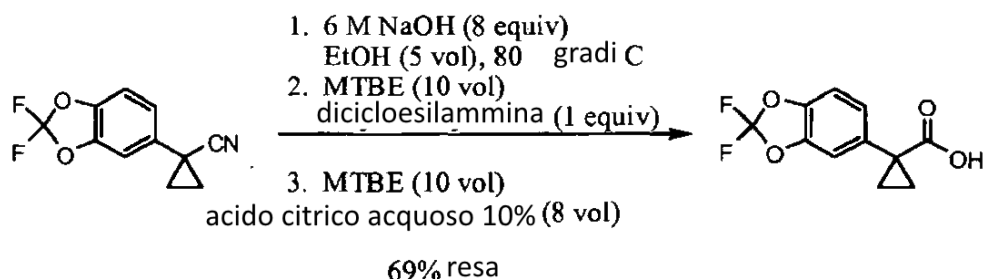
La soluzione di DMSO di (2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-1-etilacetato-acetonitrile da sopra è stata caricata con HCl 3N (617.3 mL, 1.85 mol) nel corso di 20 min mantenendo frattanto una temperatura interna < 40°C. La miscela è stata poi riscaldata a 75°C per 1 h e analizzata mediante HPLC ogni 1 - 2 h per % di conversione. Quando è stata osservata una conversione di > 99% (tipicamente dopo 5 - 6 h), la reazione è stata raffreddata a 20 - 25°C e estratta con MTBE (2 X 525 mL), con tempo sufficiente per permettere completa separazione delle fasi durante le estrazioni. Gli estratti organici combinati sono stati lavati con NaCl 5% (2 X 375 mL). La soluzione è stata poi trasferita in una appropriata apparecchiatura per una distillazione sotto vuoto a 1.5 - 2.5 Torr che era dotata di un pallone ricevente raffreddato. La soluzione è stata concentrata sotto vuoto a < 60°C per rimuovere i solventi. (2,2-Difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-acetonitrile è stato poi distillato dall'olio risultante a 125 - 130°C (temperatura della stufa) e 1.5 - 2.0 Torr. (2,2-Difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-acetonitrile è stato isolato come un olio limpido in 66% di resa da 5-bromo-2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il-acetonitrile (2 passi) e con una purezza HPLC di 91.5% AUC (corrisponde a un saggio p/p di 95%).  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO)  $\delta$  7.44 (br s, 1H), 7.43 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.22 (dd,  $J = 8.2, 1.8$  Hz, 1H), 4.07 (s, 2H).

**Preparazione di (2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-ciclopropanocarbonitrile.**



Una miscela di (2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-acetonitrile (1.0 eq), KOH acquoso 50% in peso (5.0 eq) 1-bromo-2-cloroetano (1.5 eq), e Oct<sub>4</sub>NBr (0.02 eq) è stata riscaldata a 70°C per 1 h. La miscela di reazione è stata raffreddata, poi sottoposta a work up con MTBE e acqua. La fase organica è stata lavata con acqua e soluzione salina. Il solvente è stato rimosso per fornire (2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-ciclopropanocarbonitrile.

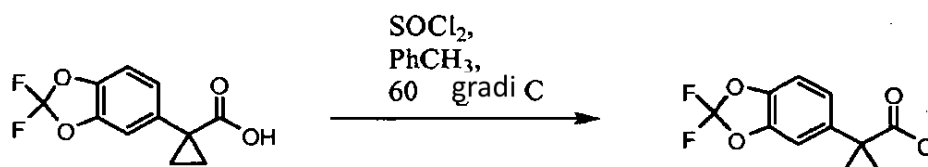
**Preparazione di acido 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-ciclopropanocarbossilico.**



(2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-ciclopropanocarbonitrile è stato idrolizzato usando NaOH 6M (8 equiv) in etanolo (5 vol) a 80°C per l'intera notte. La miscela è stata raffreddata a temperatura ambiente e l'etanolo è stato evaporato sotto vuoto. Il residuo è stato ripreso in acqua e MTBE, HCl 1M è stato aggiunto, e gli strati sono stati separati. Lo strato MTBE è stato poi trattato con dicioesilammina (DCHA) (0.97 equiv). La sospensione è stata raffreddata a 0°C, filtrata e lavata con eptano per dare il corrispondente sale DCHA. Il sale è stato ripreso in MTBE e acido citrico 10% e agitato finché tutto il solido si era disciolto. Gli strati sono stati separati e lo strato di MTBE è stato lavato con acqua e soluzione salina. Un cambio di solvente in eptano seguito da filtrazione ha dato acido 1-(2,2-difluoro-1,3-

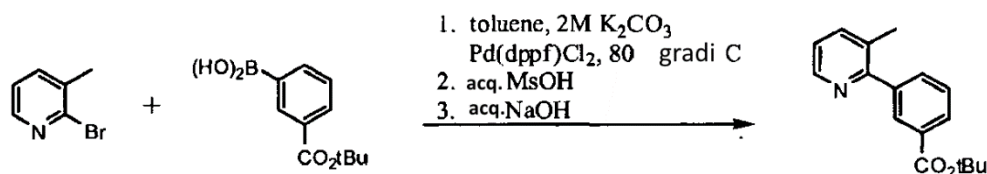
benzodiossol-5-il)-ciclopropanocarbossilico dopo essiccamento in una stufa da vuoto a 50°C per l'intera notte.

**Preparazione di 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-ciclopropanocarbonile cloruro.**



acido 1-(2,2-difluoro-1,3-benzodiossol-5-il)-ciclopropanocarbossilico (1.2 eq) è risospeso in toluene (2.5 vol) e la miscela è stata riscaldata a 60°C.  $\text{SOCl}_2$  (1.4 eq) è stato aggiunto attraverso imbuto di aggiunta. Il toluene e  $\text{SOCl}_2$  sono stati distillati dalla miscela di reazione dopo 30 minuti. Toluene aggiuntivo (2.5 vol) è stato aggiunto e la miscela risultante è stata distillata di nuovo, dando il prodotto cloruro acido come un olio, che è stato usato senza ulteriore purificazione.

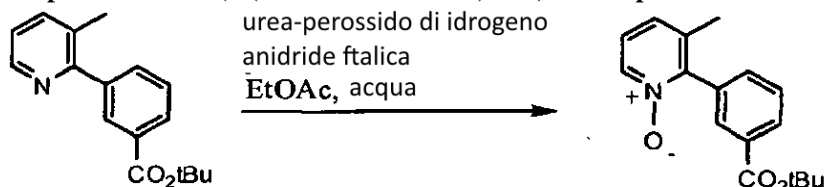
**Preparazione di *tert*-butil-3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato.**



2-Bromo-3-metilpiridina (1.0 eq) è stata disciolta in toluene (12 vol).  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (4.8 eq) è stato aggiunto, seguito da acqua (3.5 vol). La miscela risultante è stata riscaldata a 65°C sotto una corrente di  $\text{N}_2$  per 1 ora. acido 3-(*t*-Butossicarbonil)fenilboronico (1.05 eq) e  $\text{Pd(dppf)Cl}_2 \cdot \text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.015 eq) sono stati poi aggiunti e la miscela è stata riscaldata a 80°C. Dopo 2 ore, il calore è stato spento, acqua è stata aggiunta (3.5 vol), e gli strati sono stati lasciati separare. La fase organica è stata poi lavata con acqua (3.5 vol) e estratta con acido metansolfonico acquoso 10% (2 eq MsOH, 7.7 vol). La fase acquosa è stata resa basica con

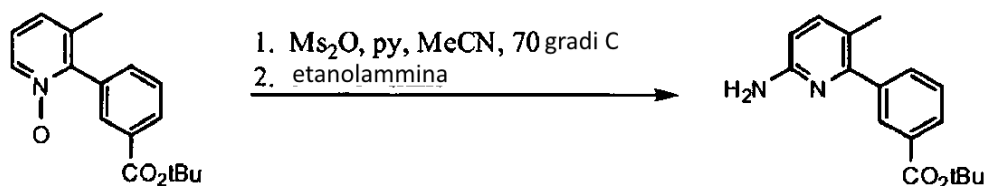
NaOH acquoso 50% (2 eq) e estratta con EtOAc (8 vol). Lo strato organico è stato concentrato per fornire *tert*-butil-3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato grezzo (82%) che è stato usato direttamente nel passo successivo.

**Preparazione di 2-(3-(*tert*-butossicarbonil)fenil)-3-metilpiridina-1-ossido.**



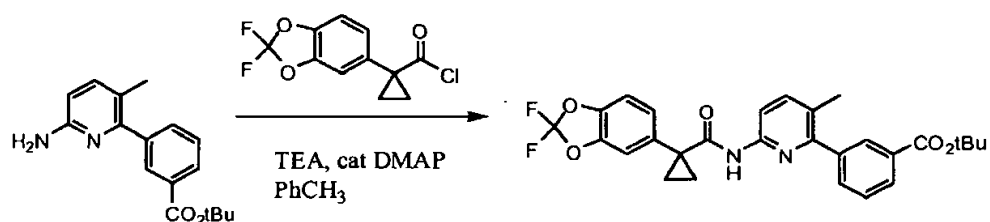
*tert*-Butil-3-(3-metilpiridin-2-il)benzoato (1.0 eq) è stato disciolto in EtOAc (6 vol). Acqua (0.3 vol) è stata aggiunta, seguita da urea-perossido di idrogeno (3 eq). Anidride ftalica (3 eq) è stata poi aggiunta a porzioni alla miscela come un solido ad un tasso per mantenere la temperatura nel reattore sotto 45°C. Dopo completamento della aggiunta di anidride ftalica, la miscela è stata riscaldata a 45°C. Dopo agitazione per altre 4 ore, il calore è stato spento. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> acquoso 10% p/p (1.5 eq) è stato aggiunto attraverso imbuto di aggiunta. Dopo completamento di aggiunta di Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, la miscela è stata agitata per altri 30 min e gli strati separati. Lo strato organico è stato agitato e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> acquoso 10% p/p (2 eq) è stato aggiunto. Dopo agitazione per 30 minuti, gli strati sono stati lasciati separare. La fase organica è stata lavata con NaCl acq 13% p/v. La fase organica è stata poi filtrata e concentrata per fornire 2-(3-(*tert*-butossicarbonil)fenil)-3-metilpiridina-1-ossido grezzo (95%) che è stato usato direttamente nel passo successivo.

**Preparazione di *tert*-butil-3-(6-ammino-3-metilpiridin-2-il)benzoato.**



Una soluzione di 2-(3-(*tert*-butossicarbonil)fenil)-3-metilpiridina-1-ossido (1 eq) e piridina (4 eq) in acetonitrile (8 vol) è stata riscaldata a 70°C. Una soluzione di anidride metanosolfonica (1.5 eq) in MeCN (2 vol) è stata aggiunta per 50 min attraverso imbuto di aggiunta mantenendo frattanto la temperatura a meno di 75°C. La miscela è stata agitata per altre 0.5 ore dopo che l'aggiunta era completa. La miscela è stata poi lasciata raffreddare a ambiente. Etanolamina (10 eq) è stata aggiunta attraverso imbuto di aggiunta. Dopo agitazione per 2 ore, acqua (6 vol) è stata aggiunta e la miscela è stata raffreddata a 10°C. Dopo agitazione per 3 ore, il solido è stato raccolto mediante filtrazione e lavato con acqua (3 vol), acetonitrile/acqua 2:1 (3 vol), e acetonitrile (2 x 1.5 vol). Il solido è stato essiccato a peso costante (<1% differenza) in una stufa da vuoto a 50°C con un leggero spurgo di  $\text{N}_2$  per fornire *tert*-butil-3-(6-ammino-3-metilpiridin-2-il)benzoato come un solido rosso-giallo (resa 53%).

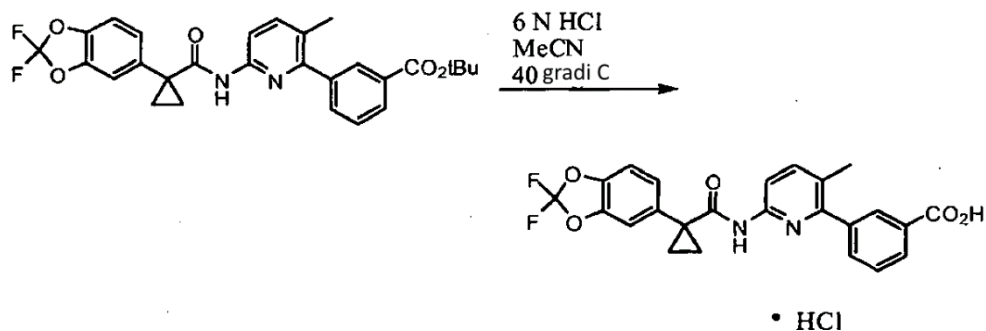
**Preparazione di 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)-ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)-*t*-butilbenzoato.**



Il cloruro acido grezzo descritto sopra è stato disciolto in toluene (2.5 vol sulla base di cloruro acido) e aggiunto attraverso imbuto di aggiunta a una miscela di *tert*-butil-3-(6-ammino-3-

metilpiridin-2-il)benzoato (1 eq), DMAP, (0.02 eq), e trietilammina (3.0 eq) in toluene (4 vol sulla base di *tert*-butil-3-(6-ammino-3-metilpiridin-2-il)benzoato). Dopo 2 ore, acqua (4 vol sulla base di *tert*-butil-3-(6-ammino-3-metilpiridin-2-il)benzoato) è stata aggiunta alla miscela di reazione. Dopo agitazione per 30 minuti, gli strati sono stati separati. La fase organica è stata poi filtrata e concentrata per fornire un olio denso di 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)-*t*-butilbenzoato (resa grezza quantitativa). Acetonitrile (3 vol sulla base di prodotto grezzo) è stato aggiunto e distillato finché avviene cristallizzazione. Acqua (2 vol sulla base di prodotto grezzo) è stata aggiunta e la miscela agitata per 2 h. Il solido è stato raccolto mediante filtrazione, lavato con acetonitrile/acqua 1:1 (in volume) (2 x 1 volumi sulla base di prodotto grezzo), e parzialmente essiccata sul filtro sotto vuoto. Il solido è stato essiccato a un peso costante (<1% differenza) in una stufa da vuoto a 60°C con un leggero spurgo di N<sub>2</sub> per fornire 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)-*t*-butilbenzoato come un solido marrone.

**Preparazione di acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il) benzoico • HCl sale.**



A una sospensione di 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il) ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)-*t*-butilbenzoato (1.0 eq) in MeCN (3.0 vol) è stata aggiunta acqua (0.83 vol) seguita da HCl acquoso concentrato (0.83 vol). La miscela

è stata riscaldata a  $45 \pm 5^\circ\text{C}$ . Dopo agitazione per 24 - 48 h, la reazione è stata completa, e la miscela è stata lasciata raffreddare a ambiente. Acqua (1.33 vol) è stata aggiunta e la miscela agitata. Il solido è stato raccolto mediante filtrazione, lavato con acqua (2 x 0.3 vol), e parzialmente essiccato sul filtro sotto vuoto. Il solido è stato essiccato a un peso costante (<1% differenza) in una stufa da vuoto a  $60^\circ\text{C}$  con un leggero spurgo di  $\text{N}_2$  per fornire acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il) benzoico • HCl come un solido bianco-sporco.

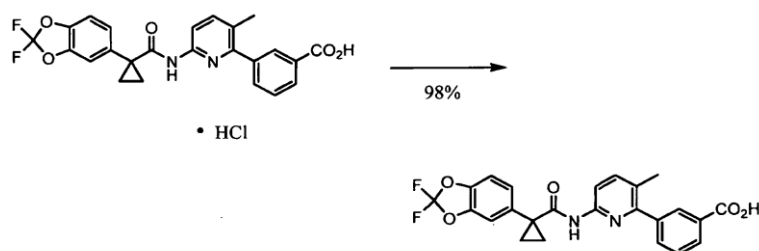
Uno spettro  $^1\text{HNMR}$  di Composto 1 è mostrato nella Figura 20 e la Figura 21 rappresenta uno spettro  $^1\text{HNMR}$  di Composto 1 come un sale di HCl.

Tabella 2 sotto elenca i dati  $^1\text{HNMR}$  per Composto I.

**Tabella 2.**

Composto No	LC/MS M + 1	LC/RT minuti	NMR
1	453.3	1.93	$^1\text{HNMR}$ (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).

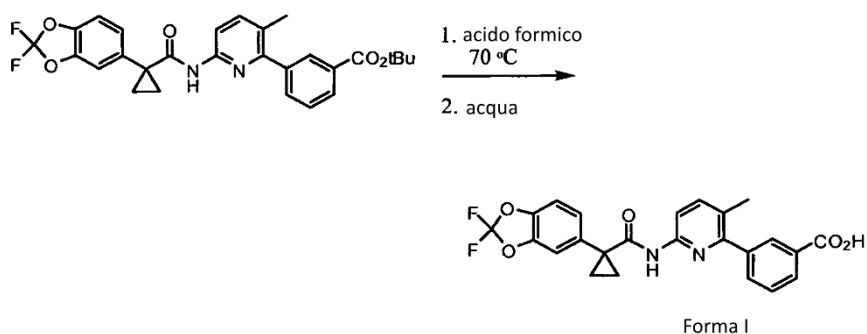
**Preparazione di Composto 1 Forma I, Metodo A.**



Forma I

Una sospensione di acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il) benzoico · HCl (1 eq) in acqua (10 vol) è stata agitata a temperatura ambiente. Un campione è stato preso dopo agitazione per 24 h. Il campione è stato filtrato e il solido è stato lavato con acqua (2 volte). Il campione di solido è stato sottoposto a analisi DSC. Quando l'analisi DSC indicava completa conversione nella forma I, il solido è stato raccolto mediante filtrazione, lavato con acqua (2 x 1.0 vol), e parzialmente essiccato su un filtro sotto vuoto. Il solido è stato poi essiccato a un peso costante (<1% differenza) in una stufa da vuoto a 60°C con un leggero spurgo di N<sub>2</sub> per fornire Composto 1 Forma I come un solido bianco-sporco (98% resa). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 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).

#### Preparazione di Composto 1 Forma I, Metodo B.



Una soluzione di 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)-t-butylbenzoato (1.0 eq) in acido formico (3.0 vol) è stata riscaldata con agitazione a 70 ± 10°C, per 8 h. La reazione è stata giudicata completa quando non rimaneva più di 1.0% AUC mediante metodi cromatografici di 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)-t-butylbenzoato). La miscela è stata lasciata raffreddare a ambiente. La soluzione è stata aggiunta a acqua (6 vol), riscaldata a 50°C, e la miscela è stata agitata. La miscela è stata poi

riscaldata a  $70 \pm 10^\circ\text{C}$  finché il livello di 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzod[1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)-t-butilbenzoato è stato non maggiore di 0.8% (AUC). Il solido è stato raccolto mediante filtrazione, lavato con acqua (2 x 3 vol), e parzialmente essiccato sul filtro sotto vuoto. Il solido è stato essiccato a un peso costante (<1% differenza) in una stufa da vuoto a  $60^\circ\text{C}$  con un leggero spurgo di  $\text{N}_2$  per fornire Composto 1 Forma I come un solido bianco-sporco.

Il tracciato di DSC di Composto 1 Forma I è mostrato nella Figura 22. La fusione per Composto 1 Forma I avviene a circa  $204^\circ\text{C}$ .

Un pattern di diffrazione di raggi X è stato calcolato da una struttura di cristallo singolo di Composto 1 Forma I ed è mostrato nella Figura 1. La Tabella 3 elenca i picchi calcolati per Figura 1.

**Tabella 3.**

Rank Picco	Angolo $2\theta$ [gradi]	Intensità 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

Un pattern di diffrazione di raggi X da polveri reale di Composto 1 Forma I è mostrato nella Figura 2. La Tabella 4 elenca i picchi reali per Figura 2.

**Tabella 4.**

Rank Picco	Angolo 2 $\theta$ [gradi]	Intensità 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

Cristalli incolori di Composto 1 Forma I sono stati ottenuti raffreddando una soluzione di 1-butanolo concentrato da 75°C a 10°C a un tasso di 0.2°C/min. Un cristallo con dimensioni di 0.50 x 0.08 x 0.03 mm è stato selezionato, pulito con olio minerale, montato su un MicroMount e centrato su un sistema Bruker APEX II. Tre batch di 40 frame separati nello spazio reciproco sono stati ottenuti per fornire una matrice di orientamento e parametri di cella iniziali. Parametri di cella finali sono stati ottenuti e affinati sulla base del set di dati completo.

Un set di dati di diffrazione di spazio reciproco è stato ottenuto a una risoluzione di 0.82 Å usando passi di 0.5° usando esposizione di 30 s per ogni frame. I dati sono stati raccolti a 100 (2) K. L'integrazione delle intensità e l'affinamento di parametri di cella è stato realizzato usando software APEXII. L'osservazione del cristallo dopo la raccolta dei dati non mostrava segni di decomposizione.

Una rappresentazione conformazionale di Composto 1 Forma I sulla base di analisi ai raggi X su cristallo singolo è mostrata nella Figura 23. Composto 1 Forma I è monoclinico,  $P_21/n$ , con le seguenti dimensioni di cella unitaria:  $a=4.9626(7)\text{Å}$ ,  $b=12.299(2)\text{Å}$ ,  $c=33.075(4)\text{Å}$ ,  $\beta=93.938(9)^\circ$ ,  $V=2014.0\text{Å}^3$ ,  $Z=4$ . La densità di Composto 1 Forma I calcolata dai dati strutturali è 1.492 g/cm<sup>3</sup> a 100 K.

#### **Preparazione di Composto 1 Forma II da Composto 1 Forma I.**

Composto 1 Forma I (approssimativamente 30 mg) è stato risospeso in 500 µL di un appropriato solvente (per esempio, metanolo, etanolo, acetone, 2-propanolo, acetonitrile, tetraidrofurano, acetato di metile, 2-butanone, formiato di etile, e -metiltetraidrofurano per due giorni. La sospensione è stata poi filtrata mediante centrifugazione oppure sotto vuoto ed è stata lasciata seccare a temperatura ambiente per l'intera notte per dare Composto 1 Forma II.

Il tracciato DSC di Composto 1 Forma II Solvato con Acetone è mostrato nella Figura 15, mostrando due transizioni di fase. Il punto di fusione per Composto 1 Forma II Solvato con Acetone si trova a circa 188°C e 205°C.

Un pattern di diffrazione di raggi X da polveri reale di Composto 1 Forma II è mostrato nella Figura 3. La Tabella 5 elenca i picchi reali per Figura 3 in ordine decrescente di intensità relativa.

**Tabella 5.**

<b>Angolo 2θ</b> <b>[gradi]</b>	<b>Intensità</b> <b>Relativa</b> <b>[%]</b>
21.70	100.0
8.98	65.5
11.04	57.4
18.16	55.9
23.06	55.4
20.63	53.1
22.22	50.2
18.57	49.1
16.66	47.2
19.86	35.0

Rappresentazioni conformazionali di Composto 1 Forma II Solvato con Acetone sulla base di analisi ai raggi X su cristallo singolo sono mostrate nella Figura 24. La stechiometria tra Composto 1 Forma II e acetone è approssimativamente 4.4:1 (4.48:1 calcolato da <sup>1</sup>H NMR;

4.38:1 da raggi X). La struttura cristallina rivela un impaccamento delle molecole dove vi sono due vuoti oppure tasche per cella unitaria, oppure 1 vuoto per molecola ospite. Nel solvato con acetone, approssimativamente il 92 per cento di vuoti sono occupati da molecole di acetone. Composto 1 Forma II è un gruppo spaziale  $P2_1/n$  monoclinico con le seguenti dimensioni di cella unitaria:  $a = 16.5235(10) \text{ \AA}$ ,  $b = 12.7425(8) \text{ \AA}$ ,  $c = 20.5512(13) \text{ \AA}$ ,  $\alpha = 90^\circ$ ,  $\beta = 103.736(4)^\circ$ ,  $\gamma = 90^\circ$ ,  $V = 4203.3(5) \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 4$ . La densità di Composto 1 in Composto 1 Forma II calcolata dai dati strutturali è  $1.430/\text{cm}^3$  a 100 K.

Uno spettro  $^{13}\text{C}$  NMR allo stato solido di Composto 1 Forma II Solvato con Acetone è mostrato nella Figura 25. La Tabella 6 fornisce spostamenti chimici dei relativi picchi.

**Tabella 6.**

Composto 1 Forma II, Acetone Solvato 13C Spostamenti Chimici		
Picco #	F1 [ppm]	Intensità
1	202.8	6.05
2	173.3	62.66
3	171.9	20.53
4	153.5	28.41
5	150.9	21.68
6	150.1	19.49
7	143.2	45.74
8	142.3	42.68
9	140.1	37.16
10	136.6	26.82
11	135.9	30.1
12	134.6	39.39
13	133.2	23.18
14	131.0	60.92
15	128.5	84.58
16	116.0	34.64
17	114.2	23.85
18	112.4	25.3
19	110.9	24.12
20	107.8	18.21
21	32.0	54.41
22	22.2	20.78
23	18.8	100

Uno spettro  $^{19}\text{F}$  NMR allo stato solido di Composto 1 Forma II Solvato con Acetone è mostrato nella Figura 26. I picchi con un asterisco indicano le spinning side band. La Tabella 7 fornisce spostamenti chimici dei relativi picchi.

**Tabella 7.**

Composto 1, Forma II, Acetone Solvato $^{19}\text{F}$ Spostamenti Chimici		
Picco	F1 [ppm]	Intensità
#		
1	-41.6	12.5
2	-46.4	6.77
3	-51.4	9.05

#### **Preparazione di Composto 1 Sale di HCl Forma A.**

Cristalli incolori di Composto 1 Sale di HCl Forma A sono stati ottenuti mediante lenta evaporazione da una soluzione concentrata del sale di HCl di Composto 1 in etanolo. Un cristallo con dimensioni di  $0.30 \times 1/5 \times 0.15$  mm è stato selezionato, pulito usando olio minerale, montato su un MicroMount e centrato su un diffrattometro Bruker *APEXII*. Tre batch di 40 frame separati in spazio reciproco sono stati ottenuti per fornire una matrice di orientamento e parametri di cella iniziali. Parametri di cella finali sono stati ottenuti e affinati sulla base del set di dati completo.

La Figura 18 fornisce una rappresentazione conformazionale di Composto 1 Sale di HCl Forma A come un dimero, sulla base di analisi su singolo cristallo. Un pattern di diffrazione di raggi X di Composto 1 Sale di HCl Forma A calcolato dalla struttura cristallina è mostrato nella Figura 27. La Tabella 8 contiene i picchi calcolati per Figura 27 in ordine decrescente di intensità relativa.

**Tabella 8.**

<b>2θ</b> <b>[gradi]</b>	<b>Intensità Relativa</b> <b>[%]</b>
8.96	100.00
17.51	48.20
18.45	34.60
10.33	32.10
16.01	18.90
11.94	18.40
8.14	16.20
10.10	13.90
16.55	13.30
9.54	10.10
16.55	13.30

**Formulazioni Farmaceutiche Orali Esempolari Comprensenti Composto 1**

Una compressa è stata preparata con i componenti e le quantità elencati nella Tabella 9 per Compressa 1A Esempolare comprendente 100mg di API, cioè Composto 1 Forma I. Compressa 1A Esempolare (formulata per avere 100 mg di Composto 1) è preparata usando un processo di formulazione con dispositivo di compattazione a secco mediante rulli. Nella Tabella 9, gradi/marchi sono stati cellulosa microcristallina: Avicel PH102; mannitolo: Pearlitol SD 100; croscarmellosa sodica: Acdisol; e silice colloidale: Cabosil.

**Tabella 9.**

Miscela di Granuli Compattazione mediante Rulli	(% p/p)
Composto 1 Forma I	30
Cellulosa microcristallina	42.3
Mannitolo	21.2
Croscarmellosa sodica	3
Sodio Lauril Solfato	1
Silice colloidale	0.5
Magnesio Stearato	2
Composizione di Compresa (100 mg dose, 335 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli Compattazione mediante Rulli	99.5
Magnesio Stearato	0.5

Una compressa è stata preparata con i componenti e le quantità elencati nella Tabella 10 per Compresa 1B Esempio comprendente 100mg di API, cioè Composto 1 Forma I. Compresa 1B Esempio (formulata per avere 100 mg di Composto 1 Forma I) è preparata usando un processo di formulazione di granuli ad alto taglio a umido. Nella Tabella 10, gradi/marchi sono stati come segue. Miscela di Granuli ad Alto Taglio - cellulosa microcristallina: Avicel PH101; mannitolo: Pearlitol C50; croscarmellosa sodica: Acdisol; polivinilpirrolidone: Kollidon PVP K30; e nella Composizione di Compresa - croscarmellosa sodica: Acdisol.

**Tabella 10.**

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
Composto 1 Forma I	50
Cellulosa microcristallina	30
Mannitolo	13
Croscarmellosa sodica	2
Polivinilpirrolidone	4
Sodio Lauril Solfato	1
Acqua (rimossa durante essiccamento)	25-40% rispetto ai solidi
Composizione di Compresa (100mg dose, 205 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	97.5
Croscarmellosa sodica	2.0
Magnesio Stearato	0.5

Una compressa è stata preparata con i componenti e le quantità elencati nella Tabella 11 per Compresa 1C Esempio comprendente 100mg di API, cioè composto 1 Forma I cristallina. Compresa 1C Esempio (formulata per avere 100 mg di composto 1 Forma I cristallina) è preparata usando un processo di formulazione di granuli ad alto taglio ad umido. Nella Tabella 11, gradi/marchi sono stati come segue. Miscela di Granuli ad Alto Taglio - cellulosa microcristallina: Avicel PH101; mannitolo: Pearlitol C50; croscarmellosa sodica: Acdisol;

polivinilpirrolidone: Kollidon PVP K30; e nella Composizione di Compresa -  
croscarmellosa sodica: Acdisol.

**Tabella 11.**

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
Composto 1 Forma I	60
Cellulosa microcristallina	20
Mannitolo	13
Croscarmellosa sodica	2
Polivinilpirrolidone	4
Sodio Lauril Solfato	1
Acqua (rimossa durante essiccamento)	25-40% rispetto ai solidi
Composizione di Compresa (100mg dose, 171 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	97.5
Croscarmellosa sodica	2.0
Magnesio Stearato	0.5

Una compressa è stata preparata con i componenti e le quantità elencati nella Tabella 12 per  
Compresa 1D Esempio comprendente 200mg di API, cioè composto 1 Forma I cristallina.  
Compresa 1D Esempio (formulata per avere 200 mg di composto 1 Forma I cristallina) è  
preparata usando un processo di formulazione di granuli ad alto taglio ad umido. Nella

Tabella 12, gradi/marchi sono stati come segue. Miscela di Granuli ad Alto Taglio - cellulosa microcristallina: Avicel PH101; mannitolo: Pearlitol C50; croscarmellosa sodica: Acdisol; polivinilpirrolidone: Kollidon PVP K30; e nella compressa Composizione - cellulosa microcristallina: Avicel PH200; croscarmellosa sodica: Acdisol; e magnesio stearato: 5712.

**Tabella 12.**

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
Composto 1 Forma I	60
Cellulosa microcristallina	20
Mannitolo	13
Croscarmellosa sodica	2
Polivinilpirrolidone	4
Sodio Lauril Solfato	1
Acqua (rimossa durante essiccamento)	25-40% rispetto ai solidi
Composizione di Compressa (200mg dose, 402 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	83
Cellulosa microcristallina	14
Croscarmellosa sodica	2
Magnesio Stearato	1.0

Una compressa è stata preparata con i componenti e le quantità elencati nella Tabella 13 per Compressa 1E Esempio comprendente 200 mg di API, cioè composto 1 Forma I cristallina.

Compressa 1E Esempio (formulata per avere 200 mg di composto cristallino 1 Forma I) è preparata usando un processo di formulazione di granuli ad alto taglio ad umido. Nella Tabella 13, gradi/marchi sono stati come segue. Miscela di Granuli ad Alto Taglio - cellulosa microcristallina: Avicel PH101; mannitolo: Pearlitol C50; croscarmellosa sodica: Acdisol; polivinilpirrolidone: Kollidon PVP K30; e nella Composizione di Compressa di Nucleo - cellulosa microcristallina: Avicel PH200; croscarmellosa sodica: Acdisol; e magnesio stearato: 5712; e nel rivestimento a film –film di rivestimento: Opadry II; cera: Carnauba.

**Tabella 13.**

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	mg
Composto 1 Forma I	200
Cellulosa microcristallina	66
Mannitolo	43
Croscarmellosa sodica	7
Polivinilpirrolidone	13
Sodio Lauril Solfato	3
Composizione di Compressa Nucleo (200 mg dose, 400 mg immagine)	mg
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	332
Cellulosa microcristallina	56
Croscarmellosa sodica	8
Magnesio Stearato	4
Composizione di Compressa Film	mg

(200 mg dose, 412 mg immagine)	
Composizione di Compresa Nucleo	400
Rivestimento a film	12
Cera	0.04

Una compressa è stata preparata con i componenti e le quantità elencati nella Tabella 14 per Compresa 1F Esempare comprendente 200 mg di API, cioè composto 1 Forma I cristallina. Compresa 1F Esempare (formulata per avere 200 mg di composto 1 Forma I cristallina) è preparata usando un processo di formulazione di granuli ad alto taglio ad umido. Nella Tabella 14, gradi/marchi sono stati come segue. Miscela di Granuli ad Alto Taglio - cellulosa microcristallina: Avicel PH101; mannitolo: Pearlitol C50; croscarmellosa sodica: Acdisol; polivinilpirrolidone: Kollidon PVP K30; e nel Composizione di Compresa Nucleo - cellulosa microcristallina: Avicel PH200; croscarmellosa sodica: Acdisol; e magnesio stearato: 5712; e nel rivestimento a film – film di rivestimento: Opadry II; cera: Carnauba.

**Tabella 14.**

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	mg
Composto 1 Forma I	200
Cellulosa microcristallina	67
Mannitolo	45
Croscarmellosa sodica	7
Polivinilpirrolidone	10.4
Sodio Lauril Solfato	2.6
Composizione di Compresa Nucleo	mg

(200 mg dose, 400 mg immagine)	
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	332
Cellulosa microcristallina	56
Croscarmellosa sodica	8
Magnesio Stearato	4
Compressa Rivestita con Film	mg
(200 mg dose, 412 mg immagine)	
Composizione di Compressa Nucleo	400
Film di rivestimento	12
Cera	0.04

Una compressa è stata preparata con i componenti e le quantità elencati nella Tabella 15 per Compressa 1G Esempio comprendente 100 mg di API, cioè composto 1 Forma I cristallina. Compressa 1G Esempio (formulata per avere 100 mg di composto 1 Forma I cristallina) è preparata usando un processo di formulazione di granuli ad alto taglio ad umido. Nella Tabella 15, gradi/marchi sono stati come segue. Miscela di Granuli ad Alto Taglio - cellulosa microcristallina: Avicel PH101; mannitolo: Pearlitol C50; croscarmellosa sodica: Acdisol; polivinilpirrolidone: Kollidon PVP K30; e nella Composizione di Compressa - croscarmellosa sodica: Acdisol.

**Tabella 15.**

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
Composto 1 Forma I	70
Cellulosa microcristallina	12

Mannitolo	11
Croscarmellosa sodica	2
Polivinilpirrolidone	4
Sodio Lauril Solfato	1
Acqua (rimossa durante essiccamento)	25-40% rispetto ai solidi
Composizione di Compresa (100mg dose, 147 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	97.5
Croscarmellosa sodica	2.0
Magnesio Stearato	0.5

Una compressa è stata preparata con i componenti e le quantità elencati nella Tabella 16 per Compresa 1H Esempio comprendente 100 mg di API, cioè composto 1 Forma I oppure Forma II cristallina. Compresa 1H Esempio (formulata per avere 100 mg di composto 1 Forma I oppure Forma II cristallina) è preparata usando un processo di formulazione di granuli ad alto taglio ad umido. Nella Tabella 16, gradi/marchi sono stati come segue. Miscela di Granuli ad Alto Taglio - cellulosa microcristallina: Avicel PH101; mannitolo: Pearlitol C50; croscarmellosa sodica: Acdisol; polivinilpirrolidone: Kollidon PVP K30; e nella Composizione di Compresa Nucleo - cellulosa microcristallina: Avicel PH200; croscarmellosa sodica: Acdisol; e magnesio stearato: 5712.

**Tabella 16.**

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	(% p/p)
Composto 1 Forma I oppure Forma II	61
Cellulosa microcristallina	20.3
Mannitolo	13.2
Croscarmellosa sodica	2
Polivinilpirrolidone	2.7
Sodio Lauril Solfato	0.7
Composizione di Compresa (100 mg dose, 197 mg immagine)	(% p/p)
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	83
Cellulosa microcristallina	14
Croscarmellosa sodica	2
Magnesio Stearato	1

Una compressa è stata preparata con i componenti e le quantità elencati nella Tabella 17 per Compressa II Esemplare comprendente 100 mg di API, cioè composto 1 Forma I oppure Forma II cristallina. Compressa II Esemplare (formulata per avere 100 mg di composto 1 Forma I oppure Forma II cristallina) è preparata usando un processo di formulazione di granuli ad alto taglio ad umido. Nella Tabella 17, gradi/marchi sono stati come segue. Miscela di Granuli ad Alto Taglio - cellulosa microcristallina: Avicel PH101; mannitolo: Pearlitol C50; croscarmellosa sodica: Acdisol; polivinilpirrolidone: Kollidon PVP K30; e

nella Composizione di Compresa Nucleo - cellulosa microcristallina: Avicel PH200; croscarmellosa sodica: Acdisol; e magnesio stearato: 5712.

**Tabella 17.**

Miscela di Granuli ad Alto Taglio	mg
Composto 1 Forma I oppure Forma II	100
Cellulosa microcristallina	33.3
Mannitolo	21.7
Croscarmellosa sodica	3.3
Polivinilpirrolidone	4.4
Sodio Lauril Solfato	1.1
Composizione di Compresa Nucleo (100 mg dose, 197 mg immagine)	mg
Miscela di Granuli ad Alto Taglio	163.9
Cellulosa microcristallina	27.6
Croscarmellosa sodica	3.9
Magnesio Stearato	2.0

**Formazione di Compresa da Composizione di Granuli da Compattazione mediante**

**Rulli**

Apparecchiatura/Processo

Apparecchiatura

Compattatori a Rulli: Alexanderwerk WP 120, Vector TF-Mini, oppure Vector TF-Labo.

#### Setacciamento/Pesatura

Composto 1 e eccipienti possono essere setacciati prima della oppure dopo la pesatura. Appropriate dimensioni di setaccio sono mesh 20, mesh 40, oppure mesh 60. Composto 1 può essere pre-mescolato con uno o più degli eccipienti per semplificare il setacciamento.

#### Mescolamento

Composto 1 e eccipienti possono essere aggiunti al mescolatore in ordine differente. Il mescolamento può essere compiuto in un mescolatore Turbula oppure un mescolatore v-shell. I componenti possono essere mescolati per 10 minuti senza lubrificante seguito da aggiuntivo mescolamento con lubrificante per 3 minuti.

#### Compattazione mediante Rulli

La miscela può essere compattata in scaglie mediante rulli e macinata in granuli usando un Alexanderwerk WP 120. I rulli usati possono essere i rulli da 25 mm usando una pressione di compattazione da 18 a 50 bar, una velocità di rullo da 3 a 12 RPM, e una velocità alimentatrice dell'elica di 20 - 80 RPM. Le dimensioni di setaccio del mulino integrato possono essere 2 mm per il setaccio superiore e 0.8 mm per il setaccio inferiore.

#### Mescolamento

I granuli compattati mediante rulli possono essere mescolati con eccipienti extra-granulari quali riempitivi e lubrificante usando un mescolatore V-shell. Il tempo di mescolamento può essere 5, 3 oppure 1 minuto/i.

#### Compressione

La miscela per compressione è stata compressa in compresse usando una stazione singola Riva MiniPress con attrezzatura da 10 mm. Il peso delle compresse per una dose di 100 mg può essere circa 200, 250, oppure 300 mg.

#### Rivestimento a film

Le compresse possono essere rivestite con film usando un pan coater, quale, per esempio un O'Hara Labcoat.

#### Stampa

Comprese rivestite con film possono essere stampate con un monogramma su una o su ambedue le facce delle compresse con, per esempio, una stampante Hartnett Delta.

### **Formazione di Compresse da Composizione di Granuli ad alto Taglio**

#### Apparecchiatura/Processo

##### Apparecchiatura

Granulatore: Procept MiPro con una tramoggia di granulazione da 250 ml oppure 1L.

##### Setacciamento/Pesatura

Composto 1 e eccipienti possono essere setacciati prima della oppure dopo la pesatura. Possibili dimensioni del setaccio sono maglia 20, maglia 40, oppure maglia 60. Composto 1 può essere pre-mescolato con uno o più degli eccipienti per semplificare il setacciamento.

##### Operazione di Granulazione

Fluido di Granulazione - SLS e legante vengono aggiunti a acqua purificata e mescolati finché disciolti. Un rapporto adatto è 2.5% p/p SLS e 10.0% p/p PVP K30 in acqua.

Granulazione - Gli eccipienti e composto 1 sono aggiunti nel recipiente di granulazione. L'ordine di aggiunta può essere Composto 1, disgregante, diluente, e riempitivo. I componenti possono essere mescolati nel recipiente da 250 ml per 1 minuto alla velocità della pala rotante di 1000 RPM e alla velocità del frantumatore di 1000 RPM. La granulazione può essere compiuta ad una velocità della pala rotante di 2000 RPM con una velocità del frantumatore di 4000 RPM aggiungendo frattanto il liquido di granulazione con una pompa a siringa a da 1.5 a 4.5 g/min. Il tempo di aggiunta di liquido può essere da 4 a 12 minuti. Dopo che è aggiunto liquido di legante necessario, i granuli possono essere aggregati ad umido per da circa 10 secondi a circa 1 minuto. Un notevole vantaggio del presente processo

di granulazione ad alto taglio è l'uso di un liquido di granulazione che comprende sia un tensioattivo sia il legante per una migliore granulazione attraverso bagnabilità aumentata. In una forma di realizzazione, il tensioattivo è SLS.

#### Essiccamento

I granuli possono essere essiccati usando una stufa da vuoto, un essiccatore a vassoio, un essiccatore bi-conico, oppure un essiccatore a letto fluido. I granuli sono stati essiccati usando una stufa da vuoto con uno spurgo di azoto.

#### Mescolamento

I granuli possono essere mescolati con eccipienti extra-granulari. I granuli sono stati mescolati con disgregante, diluente, riempitivo, e lubrificante extra-granulare. I granuli sono stati mescolati usando il mescolatore Turbula per 3 minuti pre-lubrificante e 1 minuto con lubrificante. Si può usare un mescolatore di scala maggiore quale un mescolatore V-shell 4-quart.

#### Compressione

La miscela di compressione è stata compressa in compresse usando una stazione singola Riva MiniPress con attrezzatura da 8 mm, oppure 10 mm. Il peso delle compresse per una dose da 100 mg può essere circa 160, 200, oppure 250 mg.

#### Rivestimento a film

Le compresse possono essere rivestite con film usando un pan coater, quale, per esempio un O'Hara Labcoat.

#### Stampa

Compresse rivestite con film possono essere stampate con un monogramma su una o su ambedue le facce delle compresse con, per esempio, una stampante Hartnett Delta.

#### **Schedula di Somministrazione di Dosaggio**

In un altro aspetto, l'invenzione riguarda un metodo di trattamento di una malattia mediata da CFTR in un soggetto comprendente somministrare a un soggetto che ne necessita una quantità efficace della composizione farmaceutica fornita dall'invenzione. In un'altra forma di realizzazione, la composizione farmaceutica è somministrata al soggetto una volta ogni due settimane. In un'altra forma di realizzazione, la composizione farmaceutica è somministrata al soggetto una volta a settimana. In un'altra forma di realizzazione, la composizione farmaceutica è somministrata al soggetto una volta ogni tre giorni. In un'altra forma di realizzazione, la composizione farmaceutica è somministrata al soggetto una volta al giorno. In una forma di realizzazione, quando la composizione farmaceutica è una compressa secondo la Tabella 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, oppure 17 il dosaggio è una volta al giorno.

## **SAGGI**

### **Saggi per la Rilevazione e la Misurazione delle Proprietà di Correzione di $\Delta F508$ -CFTR di Composti**

Metodi ottici di potenziale di membrana per saggiare proprietà di modulazione di  $\Delta F508$ -CFTR di composti.

Il saggio di potenziale di membrana ottico ha utilizzato sensori FRET voltaggio-sensibili descritti da Gonzalez e Tsien (*Si veda* Gonzalez, J. E. and R. Y. Tsien (1995) "Voltage sensing by fluorescence resonance energy transfer in single cells." Biophys J 69(4): 1272-80, e Gonzalez, J. E. and R. Y. Tsien (1997); "Improved indicators of cell membrane potential that use fluorescence resonance energy transfer" Chem Biol 4(4): 269-77) in combinazione con la strumentazione per misurare variazioni di fluorescenza quale il Voltage/Ion Probe Reader (VIPR) (*Si veda*, 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).

Questi saggi sensibili a voltaggio si basano sulla variazione in trasferimento di energia per risonanza in fluorescenza (FRET) tra il colorante sensibile a voltaggio membrana-solubile, DiSBAC<sub>2</sub>(3), e un fosfolipide fluorescente, CC2-DMPE, che è attaccato al foglietto esterno della membrana plasmatica e agisce come un donatore FRET. Variazioni in potenziale di membrana ( $V_m$ ) fanno sì che il DiSBAC<sub>2</sub>(3) carico negativamente si ridistribuisca attraverso la membrana plasmatica e la quantità di trasferimento di energia da CC2-DMPE di conseguenza varia. Le variazioni in emissione di fluorescenza sono state monitorate usando VIPR™ II, che è un manipolatore di liquidi e un rivelatore fluorescente integrato progettato per eseguire screening basati su cellule in piastre per microtitolazione a 96 oppure a 384 pozzetti.

#### 1. Identificazione di Composti di Correzione

Per identificare piccole molecole che correggono il difetto di trafficking associato con  $\Delta F508$ -CFTR; è stato sviluppato un formato di saggio HTS a singola aggiunta. Le cellule sono state incubate in terreno senza siero per 16 h a 37°C in presenza oppure assenza (controllo negativo) di composto da testare. Come un controllo positivo, cellule piastrate in piastre a 384 pozzetti sono state incubate per 16 h a 27°C per "temperatura correggere"  $\Delta F508$ -CFTR. Le cellule sono state successivamente sciacquate 3X con soluzione di Krebs Ringers e caricate con i coloranti sensibili a voltaggio. Per attivare  $\Delta F508$ -CFTR, 10  $\mu$ M forskolin e il potenziatore di CFTR, genisteina (20  $\mu$ M), sono stati aggiunti insieme con terreno privo di Cl<sup>-</sup> a ogni pozzetto. L'aggiunta di terreno privo di Cl<sup>-</sup> promuoveva efflusso di Cl<sup>-</sup> in risposta a attivazione di  $\Delta F508$ -CFTR e la depolarizzazione di membrana risultante è stata otticamente monitorata usando i coloranti sensori di voltaggio basati su FRET.

#### 2. Identificazione di Composti Potenziatori

Per identificare potenziatori di  $\Delta F508$ -CFTR, è stato sviluppato un formato di saggio HTS a doppia aggiunta. Durante la prima aggiunta, un terreno privo di Cl<sup>-</sup> con oppure senza

composto da testare è stato aggiunto a ogni pozzetto. Dopo 22 sec, una seconda aggiunta di terreno privo di  $\text{Cl}^-$  contenente 2 - 10  $\mu\text{M}$  forskolin è stata aggiunta per attivare  $\Delta\text{F508-CFTR}$ . La concentrazione di  $\text{Cl}^-$  extracellulare a seguito di ambedue le aggiunte è stata 28 mM, che promuoveva efflusso di  $\text{Cl}^-$  in risposta a attivazione di  $\Delta\text{F508-CFTR}$  e la depolarizzazione della membrana risultante è stata otticamente monitorata usando i coloranti sensori di voltaggio basati su FRET.

### 3. Soluzioni

Soluzione bagno #1: (in mM) NaCl 160, KCl 4.5,  $\text{CaCl}_2$  2,  $\text{MgCl}_2$  1, HEPES 10, pH 7.4 con NaOH.

Soluzione bagno priva di cloruro: I sali Cloruro in Soluzione bagno #1 sono sostituiti con sali gluconato.

CC2-DMPE: Preparato come una soluzione stock 10 mM in DMSO e conservato a  $-20^\circ\text{C}$ .

DiSBAC<sub>2</sub>(3): Preparato come uno stock 10 mM in DMSO e conservato a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 4. Coltura Cellulare

Fibroblasti murini NIH3T3 esprimenti stabilmente  $\Delta\text{F508-CFTR}$  sono usati per misurazioni ottiche di potenziale di membrana. Le cellule sono mantenute a  $37^\circ\text{C}$  in 5%  $\text{CO}_2$  e 90% di umidità in terreno di Dulbecco modificato da Eagle supplementato con 2 mM di glutamina, 10% di siero bovino fetale, 1X NEAA,  $\beta$ -ME, 1X pen/strep, e 25 mM di HEPES in fiasche di coltura di 175  $\text{cm}^2$ . Per tutti i saggi ottici, le cellule sono state seminate a 30000/pozzetto in piastre a 384 pozzetti rivestite con matrigel e coltivate per 2 h a  $37^\circ\text{C}$  prima della coltura a  $27^\circ\text{C}$  per 24 h per il saggio di potenziatore. Per i saggi di correzione, le cellule sono coltivate a  $27^\circ\text{C}$  oppure a  $37^\circ\text{C}$  con e senza composti per 16 - 24 ore.

### Saggi Elettrofisiologici per saggiare le proprietà di modulazione di $\Delta\text{F508-CFTR}$ di composti

#### 1. Saggio con Camera di Ussing

Esperimenti con camera di Ussing sono stati compiuti su cellule epiteliali polarizzate esprimenti  $\Delta F508$ -CFTR per caratterizzare ulteriormente i modulatori di  $\Delta F508$ -CFTR nei saggi ottici. Cellule epiteliali FRT <sup>$\Delta F508$ -CFTR</sup> cresciute su inserti per coltura cellulare Costar Snapwell sono state montate in una camera di Ussing (Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA), e i monostrati sono stati continuamente messi in corto-circuito usando un Sistema di Blocco del Voltaggio (Department of Bioengineering, University of Iowa, IA, e, Physiologic Instruments, Inc., San Diego, CA). La resistenza transepiteliale è stata misurata applicando un impulso di 2-mV. Sotto queste condizioni, gli epiteli FRT dimostravano resistenze di 4 K $\Omega$ /cm<sup>2</sup> o più. Le soluzioni sono state mantenute a 27°C e fatte gorgogliare con aria. Il potenziale di offset dell'elettrodo e la resistenza dei fluidi sono stati corretti usando un inserto senza cellule. Sotto queste condizioni, la corrente riflette il flusso di Cl<sup>-</sup> attraverso  $\Delta F508$ -CFTR espresso nella membrana apicale. L' $I_{SC}$  è stata acquisita digitalmente usando una interfaccia MP100A-CE e un software AcqKnowledge (v3.2.6; BIOPAC Systems, Santa Barbara, CA).

## 2. Identificazione di Composti di Correzione

Un tipico protocollo utilizzava un gradiente di concentrazione di Cl<sup>-</sup> di membrana da basolaterale a apicale. Per instaurare questo gradiente, Ringer normale è stato usato sulla membrana basolaterale, mentre invece NaCl apicale è stato sostituito con sodio gluconato equimolare (titolato a pH 7.4 con NaOH) per dare un grande gradiente di concentrazione di Cl<sup>-</sup> attraverso l'epitelio. Tutti gli esperimenti sono stati compiuti con monostrati intatti. Per attivare completamente  $\Delta F508$ -CFTR, forskolin (10  $\mu$ M) e l'inibitore di PDE, IBMX (100  $\mu$ M), sono stati applicati seguito dall'aggiunta del potenziatore di CFTR, genisteina (50  $\mu$ M). Come osservato in altri tipi cellulari, l'incubazione a basse temperature di cellule FRT stabilmente esprimenti  $\Delta F508$ -CFTR aumenta la densità funzionale di CFTR nella membrana plasmatica. Per determinare l'attività di correzione di composti, le cellule sono state incubate

con 10  $\mu\text{M}$  del composto da testare per 24 ore a 37°C e sono state successivamente lavate 3X prima della registrazione. L' $I_{\text{SC}}$  mediata da cAMP e genisteina in cellule trattate con composto è stata normalizzata rispetto ai controlli a 27°C e 37°C e espressa come attività percentuale. La pre-incubazione delle cellule con il composto di correzione aumentava significativamente l' $I_{\text{SC}}$  mediata da cAMP e genisteina rispetto ai controlli a 37°C.

### 3. Identificazione di Composti Potenziatori

Un tipico protocollo utilizzava un gradiente di concentrazione di  $\text{Cl}^-$  di membrana da basolaterale a apicale. Per instaurare questo gradiente, Ringer normale è stato usato sulla membrana basolaterale ed è stata permeabilizzata con nistatina (360  $\mu\text{g/ml}$ ), mentre invece  $\text{NaCl}$  apicale è stato sostituito con sodio gluconato equimolare (titolato a pH 7.4 con  $\text{NaOH}$ ) per dare un grande gradiente di concentrazione di  $\text{Cl}^-$  attraverso l'epitelio. Tutti gli esperimenti sono stati compiuti 30 min dopo permeabilizzazione con nistatina. Forskolin (10  $\mu\text{M}$ ) e tutti i composti da testare sono stati aggiunti a ambedue i lati degli inserti di coltura cellulare. L'efficacia dei potenziatori di  $\Delta\text{F508-CFTR}$  putativi è stata confrontata con quella del potenziatore noto, genisteina.

### 4. Soluzioni

Soluzione basolaterale (in mM):  $\text{NaCl}$  (135),  $\text{CaCl}_2$  (1.2),  $\text{MgCl}_2$  (1.2),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (2.4),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.6), acido N-2-idrossietilpiperazina-N'-2-etansolfonico (HEPES) (10), e destrosio (10). La soluzione è stata titolata a pH 7.4 con  $\text{NaOH}$ .

Soluzione apicale (in mM): Uguale alla soluzione basolaterale con  $\text{NaCl}$  sostituito con  $\text{Na Gluconato}$  (135).

### 5. Coltura Cellulare

Cellule epiteliali di ratto Fisher (FRT) esprimenti  $\Delta\text{F508-CFTR}$  ( $\text{FRT}^{\Delta\text{F508-CFTR}}$ ) sono state usate per esperimenti con camera di Ussing per i modulatori di  $\Delta\text{F508-CFTR}$  putativi identificati dai nostri saggi ottici. Le cellule sono state coltivate su inserti per coltura cellulare

Costar Snapwell e coltivate per cinque giorni a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> in terreno F-12 di Ham modificato da Coon supplementato con 5% di siero di vitello fetale, penicillina a 100 U/ml, e streptomycin a 100 µg/ml. Prima dell'uso per caratterizzare l'attività di potenziatore di composti, le cellule sono state incubate a 27°C per 16 - 48 h per correggere il ΔF508-CFTR. Per determinare l'attività di correzione dei composti, le cellule sono state incubate a 27°C oppure a 37°C con e senza i composti per 24 ore.

#### 6. Registrazioni a cellula intera

La corrente attraverso ΔF508-CFTR macroscopica ( $I_{\Delta F508}$ ) in cellule NIH3T3 corrette con temperatura e con composto da testare stabilmente esprime ΔF508-CFTR è stata monitorata usando la registrazione a cellula intera a patch perforato. In breve, registrazioni di blocco del voltaggio di  $I_{\Delta F508}$  sono state compiute a temperatura ambiente usando un amplificatore di patch-clamp Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Foster City, CA). Tutte le registrazioni sono state acquisite ad una frequenza di campionamento di 10 kHz e passate attraverso filtro passa-basso a 1 kHz. Le pipette avevano una resistenza di 5 - 6 MΩ quando riempite con la soluzione intracellulare. Sotto queste condizioni di registrazione, il potenziale di inversione calcolato per Cl<sup>-</sup> ( $E_{Cl}$ ) a temperatura ambiente è stato -28 mV. Tutte le registrazioni avevano una resistenza della saldatura di > 20 GΩ e una resistenza in serie < 15 MΩ. La generazione di impulsi, l'acquisizione dei dati, e le analisi sono state compiute usando un PC dotato di una interfaccia Digidata 1320 A/D insieme con Clampex 8 (Axon Instruments Inc.). Il bagno conteneva < 250 µl di soluzione salina ed era continuamente perfuso ad una velocità di 2 ml/min usando un sistema a perfusione guidato dalla gravità.

#### 7. Identificazione di Composti di Correzione

Per determinare l'attività di correzione di composti per aumentare la densità di ΔF508-CFTR funzionale nella membrana plasmatica, noi abbiamo usato le tecniche di registrazione a patch perforato sopra descritte per misurare la densità di corrente dopo 24 h di trattamento con i

composti di correzione. Per attivare completamente  $\Delta F508$ -CFTR, 10  $\mu\text{M}$  di forskolin e 20  $\mu\text{M}$  di genisteina sono stati aggiunti alle cellule. Sotto le nostre condizioni di registrazione, la densità di corrente dopo 24-h di incubazione a 27°C era più alta di quella osservata dopo 24-h di incubazione a 37°C. Questi risultati sono in accordo con i noti effetti di incubazione a bassa temperatura sulla densità di  $\Delta F508$ -CFTR nella membrana plasmatica. Per determinare gli effetti di composti di correzione sulla densità di corrente attraverso CFTR, le cellule sono state incubate con 10  $\mu\text{M}$  del composto da testare per 24 ore a 37°C e la densità di corrente è stata confrontata rispetto ai controlli a 27°C e a 37°C (% attività). Prima della registrazione, le cellule sono state lavate 3X con terreno di registrazione extracellulare per rimuovere qualunque composto da testare rimanente. La pre-incubazione con 10  $\mu\text{M}$  di composti di correzione aumentava significativamente la corrente dipendente da cAMP e da genisteina rispetto ai controlli a 37°C.

#### 8. Identificazione di Composti Potenziatori

La capacità di potenziatori di  $\Delta F508$ -CFTR di aumentare la corrente di  $\text{Cl}^-$  attraverso  $\Delta F508$ -CFTR macroscopica ( $I_{\Delta F508}$ ) in cellule NIH3T3 stabilmente esprimenti  $\Delta F508$ -CFTR è stata indagata anche usando tecniche di registrazione a patch perforato. I potenziatori identificati dai saggi ottici evocavano un aumento dose-dipendente in  $I_{\Delta F508}$  con similare potenza e efficacia osservata nei saggi ottici. In tutte le cellule esaminate, il potenziale di inversione prima e durante l'applicazione del potenziatore è stato intorno a -30 mV, che è l' $E_{\text{Cl}}$  calcolato (-28 mV).

#### 9. Soluzioni

Soluzione intracellulare (in mM): Cs-aspartato (90), CsCl (50),  $\text{MgCl}_2$  (1), HEPES (10), e 240  $\mu\text{g/ml}$  amfotericina-B (pH aggiustato a 7.35 con CsOH).

Soluzione extracellulare (in mM): N-metil-D-glucammina (NMDG)-Cl (150),  $\text{MgCl}_2$  (2),  $\text{CaCl}_2$  (2), HEPES (10) (pH aggiustato a 7.35 con HCl).

### 10. Coltura Cellulare

Fibroblasti murini NIH3T3 stabilmente esprimenti  $\Delta F508$ -CFTR sono usati per registrazioni a cellula intera. Le cellule sono mantenute a 37°C in 5% di CO<sub>2</sub> e 90% di umidità in terreno di Dulbecco modificato da Eagle supplementato con 2 mM di glutammina, 10% di siero bovino fetale, 1X NEAA,  $\beta$ -ME, 1X pen/strep, e 25 mM di HEPES in fiasche di coltura di 175 cm<sup>2</sup>. Per registrazioni a cellula intera, 2500 - 5000 cellule sono state seminate su coprioggetti di vetro rivestiti di poli-L-lisina e coltivate per 24 - 48 h a 27°C prima dell'uso per testare l'attività di potenziatori; e incubate con oppure senza il composto di correzione a 37°C per misurare l'attività di correttori.

### 11. Registrazioni a singolo canale

Le attività di singolo canale di  $\Delta F508$ -CFTR temperatura-corretto stabilmente espresso in cellule NIH3T3 e le attività di composti potenziatori sono state osservate usando patch di membrana dentro-fuori escissa. In breve, registrazioni di blocco del voltaggio di attività di singolo canale sono state compiute a temperatura ambiente con un amplificatore di patch-clamp Axopatch (Axon Instruments Inc.). Tutte le registrazioni sono state acquisite ad una frequenza di campionamento di 10 kHz e passata attraverso filtro passa-basso a 400 Hz. Le pipette per il patch sono state prodotte da vetro #7052 Corning Kovar Sealing (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) e avevano una resistenza di 5 - 8 M $\Omega$  quando riempite con la soluzione extracellulare. Il  $\Delta F508$ -CFTR è stato attivato dopo escissione, mediante aggiunta di 1 mM di Mg-ATP, e 75 nM della protein-chinasi cAMP-dipendente, subunità catalitica (PKA; Promega Corp. Madison, WI). Dopo che l'attività di canale si era stabilizzata, il patch è stato perfuso usando un sistema a microperfusione guidato dalla gravità. Il flusso verso l'interno è stato posto adiacente al patch, portando a completo scambio di soluzione entro 1 - 2 sec. Per mantenere attività di  $\Delta F508$ -CFTR durante la rapida perfusione, l'inibitore di fosfatasi aspecifico F<sup>-</sup> (10 mM NaF) è stato aggiunto alla soluzione

del bagno. Sotto queste condizioni di registrazione, l'attività di canale rimaneva costante per tutta la durata della registrazione di patch (fino a 60 min). Correnti prodotte dal movimento di cariche positive dalle soluzioni da intra a extracellulari (anioni che si muovono nella direzione opposta) sono mostrate come correnti positive. Il potenziale di pipetta ( $V_p$ ) è stato mantenuto a 80 mV.

L'attività di canale è stata analizzata da patch di membrana contenenti  $\leq 2$  canali attivi. Il numero massimo di aperture simultanee determinava il numero di canali attivi durante il corso di un esperimento. Per determinare l'ampiezza della corrente di singolo canale, i dati registrati da 120 sec di attività di  $\Delta F508$ -CFTR sono stati filtrati "off-line" a 100 Hz e poi usati per costruire istogrammi di ampiezza a tutti i punti che sono stati adattati con funzioni multigaussiane usando software di analisi Bio-Patch (Bio-Logic Comp. Francia). La corrente microscopica totale e la probabilità di apertura ( $P_o$ ) sono state determinate da 120 sec di attività di canale. La  $P_o$  è stata determinata usando il software Bio-Patch oppure dalla relazione  $P_o = I/i(N)$ , dove  $I$  = corrente media,  $i$  = ampiezza della corrente di singolo canale, e  $N$  = numero di canali attivi nel patch.

### 12. Soluzioni

Soluzione extracellulare (in mM): NMDG (150), acido aspartico (150),  $CaCl_2$  (5),  $MgCl_2$  (2), e HEPES (10) (pH aggiustato a 7.35 con Tris base).

Soluzione intracellulare (in mM): NMDG-Cl (150),  $MgCl_2$  (2), EGTA (5), TES (10), e Tris base (14) (pH aggiustato a 7.35 con HCl).

### 13. Coltura Cellulare

Fibroblasti murini NIH3T3 stabilmente esprimenti  $\Delta F508$ -CFTR sono usati per registrazioni a patch-clamp di membrana escissa. Le cellule sono mantenute a 37°C in 5% di  $CO_2$  e 90% di umidità in terreno di Dulbecco modificato da Eagle supplementato con 2 mM di glutammina, 10% di siero bovino fetale, 1X NEAA,  $\beta$ -ME, 1X pen/strep, e 25 mM di HEPES

in fiasche per coltura di 175 cm<sup>2</sup>. Per registrazioni a singolo canale, 2500 - 5000 cellule sono state seminate su coprioggetti di vetro rivestiti di poli-L-lisina e coltivate per 24 - 48 h a 27°C prima dell'uso.

Usando le procedure descritte sopra, l'attività, cioè, le EC50, di Composto 1 è stata misurata ed è mostrata nella Tabella 18.

Tabella 18.

Categorie IC50/EC50: +++ <= 2.0 < ++ <= 5.0 < +		
Categorie Percentuale Attività: + <= 25.0 < ++ <= 100.0 < +++		
Comp.No.	EC50 Categorizzata	Massima Efficacia Categorizzata
1	+++	+++

ALTRE FORME DI REALIZZAZIONE

### RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica comprendente:  
acido 3-(6-(1-(2,2-difluorobenzo[d][1,3]diossol-5-il)ciclopropanocarbossammido)-3-metilpiridin-2-il)benzoico (Composto 1) Forma I in una quantità di 100 mg oppure 200 mg; e  
uno o più eccipienti selezionati tra un riempitivo, un disgregante, un tensioattivo, un diluente, un legante, un glidante, un lubrificante, un colorante, e una fragranza, oppure qualunque combinazione degli stessi,  
in cui la composizione farmaceutica è in forma di compressa.
2. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, in cui la composizione farmaceutica comprende almeno 30% in peso di Composto 1 Forma I rispetto al peso della composizione.
3. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 1 oppure 2, in cui la composizione farmaceutica comprende un riempitivo che è cellulosa microcristallina e è presente in una quantità che va da 10% in peso a 60% in peso rispetto al peso della composizione.
4. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 3, in cui la cellulosa microcristallina è presente in una quantità da 20% in peso a 45% in peso rispetto al peso della composizione.
5. Composizione farmaceutica secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui la composizione farmaceutica comprende un disgregante che è croscarmellosa sodica e è presente in una quantità che va da 1% in peso a 10% in peso rispetto al peso della composizione.
6. Composizione farmaceutica secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui la composizione farmaceutica comprende un tensioattivo che è sodio lauril solfato e è

presente in una quantità di 5% in peso o minore rispetto al peso della composizione.

7. Composizioni farmaceutiche secondo la rivendicazione 6, in cui il sodio lauril solfato è presente in una quantità che va da 0.3% in peso a 2.0% in peso rispetto al peso della compressa.

8. Composizione farmaceutica secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui la composizione farmaceutica comprende un legante selezionato tra polivinilpirrolidone, calcio fosfato dibasico, saccarosio, amido di mais, cellulosa modificata, oppure qualunque combinazione degli stessi.

9. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 8, in cui il legante è polivinilpirrolidone.

10. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 9, in cui il polivinilpirrolidone è presente in una quantità che va da 2% in peso a 3% in peso rispetto al peso della composizione.

11. Composizione farmaceutica secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui la composizione farmaceutica comprende un lubrificante che è magnesio stearato e è presente in una quantità che va da 0.50% in peso a 3.0% in peso rispetto al peso della composizione.

12. Composizione farmaceutica secondo qualunque delle rivendicazioni da 1 a 11 per uso nel trattamento di fibrosi cistica.

**Figure 1**

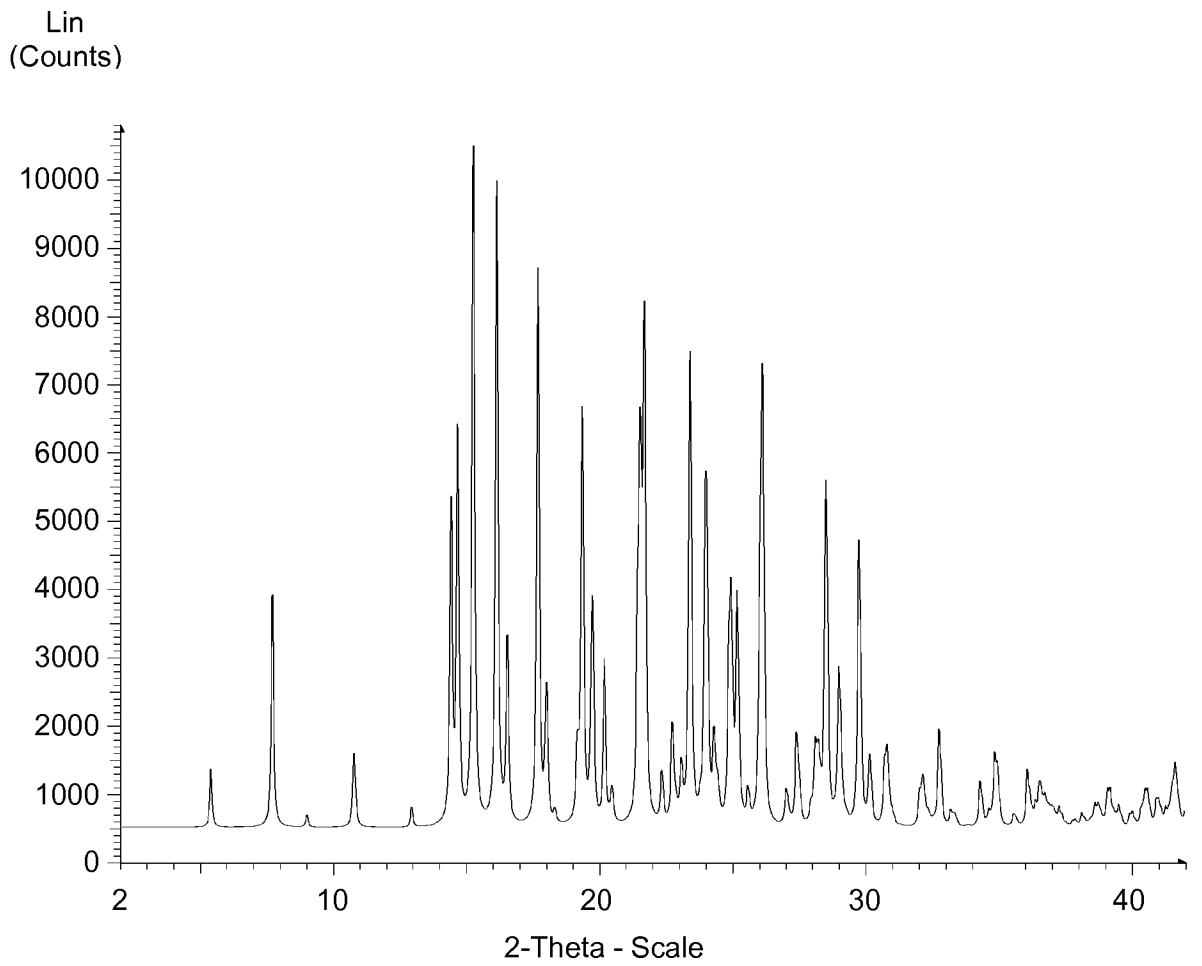


Figure 2

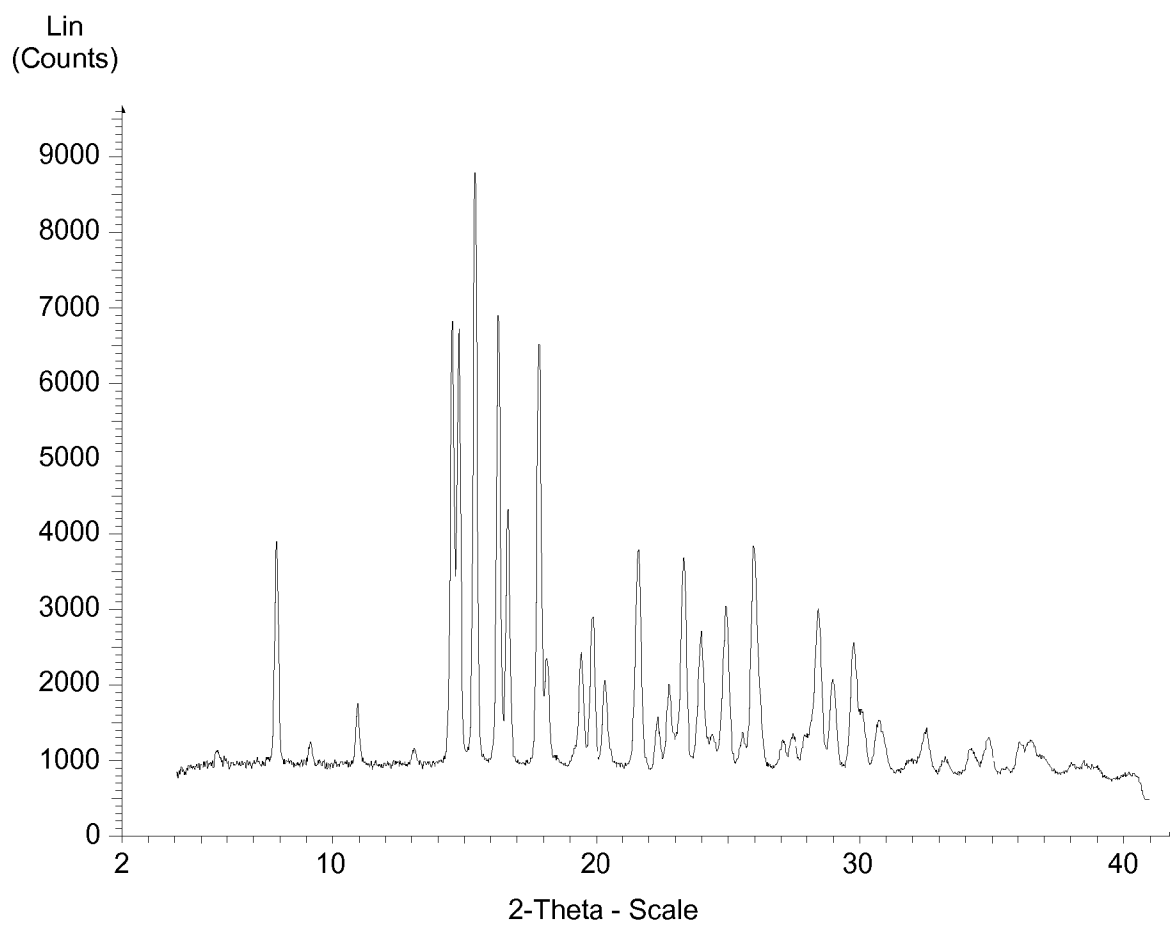


Figure 3

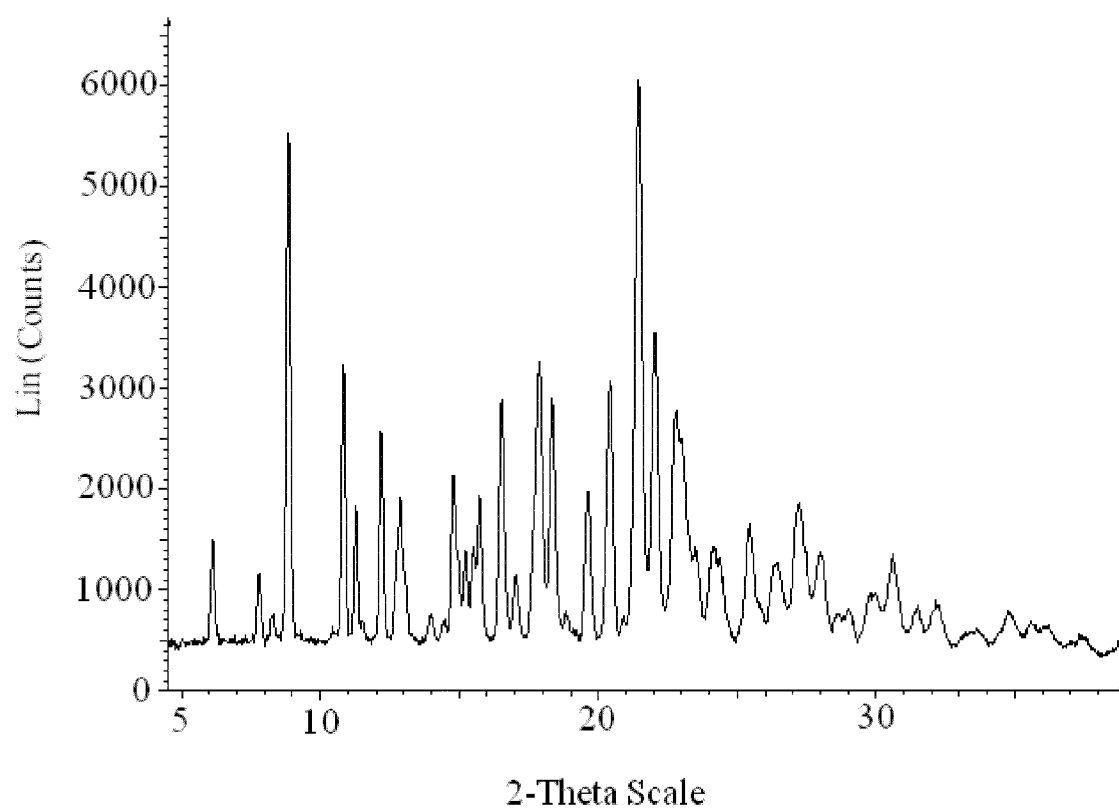


Figure 4

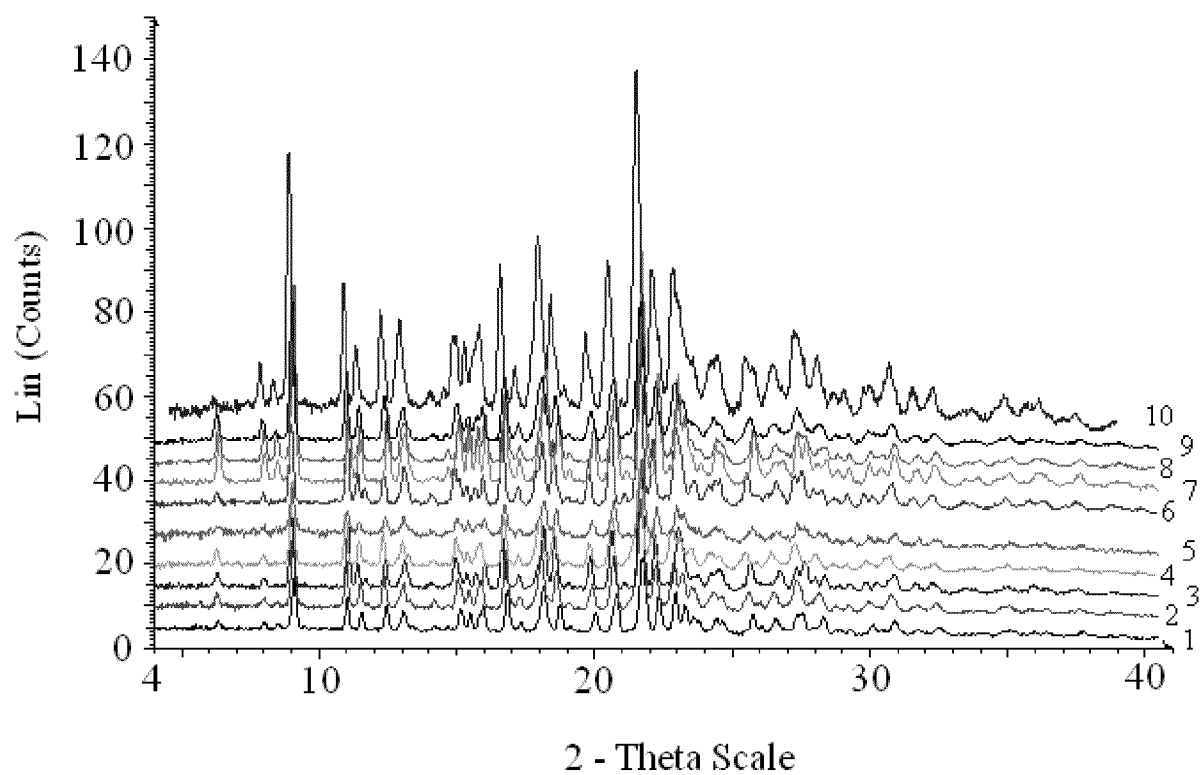


Figure 5

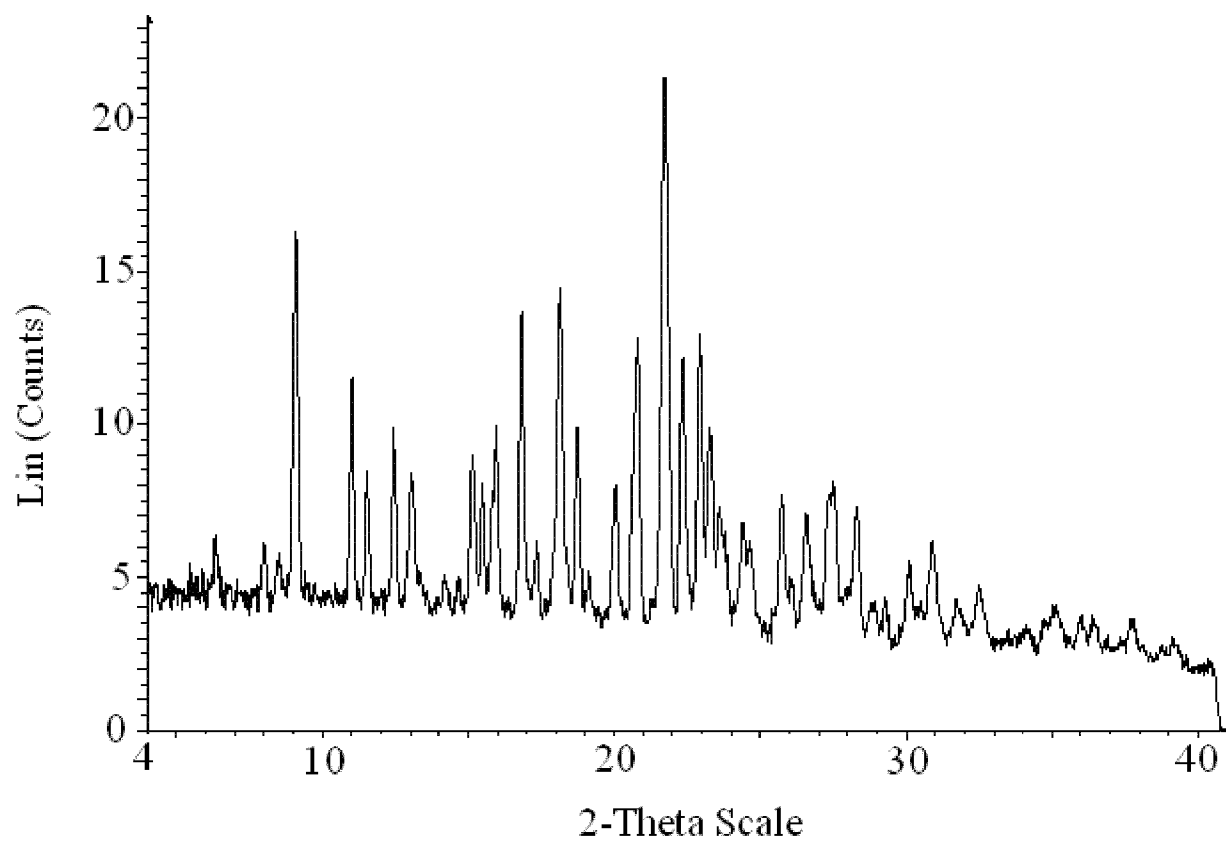


Figure 6

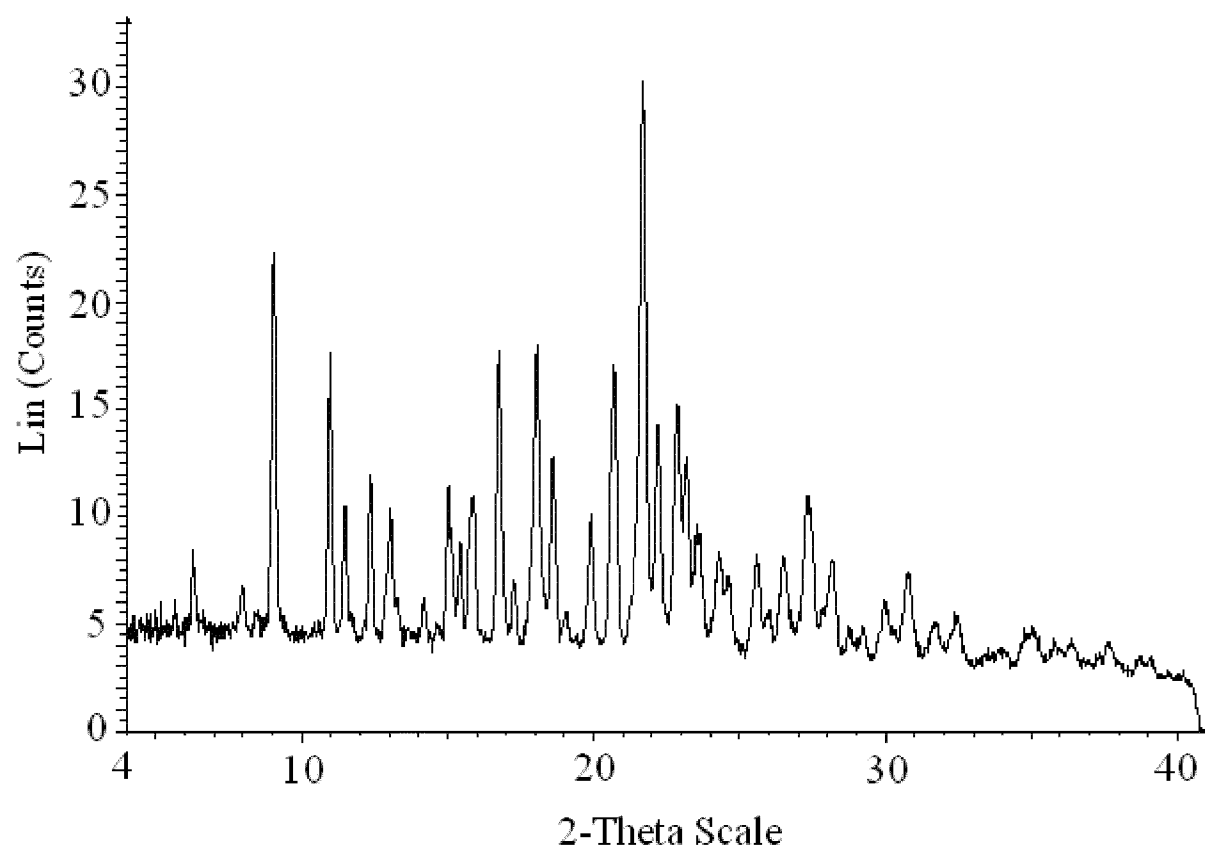


Figure 7

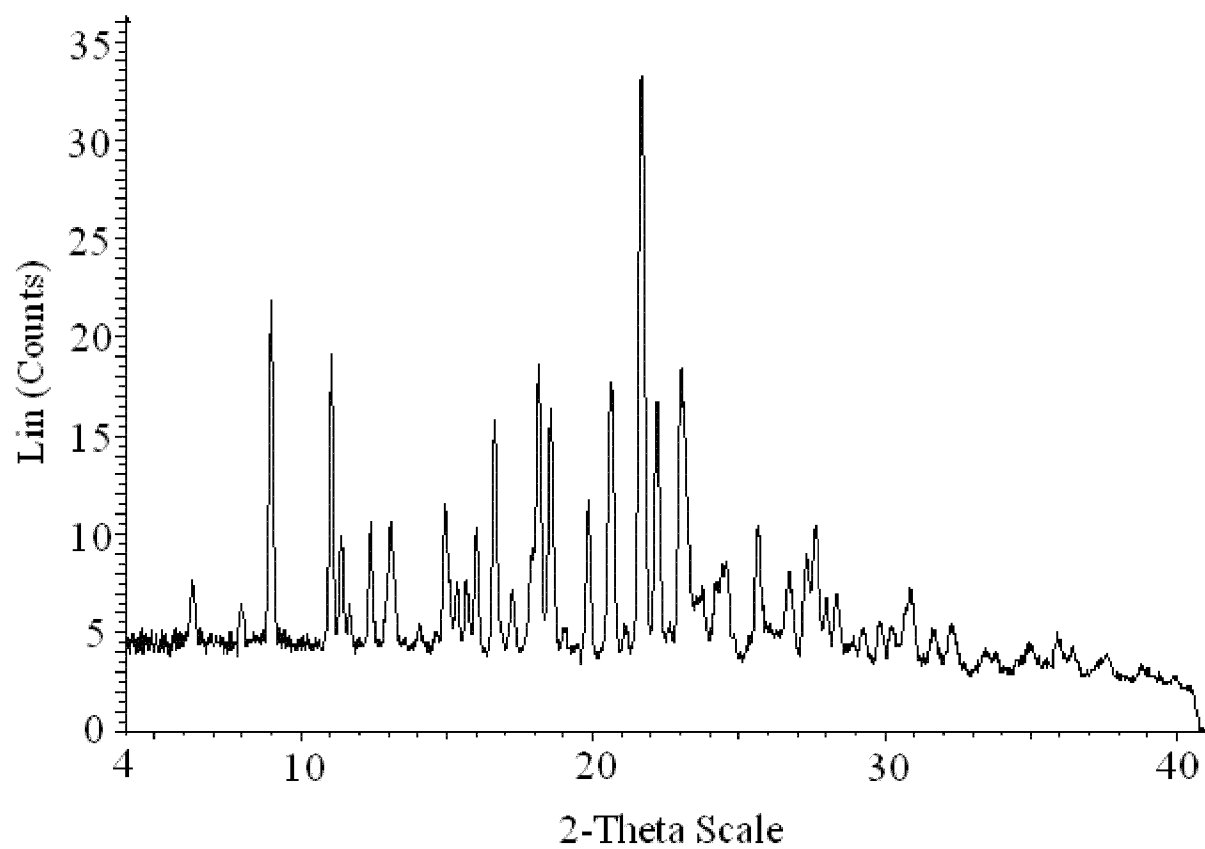


Figure 8

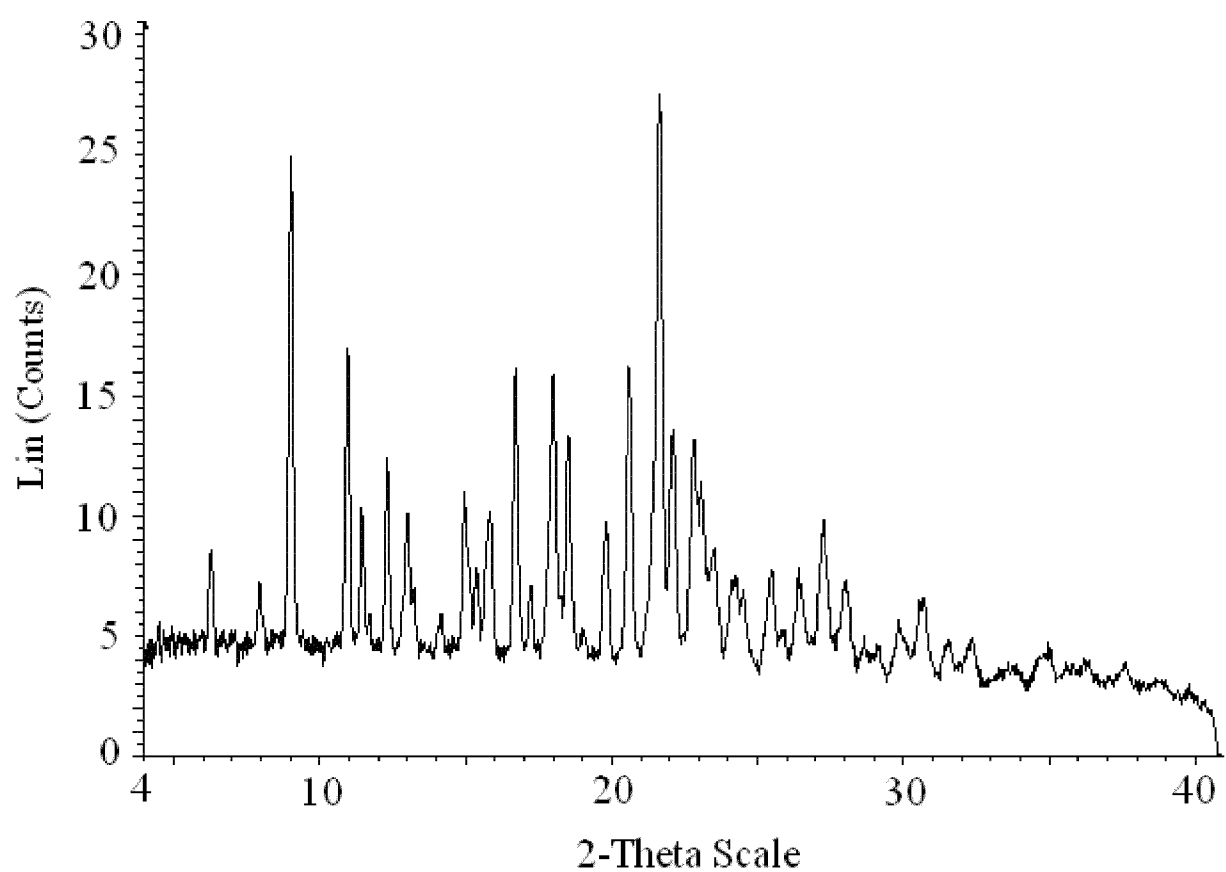


Figure 9

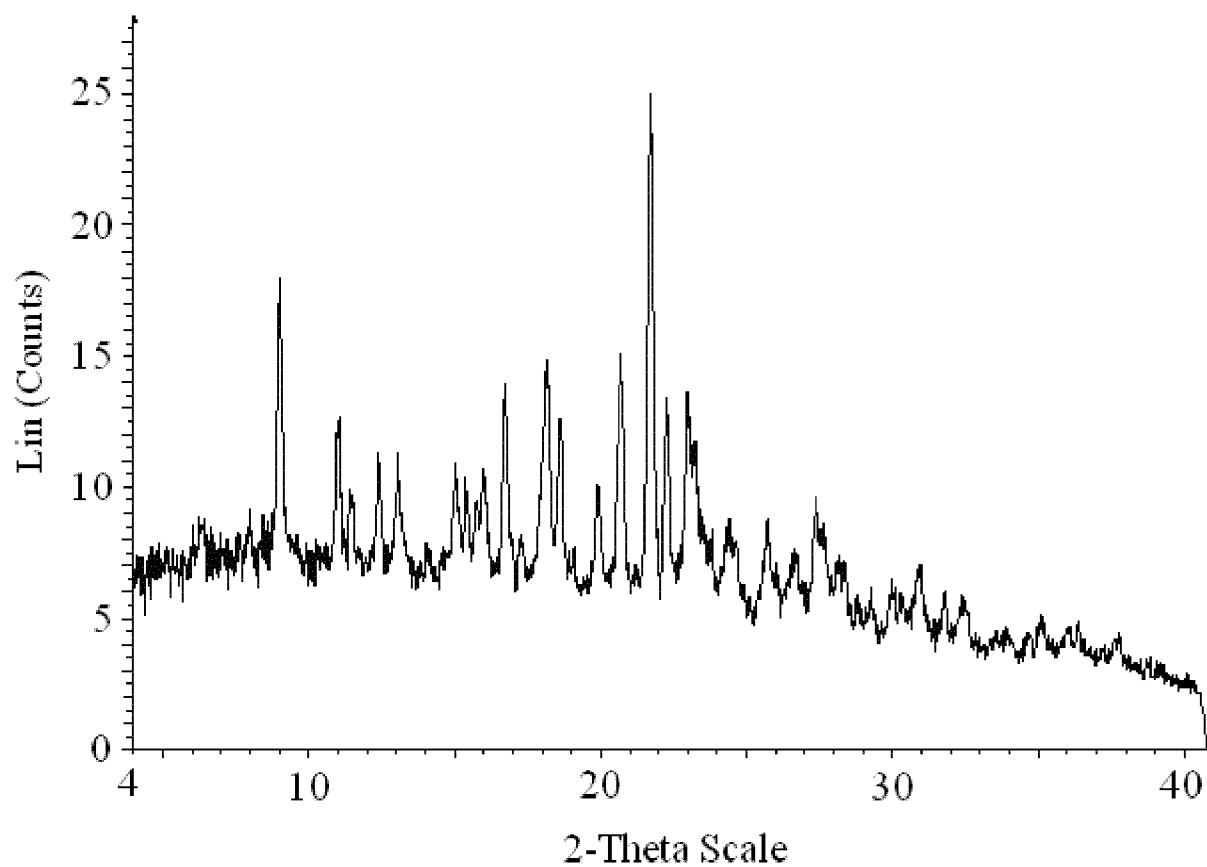


Figure 10

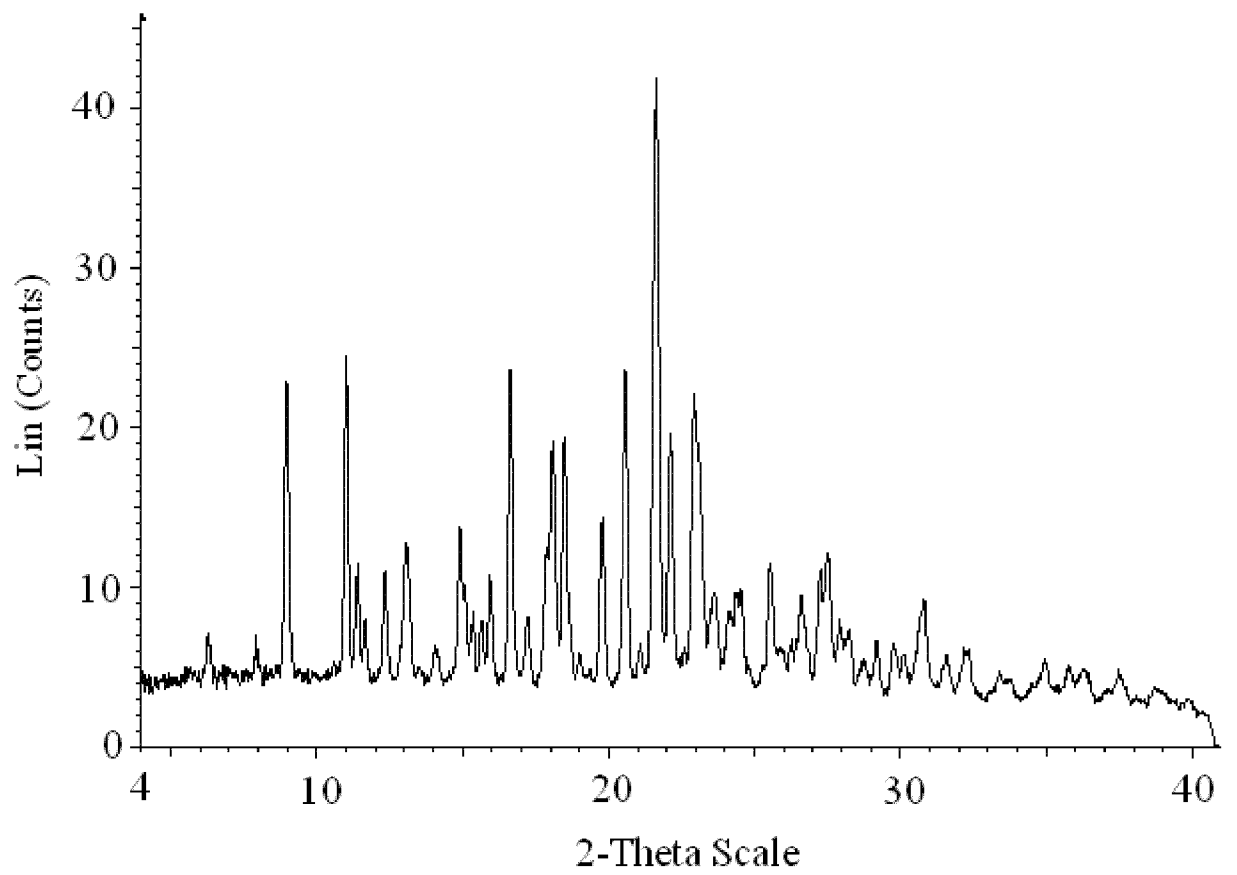


Figure 11

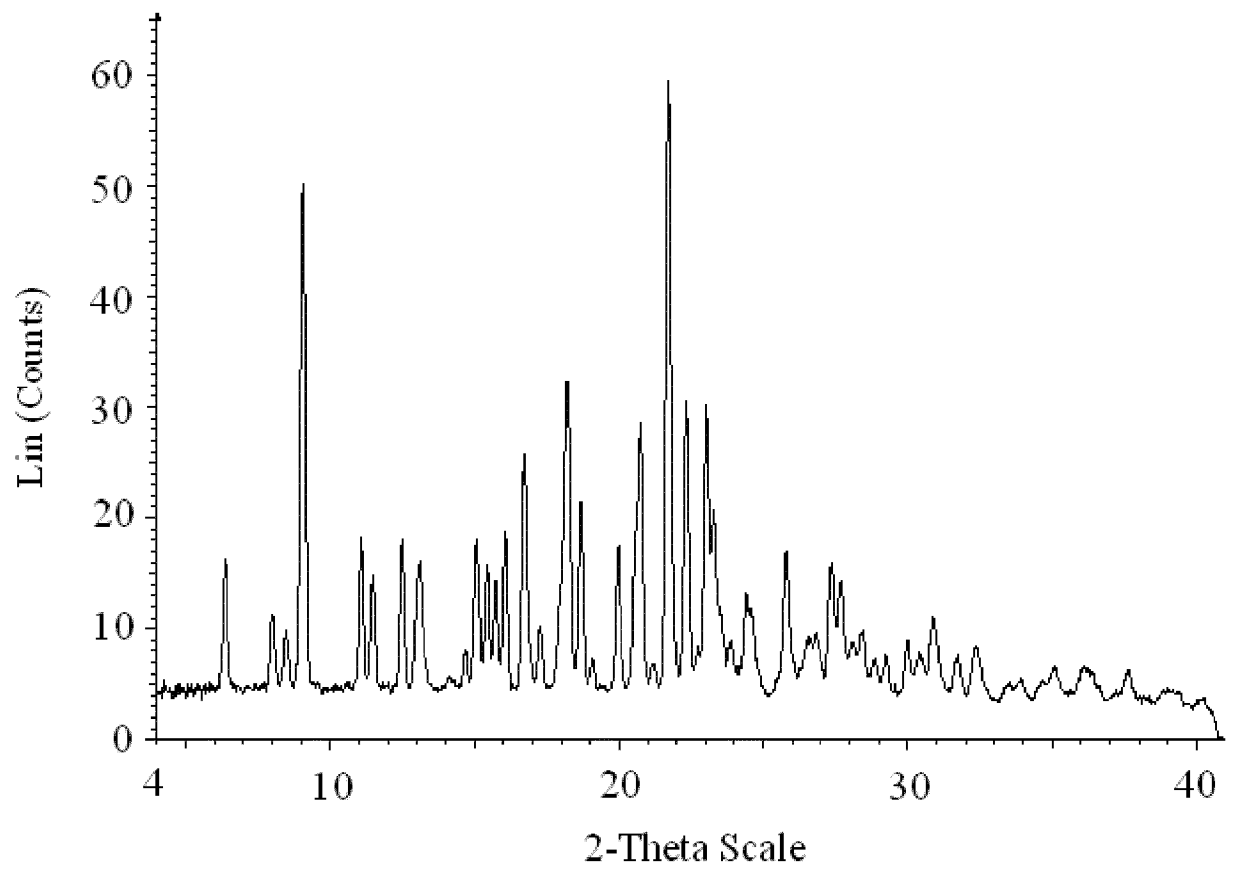


Figure 12

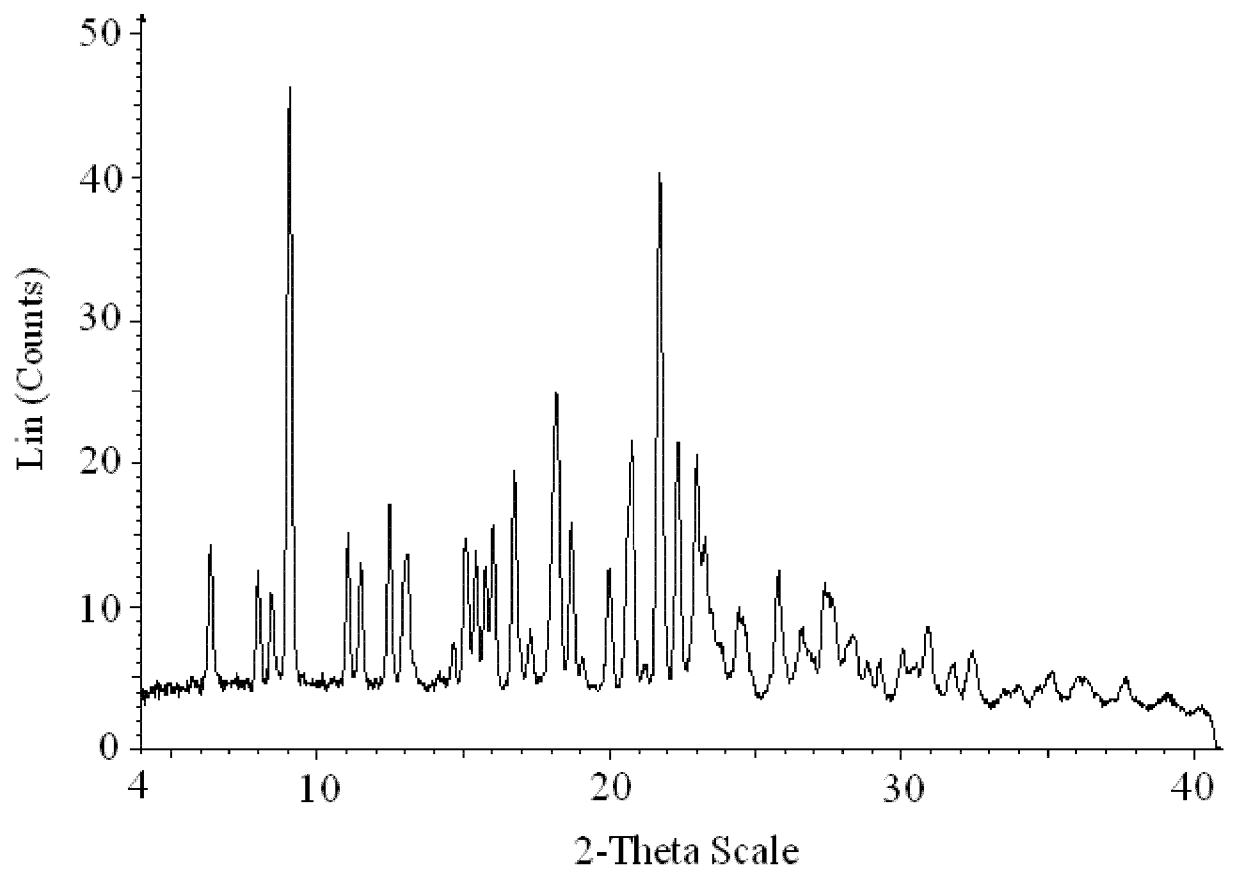


Figure 13

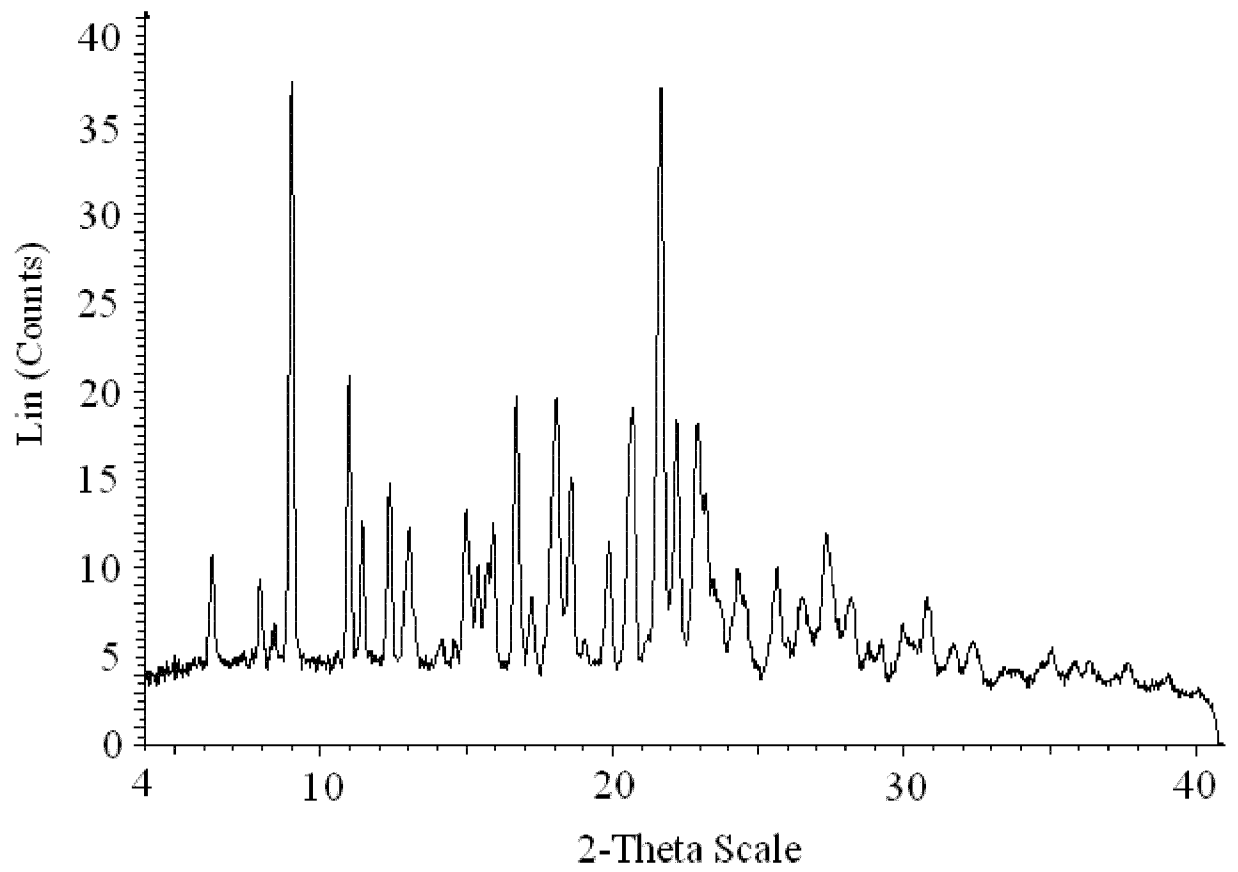


Figure 14

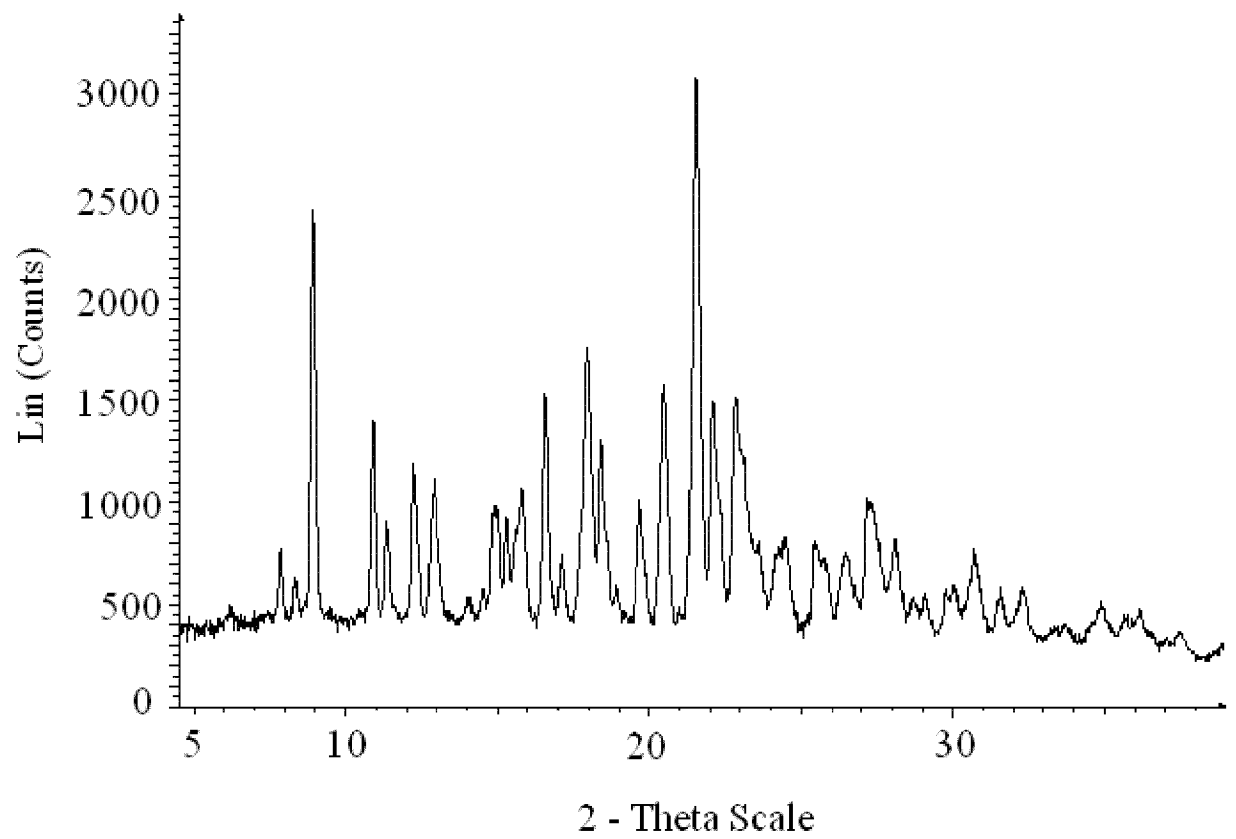


Figure 15

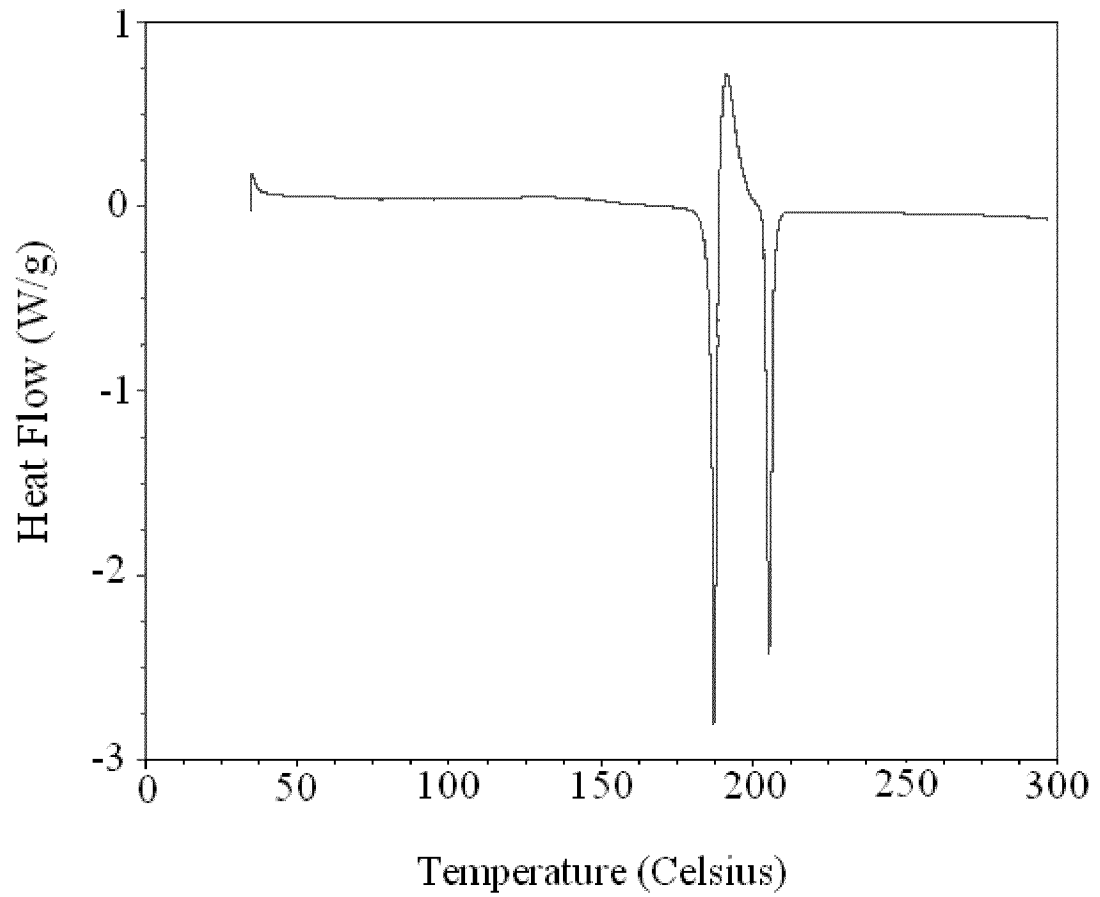


Figure 16

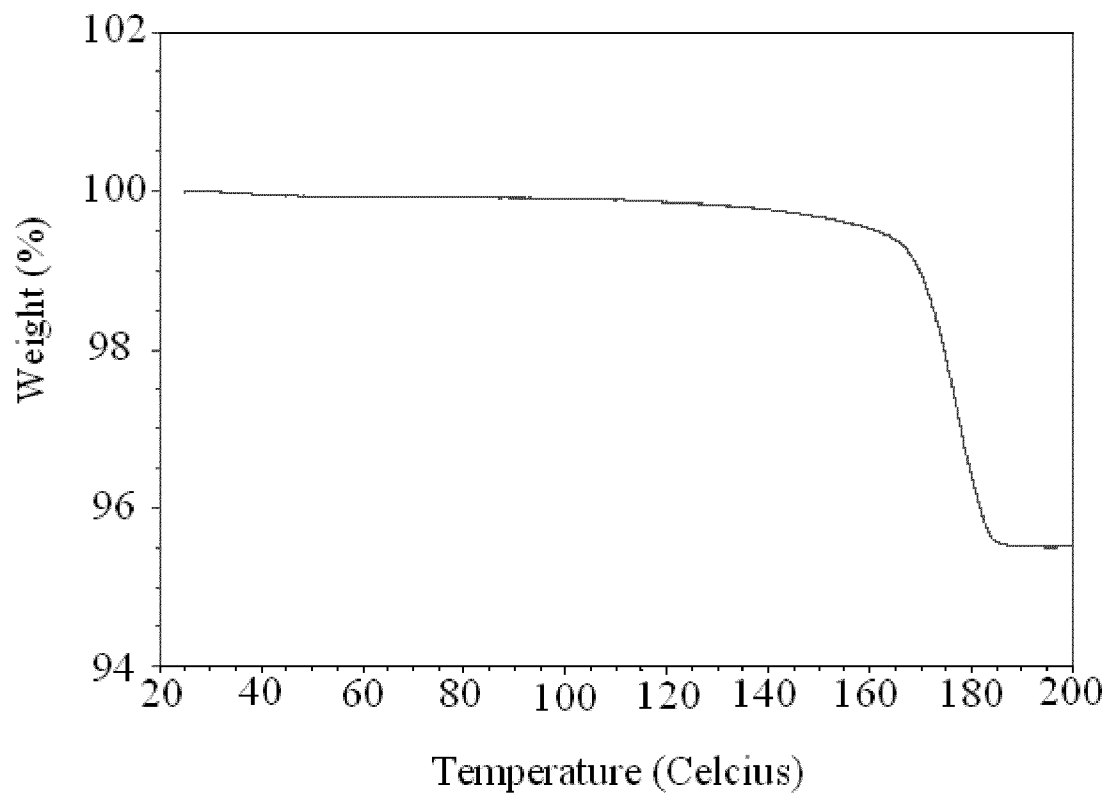


Figure 17

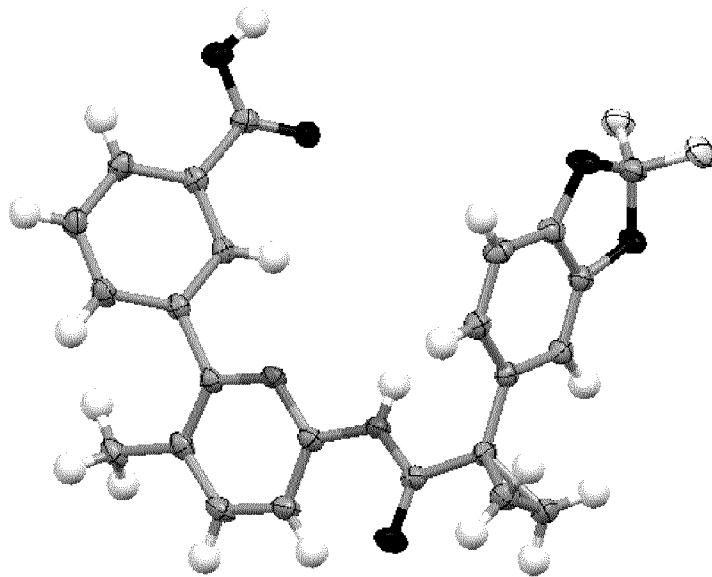


Figure 18

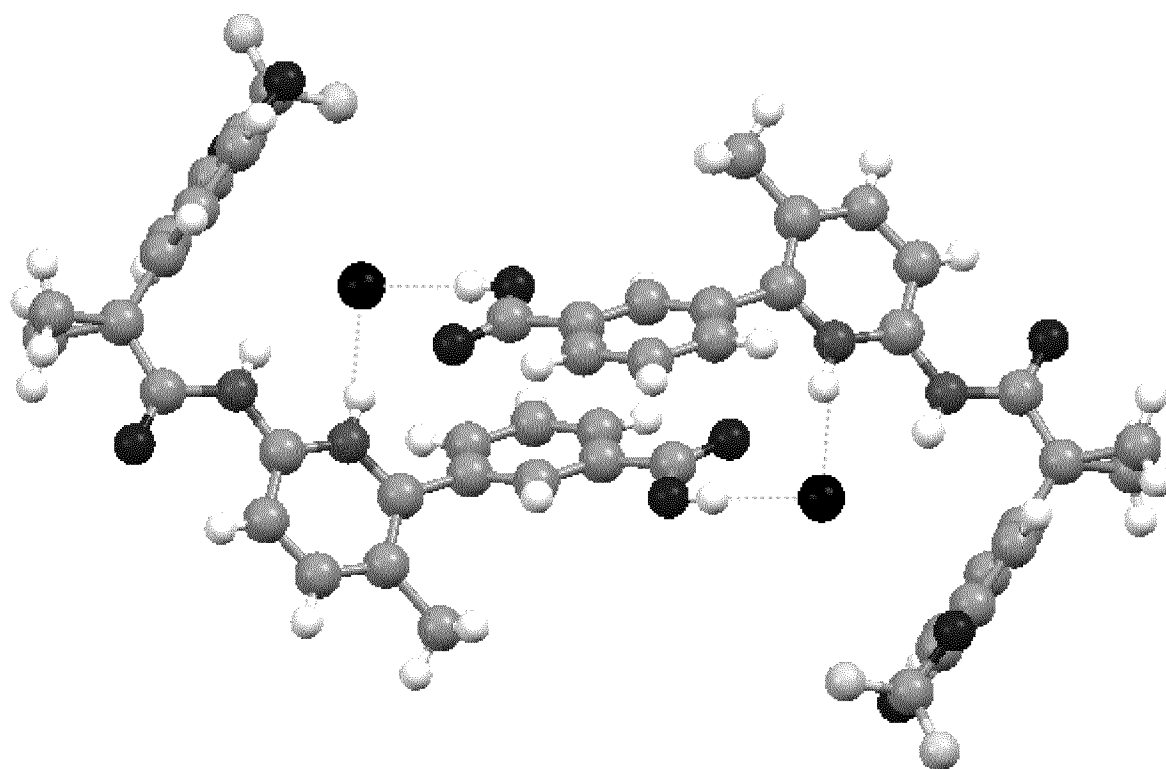


Figure 19

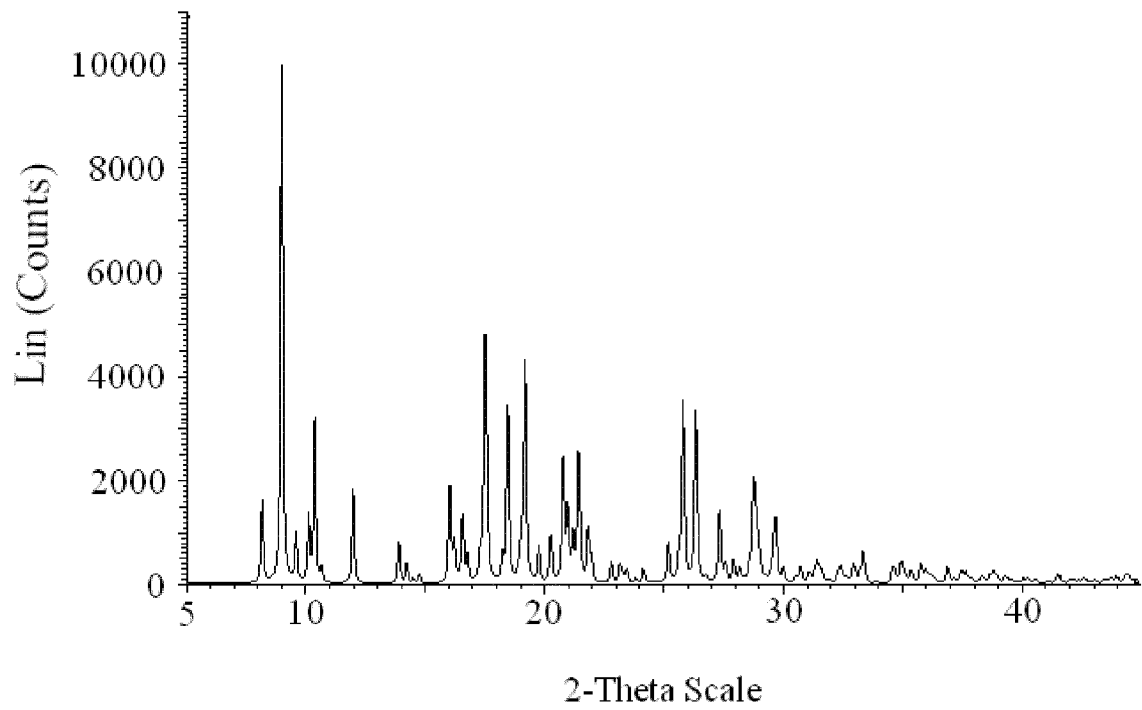


Figure 20

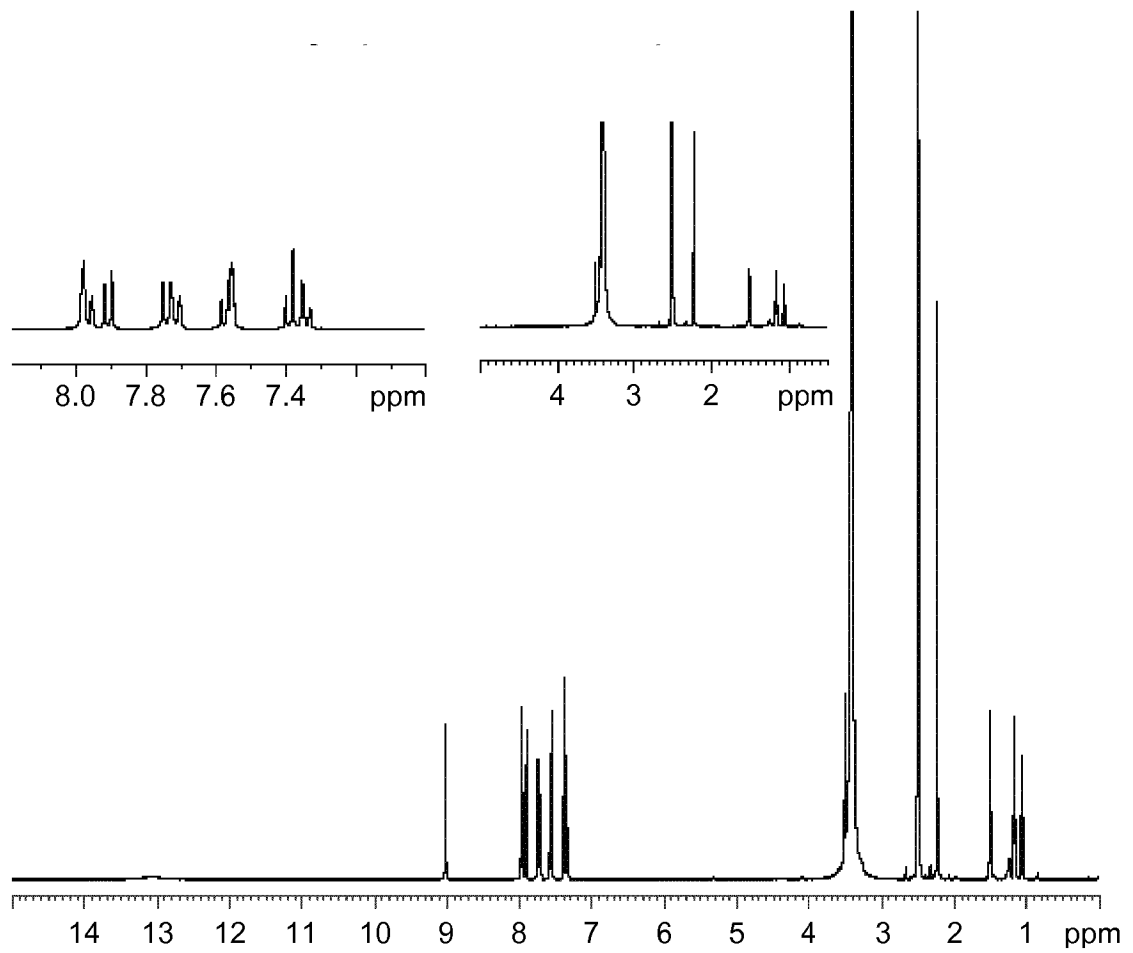


Figure 21

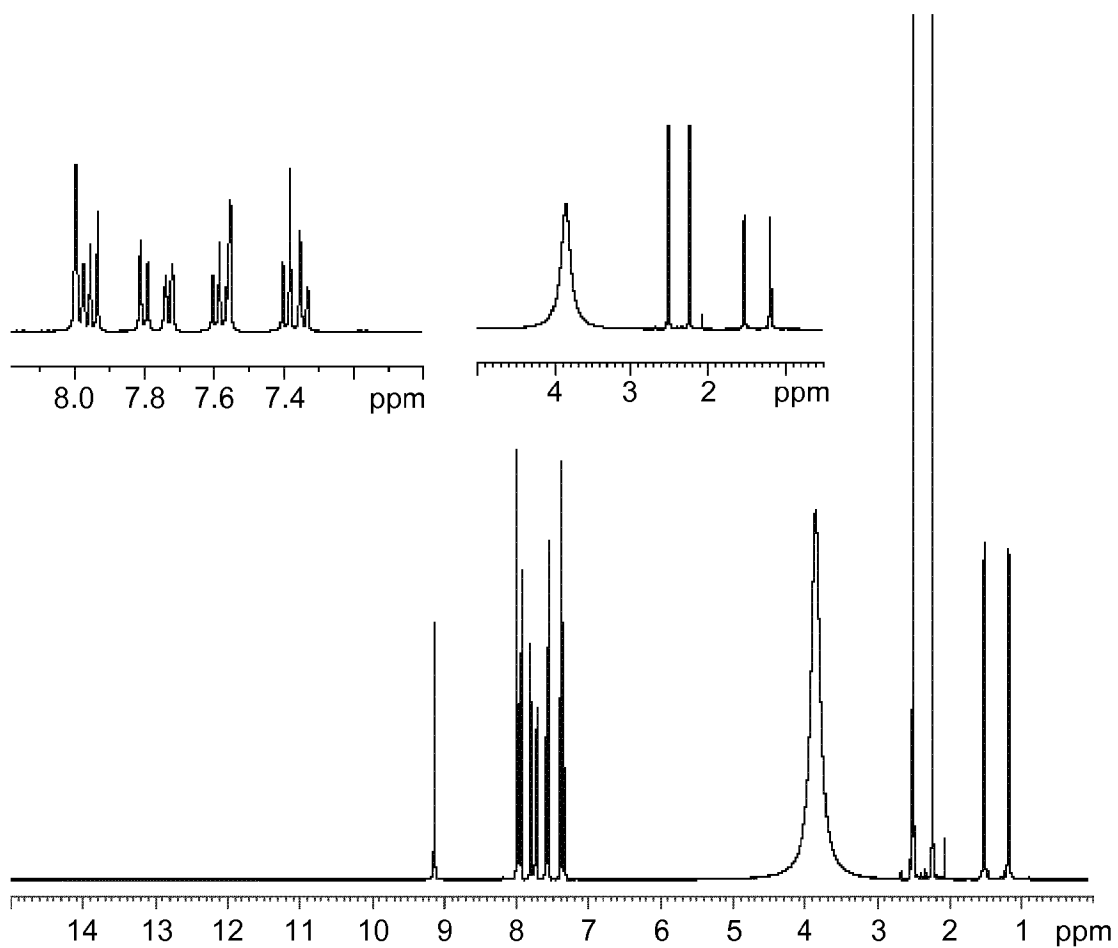


Figure 22

Heat Flow (W/g)

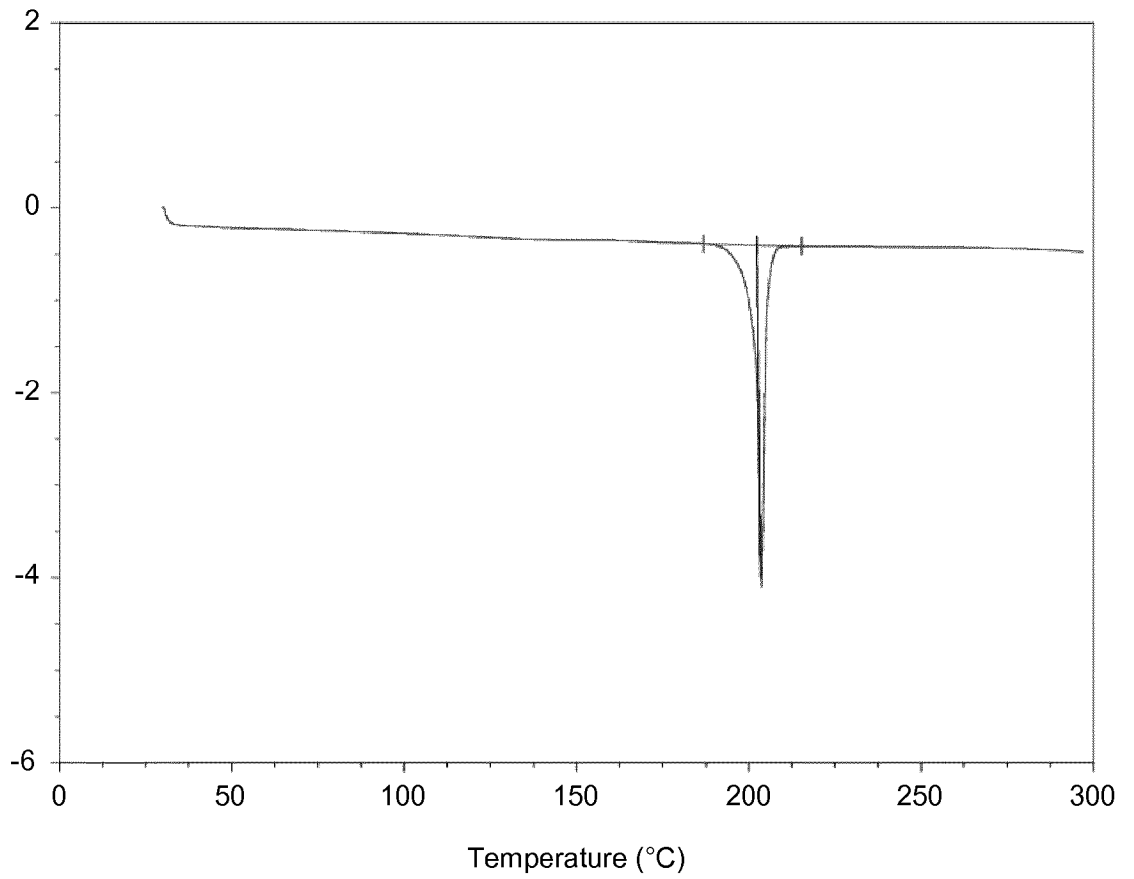


Figure 23

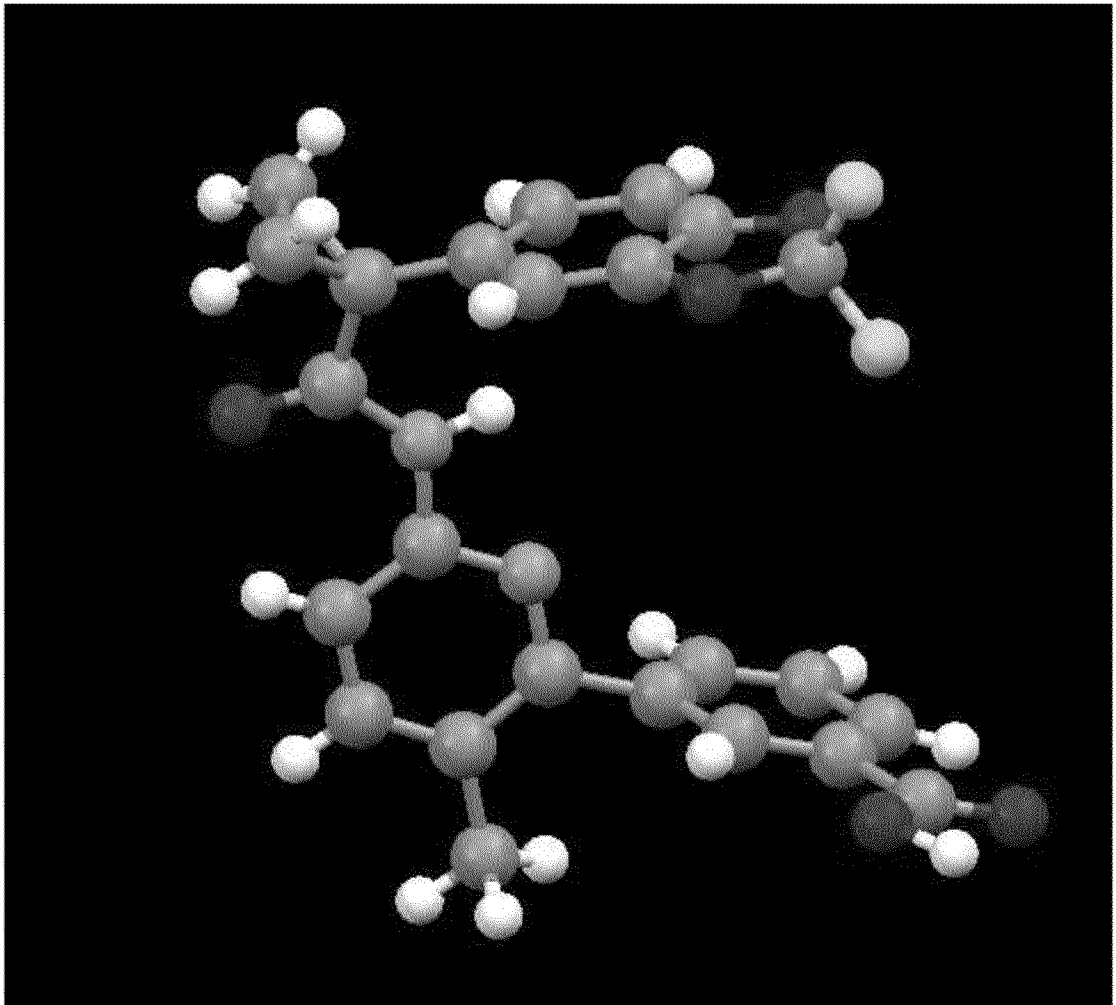


Figure 24

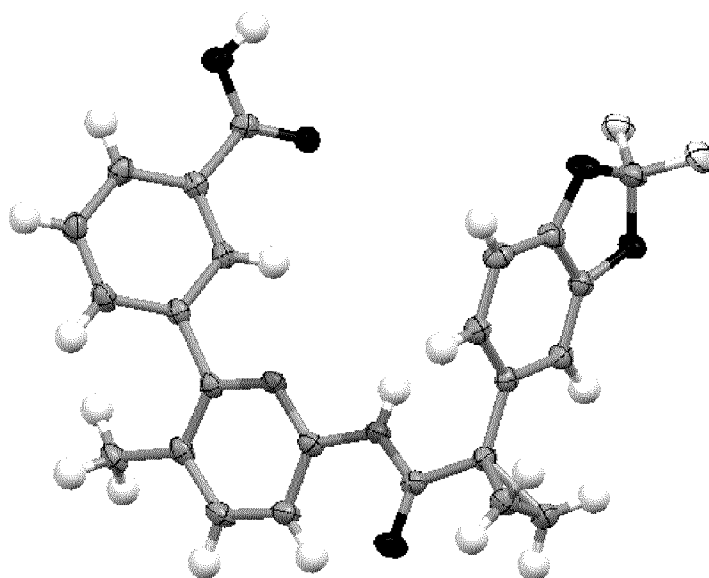


Figure 25

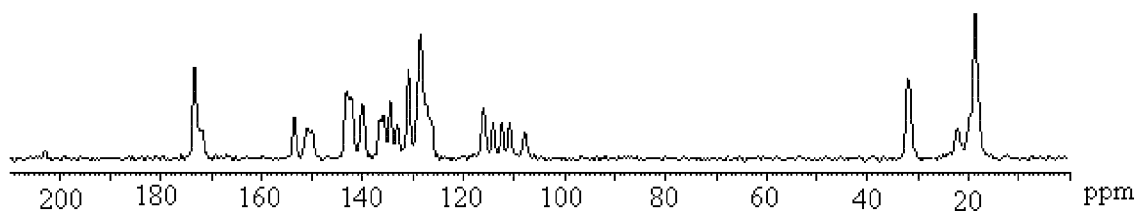


Figure 26

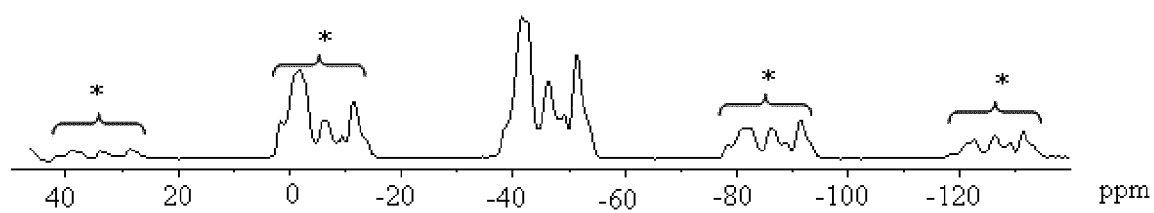
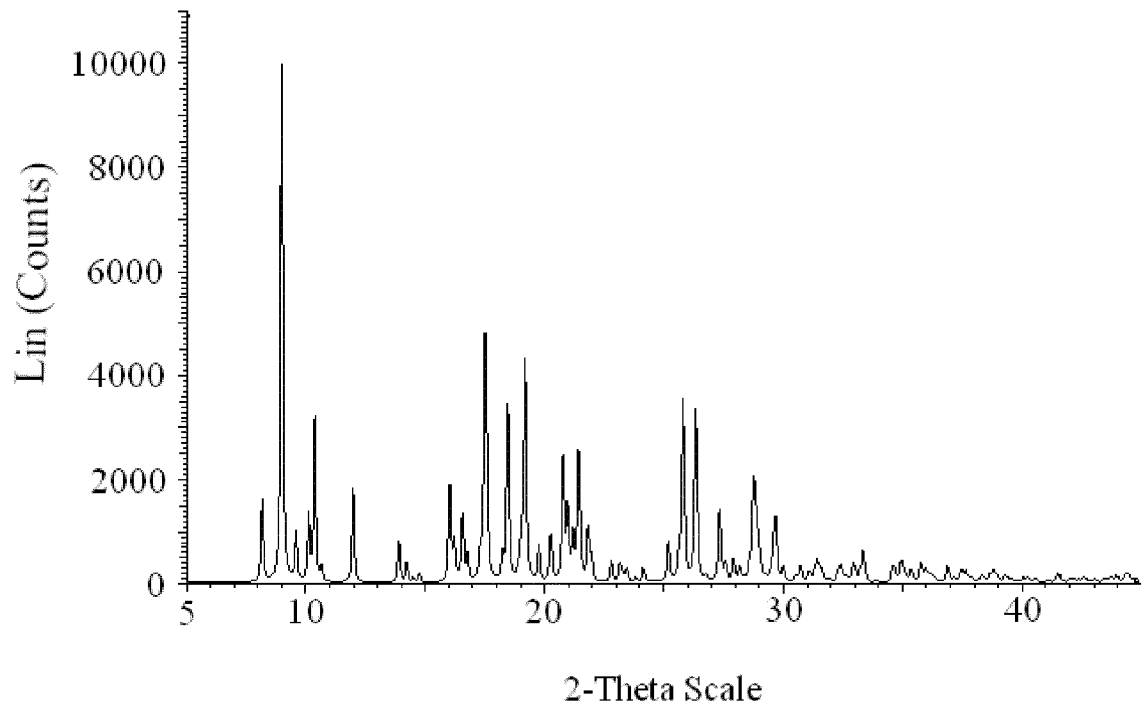


Figure 27



## EX6527R TRADUZIONE LEGENDE

Figure 1 Counts 2-Theta Scale	Figura 1 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 2 Counts 2-Theta Scale	Figura 2 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 3 Counts 2-Theta Scale	Figura 3 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 4 Counts 2-Theta Scale	Figura 4 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 5 Counts 2-Theta Scale	Figura 5 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 6 Counts 2-Theta Scale	Figura 6 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 7 Counts 2-Theta Scale	Figura 7 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 8 Counts 2-Theta Scale	Figura 8 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 9	Figura 9

Counts 2-Theta Scale	Conteggi Scala 2-Theta
Figure 10 Counts 2-Theta Scale	Figura 10 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 11 Counts 2-Theta Scale	Figura 11 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 12 Counts 2-Theta Scale	Figura 12 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 13 Counts 2-Theta Scale	Figura 13 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 14 Counts 2-Theta Scale	Figura 14 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 15 Heat Flow Temperature	Figura 15 Flusso di Calore Temperatura
Figure 16 Weight Temperature	Figura 16 Peso Temperatura
Figure 17	Figura 17
Figure 18	Figura 18

Figure 19 Counts 2-Theta Scale	Figura 19 Conteggi Scala 2-Theta
Figure 20	Figura 20
Figure 21	Figura 21
Figure 22 Heat Flow Temperature	Figura 22 Flusso di Calore Temperatura
Figure 23	Figura 23
Figure 24	Figura 24
Figure 25	Figura 25
Figure 26	Figura 26
Figure 27 Counts 2-Theta Scale	Figura 27 Conteggi Scala 2-Theta