

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0710767-6 A2**

(22) Data de Depósito: 24/04/2007
(43) Data da Publicação: 07/06/2011
(RPI 2109)



(51) *Int.Cl.:*
C07D 211/46 2006.01
A61K 31/445 2006.01
A61P 11/00 2006.01

(54) Título: **COMPOSTOS DE DIALQUILFENIL POSSUINDO ATIVIDADE AGONISTA DE RECEPTOR B2-ADRENÉRGICO E ANTAGONISTA DE RECEPTOR MUSCARÍNICO**

(30) Prioridade Unionista: 25/04/2006 US 60/794.702

(73) Titular(es): Theravance, INC.

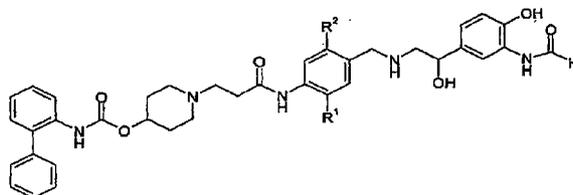
(72) Inventor(es): Adam Hughes, Craig Husfeld, Mathai Mammen, Miroslav Rapta, Pierre-Jean Colson

(74) Procurador(es): Orlando De Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2007009925 de 24/04/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/127196 de 08/11/2007

(57) Resumo: COMPOSTOS DE DIALQUILFENIL POSSUINDO ATIVIDADE AGONISTA DE RECEPTOR β 2-ADRENÉRGICO E ANTAGONISTA DE RECEPTOR MUSCARÍNICO Esta invenção está relacionada a compostos da fórmula (I), onde R^1 e R^2 estão conforme definido na especificação, ou um sal farmacologicamente aceitável ou um solvato ou estereoisômero deste. A invenção também está relacionada a composições farmacêuticas e combinações compreendendo tais compostos, processos e intermediários para preparação de tais compostos, e métodos para utilização de tais compostos para, por exemplo, tratar disfunções pulmonares, como doença pulmonar obstrutiva crônica e asma.



COMPOSTOS DE DIALQUILFENIL POSSUINDO ATIVIDADE AGONISTA DE
REPECTOR β_2 -ADRENÉRGICO E ANTAGONISTA DE RECEPTOR
MUSCARÍNICO

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

5 Campo da Invenção

A presente invenção relaciona-se aos novos compostos de dialquilfenil possuindo atividade agonista de receptor β_2 -adrenérgico e antagonista de receptor muscarínico. Esta invenção também se relaciona a composições farmacêuticas compreendendo tais compostos de bifenil, processos e intermediários para preparar tais compostos e métodos de uso de tais compostos, por exemplo, para tratar disfunções pulmonares.

Estado da Técnica

15 As disfunções pulmonares, tais como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD), são comumente tratadas com broncodilatadores. Um tipo de broncodilatador usado para tratar disfunções pulmonares consiste dos agonistas de receptor β_2 -adrenérgico (adrenoreceptor), tal como albuterol, formoterol e salmeterol. Estes compostos são geralmente administrados por inalação. Um outro tipo de broncodilatador consiste de antagonistas do receptor muscarínico (compostos anticolinérgicos), tais como ipratrópio e tiotrópio. Estes compostos são também tipicamente administrados por inalação.

As composições farmacêuticas contendo uma combinação de um agonista de receptor β_2 -adrenérgico e um antagonista de receptor muscarínico são conhecidas na técnica para uso no tratamento de disfunções pulmonares. Por exemplo, a Patente U. S. de número 6.433.027, emitida em 13 de agosto

de 2002, divulga composições de medicamento contendo um antagonista de receptor muscarínico, tal como brometo de tiotrópio e um agonista de receptor β_2 -adrenérgico, tal como fumarato de formoterol.

5 Adicionalmente, os compostos que possuem tanto a atividade do agonista de receptor β_2 -adrenérgico quanto a atividade do antagonista de receptor muscarínico são conhecidos na técnica. Por exemplo, a Patente U. S. de número 7.141.671, emitida em 28 de novembro de 2006,
10 divulga compostos de bifenila possuindo atividade do agonista de receptor β_2 -adrenérgico e atividade do antagonista de receptor muscarínico. Os compostos que possuem ambas as atividades, do agonista de receptor β_2 -adrenérgico e do antagonista de receptor muscarínico, são
15 altamente desejáveis uma vez que tais compostos fornecem broncodilatação através de dois modos de ação independentes, enquanto possuem farmacocinética de molécula única.

 Quanto se trata as disfunções pulmonares, é
20 particularmente útil fornecer agentes terapêuticos que possuam uma ação de longa duração, isto é, uma duração de pelo menos cerca de 24 horas, quando administrados por inalação de forma que os pacientes apenas necessitem administrar o agente terapêutico uma vez ao dia ou menos.
25 Nem todos os compostos de ação dupla divulgados previamente na técnica possuem esta propriedade desejável.

 Conseqüentemente, existe uma necessidade por novos compostos que possam ambas as atividades, do agonista de receptor β_2 -adrenérgico e do antagonista de receptor
30 muscarínico, que possuem uma ação de longa duração quando

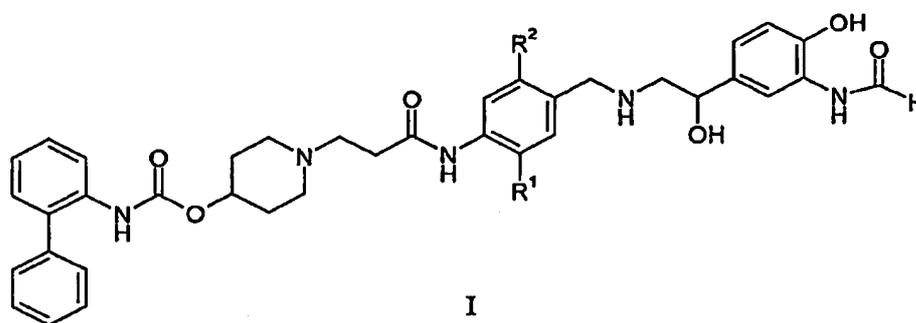
administrados a um paciente por inalação.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece novos compostos de dialquilfenil possuindo atividade agonista de receptor β_2 -
 5 adrenérgico e atividade antagonista de receptor muscarínico. Entre outras propriedades, descobriu-se que um composto desta invenção possui uma ação de longa duração, isto é, uma duração de pelo menos cerca de 24 horas, quando administrado a um mamífero por inalação. Conseqüentemente,
 10 espera-se que os compostos desta invenção sejam úteis e vantajosos como agentes terapêuticos para tratar disfunções pulmonares.

Conseqüentemente, em um dos aspectos da composição, a presente invenção relaciona-se a um composto de Fórmula I:

15



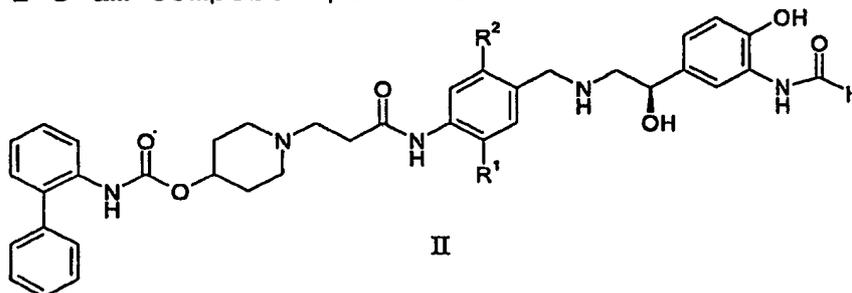
20

onde:

R^1 é metil ou etil, R^2 é metil ou etil; ou um sal farmaceuticamente aceitáveis ou solvato ou estereoisômero deste.

Em um aspecto particular desta invenção, o composto de
 25 fórmula I é um composto possuindo a fórmula II:

30



R^1 e R^2 são conforme definido aqui (incluindo quaisquer modalidades específicas ou preferidas); ou um sal farmacêuticamente aceitável ou solvato deste.

Em outro de seus aspectos de composição, esta invenção
5 relaciona-se a uma composição farmacêutica compreendendo um veículo farmacêuticamente aceitável e um composto de fórmula I.

Se desejado, os compostos da presente invenção podem ser administrados em combinação com outros agentes
10 terapêuticos, tal como um agente antiinflamatório esteroideal. Conseqüentemente, em outro de seus aspectos de composição, esta invenção relaciona-se a uma composição farmacêutica compreendendo (a) um composto de fórmula I; (b) um segundo agente terapêutico. Em ainda um outro de
15 seus aspectos de composição, esta invenção relaciona-se a uma composição farmacêutica compreendendo (a) um composto de fórmula I; (b) um segundo agente terapêutico; (c) um veículo farmacêuticamente aceitável.

Em ainda um outro de seus aspectos de composição, esta
20 invenção relaciona-se a uma combinação de agentes terapêuticos compreendendo (a) um composto de fórmula I; (b) um segundo agente terapêutico. Em outros aspectos de sua composição, esta invenção relaciona-se a uma combinação de composições farmacêuticas, a combinação compreendendo
25 (a) uma primeira composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula I e um primeiro veículo farmacêuticamente aceitável; e (b) uma segunda composição farmacêutica compreendendo um segundo agente terapêutico e um segundo veículo farmacêuticamente aceitável. Esta
30 invenção também se relaciona a um kit contendo tais

composições farmacêuticas.

Os compostos desta invenção possuem ambas as atividades, do agonista de receptor β_2 -adrenérgico e do antagonista de receptor muscarínico. Conseqüentemente, 5 espera-se que os compostos de Fórmula I sejam úteis como agentes terapêuticos para tratar disfunções pulmonares, tal como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica.

Conseqüentemente, em um dos aspectos do método, esta invenção relaciona-se a um método para tratar uma disfunção 10 pulmonar, o método compreendendo administrar a um paciente em necessidade de tratamento uma quantidade terapêuticamente efetiva de um composto da fórmula I. Esta invenção também se relaciona a um método compreendendo 15 administrar a um paciente uma quantidade terapêuticamente efetiva de um composto de fórmula I. Adicionalmente, em outros aspectos do método, esta invenção relaciona-se a um método de produção de broncodilatação em um mamífero, o método compreendendo administrar a um mamífero uma 20 quantidade produtora de broncodilatação de um composto de fórmula I. Esta invenção também se relaciona ao método de antagonizar um receptor muscarínico e agonizar um receptor β_2 -adrenérgico em um mamífero, o método compreendendo administrar ao mamífero um composto de fórmula I.

Uma vez que os compostos desta invenção possuem 25 atividade agonista de receptor β_2 -adrenérgico e atividade antagonista do receptor muscarínico, tais compostos são também úteis como ferramentas de pesquisa. Conseqüentemente, em ainda outros aspectos do método, esta invenção relaciona-se a um método de uso de um composto de 30 fórmula I como uma ferramenta da pesquisa, o método

compreendendo conduzir um ensaio biológico usando um composto de fórmula I.

Os compostos desta invenção podem também ser usados para avaliar novos compostos químicos. Conseqüentemente, em outros aspectos do método, esta invenção relaciona-se a um método de avaliação de um composto de teste em um ensaio biológico, o método compreendendo:

(a) conduzir um ensaio biológico com um composto de teste para fornecer um primeiro valor de ensaio;

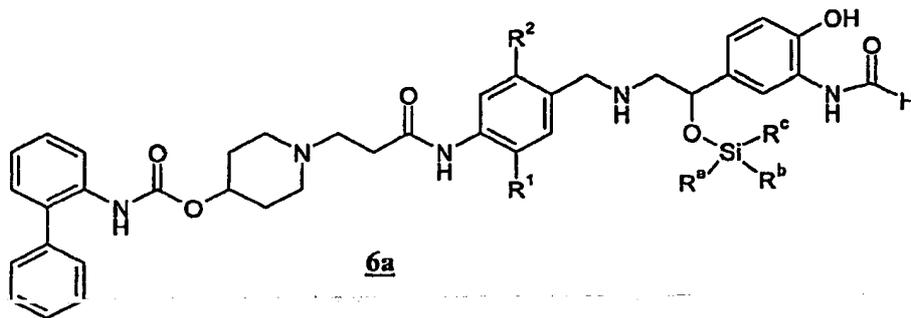
10 (b) conduzir o ensaio biológico com um composto de fórmula I para fornecer um segundo valor de ensaio; onde etapa (a) é conduzida ou antes, ou após ou concomitantemente com a etapa (b); e (c) comparar o primeiro valor de ensaio da etapa (a) com o segundo valor de ensaio da etapa (b).

Esta invenção também se relaciona a processos e novos intermediários úteis para preparar os compostos de fórmula I. Conseqüentemente, em outros aspectos dos métodos, esta invenção relaciona-se a um processo de preparação de um composto de fórmula I, o processo compreendendo desproteger um composto de fórmula 6 (conforme definido aqui) para fornecer um composto de fórmula I.

Em outros aspectos do método, esta invenção relaciona-se a um processo de preparação de um composto de Fórmula I, o processo compreendendo: (a) reagir um composto de fórmula 4 com um composto de fórmula 5 na presença de um agente redutor para fornecer um composto de fórmula 6; e (b) desproteger o composto de fórmula 6 para fornecer um composto de fórmula I; onde os compostos 4, 5 e 6 são conforme aqui definido.

Em uma modalidade particular desta invenção, os compostos de fórmula I são preparados por desproteção de um composto de fórmula 6, onde o grupo de proteção de hidroxil é um grupo silil. Conseqüentemente, em ainda outros aspectos do método, esta invenção relaciona-se a um processo de preparação de um composto de Fórmula I, o processo compreendendo desproteger um composto de fórmula 6a:

10

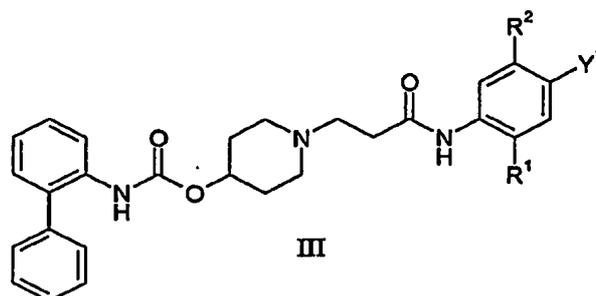


onde R^a , R^b e R^c são independentemente selecionados a partir de alquil de C_{1-4} , fenil, -alquil de C_{1-4} -(fenil), ou um entre R^{1a} , R^{1b} e R^{1c} é -O-(alquil de C_{1-4}); para fornecer um composto da fórmula I.

Em outras modalidades, os processos descritos aqui também compreendem a etapa de formação de um sal farmacologicamente aceitável de um composto de fórmula I. Em outras modalidades, esta invenção relaciona-se aos outros processos descritos aqui, e ao produto preparado por qualquer um dos processos aqui descritos.

Em uma modalidade particular, esta invenção relaciona-se a um composto de fórmula III:

30



ou um sal ou estereoisômero deste, onde Y¹ é selecionado a partir de -CHO, -CN, -CH₂OH, -CH(OR^{3a})OR^{3b}, -C(O)OH, -C(O)OR^{3c}, bromo e iodo, onde R^{3a} e R^{3b} são selecionados independentemente a partir de alquil de C₁₋₆,
5 ou R^{3a} e R^{3b} são unidos à forma alquilenos C₂₋₆, R^{3c} é selecionado a partir de alquil de C₁₋₆, e R¹ e R² são conforme definido aqui (incluindo quaisquer modalidades específicas ou preferidas), estes compostos são úteis como intermediários na preparação de compostos de fórmula I. Em
10 uma modalidade particular da fórmula III, R¹ e R² são metil. Em uma outra modalidade particular da fórmula III, Y¹ é -CHO. Em ainda uma outra modalidade particular da fórmula III, R¹ e R² são metil e Y¹ é -CHO.

Esta invenção também se relaciona ao uso de um
15 composto de fórmula I para terapia. Adicionalmente, a invenção relaciona-se ao uso de um composto de fórmula I para a produção de um medicamento para o tratamento de uma disfunção pulmonar, e ao uso de um composto de fórmula I como uma ferramenta de pesquisa. Outros aspectos e
20 modalidades desta invenção estão aqui divulgados.

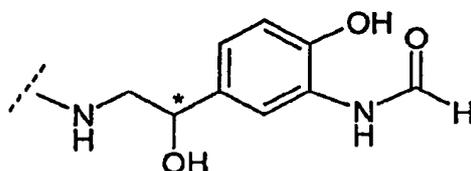
DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Em um de seus aspectos de composição, esta invenção relaciona-se a novos compostos de fórmula I. Os compostos da fórmula I contêm um ou mais centros quirais e portanto,
25 esta invenção está direcionada às misturas racêmicas; estereoisômeros puros (isto é, enantiômeros ou diastereômeros); misturas enriquecidas com estereoisômero e etc., a menos que de outra forma indicado. Quando um estereoisômero particular é mostrado ou aqui mencionado,
30 será compreendido por aqueles habilitados na técnica, que

menores quantidades de outros estereoisômeros podem estar presentes nas composições desta invenção a menos que de outra forma indicado, desde que a utilidade da composição como um todo não seja eliminada pela presença de tais
5 outros isômeros.

Particularmente, os compostos de fórmula I contêm um centro quiral no átomo de carbono indicado pelo símbolo * na seguinte fórmula parcial:

10



Em uma modalidade particular desta invenção, o átomo de carbono identificado pelo símbolo * possui a configuração (*R*). Nesta modalidade, os compostos de fórmula
15 I possuem a configuração (*R*) no átomo de carbono identificado pelo símbolo * ou são enriquecidos em uma forma estereoisômera possuindo a configuração (*R*) neste átomo de carbono.

Os compostos de fórmula I também contêm vários grupos
20 básicos (por exemplo, grupos amino) e, portanto, os compostos de fórmula I podem existir como base livre ou na forma de vários sais. Todas as tais formas estão incluídas no escopo desta invenção. Além disso, os solvatos dos compostos de fórmula I ou os sais destes são incluídos no
25 escopo desta invenção.

Conseqüentemente, aqueles habilitados na técnica irão reconhecer que a referência a um composto aqui, por exemplo, referência a um composto de fórmula I ou composto
6, inclui referência aos sais e estereoisômeros e solvatos
30 daquele composto, a menos que outra forma indicado.

Adicionalmente, conforme aqui usado, as formas no singular "um", "uma" e "o/a" incluem as formas no plural correspondentes a menos que o contexto de uso dite de outra forma claramente.

5 A nomenclatura usada aqui para nomear os compostos desta invenção e intermediários destes foi de maneira geral derivada usando-se o software AutoNom comercialmente disponível (MDL, San Leandro, California). Tipicamente, os compostos de fórmula I foram nomeados como derivados do
10 éster piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ílico carbâmico.

Modalidades Representativas

Os seguintes substituintes e valores são objetivados para fornecerem exemplos representativos de vários aspectos e modalidades desta invenção. Estes valores representativos
15 são objetivados para também definir e ilustrar tais aspectos e modalidades e não são objetivados para excluir outras modalidades ou para limitar o escopo desta invenção. Com relação a isto, a representação que um valor ou substituinte particular é preferida, não pretende de
20 qualquer forma excluir outros valores ou substituintes desta invenção a menos que especificamente indicado.

Em uma modalidade, R¹ é metil e R² é metil.

Em uma outra modalidade, R¹ é etil e R² é etil.

Em uma outra modalidade, R¹ é metil e R² é etil.

25 Em uma outra modalidade, R¹ é etil e R² é metil.

Assim, em um dos aspectos da composição, a presente invenção relaciona-se a compostos de Fórmula I selecionados a partir de:

éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-
30 2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil) etil]

piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (composto IIa);

éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino] metil}-2,5-dietilfenilcarbamoil) etil] piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (composto IIb);

éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etil] amino] metil} -2-metil-5-etilfenilcarbamoil) etil] piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (composto IIc);

éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino] metil} -2-etil-5-metilfenilcarbamoil) etil] piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (composto IID);

ou um sal farmacêuticamente aceitável deste.

Definições

Quando se descreve os compostos, composições, métodos e processos desta invenção, os seguintes termos possuem os significados a seguir, a menos que de outra forma indicado.

O termo "alquil" significa um grupo hidrocarboneto saturado monovalente que pode ser linear ou ramificado. A menos que de outra forma definido, tais grupos alquil contêm tipicamente de 1 a 10 átomos de carbono. Grupos alquil representativos incluem, por meio de exemplo, metil, etil, *n*-propil, isopropil, *n*-butil, *sec*-butil, isobutil, *terc*-butil, *n*-pentil, *n*-hexil, *n*-heptil, *n*-octil, *n*-nonil, *n*-decil e etc.

Quando um número específico de átomos de carbono é objetivado para um termo particular aqui usado, o número de átomos de carbono é mostrado depois do termo. Por exemplo,

o termo "alquil de C₁₋₃" significa um grupo alquil possuindo de 1 a 3 átomos de carbono onde os átomos de carbono estão em qualquer configuração aceitável quimicamente.

O termo "alquilenos" significa um grupo hidrocarboneto saturado divalente que pode ser linear ou ramificado. A menos que de outra forma definido, tais grupos alquilenos contêm tipicamente de 1 a 10 átomos de carbono. Grupos alquilenos representativos incluem, por meio de exemplo, metileno, etano-1,2-diil ("etileno"), propano-1,2-diil, 10 propano-1,3-diil, butano-1,4-diil, pentano-1,5-diil e etc.

O termo "grupo de proteção de amino" significa um grupo de proteção adequado para impedir reações indesejadas em um grupo amino. Grupos de proteção de amino representativos incluem, mas não estão limitados a, *tert*-butoxicarbonil (BOC), tritil (Tr), benziloxicarbonil (Cbz), 15 9-fluorenilmetoxicarbonil (Fmoc), benzil, formil, trimetilsilil (TMS), *tert*-butildimetilsilil (TBS), e etc.

O termo "grupo de proteção de carboxi" significa um grupo de proteção adequado para impedir reações indesejadas em um grupo carboxi. Grupos de proteção de carboxi representativos incluem, mas não estão limitados a, ésteres, tais como metil, etil, *tert*-butil, benzil (Bn), *p*-metoxibenzil (PMB), 9-fluorenilmetil (Fm), trimetilsilil (TMS), *tert*-butildimetilsilil (TBS), difenilmetil 25 (benzidril, DPM, e etc.

O termo "composto da invenção" ou "composto da fórmula I" ou "composto da fórmula II" conforme usado aqui significa o(s) composto(s) específico(s) ou sal farmacologicamente aceitável ou solvato ou estereoisômero 30 deste, a menos que de outra forma indicado.

O termo "halo" significa fluoro, cloro, bromo ou iodo.

O termo "grupo de proteção de hidroxil" significa um grupo de proteção adequado para impedir reações indesejadas em um grupo hidroxil. Grupos de proteção de hidroxil representativos incluem, mas não estão limitados a, grupos silil incluindo grupos trialkilsilil de C₁₋₆, tais como trimetilsilil (TMS), trietilsilil (TES), tert-butildimetilsilil (TBS) e etc.; ésteres (grupos acil) incluindo grupos alcanoil de C₁₋₆, tais como formil, acetil e etc.; grupos arilmetil, tais como benzil (Bn), p-metoxibenzil (PMB), 9-fluorenilmetil (Fm), difenilmetil (benzidril, DPM) e etc. Adicionalmente, dois grupos hidroxil podem também ser protegidos como um grupo alquilideno, tal como prop-2-ilidino, formado, por exemplo, pela reação com uma cetona, tal como acetona.

O termo "grupo de saída" significa um grupo funcional ou átomo que pode ser deslocado por um outro grupo funcional ou átomo em uma reação de substituição, tal como uma reação de substituição nucleofílica. Por meio de exemplo, grupos de saída representativos incluem, mas não estão limitados a, grupos cloro, bromo e iodo; grupos éster sulfônico, tais como mesilato, tosilato, brosilato, nosilato, e etc; e grupos aciloxi, tais como acetoxi, trifluoroacetoxi e etc.

O termo "diâmetro de massa mediana" ou "MMD" quando usado para se referir a partículas significa o diâmetro de forma que metade da massa das partículas está contida nas partículas com diâmetro maior e metade está contida nas partículas com diâmetro menor.

O termo "micronizado" ou "na forma micronizada"

significa partículas em que pelo menos cerca de 90% das partículas possuem um diâmetro de menos de cerca de 10 μm a menos que de outra forma indicado.

O termo "ou um sal farmacologicamente aceitável ou solvato ou estereoisômeros destes", conforme aqui usado, é objetivado para incluir todas as permutações de sais, solvatos e estereoisômeros, tal como um solvato de um sal farmacologicamente aceitável de um estereoisômero de um composto de fórmula I.

O termo "sal farmacologicamente aceitável" significa um sal que é aceitável para a administração a um paciente, tal como um mamífero (por exemplo, sais que oferecem segurança para o mamífero para um dado regime de dosagem). Sais farmacologicamente aceitáveis representativos incluem sais de ácido acético, ascórbico, benzenossulfônico, benzóico, canfossulfônico, cítrico, etanossulfônico, edisílico, fumárico, gentísico, glucônico, glucorônico, glutâmico, hipúrico, hidrobromico, hidrocloreico, isetiônico, láctico, lactobiónico, maléico, málico, mandélico, metanossulfônico, múcico, naftalenossulfônico, naftaleno-1,5-dissulfônico, naftaleno-2,6-dissulfônico, nicotínico, nítrico, orótico, pamóico, pantotênico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluenossulfônico, xinafóico e etc.

O termo "derivados protegidos deste" significa um derivado do composto específico em que um ou mais grupos funcionais do composto são protegidos bloqueados de reações não desejadas que ocorrem com um grupo protetor ou de bloqueio. Grupos funcionais que podem ser protegidos incluem, por meio de exemplo, grupos carboxi, grupos amino, grupo hidroxil, grupos tiol, grupo carbonil e etc. Grupos

de proteção adequados para tais grupos funcionais são bem conhecidos daqueles habilitados na técnica, conforme exemplificado pelos ensinamentos em T. W. Greene e G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3ª edição, 5 Wiley, New York, 1999, e referências citadas nesta.

O termo "sal deste" significa um composto formado quando o hidrogênio de um ácido é substituído por um cátion, tal como um cátion metálico ou um cátion orgânico e etc. Na presente invenção, o cátion tipicamente compreende 10 uma forma protonada de um composto de fórmula I, isto é, onde um ou mais grupos amino foram protonados por um ácido. Preferivelmente, o sal é um sal farmacologicamente aceitável, embora isto não seja exigido para os sais de compostos intermediários que não são objetivados para 15 administração a um paciente.

O termo "solvato" significa um complexo ou agregado formado por uma ou mais moléculas de um soluto, isto é, um composto da Fórmula I ou um sal farmacologicamente aceitável deste, e uma ou mais moléculas de um solvente. Tais 20 solvatos são tipicamente sólidos cristalinos possuindo uma proporção molar substancialmente fixa de soluto e solvente. Solventes representativos incluem por meio de exemplo, água, metanol, etanol, isopropanol, ácido acético, e etc. Quando o solvente é água, o solvato formado é um hidrato.

O termo "quantidade terapêuticamente efetiva" 25 significa uma quantidade suficiente para efetuar o tratamento quando administrada a um paciente em necessidade de tratamento.

O termo "tratar" ou "tratamento" conforme usado aqui 30 significa tratar ou o tratamento de uma doença ou condição

médica (tal como COPD ou asma) em um paciente, tal como um mamífero (particularmente um humano) que inclui:

(a) impedir que a doença ou condição médica ocorra, isto é, tratamento profilático de um paciente;

5 (b) melhorar a doença ou condição médica, isto é, eliminar ou causar a regressão da doença ou condição médica em um paciente;

(c) suprimir a doença ou condição médica, isto é, retardar ou interromper o desenvolvimento da doença ou
10 condição médica em um paciente; ou

(d) aliviar os sintomas da doença ou condição médica em um paciente.

Todos os outros termos aqui usados são objetivados para terem seu significado usual conforme compreendido por
15 aqueles habilitados na técnica a qual eles pertencem.

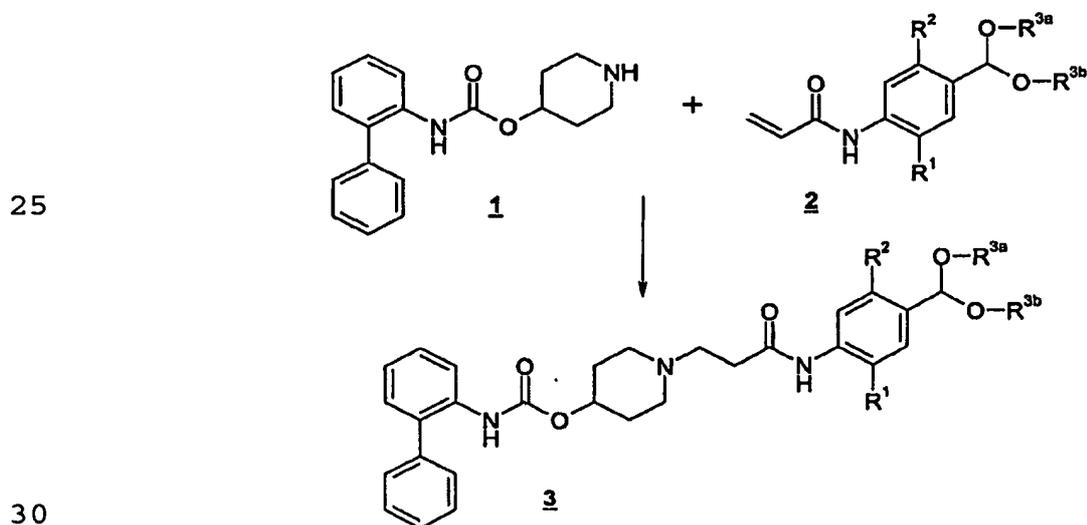
PROCEDIMENTOS SINTÉTICOS GERAIS

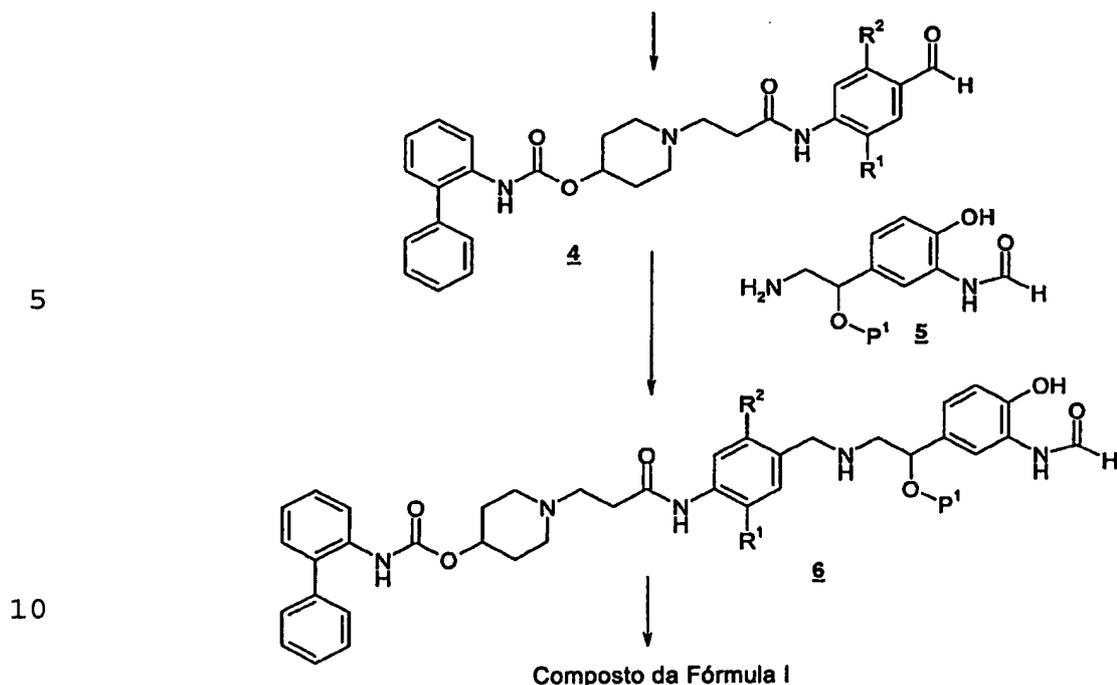
Os compostos desta invenção podem ser preparados a partir de materiais iniciais facilmente disponíveis usando-se os seguintes métodos e procedimentos gerais ou
20 utilizando-se outra informação facilmente disponível ou conhecidos por aqueles habilitados na técnica. Embora os seguintes procedimentos possam ilustrar uma modalidade particular ou aspecto da presente invenção, aqueles habilitados na técnica irão reconhecer que outras
25 modalidades ou aspectos da presente invenção podem ser preparados usando-se os mesmo métodos ou métodos similares ou utilizando-se outros métodos, reagentes e materiais iniciais conhecidos daqueles habilitados na técnica. Será também avaliado que onde são fornecidas condições de
30 processo típicas ou preferidas (isto é, temperaturas de

reação, tempos, proporções molares dos reagentes, solventes, pressões, etc.), outras condições de processo também podem ser usadas a menos que de outra forma declarado. Embora as condições de reação ideais irão tipicamente variar dependendo dos vários parâmetros de reação tais como os reagentes, solventes e quantidades usadas, aqueles habilitados na técnica podem determinar facilmente as condições de reação adequadas usando-se procedimentos de otimização de rotina.

Adicionalmente, como será aparente àqueles habilitados na técnica, os grupos de proteção convencionais podem ser necessários ou desejados para impedir que certos grupos funcionais passem por reações indesejadas. A escolha de um grupo de proteção adequado para um grupo funcional particular, assim como as condições e reagentes adequados para a proteção e desproteção de tais grupos funcionais, são bem conhecidos na técnica. Grupos de proteção que não aqueles ilustrados nos procedimentos aqui descritos podem ser usados, se desejado.

Em uma modalidade, os compostos de fórmula I são sintetizados conforme ilustrado no Esquema I:





onde P^1 é um grupo de proteção de hidroxil, e R^{3a} e R^{3b} são selecionados independentemente de alquil de C_{1-6} , ou R^{3a} e R^{3b} são unidos para formar alquileno de C_{2-6} .

15 Conforme mostrado no Esquema I, o composto 1 pode ser reagido com cerca de 0,95 a cerca de 1,05 equivalente molar do composto 2 para fornecer o composto 3. Esta reação de Michael é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de 0°C a cerca de 15°C , tipicamente cerca de 40°C

20 a cerca de 45°C , por cerca de 8 horas a cerca de 24 horas ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como diclorometano ou misturas de diclorometano e metanol ou etanol, e etc. Sob finalização

25 da reação, o produto é tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc. Alternativamente, a mistura reacional contendo o composto 3 pode ser usada na próxima etapa da síntese.

30 O composto 3 é então reagido com ácido aquoso para

hidrolisar o grupo acetal e fornecer o composto aldeído 4. Qualquer ácido adequado pode ser empregado nesta reação incluindo, por meio de exemplo, ácido hidrolórico, ácido sulfúrico, ácido metanossulfônico, ácido p-toluenossulfônico e etc. A reação de hidrólise é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de 0°C a cerca de 30°C, tipicamente de cerca de 20°C a cerca de 25°C, por cerca de 1 hora a cerca de 6 horas, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como metanol etanol, isopropanol, diclorometano/etanol, acetonitrila e etc. Sob finalização da reação, o produto é tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc.

O composto 4 é então reagido com cerca de 0,95 a cerca de 1,5 equivalente molar do composto 5 na presença de um agente redutor para fornecer o composto 6. Qualquer agente redutor adequado pode ser usado nesta reação incluindo, por meio de ilustração, um reagente de hidreto metálico, tal como borohidreto de sódio, triacetoxiborohidreto de sódio, cianoborohidreto de sódio e etc., ou hidrogênio e um catalisador metálico, tal como paládio em carbono, e etc. Esta reação de alquilação redutiva é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de -20°C a cerca de 30°C, tipicamente de cerca de 0°C a cerca de 5°C, por cerca de 1 hora a cerca de 6 horas, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado e um solvente prótico, tal como dicloroetano e metanol, e etc. Sob finalização da

reação, o produto é tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc.

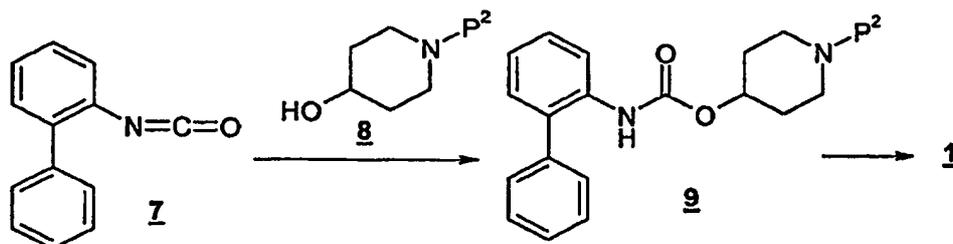
O composto 6 é então desprotegido para fornecer um
5 composto de fórmula I. As condições particulares usadas para desproteger o composto 6 dependerão do grupo de proteção empregado. Por exemplo, quando P¹ é um grupo de proteção de silil (isto é, um composto de fórmula 6a conforme aqui definido), tal como terc-butildimetilsilil,
10 terc-butildifenilsilil, difenilmetilsilil, di-terc-butylmetilsilil, terc-butoxidifenilsilil e etc., esta reação de desproteção é tipicamente conduzida contatando-se o composto 6a com uma fonte de íon fluoreto. Em uma modalidade particular, a fonte de íon fluoreto é
15 trihidrofluoreto de trietilamina. Outras fontes adequadas de íon fluoreto incluem fluoreto de tetrabutylamônio, fluoreto de potássio com 18-coroa-6, fluoreto de hidrogênio, hidrofluoreto de piridina, e etc. Esta reação é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca
20 de 0°C a cerca de 50°C, tipicamente de cerca de 10°C a cerca de 25°C, por cerca de 24 a cerca de 72 horas, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como dicloroetano e etc. Sob finalização da reação, o produto é
25 tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc.

O composto 1 é conhecido na técnica ou pode ser preparado a partir de materiais iniciais e reagentes comercialmente disponíveis usando-se procedimentos
30 conhecidos. Veja, por exemplo, a Publicação do Pedido de

Patente U. S. de número 2004/0167167, Al e R. Naito e outros, *Chem. Pharm. Bull*, 46(8) 1286-1294 (1998). Por meio de exemplo, o composto 1 pode ser preparado conforme ilustrado no Esquema II:

5

Esquema II



10

Conforme mostrado no Esquema II, bifenil-2-isocianato 7 é reagido com 4-hidroxipiperidina N-protetida 8, onde P² é um grupo de proteção de amino tal como benzil, para fornecer o intermediário carbamato 9. Esta reação é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de 20°C a cerca de 100°C, tipicamente de cerca de 60°C a cerca de 80°C, por cerca de 6 a cerca de 24 horas ou até que a reação esteja substancialmente completa. Se desejado, esta reação pode ser conduzida em um diluente adequado, tal como diclorometano, tolueno e etc. Alternativamente, esta reação pode ser conduzida na ausência de um diluente. Sob finalização da reação, o produto 9 é tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc. Alternativamente, a mistura reacional contendo o composto 9 é usada diretamente na próxima etapa da síntese.

O grupo de proteção de amino, P², é então removido do composto 9 usando-se procedimentos convencionais para fornecer o composto 1. Por exemplo, quando P² é um grupo benzil, o composto 9 pode ser desprotegido usando-se

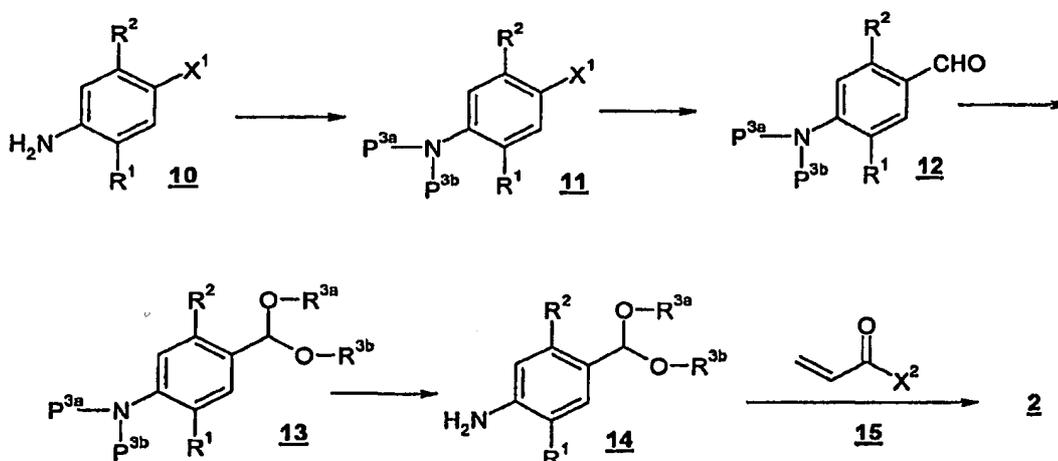
30

hidrogênio ou formato de amônio, na presença de um catalisador, tal como um catalisador de paládio. Catalisadores representativos incluem, por meio de ilustração, paládio em carbono, hidróxido de paládio em carbono e etc. Esta reação é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de 20°C a cerca de 50°C, tipicamente de cerca de 40°C, por cerca de 6 horas a cerca de 24 horas, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como metanol, etanol, isopropanol e etc. Sob finalização da reação, o composto 1 é tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc.

Compostos de fórmula 2 são conhecidos na técnica ou podem ser preparados a partir de materiais iniciais e reagentes comercialmente disponíveis usando-se procedimentos conhecidos. Por meio de ilustração, os compostos de fórmula 2 podem ser preparados conforme mostrado no Esquema III:

20

Esquema III



25

Conforme mostrado no Esquema III, um composto de anilina de fórmula 10, onde X^1 é bromo ou iodo, é

30

primeiramente protegido no grupo amino para fornecer um composto de fórmula 11, onde P^{3a} é um grupo de proteção de amino e P^{3b} é hidrogênio ou um grupo de proteção de amino. Qualquer grupo de proteção de amino pode ser usado, tal como benzil, 4-metoxibenzil, trifluoroacetil e etc. Por exemplo, um composto de fórmula 10 pode ser reagido com cerca de 2 ou mais equivalentes molares, preferivelmente cerca de 2,5 a cerca de 3,0 equivalentes molares, de um haleto de benzila, tal como cloreto, brometo ou iodeto de benzila, para fornecer o composto 11, onde P^{3a} e P^{3b} são ambos benzil. Esta reação é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de 0°C a cerca de 50°C, tipicamente de cerca de 30°C, por cerca de 18 horas a cerca de 24 horas, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como metanol, etanol, isopropanol e etc. Tipicamente, esta reação é também conduzida na presença de uma base adequada, tal como carbonato de potássio, carbonato de sódio e etc. Sob finalização da reação, o composto 11 é tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc.

Compostos representativos da fórmula 10 que podem ser empregados nesta reação incluem 2,5-dimetil-4-iodoanilina, 2,5-dietil-4-iodoanilina, 2-etil-4-iodo-5-metilanilina, 5-etil-4-iodo-2-metilanilina, 4-bromo-2,5-dimetilanilina, 4-bromo-2,5-dietilanilina, 4-bromo-2-etil-5-metilanilina, 4-bromo-5-etil-2-metilanilina e etc. Tais compostos estão comercialmente disponíveis (por exemplo, a partir de Spectra Group Limited, Inc., Millbury, OH) ou podem ser

preparados a partir de materiais iniciais e reagentes comercialmente disponíveis usando-se procedimentos convencionais.

O composto 11 é então contatado com cerca de 1 a cerca 5 de 2 equivalentes molares de um reagente de alquil lítio, tal como *n*-butil-lítio ou terc-butil-lítio, para formar o ânion correspondente em que o grupo X¹ foi trocado por lítio. Esta reação é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de -70°C a cerca de 0°C, 10 tipicamente de cerca de -20°C, por cerca de 0,25 hora a cerca de 1 hora, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como tolueno, xileno, tetrahidrofurano e etc.

15 O ânion de lítio resultante não está isolado, mas é reagido *in situ* com um excesso molar de *N,N*-dimetilformamida para fornecer o composto 12. Geralmente, cerca de 2 a cerca de 4 equivalentes molares de *N,N*-dimetilformamida são usados. Esta reação é tipicamente 20 conduzida a uma temperatura variando de cerca de -70°C a cerca de 0°C, tipicamente de cerca de -20°C a cerca de 0°C, por cerca de 0,5 a cerca de 2 horas, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Sob finalização da reação, o composto 12 é tipicamente isolado usando-se 25 procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc.

O grupo aldeído do composto 12, é então protegido como um acetal reagindo-se composto 12 com um álcool ou um diol na presença de um catalisador ácido. Qualquer álcool ou 30 diol adequado pode ser usado nesta reação. Por exemplo,

álcoois e dióis representativos incluem metanol, etanol, *n*-propanol, etileno glicol, propileno glicol, e etc. Geralmente, um excesso molar do álcool ou diol é empregado nesta reação, preferivelmente cerca de 2 a cerca de 4 5 equivalentes molares.

Qualquer catalisador ácido adequado pode ser usado nesta reação para facilitar a formação do acetal. Catalisadores ácidos representativos incluem, por meio de exemplo, ácido *p*-toluenossulfônico, ácido 10 benzenossulfônico, ácido hidrolórico e etc.

A reação é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de 50°C a cerca de 100°C, tipicamente de cerca de 60°C a cerca de 80°C, por cerca de 12 a cerca de 24 horas, ou até que a reação esteja substancialmente 15 completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como tolueno, xileno e etc. Tipicamente, a reação é conduzida de uma maneira que permita que a água produzida seja removida, tal como por destilação azeotrópica ou pelo uso de peneiras moleculares. 20 Sob finalização da reação, o composto 13 é tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc. Alternativamente, a mistura reacional contendo o composto 13 pode ser usada diretamente na próxima etapa da síntese.

25 Após a formação do acetal, o grupo amino do composto 13 é desprotegido usando-se reagentes e condições padrões para formar o composto 14. Por exemplo, se P^{3a} e P^{3b} são grupos benzil, o composto 13 pode ser desprotegido usando-se hidrogênio e um catalisador, tal como um catalisador de 30 paládio. Catalisadores representativos incluem, por meio de

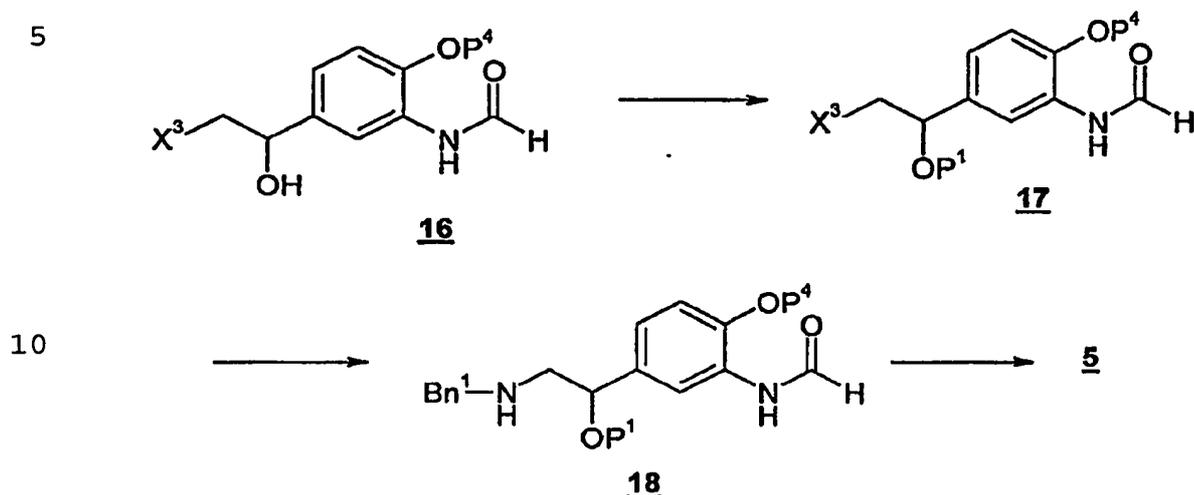
exemplo, paládio em carbono, hidróxido de paládio em carbono e etc. Esta reação é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de 20°C a cerca de 50°C, tipicamente de cerca de 25°C a cerca de 30°C, por cerca de 5 4 a cerca de 12 horas, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como metanol etanol, misturas de etanol/acetato de etila e etc. Sob finalização da reação, o composto 14 é tipicamente isolado usando-se 10 procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc.

O composto 14 é então reagido com haleto de acrilóila 15, onde X^2 é cloro, bromo ou iodo, para formar o composto 2. Esta reação é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de -20°C a cerca de 25°C, tipicamente de 15 cerca de 0°C a cerca de 5°C, por cerca de 0,5 a cerca de 6 horas, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como diclorometano e etc., na 20 presença de um a base adequada, tal como diisopropiletilamina, trietilamina e etc. Geralmente, de cerca de 1 a cerca de 1,2 equivalente molar do haleto de acrilóila e cerca de 1 a cerca de 2 equivalente(s) molar(es) da base é/são usado(s) nesta reação. Sob 25 finalização da reação, o composto 2 é tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, recristalização, cromatografia e etc.

Compostos de fórmula 5 são conhecidos na técnica ou podem ser preparados a partir de materiais iniciais e 30 reagentes comercialmente disponíveis usando-se

procedimentos conhecidos. Por meio de ilustração, os compostos de fórmula 5 podem ser preparados conforme mostrado no Esquema IV:

Esquema IV



Conforme ilustrado no Esquema IV, os compostos de fórmula 5 podem ser preparados a partir dos compostos de fórmula 16, onde P⁴ é um grupo de proteção de hidroxil, tal como benzil, e X³ é um grupo de saída, tal como cloro, bromo ou iodo. Compostos de fórmula 16 são conhecidos na técnica. Por exemplo, Patente U. S. de número 6.268.533 B1, emitida em 31 de julho de 2001; e R. Hett e outros, *Organic Process Research & Development* 1998, 2, 96-99; descrevem a preparação de N-[2-benziloxi-5-((R)-2-bromo-1-hidroxietil)fenil]formamida (isto é, o enantiômero (R) do composto 16, onde P⁴ é benzil e X³ é bromo) começando de 2-bromo-4'-benziloxi-3'-nitroacetofenona, a síntese da qual está descrita em K. Murase e outros, *Chem. Pharm. Bull.*, 25(6) 1368-1377 (1977). Se desejado, a forma racêmica do composto 16 pode ser preparada usando-se um agente redutor não quiral, tal como o complexo borano-dimetilsulfeto, para reduzir a 2-bromo-4'-benziloxi-3'-nitroacetofenona.

30 O grupo hidroxil do composto 16 é protegido usando-se

procedimentos convencionais e reagentes para fornecer o composto 17, onde P¹ é um grupo de proteção de hidroxil. Em uma modalidade particular, o grupo de proteção de hidroxil é um grupo de proteção de silil, tal como

5 dimetilisopropilsilil, dietilisopropilsilil, dimetilhexilsilil, terc-butildimetilsilil, terc-butildifenilsilil, difenilmethylsilil e etc. Por exemplo, o composto 16 pode ser reagido com cerca de 0,95 a cerca de 1,2 equivalente molar de cloreto de terc-butildimetilsilila

10 na presença de cerca de 1,1 a cerca de 1,3 equivalente molar de imidazol para fornecer o composto 17, onde P¹ é terc-butildimetilsilil. Esta reação é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de 0°C a cerca de 50°C, tipicamente à temperatura ambiente, por

15 cerca de 24 horas a cerca de 48 horas, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como *N,N*-dimetilformamida e etc. Sob finalização da reação, o composto 17 é tipicamente isolado usando-se procedimentos

20 convencionais, tal como extração, cromatografia e etc. Por meio de ilustração adicional, a síntese de *N*-{2-benziloxi-5-[(*R*)-2-bromo-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]fenil}formamida está descrita na Publicação da Patente U. S. de número 2004/0248985 A1, publicada em 9 de dezembro

25 de 2004.

O composto 17 é então reagido com uma benzilamina (isto é, Bn¹-NH₂) para fornecer o composto 18, onde Bn¹ é um grupo benzil não substituído ou um grupo benzil substituído possuindo de 1 a 3 substituintes no anel fenil no grupo

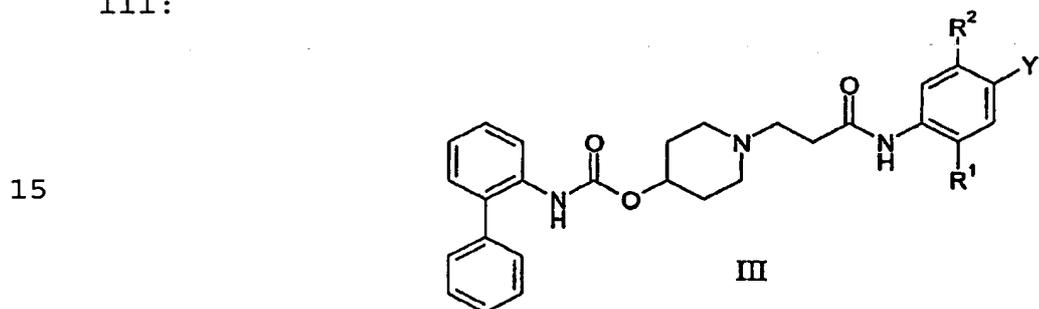
30 benzil independentemente selecionado de alquil de C₁₋₄ ou

alcoxi de C₁₋₄. Benzilaminas representativas incluem, benzilamina, 3,4-dimetoxibenzilamina, 4-metoxibenzilamina, 4-metilbenzilamina e etc. Esta reação é tipicamente conduzida contatando-se o composto 17 com cerca de 2 a 5 cerca de 4 equivalentes molares da benzilamina a uma temperatura variando de cerca de 40°C a cerca de 100°C, tipicamente de cerca de 80°C a cerca de 90°C, por cerca de 5 a cerca de 24 horas ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) e etc. Sob finalização da reação, o composto 18 é tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, cromatografia, recristalização e etc.

15 A remoção do grupo benzil, Bn¹ e P⁴ usando-se procedimentos e reagentes convencionais fornece então o composto 5. Em uma modalidade, tanto Bn¹ quanto P⁴ são grupos benzil que são removidos na mesma mistura reacional. Tipicamente, esta reação é conduzida contatando-se o 20 composto 5 com hidrogênio na presença de um catalisador, tal como um catalisador de paládio. Catalisadores representativos incluem hidróxido de paládio em carbono, paládio em carbono e etc. Geralmente, esta reação de desbenzilação é conduzida na presença de um ácido, tal como 25 ácido acético, ácido fórmico e etc. Esta reação é tipicamente conduzida a uma temperatura variando de cerca de 10°C a cerca de 50°C, tipicamente à temperatura ambiente, por cerca de 6 horas a cerca de 24 horas, ou até que a reação esteja substancialmente completa. Geralmente, 30 esta reação é conduzida em um diluente adequado, tal como

metanol, etanol e etc. Sob finalização da reação, o composto 5 é tipicamente isolado usando-se procedimentos convencionais, tal como extração, cromatografia e etc. Em uma modalidade particular, o composto 5 é isolado como o sal do ácido acético.

Aqueles habilitados na técnica irão reconhecer que os compostos da fórmula I podem também ser preparados por outros procedimentos sintéticos. Por exemplo, a ordem particular na qual as etapas sintéticas são conduzidas pode ser mudada ou intermediários diferentes podem ser empregados. Por meio de ilustração, compostos de fórmula III:



onde Y^1 é $-CN$, $-C(O)OH$ ou $-C(O)OR^{3c}$ podem ser reduzidos usando-se procedimentos e reagentes convencionais para fornecer o aldeído 4 (isto é, onde Y^1 é $-CHO$). Adicionalmente, tais compostos podem ser reduzidos ao álcool, isto é, onde Y^1 é $-CH_2OH$, e o álcool pode então ser oxidado usando-se os procedimentos e reagentes padrões para fornecer o aldeído 4 (isto é, onde Y^1 é $-CHO$).

25 Se desejado, os sais farmacologicamente aceitáveis dos compostos de fórmula I podem ser preparados contatando-se a forma de base livre de um composto de fórmula I com um ácido farmacologicamente aceitável.

30 Detalhes adicionais relacionados às condições de reação específicas e outros procedimentos para preparação

dos compostos representativos desta invenção ou intermediários destes estão descritos nos Exemplos expostos abaixo.

Composições, Combinações e Formulações Farmacêuticas

5 Os compostos desta invenção são tipicamente administrados a um paciente na forma de uma composição ou formulação farmacêutica. Tais composições farmacêuticas podem ser administradas ao paciente por qualquer rota de administração aceitável incluindo, mas não limitada a, 10 modos de administração por inalação, oral, nasal, tópica (incluindo transdermal) e parenteral. Será compreendido que qualquer forma de um composto desta invenção, (isto é, base livre, sal farmacêuticamente aceitável, solvato, etc.) que seja adequado para um modo particular de administração, 15 pode ser usado nas composições farmacêuticas discutidas aqui.

Conseqüentemente, em um de seus aspectos das composições, esta invenção relaciona-se a uma composição farmacêutica compreendendo um veículo ou excipiente 20 farmacêuticamente aceitável e um composto de fórmula I. Opcionalmente, tais composições farmacêuticas podem conter outros agentes terapêuticos e/ou de formulação, se desejado.

As composições farmacêuticas desta invenção 25 tipicamente contêm uma quantidade terapêuticamente efetiva de um composto de fórmula I. Aqueles habilitados na técnica irão reconhecer, entretanto, que uma composição farmacêutica pode conter mais de uma quantidade terapêuticamente efetiva, isto é, composições volumosas, ou 30 menos de uma quantidade terapêuticamente efetiva, isto é,

doses unitárias individuais projetadas para administração múltipla para alcançar uma quantidade terapeuticamente efetiva.

Tipicamente, tais composições farmacêuticas irão conter de cerca de 0,01 a cerca de 95% em peso do agente terapêutico; incluindo, de cerca de 0,01 a cerca de 30% em peso; tal como de cerca de 0,01 a cerca de 10% em peso do agente terapêutico.

Qualquer veículo ou excipiente convencional pode ser usado nas composições farmacêuticas desta invenção. A escolha de um veículo ou excipiente particular, ou combinações de veículos ou excipientes, irá depender do modo de administração que está sendo usado para tratar um paciente particular ou tipo de condição médica ou estado da doença. Sob este aspecto, a preparação de uma composição farmacêutica adequada para um modo particular de administração está bem inserida no escopo daqueles habilitados na técnica farmacêutica.

Os veículos ou excipientes usados nas composições farmacêuticas desta invenção estão comercialmente disponíveis. Por exemplo, tais materiais podem ser adquiridos de Sigma (St. Louis, MO). Por meio de ilustração adicional, as técnicas de formulação convencionais são bem conhecidas daqueles habilitados na técnica conforme exemplificado pelos ensinamentos em *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edição, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); e H.C. Ansel e outros, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ª edição, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Exemplos representativos de materiais que podem servir como veículos farmacêuticamente aceitáveis incluem, mas não estão limitados aos seguintes: (1) açúcares, tais como lactose, glicose e sacarose; (2) amidos, tais como amido de milho e amido de batata; (3) celulose, e seus derivados, tais com carboximetil celulose de sódio, etil celulose e acetato de celulose; (4) tragacanto em pó; (5) malte; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tais como manteiga de cacau e ceras para supositórios; (9) óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de açafrão, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, tal como propileno glicol; (11) polióis, tais como glicerina, sorbitol, manitol e polietileno glicol; (12) ésteres, tais como oleato de etila e laurato de etila; (13) Agar; (14) agentes de tamponamento, tais como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água livre de pirógeno; (17) solução salina isotônica; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções de tampão fosfato; (21) gases propelentes comprimidos, tais como clorofluorocarbonos e hidrofluorocarbonos; e (22) outras substâncias compatíveis atóxicas empregadas em composições farmacêuticas.

As composições farmacêuticas desta invenção são tipicamente preparadas misturando-se ou combinando-se completamente e intimamente um composto da invenção com um veículo farmacêuticamente aceitável e quaisquer ingredientes opcionais. Se necessário ou desejado, a mistura combinada uniformemente resultante pode então ser moldada ou carregada em comprimidos, cápsulas, pílulas,

tubos, cartuchos, dispensadores e etc., usando-se procedimentos e equipamentos convencionais.

Em uma modalidade, as composições farmacêuticas desta invenção são adequadas para a administração por inalação.

5 Composições farmacêuticas adequadas para administração por inalação estarão tipicamente na forma de um aerossol ou um pó. Tais composições são geralmente administradas usando-se dispositivos bem conhecidos, tais como um inalador nebulizador, um inalador com dose medida (MDI), um inalador

10 de pó seco (DPI) ou um dispositivo de entrega similar.

Em uma modalidade específica desta invenção, a composição farmacêutica compreendendo o agente terapêutico é administrado por inalação usando-se um inalador nebulizador. Tais dispositivos nebulizadores tipicamente

15 produzem uma corrente de ar de alta velocidade que faz com que a composição farmacêutica compreendendo o agente terapêutico pulverize-se como uma névoa que é transportada para dentro do trato respiratório do paciente. Conseqüentemente, quando formulado para uso em um inalador

20 nebulizador, o agente terapêutico é tipicamente dissolvido em um veículo adequado para formar uma solução. Alternativamente, o agente terapêutico pode ser micronizado e combinado com um veículo adequado para formar uma suspensão de partículas micronizadas. Dispositivos

25 nebulizadores adequados para administrar os agentes terapêuticos por inalação são bem conhecidos daqueles habilitados na técnica ou tais dispositivos estão comercialmente disponíveis. Por exemplo, dispositivos nebulizadores representativos incluem o Respimat Softmist

30 Inhalaler (Boehringer Ingelheim); o AERx Pulmonary Delivery

System (Aradigm Corp.); o PARI LC Plus Reusable Nebulizer (Pari GmbH); e etc.

Uma composição farmacêutica representativa para uso em um inalador nebulizador compreende uma solução aquosa isotônica compreendendo de cerca de 0,05 µg/mL a cerca de 10 mg/mL de um composto de Fórmula I. Em uma modalidade, tal solução possui um pH de cerca de 4 a cerca de 6.

Em uma outra modalidade específica desta invenção, a composição farmacêutica compreendendo o agente terapêutico é administrada por inalação usando-se um inalador de pó seco. Tais inaladores de pó seco tipicamente administram o agente terapêutico como um pó não aglomerado que é disperso em uma corrente de ar do paciente durante a inspiração. A fim de alcançar um pó não aglomerado, o agente terapêutico é tipicamente formulado com um excipiente adequado, tal como lactose, amido, manitol. Dextrose, ácido poliláctico (PLA) polilactídeo-co-glicolídeo (PLGA) ou combinações destes. Tipicamente, o agente terapêutico é micronizado e combinado com um veículo adequado para formar uma combinação adequada para inalação. Conseqüentemente, em uma modalidade da invenção, o composto de fórmula I está na forma micronizada.

Uma composição farmacêutica representativa para uso em um inalador de pó seco compreende lactose moída seca e partículas micronizadas de um composto de fórmula I.

Tal formulação de pó seco pode ser feita, por exemplo, combinando-se a lactose com o agente terapêutico e então se combinando a seco os componentes. Alternativamente, se desejado o agente terapêutico pode ser formulado sem um excipiente. A composição farmacêutica é então tipicamente

colocada em um distribuidor de pó seco, ou dentro de cartuchos ou cápsulas de inalação para uso com um dispositivo de entrega de pó seco.

Dispositivos de entrega do tipo inalador de pó seco adequados para administrar os agentes terapêuticos por inalação são bem conhecidos daqueles habilitados na técnica ou tais dispositivos estão comercialmente disponíveis. Por exemplo, os dispositivos de entrega do tipo inalador de pó seco representativos ou produtos incluem Aeolizer (Novartis); Airmax (IVAX); ClickHaler (Innovata Biomed); Diskhaler (GlaxoSmithKline); Diskus/Accuhaler (GlaxoSmithKline); Easyhaler (Orion Pharma); Eclipse (Aventis); FlowCaps (Hovione); Handihaler (Boehringer Ingelheim); Pulvinal (Chiesi); Rotahaler (GlaxoSmithKline); SkyeHaler/Certihaler (SkyePharma); Twisthaler (Schering-Plough); Turbuhaler (AstraZeneca); Ultrahaler (Aventis); e etc.

Em ainda uma outra modalidade específica desta invenção, a composição farmacêutica compreendendo o agente terapêutico é administrada por inalação usando-se um inalador de dose medida. Tais inaladores de dose medida tipicamente descarregam uma quantidade medida do agente terapêutico usando-se gás propelente comprimido. Conseqüentemente, as composições farmacêuticas administradas usando-se um inalador de dose medida tipicamente compreendem uma solução ou suspensão do agente terapêutico em um propelente liquefeito. Qualquer propelente liquefeito adequado pode ser empregado incluindo clorofluorocarbonos, tal como CCl_3F , e hidrofluoroalcanos (HFAs), tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134a) e

1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-n-propano (HFA 227). Devido às preocupações com a destruição da camada de ozônio pelos clorofluorocarbonos, as formulações que contêm HFAs são geralmente preferidas. Componentes opcionais adicionais de
5 formulações de HFA incluem co-solventes, tais como etanol ou pentano, e tensoativos, tais como trioleato de sorbitano, ácido oléico, lecitina e glicerina.

Uma composição farmacêutica representativa para uso em um inalador de dose medida compreende de cerca de 0,01% a
10 cerca de 5% em peso de um composto de fórmula I, de cerca de 0% a cerca de 20% em peso de etanol, e de cerca de 0 % a cerca de 5% em peso de tensoativo, com o restante sendo um propelente do tipo HFA.

Tais composições são tipicamente preparadas pela
15 adição de hidrofluoroalcano resfriado ou pressurizado a um recipiente adequado contendo o agente terapêutico, etanol (se presente) e o tensoativo (se presente). Para preparar uma suspensão, o agente terapêutico é micronizado e então combinado com o propelente. A formulação é então carregada
20 dentro de um tubo de aerossol, que forma uma parte de um dispositivo inalador de dose medida.

Dispositivos inaladores de dose medida adequados para administrar os agentes terapêuticos por inalação são bem conhecidos daqueles habilitados na técnica ou tais
25 dispositivos estão comercialmente disponíveis. Por exemplo, dispositivos inaladores de dose medida representativos ou produtos incluem AeroBid Inhaler System (Forest Pharmaceuticals); Atrovent Inhalation Aerosol (Boehringer Ingelheim); Flovent (GlaxoSmithKline); Maxair Inhaler (3M);
30 Proventil Inhaler (Schering); Serevent Inhalation Aerosol

(GlaxoSmithKline); e etc.

Em uma outra modalidade, as composições farmacêuticas desta invenção são adequadas para a administração oral. Composições farmacêuticas adequadas para administração oral
5 podem estar na forma de cápsulas, comprimidos, pílulas, lozangos, pastilhas, drágeas, pós, grânulos; ou como uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou não aquoso; ou como uma emulsão líqüida de óleo em água ou água em óleo; ou como um elixir ou xarope; e etc.; cada uma
10 contendo uma quantidade predeterminada de um composto da pr como um ingrediente ativo.

Quando objetivadas para administração oral em uma forma de dosagem sólida (isto é, como cápsulas, comprimidos, pílulas e etc.), as composições farmacêuticas
15 desta invenção irão compreender tipicamente um composto da presente invenção como o ingrediente ativo e um ou mais veículo(s) farmacêuticamente aceitável(eis), tais como citrato de sódio ou fosfato de dicálcio. Opcionalmente ou
alternativamente, tais formas de dosagem sólidas podem
20 também compreender: (1) cargas ou diluentes, tais como amidos, lactose, sacarose, glicose, manitol e/ou ácido silícico; (2) ligantes, tais como carboximetilcelulose, alginatos, gelatinas, polivinil pirrolidona, sacarose e/ou acácia; (3) umectantes, tal como glicerol; (4) agentes
25 desintegrantes, tal como Agar-agar, carbonato de cálcio, amido de batata e de tapioca, ácido algínico, alguns silicatos e/ou carbonato de sódio; (5) agentes retardantes em solução, tal como parafina; (6) aceleradores de absorção, tais como compostos de quaternário de amônio; (7)
30 agentes umectantes, tal como álcool cetílico e/ou

monoestearato de glicerol; (8) absorventes, tais como caulim e/ou argila bentonita; (9) lubrificantes, tais como talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, polietileno glicóis sólidos, lauril sulfato de sódio e/ou 5 misturas destes; (10) agentes corantes; e (11) agentes de tamponamento.

Agentes de liberação, agentes umectantes, agentes de cobertura, adoçantes, agentes flavorizantes e aromatizantes, preservativos e antioxidantes podem também 10 estar presentes nas composições farmacêuticas desta invenção. Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, hidrocloreto de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfato de sódio, sulfito de 15 sódio e etc.; (2) antioxidantes solúveis em óleos, tais como palmitato de ascorbil, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propila, alfa-tocoferol, e etc., e (3) agentes quelantes metálicos, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetraacético 20 (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e etc. Agentes de revestimento para comprimidos, cápsulas, pílulas e etc., incluem aqueles usados para revestimentos entéricos, tais como ftalato de acetato de celulose (CAP), ftalato de acetato de polivinila (PVAP), ftalato de 25 hidroxipropil metilcelulose, copolímeros de ácido metacrílico-éster de ácido metacrílico, trimetilato de acetato de celulose (CAT), carboximetil etil celulose (CMEC), succinato de acetato de hidroxipropil metil celulose (HPMCAs) e etc.

30 Se desejado, as composições farmacêuticas da presente

invenção podem também ser formuladas para fornecer liberação lenta ou controlada do ingrediente ativo usando-se, por meio de exemplo, hidroxipropil metil celulose em proporções variadas; ou outras matrizes poliméricas, lipossomos e/ou microesferas.

Além disso, as composições farmacêuticas da presente invenção podem opcionalmente conter agentes opacificantes e podem também ser formuladas de forma que elas liberem o ingrediente ativo apenas, ou preferivelmente, em uma certa parte do trato gastrointestinal, opcionalmente, de uma maneira retardada. Exemplos de composições que podem ser usadas incluem substâncias poliméricas e ceras. O ingrediente ativo pode também estar na forma microencapsulada, se apropriado, com um ou mais do(s) excipiente(s) acima descrito(s).

As formas de dosagem líquidas adequadas para administração oral incluem, por meio de ilustração, emulsões farmacêuticamente aceitáveis, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires. Tais formas de dosagem líquidas tipicamente compreendem o ingrediente ativo e um diluente inerte, tais como, por exemplo, água ou outros solventes, agentes de solubilização e emulsificantes, tais como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila álcool benzílico, benzoato de benzila, propileno glicol, 1,3-butileno glicol, óleos (especialmente, óleos de semente de algodão, noz moída, milho, germe de trigo, oliva, rícino, e gergelim), glicerol, álcool tetrahidrofurílico, polietileno glicóis e ésteres de ácido graxo de sorbitano, e misturas destes. Suspensões, além dos ingredientes ativos, podem

conter agentes de suspensão tais como, por exemplo, álcoois isoestearílico etoxilado, polioxietileno sorbitol e ésteres de sorbitano, celulose microcristalina, metahidróxido de alumínio, bentonita, Agar-agar e tragacanto, e misturas
5 destes.

Quando objetivadas para administração oral, as composições farmacêuticas desta invenção podem ser preferivelmente embaladas em uma forma de dosagem unitária. O termo "forma de dosagem unitária" significa uma unidade
10 fisicamente separada adequada para medicamentar por dose um paciente, isto é, cada unidade contendo uma quantidade predeterminada de agente ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado ou sozinho ou em combinação com uma ou mais unidades adicionais. Por exemplo, tais formas
15 de dosagem unitárias podem ser cápsulas, comprimidos, pílulas e etc.

Os compostos desta invenção podem também ser administrados de forma transdérmica usando-se sistemas de entrega transdérmica e excipientes. Por exemplo, um
20 composto desta invenção pode ser misturado com melhoradores de permeação, tais como propileno glicol, monolaurato de polietileno glicol, azacicloalcan-2-onas e etc., e incorporado em um adesivo ou sistema de entrega similar. Excipientes adicionais incluindo agentes de gelificação,
25 emulsificantes e tampões, podem ser usados em tais composições transdérmicas se desejado.

Adicionalmente, os compostos desta invenção podem ser administrados parenteralmente, isto é, de forma intravenosa, subcutânea ou intramuscular. Para a
30 administração parenteral, um composto de fórmula I é

tipicamente dissolvido em um veículo aceitável para administração parenteral, tal como água estéril, solução salina, óleo vegetal e etc. Por meio de ilustração, uma composição intravenosa tipicamente compreende uma solução aquosa estéril de um composto de fórmula I, onde a solução possui um pH na faixa de cerca de 4 a cerca de 7.

Se desejado, os compostos desta invenção podem ser administrados em combinação com um ou mais outros agentes terapêuticos. Nesta modalidade, um composto desta invenção ou é fisicamente misturado com o outro agente terapêutico para formar uma composição contendo ambos os agentes, ou cada agente está presente em composições separadas e distintas que são administradas ao paciente simultaneamente ou seqüencialmente.

Por exemplo, um composto da fórmula I pode ser combinado com o segundo agente terapêutico usando procedimentos convencionais e equipamento para formar uma composição compreendendo um composto de fórmula I e um segundo agente terapêutico. Adicionalmente, os agentes terapêuticos podem ser combinados com um veículo farmacologicamente aceitável para formar uma composição farmacêutica compreendendo um composto da fórmula I, um segundo agente terapêutico e um veículo farmacologicamente aceitável. Nesta modalidade, os componentes da composição são tipicamente misturados ou combinados para criar uma mistura física. A mistura física é então administrada em uma quantidade terapêuticamente efetiva usando-se qualquer uma das rotas descritas aqui.

Alternativamente, os agentes terapêuticos podem permanecer separados e distintos antes da administração ao

paciente. Nesta modalidade, os agentes terapêuticos não são fisicamente misturados juntos antes da administração, mas são administrados simultaneamente ou seqüencialmente como composições separadas. Por exemplo, um composto de fórmula I pode ser administrado por inalação simultaneamente ou seqüencialmente com outro agente terapêutico usando-se um dispositivo de entrega de inalação que emprega compartimentos separados (por exemplo, cartela tipo blíster) para cada agente terapêutico. Alternativamente, a combinação pode ser administrada através de dispositivos de entrega separados, isto é, um dispositivo de entrega para cada agente terapêutico. Adicionalmente, os agentes terapêuticos podem ser entregues por diferentes rotas de administração, isto é, um pode inalação e o outro por administração oral.

Qualquer agente terapêutico compatível com os compostos da presente invenção podem ser usados em combinação com tais compostos. Em uma modalidade particular, o segundo agente terapêutico é um que seja efetivamente administrado por inalação. Por meio de ilustração, os tipos representativos dos agentes terapêuticos que podem ser usados com os compostos desta invenção incluem, mas não estão limitados a agentes antiinflamatórios, tais como agentes antiinflamatórios esteroidais (incluindo corticosteróides e glucocorticóides), agentes antiinflamatórios não esteroidais (NSAEDs) e inibidores de PDE4; broncodilatadores, tais como inibidores de PDE3, moduladores de adenosina 2b e agonista de receptor β_2 -adrenérgico; agentes antiinfectivos, tais como antibióticos

gram-positivos e gram-negativos, e agentes antivirais; antihistamínicos; inibidores da protease,; bloqueadores aferentes, tal como agonistas D2 e moduladores da neuroquinina; e antagonistas de receptor muscarínico
5 (agentes anticolinérgicos). Numerosos exemplos de tais agentes terapêuticos são bem conhecidos na técnica. Doses adequadas para os outros agentes terapêuticos administrados em combinação com um composto da invenção estão tipicamente na faixa de cerca de 0,05 µg/dia a cerca de 500 mg/dia.

10 Em uma modalidade particular desta invenção, um composto de fórmula I é administrado em combinação com um agente antiinflamatório esteroidal. Exemplos representativos de agentes antiinflamatórios estereoidais que podem ser usados em combinação com os compostos desta
15 invenção incluem, mas não estão limitados a dipropionato de beclometasona; budesonida; propionato de butixocort; 20R-16α,17α-butilidenobis(oxi)]-6α,9α-difluoro-11β-hidroxi-17β-(metiltio)androsta-4-en-3-ona (RPR-106541); ciclesonida; dexametasona; éster *S*-fluorometílico do ácido 6α,9α-
20 difluoro-17α-[(2-furanilcarbonil)oxi]-11β-hidroxi-16α-metil-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17β-carbotiólico; éster *S*-fluorometílico do ácido 6α,9α-difluoro-11β-hidroxi-16α-metil-17α-[(4-metil-1,3-tiazol-5-carbonil)oxi]-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17β-carbotiólico; éster (*S*)-(2-oxotetrahidrofuran-3*S*-ílico) do ácido 6α,9α-difluoro-11β-
25 hidroxi-16α-metil-3-oxo-17α-propioniloxiandrosta-1,4-dieno-17β-carbotiólico; flunisolida; propionato de fluticasona; metil prednisolona; fluroato de mometasona; prednisolona; prednisona; rofleponida; ST-126; triamcinolona acetonida; e
30 etc., ou os sais farmacologicamente aceitáveis destes. Tais

agentes antiinflamatórios esteroidais estão comercialmente disponíveis ou podem ser preparados usando-se procedimentos e reagentes convencionais. Por exemplo, a preparação e uso de agentes antiinflamatórios esteroidais estão descritos na Patente U. S. de número 6.750.210 B2, emitida em 15 de junho de 2004; Patente U. S. de número 6.759.398 B2, emitida em 6 de julho de 2004; Patente U. S. de número 6.537.983, emitida em 25 de março de 2003; Publicação de Pedido de Patente U. S. de número US 2002/0019378 A1, publicada em 14 de fevereiro de 2002; e referências aqui citadas.

Quando empregado, o agente antiinflamatório esteroidal é tipicamente administrado em uma quantidade que produz um efeito terapeuticamente benéfico quando co-administrado com um composto da invenção. Tipicamente, o agente antiinflamatório esteroidal será administrado em uma quantidade suficiente para fornecer de cerca de 0,05 µg a cerca de 500 µg por dose.

Os seguintes exemplos ilustram composições farmacêuticas representativas da presente invenção:

Exemplo A

Composição de Pó Seco

Um composto micronizado da invenção (100 mg) é combinado com lactose moída (25 g) (por exemplo, lactose em que não mais que cerca de 85% das partículas tenham um MMD de cerca de 60 µm a cerca de 90 µm e não menos de 15% das partículas possuem um MMD de menos de 15 µm). Esta mistura combinada é então carregada em blísteres individuais de um pacote de blíster "descascável", em uma quantidade suficiente para fornecer cerca de 10 µg a cerca de 500 µg

do composto da invenção por dose. Os conteúdos dos blísteres são administrados usando-se um inalador de pó.

Exemplo B

Composição de Pó Seco

5 Um composto micronizado da invenção (1 g) é combinado com lactose moída (200 g) para formar uma composição volumosa possuindo uma relação de peso entre o composto e a lactose moída de 1:200. A composição combinada é embalada em um dispositivo de inalação de pó seco capaz de entregar
10 entre cerca de 10 µg a cerca de 500 µg do composto da invenção por dose.

Exemplo C

Composição de Pó Seco

Um composto micronizado da invenção (100 mg) e um
15 agente antiinflamatório esteroidal micronizado (500 mg) são combinados com lactose moída (30 g). Esta mistura combinada é então carregada em blísteres individuais de um pacote de blíster "descascável", em uma quantidade suficiente para fornecer cerca de 10 µg a cerca de 500 µg do composto da
20 invenção por dose. Os conteúdos dos blísteres são administrados usando-se um inalador de pó.

Exemplo D

Composição de Inalador de Dose Medida

Um composto micronizado da invenção (10 g) é disperso
25 em uma solução preparada dissolvendo-se lecitina (0,2 g) em água desmineralizada (200 mL). A suspensão resultante é seca por pulverização e então é micronizada para formar uma composição micronizada compreendendo partículas possuindo um diâmetro médio menor que 1,5 µm. A composição
30 micronizada é então carregada em cartuchos inaladores de

dose medida contendo 1,1,1,2-tetrafluoroetano pressurizado em uma quantidade suficiente para fornecer cerca de 10 µg a cerca de 500 µg do composto da invenção por dose quando administrado pelo inalador de dose medida.

5 **Exemplo E**

Composição Nebulizadora

Um composto da invenção (25 mg) é dissolvido em solução salina isotônica tamponada com citrato (pH =5) (125 mL). A mistura é agitada e sonicada até que o composto seja
10 dissolvido. O pH da solução é verificado e ajustado, se necessário, ao pH 5 adicionando-se lentamente hidróxido de sódio 1N aquoso. A solução é administrada usando-se um dispositivo nebulizador que fornece cerca de 10 µg a cerca de 500 µg do composto da invenção por dose.

15 **Exemplo F**

Cápsulas de Gelatina Rígidas

Um composto da invenção (50 g), lactose seca por pulverização (440 g) e estearato de magnésio (10 g) são completamente misturados. A composição resultante é
20 carregada em uma cápsula de gelatina dura (500 mg da composição por cápsula) que são administradas oralmente.

Exemplo G

Suspensão Oral

Os ingredientes seguintes são completamente misturados
25 para formar uma suspensão para administração oral:

<u>Ingredientes</u>	<u>Quantidade</u>
Composto da Invenção	1,0 g
Ácido fumárico	0,5 g
Cloreto de sódio	2,0 g
Metol parabeno	0,15 g

Propil parabeno	0,05 g
Açúcar granulado	25,5 g
Sorbitol (solução 70%)	12,85 g
VEEGUM® K (silicato de magnésio e alumínio)	1,0 g
flavorizante	0,035 mL
corante	0,5 mg
Água destilada	q.s. para 100 mL

A suspensão resultante contém 100 mg de ingrediente ativo por 10 mL de suspensão. A suspensão é administrada oralmente.

Exemplo H

5 Composição Injetável

Um composto da invenção (0,2 g) é combinado com uma solução tampão de acetato de sódio 0,4 M (2,0 mL). O pH da solução resultante é ajustado a pH 4 usando-se ácido hidrolórico 0,5N ou hidróxido de sódio 0,5N, conforme necessário, e então água suficiente para injeção é adicionada para fornecer um volume total de 20 mL. A mistura é então filtrada através de um filtro estéril (0,22 micron) para fornecer uma solução estéril adequada para administração por injeção.

15

UTILIDADE

Os compostos desta invenção possuem tanto atividade agonista de receptor β_2 -adrenérgico quanto atividade antagonista do receptor muscarínico e portanto, espera-se que tais compostos sejam úteis como agente terapêuticos para tratar condições médicas mediadas pelos receptores β_2 -adrenérgicos ou receptores muscarínicos, isto é, condições médicas que são melhoradas pelo tratamento com o agonista

20

do receptor β_2 -adrenérgico ou um antagonista do receptor muscarínico. Tais condições médicas são bem conhecidas daqueles habilitados na técnica conforme exemplificado pelos ensinamentos de Eglen e outros, *Muscarinic Receptor* 5 *Subtypes: Pharmacology and Therapeutic Potential*, DN&P 10(8), 462-469 (1997); Emilien e outros, *Current Therapeutic Uses and Potential of beta-Adrenoceptor Agonists and Antagonists*, *European J. Clinical Pharm.*, 53(6), 389-404 (1998); e referências citadas neste. Tais 10 condições médicas incluem, por meio de exemplo, disfunções ou doenças pulmonares associadas com obstrução das vias aéreas reversível, tais como doença pulmonar obstrutiva crônica (por exemplo, bronquite crônica e respiração difícil e enfisema), asma, fibrose pulmonar, e etc. Outras 15 condições incluem parto prematuro, depressão, falha congestiva do coração, doenças de pele (por exemplo, doenças inflamatórias, alérgicas, psoriáticas e doenças de pele proliferativas, condições onde a diminuição da acidez péptica é desejável (por exemplo, ulceração péptica e 20 gástrica) e doença de enfraquecimento muscular).

Conseqüentemente, em uma modalidade, esta invenção relaciona-se a um método para tratar uma disfunção pulmonar, o método compreendendo administrar a um paciente em necessidade de tratamento uma quantidade 25 terapêuticamente efetiva de um composto de fórmula I. Quando usado para tratar uma disfunção pulmonar, os compostos desta invenção serão tipicamente administrados por inalação em múltiplas doses por dia, em uma única dose por dia ou em uma única dose por semana. Geralmente, a dose 30 para tratar uma disfunção pulmonar irá variar de cerca de

10 µg/dia a cerca de 500 µg/dia.

Em um dos aspectos dos métodos, esta invenção relaciona-se a um método de tratamento de doença pulmonar obstrutiva crônica ou asma, o método compreendendo 5 administrar a um paciente uma quantidade terapeuticamente efetiva de um composto de fórmula I. Geralmente, a dose para tratar COPD ou asma irá variar de cerca de 10 µg/dia a cerca de 500 µg/dia. O termo "COPD" é compreendido por aqueles habilitados na técnica como incluindo uma variedade 10 de condições respiratórias, incluindo bronquite obstrutiva crônica e enfisema, conforme exemplificado pelos ensinamentos de Barnes, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease, N. Engl. J. Med.*, 2000: 343:269-78, e referências aqui citadas.

15 Quando administrados por inalação, os compostos desta invenção tipicamente possuem o efeito de produzir broncodilatação. Conseqüentemente, em outros aspectos dos métodos, esta invenção relaciona-se a um método de produção de broncodilatação em um mamífero, o método compreendendo 20 administrar a um mamífero uma quantidade produtora de broncodilatação de um composto de fórmula I. Geralmente, a dose para produzir broncodilatação irá variar de cerca de 10 µg/dia a cerca de 500 µg/dia.

Quando usados como agente terapêutico, os compostos 25 desta invenção são opcionalmente administrados em combinação com outros agentes terapêuticos. Particularmente, administrando-se os compostos desta invenção com um agente antiinflamatório esteroidal, terapia tripla, isto é, atividade agonista de receptor β_2 - 30 adrenérgico, atividade antagonista de receptor muscarínico

e atividade antiinflamatória, pode ser alcançada usando-se apenas dois agentes terapêuticos. Uma vez que as composições farmacêuticas (e combinações) contendo dois agentes terapêuticos são tipicamente mais fáceis de formular e/ou administrar comparadas às composições que contêm três agentes terapêuticos, tais composições de dois componentes fornecem uma vantagem significativa sobre as composições que contêm três agentes terapêuticos. Conseqüentemente, em uma modalidade particular, as composições farmacêuticas, combinações e métodos desta invenção também compreendem um agente antiinflamatório esteroidal.

Uma vez que os compostos desta invenção possuam atividade agonista de receptor β_2 -adrenérgico e atividade antagonista do receptor muscarínico, tais compostos são também úteis como ferramentas de pesquisa para investigação ou estudo de sistemas biológicos ou amostras possuindo os receptores β_2 -adrenérgicos ou muscarínicos. Adicionalmente, tais compostos são úteis em ensaios de seleção para descobrir, por exemplo, novos compostos possuindo atividade agonista de receptor β_2 -adrenérgico e atividade antagonista do receptor muscarínico. Tais sistemas biológicos ou amostras podem compreender receptores β_2 -adrenérgicos e/ou receptores muscarínicos. Qualquer sistema biológico ou amostra adequados que possuem receptores β_2 -adrenérgicos e/ou receptores muscarínicos pode ser empregado em tais estudos, os quais podem ser conduzidos ou *in vitro* ou *in vivo*. Sistemas biológicos ou amostras representativos adequados para tais estudos incluem, mas não estão limitados a células, extratos celulares, membranas de

plasma, amostras de tecido, mamíferos (tais como camundongos, ratos, porquinho da índia, coelhos, cachorros, porcos, etc.) e etc.

Quando usando como uma ferramenta de pesquisa, um sistema biológico ou amostra compreendendo um receptor β_2 -adrenérgico e/ou receptores muscarínico é tipicamente contatado com uma quantidade agonizante do receptor β_2 -adrenérgico ou antagonizante do receptor muscarínico de um composto desta invenção. Os efeitos no sistema biológico ou amostras causados pelo composto são então determinados ou medidos usando-se procedimentos convencionais e equipamentos, tal como medindo-se a ligação em um ensaio de ligação de radioligante ou mudanças mediadas por ligante em um ensaio funcional ou determinando-se a quantidade de broncoproteção fornecida pelo composto em um ensaio de broncoproteção em um mamífero. Mudanças mediadas por ligante representativas em um ensaio funcional incluem mudanças mediadas por ligante em monofosfato de adenosina cíclica intracelular (cAMP), mudanças mediadas por ligante na atividade da enzima adenilil ciclase (que sintetiza o cAMP), mudanças mediadas por ligante na incorporação de 5'-O-(tio)trifosfato de guanosina ($[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$) em membranas isoladas através da troca catalisada por receptor de ($[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$) por GDP, mudanças mediadas por ligante em íons cálcio intracelular livres (medida, por exemplo, com um leitor de placa de imagem ligado a fluorescência ou FLIPR[®] a partir de Molecular Devices, Inc.) e etc. Espera-se que compostos desta invenção agonizem ou causam a ativação de um receptor β_2 -adrenérgico e antagonizem ou diminuam a ativação dos receptores muscarínicos nos ensaios funcionais

listados aqui ou em ensaios de uma natureza similar. Os compostos desta invenção serão tipicamente usados nestes estudos a uma concentração variando de cerca de 0,1 nanomolar a cerca de 100 nanomolar.

5 Adicionalmente, os compostos desta invenção podem ser usados como ferramentas de pesquisa para avaliar outros compostos químicos. Neste aspecto da invenção, um composto de fórmula I é usado como um padrão em um ensaio para permitir a comparação dos resultados obtidos com um

10 composto de teste e o composto de fórmula I. Por exemplo, os dados de ligação do receptor β_2 -adrenérgico e/ou do receptor muscarínico (conforme determinado, por exemplo, por ensaios de deslocamento de radioligante *in vitro*) para um composto de teste ou um grupo de compostos de teste é

15 comparado aos dados de ligação do receptor β_2 -adrenérgico e/ou do receptor muscarínico para um composto de fórmula I para identificar aqueles compostos de teste que possuem ligação desejável, isto é, compostos de teste possuindo ligação quase igual ou superior a um composto de fórmula I,

20 se houver. Alternativamente, por exemplo, os efeitos broncoprotetores podem ser determinados para os compostos de teste e um composto de fórmula I em um ensaio de broncoproteção em um mamífero e estes dados comparados para identificar os compostos de teste que fornecem efeitos

25 broncoprotetores quase iguais ou superiores. Este aspecto da invenção inclui, como modalidades separadas, tanto (i) a geração dos dados de comparação (usando-se os ensaios apropriados) quanto (ii) a análise dos dados de teste para identificar os compostos de teste de interesse.

30 As propriedades e utilidades dos compostos desta

invenção podem ser demonstradas usando-se vários ensaios *in vitro* e *in vivo* bem conhecidos daqueles habilitados na técnica.

Por exemplo, ensaios representativos são descritos em maiores detalhes nos seguintes Exemplos.

EXEMPLOS

As Preparações e Exemplos a seguir são fornecidos para ilustrar modalidades específicas e aspectos desta invenção. A ilustração das modalidades específicas e aspectos, entretanto, não é objetivada para limitar o escopo desta invenção de qualquer forma a menos que especificamente indicado.

Todos os reagentes, materiais iniciais e solventes usados nos seguintes exemplos foram adquiridos a partir de fornecedores comerciais (tal como Aldrich, Fluka, Sigma e similares) e foram utilizados sem purificação adicional a menos que de outra forma indicado.

Nos exemplos descritos a seguir, a análise por HPLC foi tipicamente conduzida utilizando-se um instrumento Agilent (Palo Alto, CA) série 1100 equipado com colunas Zorbax Bonus RP 2,1 x 50 mm fornecida por Agilent, (uma coluna C14) possuindo um tamanho de partícula de 3,5 micra. A detecção foi feita por absorbância UV a 214 nm. A fase móvel "A" era 2% de acetonitrila, 97,9% de água, e 0,1% de ácido trifluoroacético (v/v/v); e a fase móvel "B" era 89,9% de acetonitrila 89,9%, 10% de água, e 0,1% de ácido trifluoroacético (v/v/v). Os dados de HPLC (10-70) foram obtidos com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/minuto de gradiente de fase móvel B de 10% a 70% durante um período de 6 minutos; os dados de HPLC (5-35) foram obtidos com uma taxa

de fluxo de 0,5 mL/minuto de gradiente de fase móvel B de 5% a 35% durante um período de 5 minutos; e os dados de HPLC (10-90) foram obtidos com uma taxa de fluxo de 0,5 mL/minuto de gradiente de fase móvel B de 10% a 90% durante um período de 5 minutos.

Os dados de cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LCMS) foram tipicamente obtidos com um instrumento da Applied Biosystems (Foster City, CA) Modelo API-150EX. Os dados de LCMS 10-90 foram obtidos com um gradiente de fase móvel B de 10% - 90% durante período de 5 minutos.

Purificações em pequena escala foram conduzidas utilizando-se um sistema de estação de preparação/Prep Workstation API 150EX da Applied Biosystems. A fase móvel "A" era água contendo 0,05% de ácido trifluoroacético (v/v); e a fase móvel "B" era acetonitrila contendo 0,05% de ácido trifluoroacético (v/v). Para pequenas amostras (cerca de 3 a 50 mg de tamanho de amostra recuperada), as seguintes condições foram tipicamente utilizadas: taxa de fluxo de 20 mL/min; gradientes de 15 minutos e uma coluna Prism RP de 20 mm x 50 mm com partículas de 5 micra (Thenno Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA). Para amostras maiores (isto é, maiores que cerca de 100 mg de amostra bruta), as seguintes condições foram utilizadas: taxa de fluxo de 60 mL/min; gradientes de 30 minutos e uma coluna Microsorb BDS de 41,4 mm x 250 mm com partículas de 10 micra (Varian, Palo Alto, CA).

Exemplo 1

Éster Piperidin-4-ílico do Ácido Bifenil-2-ilcarbâmico Bifenil-2-isocianato (97,5 g, 521 mmol) e 4-hidroxi-1-

benzilpiperidina (105 g, 549 mmol), ambos disponíveis comercialmente a partir de Aldrich, Milwaukee, WI, foram aquecidos juntos a 70°C por 12 horas, durante este tempo a formação do éster 1-benzilpiperidin-4-ílico do ácido

5 bifenil-2-ilcarbâmico foi monitorada por LCMS. A mistura de reação foi então resfriada a 50°C e foi adicionado etanol (1 L) e depois foi adicionado ácido hidrolórico 6M (191 mL) lentamente. A mistura reacional foi então resfriada à temperatura ambiente e formato de amônio (98,5 g, 1,56 mol)

10 foi adicionado e gás nitrogênio foi borbulhado através da solução vigorosamente por 20 minutos. Paládio (10% em peso (base seca) em carvão ativo) (20 g) foi então adicionado. A mistura reacional foi aquecida a 40°C por 12 horas e então filtrada através de um absorvente de Celite. O solvente foi

15 então removido sob pressão reduzida e ácido hidrolórico 1M (40 mL) foi adicionado ao resíduo bruto. Hidróxido de sódio (10 N) foi então adicionada para ajustar o pH a 12. A camada aquosa foi extraída com acetato de etila (2 x 150 mL) e seca (sulfato de magnésio), e então o solvente foi

20 removido sob pressão reduzida para fornecer o éster piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (155 g, 100%). HPLC (10-70) $R_t = 2,52$; MS m/z : $[M + H^+]$ calculado para $C_{18}H_{20}N_2O_2 = 297,15$; encontrado, 297,3.

Exemplo 2

25 **Ácido 3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propiónico**

A uma solução do éster piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (50 g, 67,6 mmol) em diclorometano (500 mL) foi adicionado ácido acrílico (15,05 mL, 100

30 mmol). A mistura resultante foi aquecida a 50°C sob refluxo

por 18 horas e então o solvente foi removido. Metanol (600 mL) foi adicionado e esta mistura foi aquecida a 75°C por 2 horas e então resfriada à temperatura ambiente para formar uma mistura semifluida espessa. O sólido foi coletado por 5 filtração, lavado com metanol (50 mL) e seco a ar para fornecer o ácido 3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propiónico (61g, 96% de pureza) como um sólido branco.

Exemplo 3

Sal do ácido acético de *N*-{5-[(*R*)-2-amino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}-formamida 10

Etapa A - *N*-{5-[(*R*)-2-benzilamino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benziloxifenil}formamida

A um frasco de fundo redondo de três gargalos de 500 mL foram adicionados *N*-{2-benziloxi-5-[(*R*)-2-bromo-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]fenil}formamida (100 g, 215 15 mmol) e *N*-metil-2-pirrolidona (300 mL). A benzilamina (69,4 mmol, 648 mol) foi adicionada e a mistura reacional foi inundada com nitrogênio. A mistura reacional foi então aquecida a 90°C e agitada por cerca de 8 horas. A mistura 20 reacional foi então resfriada à temperatura ambiente e água (1,5 L) e acetato de etila (1,5 L) foi adicionado. As camadas foram separadas e a camada orgânica foi lavada com água (500 mL), uma mistura de 1:1 de água e salmoura saturada (500 mL total) e então novamente com água (500 25 mL). A camada orgânica foi então seca sobre sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para fornecer a *N*-{5-[(*R*)-2-benzilamino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benziloxifenil} formamida (100 g, 90% de rendimento, 75-80% de pureza) bruta como um 30 óleo espesso laranja-amarronzado.

Etapa B - Sal do ácido acético de N-{5-[(R)-2-amino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}-formamida

N-{5-[(R)-2-benzilamino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benziloxifenil}formamida
 5 bruta (100 g, 194 mmol) foi dissolvida em metanol (1L) e ácido acético (25 mL, 291 mmol). A mistura resultante foi purgada com nitrogênio seco e então hidróxido de paládio em carbono (20 g, 20% em peso, cerca de 50% de água) foi
 10 lavado. Hidrogênio foi bombeado através da mistura reacional com agitação à temperatura ambiente por cerca de 10 horas. A mistura foi então purgada com nitrogênio seco e a mistura foi filtrada através de Celite. O filtrado foi concentrado em um evaporador rotativo e acetato de etila
 15 (600 mL) foi adicionado ao resíduo. Esta mistura foi agitada por cerca de 2 horas em cujo tempo uma mistura semifluida amarela espessa foi desenvolvida: A mistura semifluida foi filtrada e o precipitado foi seco a ar para fornecer o sal do ácido acético de N-{5-[(R)-2-amino-1-
 20 (terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida como um sólido amarelo-esbranquiçado. LCMS (10-70) R_t = 3,62; [M + H⁺] encontrado 311,3.

Exemplo 4

Éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil) etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

Etapa A - 2,5-dimetil-4-nitrobenzoato de metila

A uma solução agitada de ácido 2,5-dimetil-4-nitrobenzóico (480 mg, 2,4 mmol) em metanol (8,2 mL) a 0°C
 30 sob nitrogênio seco foi adicionado cloreto de tionila

(0,538 mL, 7,38 mmol). A mistura resultante foi deixada a aquecer até temperatura ambiente e agitada por cerca de 7 horas. Cloreto de tionila adicional (0,300 mL) foi adicionado e a agitação foi continuada à temperatura ambiente durante a noite. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o resíduo foi dissolvido em acetato de etila (30 mL). Esta solução foi lavada com bicarbonato de sódio aquoso saturado, seca sob sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer 2,5-dimetil-4-nitrobenzoato de metila (578 mg) como um sólido amarelo claro. HPLC (10-70) $R_t = 4,61$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2,57 (3H, s), 2,61 (3H, s), 3,94 (3H, s), 7,82 (1H, s), 7,87 (1H, s).

Etapa B - 4-amino-2,5-dimetilbenzoato de metila

A uma solução agitada de 2,5-dimetil-4-nitrobenzoato de metila (523 mg, 2,5 mmol) em uma mistura 9:1 de metanol e água (25 mL no total) a 0°C foi adicionado cloreto de amônio (401 mg, 7,5 mmol). Zinco (1,63 g, 25 mmol) foi adicionado em porções e a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. A mistura reacional foi então filtrada através de Celite, e o adsorvente de Celite foi lavado com metanol. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo resultante foi dissolvido em acetato de etila. Esta solução foi lavada com bicarbonato de sódio aquoso saturado, seca sob sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida para fornecer 4-amino-2,5-dimetilbenzoato de metila (450 mg) como um óleo amarelo. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2,14 (3H, s), 2,53 (3H, s), 3,83 (3H, s), 3,85 (2H, br s), 6,48 (1H, s), 7,72 (1H, s).

Etapa C - 4-{3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}2,5-dimetilbenzoato de metila

A uma solução agitada de ácido 3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propiônico (670 mg, 1,82 mmol) e 4-amino-2,5-dimetilbenzoato de metila (390 mg, 2,18 mmol) em dichlorometano (3,6 mL) e diisopropiletilamina (0,413 mL) foi adicionado hexafluorofosfato de o-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio (HATU) (829 mg, 2,18 mmol). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. A mistura foi então lavada com solução saturada aquosa de bicarbonato de sódio, seca sobre sulfato de sódio anidro e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia de sílica gel eluindo-se com diclorometano contendo de 3% a 5% de metanol para fornecer 4-{3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il] propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metila (568 mg, 59% de rendimento). LCMS (10-70) $R_t = 4,55$; $[M + H^+]$ encontrado 530,4.

Etapa D - Éster 1-{2-[(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

A uma solução agitada de hidreto de lítio e alumínio 1M em THF (1,52 mL, 1,52 mmol) a 0°C foi adicionado 4-{3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metila (400 mg, 0,76 mmol). A mistura resultante foi agitada a 0°C por 30 minutos e então uma mistura 1:1 de hidróxido de sódio aquoso 1M (5 mL) e água (5 mL) foi adicionada e a agitação foi continuada por 2 horas. Diclorometano foi adicionado e a camada orgânica foi separada, seca sobre sulfato de sódio e o solvente

removido sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por cromatografia em sílica gel eluindo-se com diclorometano contendo 5% de metanol para fornecer o éster 1-{2-[(4-hidroxi-
 5 ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico. LCMS (10-70) R_t = 3,94; [M + H⁺] encontrado 502,5.

Etapa E - Éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

10 A uma solução de éster 1-[2-(4-hidroxi-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ac bifenil-2-ilcarbâmico (151 mg, 0,3 mmol) em diclorometano (3 mL) a 0°C foi adicionado dimetil sulfóxido (128 µL, 1,8 mmol) e diisopropiletilamina (157 µL, 0,9 mmol). Após 15 minutos, o
 15 complexo trióxido de enxofre-piridina (143 mg, 0,9 mmol) foi adicionado e a agitação a 0°C foi continuada por 1 hora. Água foi adicionada para temperar a reação e as camadas foram separadas. A camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob
 20 pressão reduzida para fornecer o éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (150 mg, 100% de rendimento), que foi usado sem purificação adicional. [M + H⁺] encontrado 500,4.

**Etapa F - Éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxi-
 25 etilamino]metil})-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico**

Uma solução de éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido
 30 bifenil-2-ilcarbâmico (150 mg, 0,30 mmol) e N-{5-[(R)-2-

amino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil] -2-hidroxifenil} formamida (112 mg, 0,36 mmol) em uma mistura 1:1 de mistura 1:1 de diclorometano e metanol (3,0 mL total) foi agitada à temperatura ambiente por 30 minutos. Triacetoxiborohidreto de sódio (191 mg, 0,9 mmol) foi adicionado e a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante a noite. Ácido acético foi adicionado para temperar a reação e a mistura foi concentrada sob pressão reduzida para fornecer o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico, que foi usados sem purificação adicional. LCMS (10-70) $R_t = 4,55$; $[M + H^+]$ encontrado 794,6.

15 Etapa G - Éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

A uma suspensão do éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil] piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (238 mg, 0,30 mmol) em diclorometano (3,0 mL) foi adicionado trihidrofluoreto de trietilamina (147 μ L, 0,90 mmol). Esta mistura foi agitada à temperatura ambiente durante a noite e então a mistura foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por prep-RP-HPLC (gradiente: 2 a 50% de acetonitrila em água com 0,05% de TFA). As frações apropriadas foram coletadas, combinadas e liofilizadas para fornecer éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-

hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico como o sal ditrifluoroacetato (50 mg, 97% de pureza). LPLC (2-90) R_t = 2,76; [M + H⁺] encontrado 5 680,8.

Exemplo 5

Éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

10 Etapa A - dibenzil-(4-iodo-2,5-dimetilfenil)amina

A um frasco de fundo redondo de 2 litros equipado com um agitador suspenso, controle de temperatura e um funil de adição, foi adicionada 4-iodo-2,5-dimetilanilina (100,0 g, 0,405 mol) (a partir de Spectra Group Limited, Inc., 15 Millbury, OH). Etanol (1L) e carbonato de potássio sólido (160 g, 1,159 mol) foram adicionados e então brometo de benzila puro (140 mL, 1,179 mol) foi adicionado em uma porção. A mistura resultante foi agitada a 30°C por cerca de 18 horas em cujo tempo o HPLC apresentou mais de 98% de 20 conversão. A mistura foi então resfriada até temperatura ambiente e os hexanos (1L) foram adicionados. Esta mistura foi agitada por 15 minutos e então filtrada através de um papel de filtro para remover sólidos e o bolo do filtro foi lavado com hexanos (200 mL). Usando-se um rotoevaporador, o 25 volume do filtrado foi reduzido a cerca de 500 mL e ácido hidrolórico concentrado (30 mL) foi adicionado. O solvente restante foi então removido usando-se um rotoevaporador. Ao resíduo resultante foram adicionados hexanos (500 mL) e esta mistura foi agitada por cerca de 30 minutos em cujo 30 tempo uma mistura semifluida não aglomerada foi formada. A

mistura semifluida foi filtrada e o bolo do filtro foi lavado com hexanos (200 mL) e seco para fornecer hidrocloreto de dibenzil-(4-iodo-2,5-dimetilfenil)amina (115 g, 62% de rendimento, 97,5% de pureza) como um sólido de cor esverdeada.

O hidrocloreto de dibenzil-(4-iodo-2,5-dimetilfenil)amina foi transferido a um frasco de 3L e tolueno (1L) e hidróxido de sódio aquoso 1M (1L) foram adicionados. A mistura resultante foi agitada por 1 hora e então as camadas foram separadas. A camada orgânica foi lavada com salmoura diluída (500 mL) e o solvente foi removido por rotoevaporação para fornecer dibenzil-(4-iodo-2,5-dimetilfenil)amina (80 g) como um óleo espesso semi-sólido. (Alternativamente, diclorometano pode ser usado no lugar de tolueno nesta etapa). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2,05 (3H, s), 2,19 (3H, s), 3,90 (4H, s), 6,91 (1H, s), 7,05-7,20 (10H, m), 7,42 (1H, s); MS [M + H $^+$] encontrado 428.

Etapa B - Hidrocloreto de 4-dibenzilamino-2,5-dimetilbenzaldeído

A um frasco de fundo redondo de 3 gargalos de 1 litro equipado com um agitador suspenso, controle de temperatura e um funil de adição, foi adicionada dibenzil-(4-iodo-2,5-dimetilfenil)amina (15 g, 35 mmol). Tolueno (300 mL) foi adicionado e a mistura resultante foi agitada por cerca de 15 minutos. O frasco de reação foi purgado com nitrogênio seco resfriado a cerca de -20°C e *n*-butil-lítio 1,6 M em hexanos (33 mL, 53 mmol) foi adicionado gota a gota através do funil de adição. Durante a adição, a temperatura interna da mistura reacional foi mantida abaixo de -10°C . Quando a

adição estava completa, a mistura resultante foi agitada a cerca de -15°C por 15 minutos. *N,N*-dimetilformamida (10 mL, 139 mmol) foi então adicionada gota a gota enquanto se mantinha a temperatura interna da reação abaixo de 0°C . A 5 mistura resultante foi então agitada entre -20°C e 0°C por cerca de 1 hora. Ácido hidrocloreto 1M aquoso (200 mL) foi então adicionado durante um período de 5 minutos e a mistura resultante foi agitada por 15 minutos. As camadas foram então separadas e a camada orgânica foi lavada com 10 salmoura diluída (100 mL). A camada orgânica foi então seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e o solvente removido sob pressão reduzida para fornecer hidrocloreto de 4-dibenzilamino-2,5-dimetilbenzaldeído (11,5 g, 90% de rendimento, 95% de pureza) como um óleo espesso que se 15 solidificou sob repouso. O produto continha cerca de 3 a 5% do subproduto desidratado. ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.42 (3H, s), 2.50 (3H, s), 4.25 (4H, s), 6.82 (1H, s), 7.10-7.30 (10H, m), 7.62 (1H, s), 10.15 (1H, s); MS [$\text{M} + \text{H}^+$] encontrado 330,3.

20 **Etapa C - 4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilamina**

A um frasco de fundo redondo de 500 mL foi adicionado hidrocloreto de 4-dibenzilamino-2,5-dimetilbenzaldeído (11,5 g, 31,4 mmol) e tolueno (150 mL) e a mistura resultante foi agitada até que o sal estivesse 25 completamente dissolvido. O frasco de reação foi então purgado com nitrogênio seco por 5 minutos. Etileno glicol (5,25 mL, 94,2 mmol) e ácido *p*-toluenossulfônico (760 mg, 6,2 mmol) foram adicionados e a mistura resultante foi aquecida a uma temperatura entre 60°C e 80°C por cerca de 30 20 horas. O solvente foi então removido lentamente (durante

cerca de 40 minutos) a 40°C em um evaporador rotativo. Tolueno (100 mL) foi adicionado ao resíduo e o solvente foi novamente removido lentamente a 40°C em um evaporador rotativo. Este processo foi repetido usando-se uma outra
5 alíquota de tolueno (100 mL) e a mistura foi evaporada à secura. Acetato de etila (150 mL) e bicarbonato de sódio aquoso saturado (100 mL) foram adicionados ao resíduo e as camadas foram separadas. A camada orgânica foi lavada com salmoura (50 mL) e então seca sobre sulfato de sódio
10 anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para fornecer dibenzil-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)amina bruta (11,4 g).

A dibenzil-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)amina bruta foi dissolvida em uma mistura 2:1 de
15 etanol e água (total de 150 mL) e a mistura resultante foi purgada com nitrogênio seco por 5 minutos. Paládio em carbono (2,3 g, 10% em peso contendo cerca de 50% de água) e bicarbonato de sódio sólido (1,0 g) foram adicionados e a mistura resultante foi hidrogenada a cerca de 101,33 kPa de
20 hidrogênio a uma temperatura entre 25°C e 30°C por cerca de 8 horas. A mistura foi então filtrada através de Celite e o filtrado foi concentrado em um evaporador rotativo para fornecer a 4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilamina bruta (5,6 g, 92% de rendimento) como um óleo espesso. ¹H NMR
25 (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2,05 (3H, s), 2,22 (3H, s), 3,7-3,9 (4H, m), 3,95 (4H, s), 5,59 (1H, s), 6,72 (1H, s), 7,0-7,25 (11H, m).

Etapa D - N-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida

30 A um frasco de fundo redondo de 500 mL foram

adicionados. 4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilamina
bruta (5,6 g, 29 mmol), diclorometano (100 mL) e
diisopropiletilamina (7,6 mL, 43,5 mmol). A mistura
resultante foi agitada à temperatura ambiente até que os
5 ingredientes estivessem dissolvidos e então a mistura foi
resfriada a 0°C. Cloreto de acrilóila (2,35 mL, 29 mmol)
foi então adicionado gota a gota durante um período de 5
minutos. A mistura reacional foi agitada entre 0°C e 5°C
por 1 hora e então água (50 mL) foi adicionada e a agitação
10 foi continuada por cerca de 30 minutos em cujo tempo os
sólidos finos foram formados. A mistura foi filtrada para
coletar os sólidos. As camadas do filtrado foram então
separadas e a camada orgânica foi concentrada sob pressão
reduzida à secura. Diclorometano (50 mL) foi adicionado ao
15 resíduo e esta mistura foi agitada até que uma mistura
semifluida não aglomerada fosse desenvolvida. A mistura
semifluida foi filtrada (usando-se o mesmo funil usado para
coletar os sólidos finos acima) e o bolo do filtro foi
lavado com diclorometano (10 mL) e seco para fornecer *N*-(4-
20 [1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (3,1 g, 97%
de pureza) como um sólido de branco gelo a branco.

O filtrado acima foi então concentrado à secura e
metanol (10 mL) foi adicionado ao resíduo. Esta mistura foi
agitada por 15 minutos e então o precipitado foi coletado
25 por filtração, lavado com metanol (5 mL) e seco para dar
uma "safra" de *N*-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-
dimetilfenil)acrilamida (0,8 g, 95% de pureza). ¹H NMR (300
MHz, CD₃OD) δ 2,10 (3H, s), 2,23 (3H, s), 3,85-4,10 (4H,
m), 5,60-6,40 (3H, m), 5,59 (1H, s), 7,18 (1H, s), 7,23
30 (1H, s).

Etapa E - Hidrocloreto do éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

A um frasco de fundo redondo de 50 mL foi adicionado o
 5 éster piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (1,2 g, 4,04 mmol) e N-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (1,0 g, 4,04 mmol). Etanol (10 mL) e diclorometano (10 mL) foram adicionados para formar uma
 10 mistura semifluida. A mistura reacional foi aquecida entre 45°C e 50°C por cerca de 18 horas e então resfriada até temperatura ambiente. Ácido hidrolórico aquoso 1M (10 mL) foi adicionado e a mistura resultante foi agitada vigorosamente por cerca de 3 horas. Diclorometano (10 mL) foi adicionado e a mistura resultante foi agitada por cerca
 15 de 5 minutos. As camadas foram então separadas e a camada orgânica foi seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em um evaporador rotativo para fornecer o hidrocloreto do éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido
 20 bifenil-2-ilcarbâmico bruto (1,9 g). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1,2-1,4 (2H, m), 1,58-1,75 (2H, m), 2,0-2,17 (2H, m), 2,19 (3H, s), 2,38 (3H, s), 2,41-2,50 (4H, m), 2,5-2,75 (2H, m), 4,31-4,42 (1H, m), 7,10-7,35 (9H, m), 7,55 (1H, s), 7,75 (1H, s), 8,59 (1H, s), 9,82 (1H, s), 9,98 (1H, s);
 25 MS [M + H⁺] encontrado 500,2.

Etapa F - Éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido
 30 **bifenil-2-ilcarbâmico**

A um frasco de fundo redondo de três gargalos de 2L foram adicionados hidrocloreto do éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (38 g, 70 mmol) e o sal do ácido acético de N-{5-[(R)-2-amino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida (33,6 g, 91 mmol). Diclorometano (500 mL) e metanol (500 mL) foram adicionados e a mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente sob nitrogênio seco por cerca de 3 horas. A mistura reacional foi então resfriada entre 0°C e 5°C e triacetoxiborohidreto de sódio sólido (44,5 g, 381 mmol) foi adicionado em porções por um período de 10 minutos. A mistura reacional foi aquecida lentamente a 0°C até temperatura ambiente durante um período de cerca de 2 horas e então resfriada a 0°C. Bicarbonato de sódio aquoso saturado (500 mL) e diclorometano (500 mL) foram adicionados. Esta mistura foi agitada completamente e então as camadas foram separadas. A camada orgânica foi lavada com salmoura (500 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida para fornecer o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico bruto (55 g, 86% de pureza) como um sólido amarelo.

O produto bruto (30 g) foi dissolvido em diclorometano contendo 2% de metanol (total de 150 mL) e carregado sobre coluna de sílica gel (300 g) que foi empacotada e equilibrada com diclorometano contendo 2% de metanol e 0,5% de hidróxido de amônio. O produto foi eluído da coluna

usando diclorometano contendo 2% de metanol e 0,5% de hidróxido de amônio (1L), diclorometano contendo 4% de metanol e 0,5% de hidróxido de amônio (1L) e diclorometano contendo 5% de metanol e 0,5% de hidróxido de amônio (cerca de 3L). Frações (200 mL) foram coletadas e aquelas frações que possuíam pureza maior que 90% foram combinadas e concentradas sob pressão reduzida para fornecer o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico bruto (21,6 g, 96,5% de pureza) como um sólido amarelo. MS [M + H⁺] encontrado 794,6.

Etapa G - Sal hidrofluoreto do éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

A um frasco de fundo redondo de 1L foi adicionado o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (21,5 g, 27,1 mmol) e diclorometano (200 mL). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente até que os ingredientes estivessem dissolvidos e então trihidrofluoreto de trietilamina (8,85 mL, 54,2 mmol) foi adicionado e a mistura resultante foi agitada a 25°C por cerca de 48 horas. O solvente foi removido em um evaporador rotativo para fornecer uma pasta espessa. Diclorometano (100 mL) e acetato de etila (200 mL) foram adicionados à pasta e a mistura resultante foi agitada por 30 minutos. A mistura semifluida resultante foi lentamente

filtrada sob nitrogênio seco e o bolo do filtro foi lavado com uma mistura 1:2 de diclorometano e acetato de etila (total de 100 mL), seca sob nitrogênio por 2 horas e então seca a vácuo durante a noite para fornecer o éster 1-[2-(4-
5 {[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil] piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico como um sal hidrofluoreto (25 g, 96,9% de pureza) que era um sólido tipo argila duro. MS [M + H⁺] encontrado 680,8.

10 **Etapa H - Éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico**

O sal hidrofluoreto do éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-
15 formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (25 g) foi purificado em uma coluna de fase reversa de 15,24 cm (fase sólida de Microsorb) em três lotes iguais usando-se uma mistura de 10% a 50% de
20 acetonitrila em água contendo ácido trifluoroacético 1% como a fase móvel. As frações com pureza maior que 99% foram combinadas e então diluídas com um volume de água. A mistura resultante foi resfriada a 0°C e bicarbonato de
25 sódio sólido foi adicionado até que o pH da mistura fosse de cerca de 7,5 a 8,0. Dentro de cerca de 5 minutos, desenvolveu-se uma mistura semifluida branca. A mistura semifluida foi agitada por 30 minutos, filtrada. O bolo do filtro foi lavado com água (500 mL), seco a ar por cerca de
30 o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-

hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil) etil] piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (12 g, 99+% de pureza) como uma base livre semi-cristalina.

Exemplo 6

5 Éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil) etil] piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

Etapa A - Éster 1-[2-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido
10 bifenil-2-ilcarbâmico

A um frasco de fundo redondo de 500 mL foi adicionado o éster piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (17,0 g, 58 mmol) e N-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (13,1 g, 52,9 mmol). Etanol (150
15 mL) e diclorometano (150 mL) foram adicionados para formar uma mistura semifluida. A mistura reacional foi aquecida entre 50°C e 55°C por cerca de 24 horas e então resfriada até temperatura ambiente. A maior parte do solvente foi removida em um evaporador rotativo, resultando em uma
20 mistura semifluida espessa. Etanol (grau reagente) foi adicionado para formar um volume total de cerca de 200 mL e a mistura resultante foi aquecida a 80°C e então resfriada lentamente até temperatura ambiente. A mistura semifluida espessa resultante foi filtrada, lavada com etanol (20 mL)
25 e seca a vácuo para fornecer o éster 1-[2-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (23,8 g, cerca de 98% de pureza) como um sólido branco.

Etapa B - Éster 1-{2-[(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido
30

bifenil-2-ilcarbâmico

A um frasco de fundo redondo de 500 mL foram adicionados o éster 1-[2-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (15 g, 27,6 mmol) e acetonitrila (150 mL) para formar uma mistura semifluida. Ácido hidrolórico aquoso 2M (75 mL) foi adicionado e a mistura resultante foi agitada a 30°C por 1 hora. A mistura foi então resfriada até temperatura ambiente e acetato de etila (150 mL) foi adicionado. Ácido hidrolórico aquoso 2M (75 mL) foi adicionado, o pH foi verificado e então hidróxido de sódio 2M adicional foi adicionado até que o pH da solução estivesse na faixa de 9 a 10. As camadas foram separadas e a camada orgânica foi lavada com salmoura diluída (75 mL; 1:1 salmoura/água). Seca sobre sulfato de sódio anidro e o solvente removido em um evaporador rotativo para fornecer o éster 1-{2-[(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (12,5 g, cerca de 98% de pureza). Se desejado, a pureza deste intermediário pode ser aumentada formando-se uma mistura semifluida com etanol (3 volumes de etanol), aquecendo-se a mistura semifluida a 80°C, e então resfriando-se lentamente até temperatura ambiente e isolando-se por filtração.

Etapa C - Éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

A um frasco de fundo redondo de 250 mL foram adicionados o éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido

bifenil-2-ilcarbâmico (7,1 g, 14,2 mmol) e o sal do ácido acético de *N*-{5-[(*R*)-2-amino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida (5,8 g, 15,6 mmol). Metanol (100 mL) foi adicionado para formar uma mistura semifluida e esta mistura foi agitada entre 45°C e 50°C sob nitrogênio por 1 hora. A mistura foi então resfriada até temperatura ambiente e tolueno (50 mL) foi adicionado e o solvente foi removido em um evaporador rotativo a uma temperatura variando de 35°C a 45°C. Tolueno (50 mL) foi adicionado ao resíduo e o solvente foi removido para fornecer éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (12 g) como um sólido amarelo-laranja.

Etapa D - Éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

A um frasco de hidrogenação foi adicionado o éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (4,6 g) e 2-metiltetrahidrofurano (50 mL). A mistura resultante foi agitada até que o sólido estivesse dissolvido (cerca de 5 minutos) e então a mistura foi purgada com nitrogênio. Platina em carbono (920 mg, 5% em peso, carbono em suporte ativado) foi adicionada e a mistura foi hidrogenada a 0,344 MPa (agitador Parr) por 6 horas. A mistura foi então filtrada através de Celite, e o

Celite foi lavado com 2-metiltetrahydrofurano (10 mL). Ao filtrado foi adicionada uma sílica gel modificada com tiopropil (20% de peso de solução, Silicycle) e esta mistura foi agitada a uma temperatura entre 25°C e 30°C por 5 3 horas. A mistura foi então filtrada através de Celite e concentrada para remover o solvente. O resíduo foi dissolvido em metanol (5 mL por grama de resíduo) e então a solução resultante foi adicionada lentamente a uma mistura 1:1 vigorosamente agitada de bicarbonato de sódio aquoso e 10 água (40 mL por grama de resíduo). A mistura semifluida branco gelo resultante foi agitada por 20 minutos e então filtrada. O bolo do filtro foi lavado com água (20 volumes), seco a ar por cerca de 3 horas e então seco a vácuo à temperatura ambiente durante a noite para fornecer 15 o éster 1-[2-(4-{{[(R)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino] metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil) etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (80% de recuperação, 96% de pureza).

Etapa E - Sal L-tartrato do éster 1-[2-(4-{{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

A um frasco de fundo redondo de 200 mL foi adicionado o éster 1-[2-(4-{{[(R)-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino] metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (3,8 g, 4,8 mmol) e 2-metiltetrahydrofurano (40 mL). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente até que os ingredientes 25 estiverem dissolvidos (cerca de 15 minutos) e então 30

trihidrofluoreto de trietilamina (0,94 mL, 5,76 mmol) foi adicionado e a mistura resultante foi agitada a 25°C por cerca de 24 horas. A esta mistura foi adicionada uma mistura 1:1 de bicarbonato de sódio aquoso saturado e água (40 mL) e 2-metiltetrahidrofurano e a mistura resultante foi agitada até que o sólido estivesse dissolvido (solução de pH de cerca de 8). As camadas foram separadas e a camada orgânica foi lavada com salmoura (30 mL), seca sobre sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em um evaporador rotativo. O resíduo foi dissolvido em 2-metiltetrahidrofurano (50 mL) e o ácido L-tartárico sólido (650 mg) foi adicionado. A mistura resultante foi agitada a uma temperatura entre 25°C e 30°C por 18 horas e então filtrada através de filtro de papel. O bolo do filtro foi lavado com 2-metiltetrahidrofurano (10 mL), isopropanol (10 mL) e imediatamente colocado sob vácuo para fornecer o sal do ácido L-tartárico do éster 1-[2-(4-{{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (3,7 g, >97% de pureza).

Etapa F - Éster 1-[2-(4-{{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

A um frasco de fundo redondo de 250 mL foi adicionado o sal do ácido L-tartárico do éster 1-[2-(4-{{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (3,5 g) e metanol (35 mL) e a mistura resultante foi agitada por 15 minutos. Uma mistura 1:1 de

bicarbonato de sólido aquoso saturado e água (70 mL) foi adicionada por um período de 5 minutos e a agitação foi continuada por 2 horas. A mistura semifluida branco gelo resultante foi filtrada e o bolo do filtro foi lavado com 5 água (20 mL), seco a ar por cerca de 2 horas e então seco a vácuo durante a noite para fornecer o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (2,3 g) como uma base livre semi-10 cristalina.

Espectros ^1H e ^{13}C NMR foram obtidos para uma amostra do éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (22,2 mg 15 em cerca de 0,75 mL de DMSO- d_6) à temperatura ambiente usando-se o espectrômetro JEOL ECX-400 NMR:

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), isômero principal, δ 9,64 (br, 1H), 9,54 (br s, 1H), 9,43 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,03 (d, $J = 1,9$, 1H), 7,25-7,45 (m, 9H), -7,3 20 (nd, 1H), 7,07 (s, 1H), 6,88 (dd, $J = 8,2, 1,9$, 1H), 6,79 (d, $J = 8,2$, 1H), 5,15 (br, 1H), 4,53 (dd, $J = 7,3, 4,7$, 1H), 4,47 (m, 1H), ~3,65 e ~3,60 (par AB, 2H), 2,68 (br m, 2H), ~2,59 (nd, 4H), 2,44 (br t, $J = 6,5, 2\text{H}$), 2,20 (s, 3H), - 2,17 (br m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,73 (br, 2H), 1,44 (brq, $J =$ 25 ~9,0, 2H).

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6), isômero em menor quantidade, δ 9,64 (br, 1H), 9,43 (s 1H), 9,26 (br d, $J =$ ~7,0, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,50 (br d, $J =$ ~7,0, 1H), 7,25-7,45 (m, 9H), ~7,3 (nd, 1H), 7,07 (s, 1H), ~7,07 (nd, 1H), 6,95 30 (dd, $J = 8,3, 1,8$, 1H), 6,83 (d, $J = 8,3, 1\text{H}$), 5,15 (br, 1H),

4,47 (m, 1H), ~3,65 e ~3,60 (AB pair, 2H), 2,68 (br m, 2H), ~2,59 (nd, 2H), 2,44 (br t, J = 6,5, 2H), 2,20 (s, 3H), ~2,17 (br m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,73 (br, 2H), 1,44 (br q, J = ~9,0, 2H).

5 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), isômero principal, δ 170,0, 159,9, 153,9, 145,5, 139,3, 137,6, 135,2, 135,0, 134,8, 133,4, 133,4, 130,2, 130,2, 128,6, 128,2, 127,8, 127,4, 127,2, 127,0, 126,1, 125,7, 125,6, 121,7, 118,6, 114,5, 71,4, 70,0, 57,4, 53,9, 50,3, 50,1, 33,7, 30,7, 18,2, 17,5.

10 ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6), isômero em menor quantidade, δ 170,0, 163,4, 153,9, 147,8, 139,3, 137,6, 135,7, 135,2, 135,0, 134,8, 133,4, 133,4, 130,2, 130,2, 128,6, 128,2, 127,8, 127,4, 127,2, 127,0, 126,1, 125,7, 123,0, 119,6, 115,6, 71,0, 70,0, 57,3, 53,9, 50,3, 50,1, 33,7, 30,7, 18,2, 17,5.

Os espectros de ^1H e ^{13}C NMR mostraram a presença de um isômero principal (cerca de 82% em mol) e um isômero em menor quantidade (cerca de 18% em mol) que se acredita que sejam isômeros rotacionais resultantes de rotação impedida na ligação -NH-C(O)H. Acredita-se que o grupo fenil seja *syn* em relação ao oxigênio do grupo carbonil no isômero principal e *anti* no isômero presente em menor quantidade.

Exemplo 7

25 Cristais de semente da forma II do Éster 1-[2-(4-
 {[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

30 Éster 1-[2-(4-
 {[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil] piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico semi-

cristalino (500 mg) foi dissolvido em metanol (50 mL) e água foi adicionada até que o ponto de névoa fosse alcançado. A mistura resultante foi agitada a 25°C por 3 horas e o material cristalino resultante foi isolado pela
5 filtração para fornecer o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico cristalino (420 mg). Esta base livre cristalina foi determinada para ter um traço de
10 calorimetria de escaneamento diferencial (DSC) que exhibe um pico em fluxo de calor endotérmica entre cerca de 142°C a cerca de 150°C; e um padrão de difração de raio X em pó (PXRD) possuindo picos de difração significantes, entre outros picos, em 20 valores de cerca de 20,7 ± 0,3, 21,6 ±
15 0,3, 22,5 ± 0,3 e 23,2 ± 0,3. Esta forma de base livre cristalina é projetada como a Forma II. Informação adicional da Forma II e outras formas de base livre cristalina deste composto estão divulgadas no Pedido U. S. comumente cedido de número _____, depositado na mesma
20 data desta (Procuração n° P-222-US1) e Pedido Provisório U. S. de número 60/794.709, depositado em 25 de abril de 2006, as divulgações destas estão aqui incorporadas para referência integralmente.

Exemplo 8

25 **Cristalização da forma II do Éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico**

A um frasco de fundo redondo de três gargalos de 3L
30 equipado com um agitador suspenso, controle de temperatura

e funil de adição foram adicionados o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico semi-cristalino (14 g) e metanol (1,4 L). Água (500 mL) foi adicionada em uma porção e então água adicional (200 mL) foi adicionada lentamente até que o ponto de névoa fosse alcançado. Cristais de semente da forma II do éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (50 mg) foram adicionados e a mistura resultante foi agitada a 25°C por 3 horas em cujo tempo uma mistura semifluida não aglomerada foi desenvolvida. Água (300 mL) foi adicionada por um período de 15 minutos e a mistura resultante foi agitada a 25°C durante a noite. A mistura foi então filtrada e o bolo do filtro foi lavado com água (100 mL), seco a ar por cerca de 2 horas e então seco a vácuo à temperatura ambiente durante 48 horas para fornecer o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (12,5 g, 99,6% de pureza). Este sal cristalino foi determinado para ser a Forma II.

Exemplo 9

Éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifenil-2-ilcarbâmico

Etapa A - 4-iodo-2,5-dimetilfenilamina

A uma solução de 2,5-dimetilanilina (20 g, 165 mmol) em uma mistura 1:1 de diclorometano e metanol (400 mL) foi adicionado bicarbonato de sódio (20,8 g, 250 mmol) e

dicloroiodato tetrametilamônio (I) (44,7 g, 165 mmol). A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente por 1 hora e então água foi adicionada (500 mL). A camada orgânica foi removida e lavada com 5% de tiosulfato de sódio aquoso (500 mL) e salmoura (500 mL). A camada orgânica foi então seca sobre sulfato de magnésio anidro, filtrada e concentrada a vácuo para fornecer 4-iodo-2,5-dimetilfenilamina (39,6 g, 98% de rendimento). O produto foi usado sem purificação adicional.

10 **Etapa B - N-(4-iodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida**

A uma solução de 4-iodo-dimetilfenilamina (37,2 g, 151 mmol) em diclorometano (500 mL) foi adicionado bicarbonato de sódio (25,4 g, 302 mmol). A mistura resultante foi resfriada a 0°C e cloreto de acrilóila (12,3 mL, 151 mmol) foi adicionado lentamente por um período de 25 minutos. A mistura resultante foi agitada à temperatura ambiente durante a noite e então filtrada. O volume do filtrado foi reduzido a cerca de 100 mL e o precipitado foi formado. O precipitado foi filtrado, seco, lavado com água (1L) e então seco novamente para fornecer a N-(4-iodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida (42,98g, 95% de pureza, 90% de rendimento). O produto foi usado sem purificação adicional.

25 **Etapa C - Éster 1-[2-(4-iodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico**

A uma solução de N-(4-iodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida (32,2 g, 107 mmol) em uma mistura 6:1 v/v N-dimetilformamida e isopropanol (700 mL) foi adicionado o éster piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (36,3 g, 123 mmol). A mistura resultante foi aquecida a

50°C por 24 horas e então a 80°C por 24 horas. A mistura reacional foi então resfriada à temperatura ambiente e concentrada a vácuo. O resíduo foi dissolvido em diclorometano (1L) e esta solução foi lavada com ácido 5 hidroclórico aquoso 1N (500 mL) e água (500 mL), salmoura (500 mL) e solução de bicarbonato de sódio aquoso saturada (500 mL). A camada orgânica foi então seca sobre sulfato de magnésio anidro e filtrada. Etanol (400 mL) foi adicionado e a mistura resultante foi concentrada a vácuo a um volume 10 de cerca de 400 mL, em cujo tempo um precipitado foi formado. O precipitado foi filtrado e seco para fornecer o éster 1-[2-(4-iodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil] piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (59,6g, 84% de pureza, 79% de rendimento), m/z : $[M + H^+]$ calculado 15 para $C_{29}H_{32}IN_3O_3 = 598,49$; encontrado = 598,5.

Etapa D - Éster metílico do ácido 4-{3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzóico

A uma solução do éster 1-[2-(4-iodo-2,5- 20 dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (56 g, 94 mmol) em uma mistura 5:1 v/v de *N,N*-dimetilformamida e metanol (600 mL) foram adicionados diispropiletilamina (49 mL, 281 mmol), 1,3-bis(difenilfosfino)propano (3,9 g, 9,4 mmol) e acetato de 25 paládio II (2,1 g, 9,4 mmol). A mistura resultante foi purgada com monóxido de carbono e então agitada durante a noite entre 70°C e 80°C sob atmosfera de monóxido de carbono (pressão de balão). A mistura reacional foi concentrada a vácuo e o resíduo foi dissolvido em 30 diclorometano (500 mL). Esta mistura foi lavada com ácido

hidroclórico aquoso 1N (500 mL), água (500 mL) e então salmoura (500 mL). A camada orgânica foi então seca sobre sulfato de magnésio anidro, filtrada e então concentrada a vácuo. O resíduo foi misturado com etanol (cerca de 5:1 v/p
5 entre etanol e resíduo) e a mistura foi aquecida até que todos material sólido estivesse dissolvido. Esta solução foi deixada a resfriar lentamente até temperatura ambiente e o precipitado resultante foi isolado por filtração para fornecer o éster metílico do ácido 4-{3-[4-(bifenil-2-
10 ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzóico (47,3 g, 97% de pureza, 92% de rendimento), m/z : $[M + H^+]$ calculado para $C_{31}H_{35}N_3O_5 = 530,63$; encontrado = 530,4.

Etapa E - Éster 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifenil-2-ilcarbâmico
15

A uma solução do éster metílico do ácido 4-{3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzóico (49,8 g, 93,9 mmol) em tetrahidrofurano
20 (200 mL) foi resfriado a 0°C e hidreto de lítio e alumínio (10,7 g, 281,7 mmol) foi adicionado em porções (10 x 1,07 g). A mistura resultante foi agitada por 3 horas e então água (10,7 mL) foi adicionada, seguida por hidróxido de sódio aquoso 1N (10,7 mL) e água adicional (32,1 mL). Esta
25 mistura foi agitada durante a noite e então filtrada. A camada orgânica foi concentrada a vácuo e o resíduo foi misturado com acetato de etila (cerca de 5:1 v/p de acetato de etila e resíduo). Esta mistura foi aquecida até que o material sólido estivesse dissolvido e então a solução foi
30 deixada a resfriar até temperatura ambiente. O precipitado

resultante foi filtrado e seco para fornecer o éster 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (24,6 g, 95% de pureza, 47,5% de rendimento). Este material foi usado sem
 5 purificação adicional. m/z : $[M + H^+]$ calculado para $C_{30}H_{35}N_3O_4 = 502,62$; encontrado = 502,5.

Etapa F - Éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico

10 A uma solução de éster 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ac bifenil-2-ilcarmâmico (5,0 g, 10 mmol) em diclorometano (200 mL) a 0°C foi adicionado diisopropiletilamina (8,7 mL, 50 mmol) e dimetilsulfóxido (5,6 mL, 100 mmol). A mistura resultante
 15 foi resfriada a 0°C e o complexo de trióxido de enxofre-piridina (8,0 g, 50 mmol) foi adicionado. A mistura reacional foi agitada por 1 hora a 0°C e então água (300 mL) foi adicionada. A camada orgânica foi removida e lavada com ácido hidrocloreico aquoso (300 mL) e salmoura (300 mL).
 20 A camada orgânica foi então seca sobre sulfato de magnésio anidro e filtrada. A solução resultante contendo o éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil) etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico foi usada sem purificação adicional, m/z : $[M + H^+]$ calculado para
 25 $C_{30}H_{33}N_3O_4 = 500,60$; encontrado = 500,4.

Exemplo 10

Cultura de célula e preparação de membrana a partir de células que expressam os receptores muscarínicos M_1 , M_2 , M_3 e M_4 humanos

30 Linhas de célula CHO que expressam de forma estável os

subtipos do receptor muscarínico hM₁, hM₂, hM₃ e hM₄ humano clonado, respectivamente, foram desenvolvidas até quase confluência em meio de HAM's F-12 suplementado com FBS 10% e 250 µg/mL de Geneticin. As células foram desenvolvidas em 5 5% de CO₂, incubador a 37°C e suspensas com 2 mM de EDTA em dPBS. As células foram coletadas por 5 minutos de centrifugação a 650 x g, e as pelotas de célula foram armazenadas congeladas a -80°C ou as membranas foram preparadas imediatamente para uso. Para a preparação da 10 membrana, as pelotas de célula foram ressuspensas em tampão de lise e homogeneizadas com um disruptor de tecido Polytron PT-2100 (Kinematica AG; 20 segundos x 2 rupturas). As membranas brutas foram centrifugadas a 40.000 x g por 15 minutos a 4°C. A pelota de membrana foi então ressuspensa 15 com tampão de ressuspensão e homogeneizada novamente com o disruptor de tecido Polytron. A concentração da proteína da suspensão da membrana foi determinada pelo método descrito em Lowry e outros, 1951, *Journal of Biochemistry*, 193, 265. Todas as membranas foram armazenadas congeladas em 20 alíquotas de -80°C ou usadas imediatamente. Alíquotas de receptor hM₅ preparadas foram adquiridas diretamente de Perkin Elmer (Wellesley, MA) e armazenadas a -80°C até o uso.

Exemplo 11

25 Ensaio de Ligação de Radioligante para Receptores Muscarínicos

Os ensaios de ligação de radioligante para receptores muscarínicos clonados foram executados em placas de microtitulação de 96 cavidades em um volume de ensaio total 30 de 100 µL. Membranas de célula CHO que expressam de forma

estável o subtipo do receptor muscarínico hM_1 , hM_2 , hM_3 , hM_4 ou hM_5 foram diluídas em tampão de ensaio às seguintes concentrações de proteína alvo especificadas ($\mu\text{g}/\text{cavidade}$): 10 μg para hM_1 , 10-15 μg para hM_2 , 10-20 μg para hM_3 , 10-20 5 μg para hM_4 , e 10-12 μg para hM_5 para obtenção de sinal similares (cpm). As membranas foram rapidamente homogeneizadas usando-se um disruptor de tecido Polytron (10 segundos) antes da adição da placa de ensaio. Os estudos de ligação de saturação para determinar os valores de K_D do radioligante foram executados usando-se cloreto de 10 L-*[N-metil- ^3H]scopolamina metil* (^3H -NMS) (TRK666, 84,0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) a concentrações variando de 0,001 nM a 20 nM. Os ensaios de deslocamento para determinação dos valores de K_i 15 dos compostos de teste foram executados com ^3H -NMS a 1 nM e onze diferentes concentrações de composto de teste. Os compostos de teste foram inicialmente dissolvidos a uma concentração de 400 μM em tampão de diluição e então diluído serialmente 5 vezes com tampão de diluição a 20 concentrações finais variando de 10 pM a 100 μM . A ordem de adição e os volumes para as placas de ensaio foram como segue: 25 μL de radioligante, 25 μL de composto de teste diluído e 50 μL de membranas. As placas de ensaio foram incubadas por 60 minutos à 37°C. As reações de ligação 25 foram finalizadas por rápida filtração sobre placas de filtro de fibra de vidro GF/B (PerkinElmer Inc.) pré-tratadas com BSA 1%. As placas de filtro foram lavadas três vezes com tampão de lavagem (HEPES 10 mM) para remover a radioatividade não ligada. As placas foram então secas ao 30 ar e 50 μL de fluido de cintilação líquido Microscint-20

(PerkinElmer Inc.) foram adicionados a cada cavidade. As placas foram então contadas em um contador de cintilação líquida PerkinElmer Topcount (PerkinElmer Inc.). Os dados de ligação foram analisados por análise de regressão não linear com o pacote de software GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) usando-se o modelo de competição de sítio único. Os valores de K_i para os compostos de teste foram recalculados a partir de valores de IC_{50} observados e o valor de K_D do radioligante, usando-se a equação de Cheng-Prusoff (Cheng Y; Prusoff W. H. (1973) *Biochemical Pharmacology*, 22(23):3099-108). Os valores de K_i foram convertidos a valores de pK_i para determinar a média geométrica e intervalos de 95% de segurança. Esta estatística concisa foi então convertida de volta a valores de K_i para relatório de dados.

Neste ensaio, um valor de K_i menor indica que o composto de teste possui uma afinidade de ligação maior para o receptor testado. Descobriu-se que o éster 1-[2-(4- $\{[(R)-2-(3\text{-formilamino-4-hidroxfenil})-2\text{-hidroxi-etilamino}]$ -2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (composto IIa) possui um valor de K_i menor que 10 nM para os subtipos do receptor muscarínico M_1 , M_2 , M_3 , M_4 e M_5 .

Exemplo 12

Cultura de célula e preparação de membrana a partir de células que expressam os receptores β_1 -, β_2 - β_3 -adrenérgicos humanos

Linhas de células de rim embriônicas humanas (HEK-293) que expressam de forma estável os receptores β_1 - e β_2 - adrenérgicos humanos clonados ou linhas de célula ovariana

de hamster Chinês (CHO) que expressam de forma estável os receptores β_3 -adrenérgicos humanos clonados foram desenvolvidas até quase confluência em meio DMEM ou Hams F-12 com FBS 10% na presença de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Geneticin. A

5 monocamada de célula foi suspensa com EDTA 2mM em PBS. As células foram peletizadas por centrifugação a 1.000 rpm, e as pelotas de célula foram ou armazenadas congeladas a -80°C ou as membranas foram preparadas imediatamente para uso. Para preparação das membranas que expressam os

10 receptores β_1 e β_2 , as pelotas de célula foram ressuspensas em tampão de lise (10 mM HEPES/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4 a 4°C) e homogeneizadas usando-se um homogeneizador de vidro Dounce (30 golpes) de encaixe firme em gelo. Para as membranas que expressam o receptor β_3 mais sensíveis à

15 protease, as pelotas de célula foram homogeneizadas em tampão de lise (10 mM HEPES/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4) suplementado com um comprimido de "Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets with 2 mM EDTA" para cada 50 mL de tampão (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN).

20 O homogenato foi centrifugado a 20.000 x g, a pelota resultante foi lavada uma vez com tampão de lise por ressuspensão e centrifugação conforme acima. A pelota final foi então ressuspensa em tampão de ensaio de ligação gelado (75 mM Tris/HCl pH 7,4, 12,5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA). A

25 concentração da proteína da suspensão da membrana foi determinada pelos métodos descritos em Lowry e outros, 1951, *Journal of Biochemistry*, 193, 265; e Bradford, *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248-54. Todas as membranas foram armazenadas congeladas em alíquotas a -80°C

30 ou usadas imediatamente.

Exemplo 13**Ensaio de Ligação de Radioligante para Receptores β_1 -,
 β_2 - β_3 -adrenérgicos Humanos**

Os ensaios de ligação foram executados em placas de
5 microtitulação de 96 cavidades em um volume de ensaio total
de 100 μ L com 10-15 μ g de proteína de membrana contendo os
receptores β_1 -, β_2 - β_3 -adrenérgicos humanos em tampão de
ensaio (75 mM Tris/HCl pH 7,4 a 25 °C, 12,5 mM MgCl₂, 1 mM
EDTA, 0,2% BSA). Estudos de ligação de saturação para
10 determinação dos valores de K_d do radioligante foram feitos
usando-se [³H]-dihidroalprenolol (NET-720,100 Ci/mmol,
PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) para os
receptores β_1 e β_2 e [¹²⁵I]-(-)-iodocianopindolol (NEX-
189,220 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston,
15 MA) em 10 ou 11 concentrações diferentes variando de 0,01
nM a 20 nM. Os ensaios de deslocamento para determinação
dos valores de K_i dos compostos de teste foram feitos com
[³H]-dihidroalprenolol a 1 nM e [¹²⁵I]-(-)-iodocianopindolol
a 0,5 nM para 10 ou 11 concentrações diferentes variando de
20 10 pM a 10 μ M. A ligação não específica foi determinada na
presença de propanolol 10 μ M. Os ensaios foram incubados
por 1 hora à 37°C, e então as reações de ligação foram
finalizadas por rápida filtração sobre GF/B para os
receptores β_1 e β_2 ou placas de filtro de fibra de vidro
25 GF/C para os receptores β_3 (Packard BioScience Co.,
Meriden, CT) pré-umedecidos em polietilenoimina 0,3%. As
placas de filtro foram lavadas três vezes com tampão de
filtração (Tris/HCl 75 mM, pH = 7,4 a 4°C, MgCl₂ 12,5 mM,
EDTA 1 mM) para remover radioatividade não ligada. As
30 placas foram secas e 50 μ L de fluido de cintilação líquidos

Microscint-20 (Packard BioScience Co. , Meriden, CT) foram adicionados e as placas foram contadas em um contador de cintilação Packard Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT). Os dados de ligação foram analisados por análise de regressão não linear com o pacote de software GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) usando-se o modelo de 3 parâmetros para competição de sítio único. O mínimo da curva foi fixado ao valor para ligação não específica, conforme determinado na presença de propanolol 10 μM . Os valores de K_i para os compostos de teste foram calculados a partir de valores de IC_{50} observados e o valor de K_D do radioligante, usando-se a equação de Cheng-Prusoff (Cheng Y; Prusoff W. H. *Biochemical Pharmacology*, 1973 22, 23, 3099-108).

Neste ensaio, um valor de K_i menor indica que um composto de teste possui uma afinidade de ligação maior para o receptor testado. Descobriu-se que o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil) -2-hidroxietilamino] metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil] piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (composto IIa) possui um valor de K_i menor que 10 nM o receptor β_2 -adrenérgico e valores de K_I maiores que 1000 nM para os receptores β_1 - e β_3 -adrenérgicos.

Exemplo 14

Ensaio funcionais de Antagonismo para os Subtipos do Receptor Muscarínico

Ensaio A. Bloqueio da Inibição Mediada por Agonista do Acúmulo de cAMP

Neste ensaio, a potência funcional de um composto de teste como um antagonista para o receptor hM_2 foi

determinada por medições da capacidade do composto de teste de bloquear a inibição de oxotremorina do acúmulo cAMP medida por forskolina em células CHO-K1 que expressão o receptor hM_2 . Os ensaios de cAMP foram executados em um formato de radioimunoensaio usando-se *Flashplate Adenylyl Cyclase Activation Assay System* com ^{125}I -cAMP (NEN SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram rinsadas com dPBS e suspensas com solução Tripsina-EDTA (tripsina 0,05%/EDTA 0,53 mM) conforme descrito na seção de Cultura de Célula e Preparação de Membrana acima. As células separadas forma lavadas duas vezes por centrifugação a 650 x g por 5 minutos em dPBS 50 mL. A pelota de célula foi então ressuspensa em 10 mL de dPBS, e as células forma contadas com um Coulter Z1 Dual Particle Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CaMV 35S). As células foram centrifugadas novamente a 650 x g por 5 minutos e ressuspensas em tampão de estimulação a uma concentração de ensaio de $1,6 \times 10^6$ a $2,8 \times 10^6$ células/mL.

O composto de teste foi inicialmente dissolvido a uma concentração de 400 μ M em tampão de diluição (dPBS suplementado com 1 mg/mL de BSA (0,1%)), e então diluído serialmente com tampão de diluição a concentrações finais variando de 100 μ M a 0,1 nM. Oxotremorina foi diluída de uma maneira similar.

Para medir a inibição da atividade da adenilil ciclase pela oxotremorina, 25 μ L de forskolina (concentração final de 25 μ M diluída em dPBS), 25 μ L de oxotremorina diluída e 50 μ L de células foram adicionados às cavidades de ensaio do agonista. Para medir a capacidade de um composto de

teste de bloquear a atividade da adenilil ciclase inibida por oxotremorina, 25 μ L de forskolina e oxotremorina (concentrações finais de 25 μ M e 5 μ M, respectivamente, diluídas em dPBS), 25 μ L do composto de teste diluído e 50 μ L de células foram adicionados às cavidades de ensaio restantes.

As reações foram incubadas por 10 minutos a 37°C e interrompidas por adição de 100 μ L de tampão de detecção gelado. As placas foram seladas, incubadas durante a noite à temperatura ambiente e contadas na manhã seguinte em um contador de cintilação líquida PerkinElmer TopCount (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA). A quantidade de cAMP produzida (pmol/cavidade) foi calculada com base nas contagens observadas para as amostras e padrões de cAMP, conforme descrito no manual do usuário do fabricante. Os dados foram analisados por análise de regressão não linear com o pacote de software GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) usando-se o modelo de regressão não linear, equação de competição de sítio único. A equação de Cheng-Prusoff foi usada para calcular o K_{obs} , usando-se o EC_{50} da curva de resposta de concentração de oxotremorina e a concentração do ensaio de oxotremorina como o K_D e $[L]$, respectivamente.

Neste ensaio, um valor de K_{obs} menor indica que o composto de teste possui uma atividade funcional maior no receptor testado. Descobriu-se que o éster 1-[2-(4-{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (composto IIa) possui um valor de K_{obs} menor que 10 nM para bloqueio da inibição de oxotremorina

do acúmulo de cAMP mediado por forskolina em células CHO-K1 expressando os receptor hM_2 .

Ensaio B - Bloqueio de Ligação [^{35}S]GTP γ S Mediada por Agonista

5 Neste ensaio funcional, a potência funcional de um composto de teste como um antagonista do receptor hM_2 foi determinada medindo-se a capacidade do composto de teste de bloquear a ligação [^{35}S]GTP γ S estimulada por oxotremorina em em células CHO-K1 expressando o receptor hM_2 .

10 No momento do uso, membranas congeladas foram descongeladas e então diluídas em tampão de ensaio como uma concentração de tecido final de 5-10 μ g de proteína por cavidade. As membranas foram rapidamente homogeneizadas usando-se um disruptor de tecido Polytron PT-2100 e então
15 adicionadas às placas de ensaio.

O valor de EC_{90} (concentração efetiva para resposta máxima de 90%) para estímulo de ligação de [^{35}S]GTP γ S pela oxotremorina agonista foi determinado em cada experimento.

Para determinar a capacidade de um composto de teste
20 em inibir a ligação de [^{35}S]GTP γ S estimulada por oxotremorina, o seguinte foi adicionado a cada cavidade das placas de 96 cavidades: 25 μ L de tampão de ensaio com [^{35}S]GTP γ S (0,4 nM), 25 μ L de oxotremorina (EC_{90}) e GDP (3 μ M), 25 μ L de composto de teste diluído e 25 μ L de
25 membranas de célula CHO expressando o receptor hM_2 . As placas de ensaio foram então incubadas a 37°C por 60 minutos. As placas de ensaio foram filtradas sobre filtros GF/B pré-tratados com 1% de BSA usando-se um coletor de 96 cavidades PerkinElmer. As placas foram rinsadas com tampão
30 de lavagem resfriado com gelo por 3 vezes durante 3

segundos e então foram secas a ar ou a vácuo. Líquido de cintilação Microscint-20 (50 µL) foi adicionados a cada cavidade, e cada placa foi selada e a radioatividade foi contada em um Topcounter (PerkinElmer). Os dados foram analisados por análise de regressão não linear com o pacote de software GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) usando-se o modelo de regressão não linear, a equação de competição de sítio único. A equação de Cheng-Prusoff foi usada para calcular o K_{obs} , usando-se os valores de IC_{50} da curva de resposta de concentração para o composto de teste e a concentração de oxotremorina no ensaio como o K_D e $[L]$, concentração de ligante, respectivamente.

Neste ensaio, um valor de K_{obs} menor indica que o composto de teste possui uma atividade funcional maior no receptor testado. Descobriu-se que o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino] metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (composto IIa) possui um valor de K_{obs} menor que 10 nM para bloqueio da ligação [35 S]GTPyS estimulada por oxotremorina em células CHO-K1 expressando os receptor hM_2 .

Ensaio C - Bloqueio de Liberação de Cálcio Mediada por Agonista através de Ensaio de FLIPR

Neste ensaio funcional, a potência funcional de um composto de teste como um antagonista de receptores hM_1 , hM_3 e cm_5 foi determinada medindo-se a capacidade do composto de teste para inibir os aumentos mediados por agonista no cálcio intracelular.

Células CHO expressando estavelmente os receptores

foram semeadas em placas FLIPR de 96 cavidades na noite antes que o ensaio foi feito. As células semeadas são lavadas duas vezes com tampão FLIPR (10 mM HEPES, pH = 7,4, cloreto de cálcio 2 mM, probenecid 2,5 mM em solução salina tamponada de Hank (HBSS) sem cálcio e magnésio) usando-se Cellwash (MTX LabSystems, Inc.) para remover o meio de crescimento. Após lavagem, cada cavidade continha 50 µl de tampão FLIPR. As células foram então incubadas com 50 µL/cavidade de 4 µM FLUO-4AM (uma solução 2X foi feita) por 40 minutos a 37°C, 5% de dióxido de carbono. Seguindo-se o período de incubação do corante, as células foram lavadas duas vezes com tampão FLIPR, deixando um volume final de 50 µL em cada cavidade.

O estímulo dependente de dose da liberação Ca^{2+} intracelular para oxotremorina foi determinado de forma que o composto de teste poderia ser medido contra o estímulo de oxotremorina a uma concentração de EC_{90} . As células foram primeiro incubadas com tampão de diluição de composto por 20 minutos e então oxotremorina foi adicionada. Um valor de EC_{90} para oxotremorina foi gerada de acordo com o método detalhado na medição com FLIPR e a seção de redução dos dados abaixo, em conjunto com a Fórmula $EC_F = ((F/100 - F)^{1/H}) * EC_{50}$. Uma concentração de oxotremorina de 3 x EC_F foi preparada em placas de estímulo de forma que uma concentração de EC_{90} de oxotremorina foi adicionada a cada cavidade nas placas de ensaio de teste.

Os parâmetros usados para FLIPR foram: duração de exposição de 0,4 segundo, força do laser de 0,5 watts, comprimento de onda da excitação de 488 nm, e comprimento de onda de emissão de 550 nm. A linha base foi determinada

medindo-se a mudança na fluorescência por 10 segundos antes a adição de oxotremorina. Depois da estimulação do oxotremorina, o FLIPR mediu continuamente a mudança de fluorescência a cada 0,5 a 1 segundo por 1,5 minuto para 5 capturar a mudança de fluorescência máxima.

A mudança de fluorescência foi expressa como fluorescência máxima menos a fluorescência da linha de base para cada cavidade. Os dados brutos foram analisados contra o logaritmo da concentração do composto de teste por 10 regressão não linear com GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) usando-se o modelo construído para resposta de dose sigmoidal. Os valores de K_{obs} do antagonista foram determinados por Prism usando-se o valor EC_{50} de oxotremorina como o K_D e EC_{90} de oxotremorina para a 15 concentração de ligante de acordo com a equação de Cheng-Prusoff (Cheng & Prusoff, 1973).

Neste ensaio, um valor de K_{obs} menor indica que o composto de teste possui uma atividade funcional maior no receptor testado. Descobriu-se que o éster 1-[2-(4-{[(R)-2- 20 (3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino] metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (composto IIa) possui um valor de K_{obs} menor que 10 nM para bloqueio da liberação de cálcio mediada por agonista em células CHO expressando de forma 25 estável os receptores hM_1 , hM_3 , CM_5 .

Exemplo 15

Ensaio *Flashplate* de cAMP de célula integral em linhas de célula CHO expressando de forma heteróloga os receptores β_1 , β_2 e β_3 -adrenérgicos humanos

30 Os ensaios de cAMP foram executados em um formato de

radioimunoensaio usando-se o "Flashplate Adenylyl Cyclase Activation Assay System" com [¹²⁵I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), de acordo com as instruções dos fabricantes. Para determinação da

5 potência agonista do receptor β_1 e β_2 (EC₅₀), linhas de célula HEK-293 expressando de forma estável os receptores β_1 e β_2 foram desenvolvidos até quase confluência em DMEM suplementado com 10% FBS e Geneticin (500 μ g/mL). Para a determinação da potência do agonista do receptor β_3 (EC₅₀),

10 linhas de célula CHO-K1 expressando estavelmente os receptores β_3 -adrenérgicos humanos clonados foram desenvolvidas até quase confluência em meio F-12 de Hams suplementado com FBS 10% e Geneticin (250 μ g/mL). As células foram rinsadas com PBS e separadas em dPBS (solução

15 salina tamponada com fosfato de Dulbecco, sem CaCl₂ e MgCl₂) contendo EDTA 2 mM ou solução de Tripsina-EDTA (tripsina 0,05%/EDTA 0,53 mM). Após contagem das células em um contador de célula Coulter, as células foram peletizadas por centrifugação a 1.000 rpm e ressuspensas em tampão de

20 estimulação contendo IBMX (PerkinElmer Kit) pré-aquecido à temperatura ambiente a uma concentração de $1,6 \times 10^6$ a $2,8 \times 10^6$ células/mL. Cerca de 40.000 a 80.000 células por cavidade foram usados deste ensaio. Os compostos de teste (10 mM em DMSO) foram diluídos em PBS contendo BSA 0,1% em

25 Beckman Biomek-2000 e testados em 11 diferentes concentrações variando de 100 μ M a 1 pM. As reações foram incubadas por 10 minutos a 37°C e interrompidas adicionando-se 100 μ L de tampão de detecção frio contendo

30 [¹²⁵I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). A quantidade de cAMP produzida (pmol/cavidade) foi

calculada com base nas contagens observadas para as amostras e padrões de cAMP, conforme descrito no manual do usuário do fabricante. Os dados foram analisados por análise de regressão não linear com o pacote de software 5 GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) com a equação sigmoidal. A equação de Cheng-Prusoff (Cheng Y, e Prusoff WH., *Biochemical Pharmacology*, 1973, 22, 23, 3099-108) foi usada para calcular os valores de EC₅₀.

10 Neste ensaio, um valor de EC₅₀ menor indica que o composto de teste possui uma atividade funcional maior no receptor testado. Descobriu-se que o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido 15 bifenil-2-ilcarbâmico (composto IIa) possui um valor de EC₅₀ menor que 10 nM o receptor β_2 -adrenérgico, um valor de EC₅₀ de cerca de 30 nM para o receptor β_1 -adrenérgico; e um valor de EC₅₀ maior que 700 nM para os receptores β_3 -adrenérgico.

20 Exemplo 16

Ensaio *Flashplate* de cAMP de célula integral com uma Linha de Célula Epitelial de Pulmão Expressando de Forma Endógena o Receptor β_2 -Adrenérgico Humano

25 Neste ensaio, a potência do agonista e atividade intrínseca de um composto de teste foram determinados usando-se uma linha de célula expressando níveis endógenos do receptor β_2 -adrenérgico. As células de uma linha de célula epitelial de pulmão humano (BEAS-2B) (ATCC CRL-9609, American Type Culture Collection, Manassas, VA) (January B, 30 e outros *British Journal of Pharmacology*, 1998, 123, 4, 701-

11) foram desenvolvido a 75-905 de confluência em meio completo livre de soro (meio LHC-9 contendo epinefrina e ácido retinóico, Biosource International, Camarillo, CA). No dia antes do ensaio, o meio foi trocado para LHC-8
5 (nenhuma epinefrina ou ácido retinóico, Biosource International, Camarillo, CA). Os ensaios de cAMP foram executados em um formato de radioimunoensaio usando-se o "Flashplate Adenylyl Cyclase Activation Assay System" com [¹²⁵I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc.,
10 Boston, MA), de acordo com as instruções dos fabricantes.

No dia do ensaio, as células foram rinsadas com PBS, suspensas através de raspagem com EDTA 5 mM em PBS, e contadas. As células foram peletizadas por centrifugação a 1000 rpm e ressuspensas em tampão de estimulação pré-
15 aquecido a 37°C a uma concentração final de 600.000 células/mL. As células foram usadas a uma concentração final de 100.000 células/cavidade neste ensaio. Os compostos de teste foram serialmente diluídos em tampão de ensaio (75 mM Tris/HCl pH 7,4 a 25 °C, MgCl₂ 12,5 mM, EDTA
20 1 mM, BSA 0,2%) em Beckman Biomek-2000. Os compostos foram testados no ensaio com 11 diferentes concentrações, variando de 10 µM a 10 pM. As reações foram incubadas por 10 minutos a 37°C e interrompidas por adição de 100 µL de tampão de detecção gelado. As placas foram seladas,
25 incubadas durante a noite a 4°C e contadas na manhã seguinte em um contador de cintilação Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT). A quantidade de cAMP produzida por mL de reação foi calculada com base nas contagens observadas para as amostras e padrões de cAMP,
30 conforme descrito no manual do usuário do fabricante. Os

dados foram analisados por análise de regressão não linear com o pacote de software GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) usando-se o modelo de 4 parâmetros para resposta de dose sigmoïdal com inclinação 5 variável.

Neste ensaio, um valor de EC_{50} menor indica que o composto de teste possui uma atividade funcional maior no receptor testado. Descobriu-se que o éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}- 10 2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (composto IIa) possui um valor de EC_{50} menor que 10 nM com valor de atividade intrínseco maior 0,3 comparado com um isoproterenol agonista β_2 completo (1,0).

15 Exemplo 17

Ensaio de Einthoven para determinação de eficácia e duração broncoprotetora

Neste ensaio, a eficácia broncoprotetora e a duração dos compostos de teste foram determinadas usando-se 20 porquinhos da Índia. Este ensaio foi derivado dos procedimentos descritos em Einthoven (1892) *Pflugers Arch.* 51: 367 - 445; e Mohammed e outros. (2000) *Pulm Pharmacol Ther.* 13(6):287-92. Neste ensaio, as mudanças na pressão de ventilação servem como uma medida substituta de resistência 25 das vias aéreas. Seguindo-se o pré-tratamento com um composto de teste, a potência do antagonista muscarínico foi determinada usando-se curvas de resposta à dose broncoconstritora para metacolina intravenosa na presença de propanolol. Similarmente, a potência broncoprotetora do 30 agonista β_2 foi determinada usando-se histamina. A potência

broncoprotetora combinada foi determinada usando-se metacolina na ausência de propanolol.

O ensaio foi conduzido usando-se porquinhos da índia machos Duncan-Hartley (Harlan, Indianapolis, IN), pesando 5 entre 250 e 400 g. Um composto de teste ou veículo (isto é, água estéril) foi doseado por inalação (IH) durante um período de tempo de 10 minutos em uma câmara de dosagem de exposição corporal total (R+S Molds, San Carlos, CA), usando-se 5 mL de solução de dosagem. Os animais foram 10 expostos a um aerossol gerado a partir de um Conjunto Nebulizador LC Star (Modelo 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA) acionado por Bioblend (uma mistura de CO₂ = 5%, O₂ = 21% e N₂ = 74%) a uma pressão de 0,152 MPa. A função pulmonar foi avaliada em vários pontos 15 de tempo após a dosagem da inalação.

Setenta e cinco minutos antes do início do ensaio, os porquinhos-da-índia foram anestesiado com uma injeção intramuscular de uma mistura de cetamina (43,7 mg/kg), xilazina (3,5 mg/kg) e acepromazina (1,05 mg/kg). Uma dose 20 suplementar desta mistura (50% da dose inicial) foi administrada conforme necessário. A veia jugular e a artéria carótida foram isoladas e entubadas com cateteres de polietileno cheios com solução salina (*micro-renathane* e PE-50, respectivamente, Beckton Dickinson, Sparks, MD). A 25 artéria carótida foi conectada a um transdutor de pressão para permitir a medição da pressão sanguínea e a cânula da veia jugular foi usada para injeção IV da metacolina ou histamina. A traquéia foi então dissecada livremente e entubada com uma agulha 14G (#NE-014, Small Parts, Miami 30 Lakes, FL). Uma vez que a entubação estava completa, os

porquinhos da índia foram ventilados usando-se um respirador (Modelo 683, Harvard Apparatus, Inc., MA) ajustado a um volume de golpe de 1 mL/100 g de peso corporal mas não excedendo o volume 2,5 mL, e a uma taxa de 5 100 golpes por minuto. A pressão de ventilação (VP) foi medida na cânula traqueal usando-se um transdutor Biopac conectado a um pré-amplificador Biopac (TSD 137C). A temperatura corporal foi mantida a 37°C usando-se uma placa de aquecimento. Antes de iniciar a coleta de dados, 10 pentobarbital (25 mg/kg) foi administrado de forma intraperitoneal (IP) para suprimir respiração espontânea e obter uma linha de base estável. As mudanças em VP foram registradas em uma interface de coleta de dados Biopac Windows. Os valores da linha de base foram coletados por 15 pelo menos 5 minutos, após cujo tempo os porquinhos da índia foram atacados IV de forma não cumulativa com doses do broncoconstritor incrementais de 2 vezes (metacolina ou histamina). Quando a metacolina foi usada como o agente broncoconstritor, os animais foram pré-tratados com 20 propanolol (5mg/kg IV) para isolar os efeitos antimuscarínicos do composto de teste. O propanolol foi administrado 30 minutos antes da construção da curva de resposta de dose para metacolina ou histamina. Mudanças em VP foram registradas usando-se Acknowledge Data Collection 25 Software (Santa Barbara, CA). Após a finalização do estudo, os animais foram eutanizados.

Mudança em VP foi medida em cm de água. Mudança em VP (cm H₂O) = pressão máxima (após ataque broncoconstritor) - pressão de linha de base máxima. As curvas de resposta da 30 dose para metacolina ou histamina foram ajustadas com uma

equação logística de quatro parâmetros usando-se GraphPad Prism, versão 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California). A seguinte formulação foi usada:

$$Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{((\log \text{ID50}-X) * \text{inclinação de Hill})})$$

5 onde X é o logaritmo da dose, Y é a resposta. Y inicia no Min e aproxima-se assintoticamente de Max com uma forma sigmoidal.

O percentual de inibição da resposta broncoconstritora a uma dose submáxima de metacolina ou histamina foi calculado em cada dose do composto de teste usando-se a seguinte equação: % inibição de resposta = 100 - ((pressão de pico (após ataque broncoconstritor, tratado) - pressão de linha de base de pico (tratada) x 100% / (pressão de pico (após ataque broncoconstritor, água) - pressão de linha de base de pico (água) x 100)). As curvas de inibição foram ajustadas à equação logística de quatro parâmetros do software GraphPad. ID50 (dose exigida para produzir 50% de inibição da resposta broncoconstritora) e Emax (inibição máxima) foram também estimados sempre que apropriado.

20 A magnitude da broncoproteção em diferentes pontos de tempo após inalação do composto de teste foi usada para estimar a meia-vida farmacodinâmica (PD T1/2). PD Tm foi determinada usando-se um ajuste de regressão não linear usando-se uma equação de declínio exponencial de uma fase (GraphPad Prism, Versão 4.00): $Y = \text{Duração} * \exp(-K * X) + \text{Platô}$; Começa em "Duração+Platô" e declina ao Platô com uma constante K. A PD T1/2 = 0,69/K. Platô foi forçado a 0.

Em 1,5 hora após a dose, descobriu-se que o éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxiifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil) etil]

piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico (Iia) possui um valor ID_{50} menor que cerca de 50 $\mu\text{g/mL}$ tanto para broncoconstrição induzida por metacolina quanto para broncoconstrição induzida por histamina.

5 Adicionalmente, este composto produziu broncoproteção significativa por até 72 horas quando administrada como uma dose subsequente-máxima única (100 $\mu\text{g/mL}$). Neste ensaio, salmeterol (3 $\mu\text{g/mL}$) (um agonista de receptor β_2 -adrenérgico) exibiu broncoproteção significativa por 6 a 14
10 horas; e tioprópio (10 $\mu\text{g/mL}$) (um antagonista de receptor muscarínico) exibiu significativa broncoproteção por mais de 72 horas.

Exemplo 18

15 **Ensaio de porquinho da índia por pletismografia para determinação de eficácia e duração broncoprotetora**

Neste ensaio, a eficácia broncoprotetora e a duração dos compostos de teste foram determinadas usando-se um ensaio de porquinho da índia.

20 Grupos de seis porquinhos da índia machos (Duncan-Hartley (HsdPoc:DH) Harlan, Madison, WI) pesando entre 250 e 350 gramas foram individualmente identificados por cartões de gaiola. Por todo o estudo os animais foram deixados acessar comida e água *ad libitum*. Os compostos de teste foram administrados através de inalação Durante 10
25 minutos em uma câmara de dosagem de exposição de corpo inteiro (R & S Molds, San Carlos, CA). As câmaras de dosagem foram dispostas de forma que um aerossol fosse simultaneamente entregue a 6 câmaras individuais a partir de um distribuidor central. Os porquinhos da índia foram
30 expostos a um aerossol de um composto de teste ou veículo

(WFI).

Os aerossóis foram gerados a partir de soluções aquosas usando-se um Conjunto Nebulizador LC Star (Modelo 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA) acionado por uma mistura de gases ($\text{CO}_2 = 5\%$, $\text{O}_2 = 21\%$ e $\text{N}_2 = 74\%$) a uma pressão de 0,152 MPa. O fluxo de gás através do nebulizador nesta pressão de operação era de aproximadamente 3 L/minuto. Os aerossóis gerados foram direcionados para dentro das câmaras por pressão positiva. Nenhum ar de diluição foi usado durante a entrega das soluções aerossolizadas. Durante os 10 minutos de nebulização, aproximadamente 1,8 mL de solução foram nebulizados. Este valor foi medido gravimetricamente comparando-se os pesos antes e depois da nebulização do nebulizador carregado.

Os efeitos broncoprotetores dos compostos administrados através de inalação foram avaliados usando-se pletismografia de corpo inteiro a 1,5, 24, 48 e 72 horas após a dose. Quarenta e cinco minutos antes do início da avaliação pulmonar, cada porquinho-da-índia foi anestesiado com uma injeção intramuscular de cetamina (43,75 mg/kg), xilazina (3,50 mg/kg) e acepromazina (1,05 mg/kg). O local da cirurgia foi raspado e limpo com álcool 70%, uma incisão de linha central de 2 a 3 cm do aspecto ventral do pescoço foi feita. A veia jugular foi isolada e canulada com um cateter de polietileno cheio de solução salina (PE-50, Becton Dickinson, Sparks, MD) para permitir as infusões intravenosas de acetilcolina (Ach) ou histamina em solução salina. A traquéia foi então dissecada livremente e canulada com um tubo de teflon 14G (#NE-014, Small Parts,

Miami Lakes, FL). Se exigido, a anestesia foi mantida por injeções adicionais intramusculares da mistura anestésica. A profundidade da anestesia foi monitorada e ajustada se o animal respondesse ao aperto de suas patas ou se a taxa de 5 respiração fosse maior que 100 respirações/minuto.

Uma vez que as canulações estavam completas, o animal foi colocado dentro de um pletismógrafo (#PLY3114, Buxco Electronics, Inc., Sharon, CT) e uma cânula de pressão esofageal (PE-160, Becton Dickinson, Sparks, MD) foi 10 inserida para medir a pressão pulmonar. O tubo traqueal de teflon foi fixado à abertura do pletismógrafo para permitir que o porquinho-da-índia respirasse ar do ambiente de fora da câmara. A câmara foi então selada. Uma lâmpada de aquecimento foi usada para manter a temperatura corporal e 15 os pulmões do porquinho-da-índia foram inflados 3 vezes com 4 mL de ar usando-se uma seringa de calibração de 10 mL (Série #5520 Hans Rudolph, Kansas City, MO) para assegurar que as vias aéreas inferiores não tinham sofrido colapso e que o animal não sofria de hiperventilação.

20 A avaliação pulmonar foi iniciada depois de determinar que os valores de linha de base estavam dentro da faixa de 0,3 a 0,9 mL por cm de H₂O para conformidade e dentro da faixa de 0,1 a 0,199 cm H₂O por segundo para resistência. Um programa de computador de medição pulmonar Buxco foi 25 usado para a coleta e derivação dos valores pulmonares. Iniciando-se o programa, iniciou-se o protocolo experimental e a coleta de dados. As mudanças em volume durante o tempo que ocorreram dentro do pletismógrafo com cada respiração foram medidas através de um transdutor de 30 pressão Buxco. Integrando-se este sinal over time, uma

medição de fluxo foi calculada para cada respiração. Este sinal, junto com as mudanças de pressão pulmonar, que foram coletadas usando-se um transdutor de pressão Sensym (#TRD4100), foram conectados através de um pré-amplificador 5 Buxco (MAX 2270) a uma interface de coleta de dados (#SFT3400 e SFT3813). Todos os outros parâmetros pulmonares foram derivados a partir destas duas entradas.

Os valores de referência foram coletados por 5 minutos, após este tempo os porquinhos-da-índia foram 10 atacados com acetilcolina ou histamina. Quando se avalia os efeitos do antagonista muscarínico, propanolol (5 mg/kg, iv) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi administrado 15 minutos antes de serem atacados com acetilcolina. A acetilcolina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (0,1 mg/mL) foi 15 infundida de forma intravenosa por 1 minuto a partir de uma seringa (sp210iw, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) nas seguintes doses e tempos de prescrição a partir do início do experimento: 1,9 µg/minuto em 5 minutos, 3,8 µg/minuto em 10 minutos, 7,5 µg/minuto em 15 minutos, 15,0 µg/minuto em 20 minutos, 30 µg/minuto em 25 minutos e 60 µg/minuto em 30 minutos. Alternativamente, a broncoproteção dos compostos de teste foi avaliada no modelo de ataque de acetilcolina sem pré-tratamento com um composto beta-bloqueador.

25 Quando se avalia os efeitos do receptor β_2 -adrenérgico dos compostos de teste, a histamina (25 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi infundida de forma intravenosa por 1 minuto de uma seringa nas seguintes doses e tempos prescritos a partir do início do experimento: 0,5 µg/minuto 30 em 5 minutos, 0,9 µg/minuto em 10 minutos, 1,9 µg/minuto em

15 minutos, 3,8 $\mu\text{g}/\text{minuto}$ em 20 minutos, 7,5 $\mu\text{g}/\text{minuto}$ em 25 minutos e 15 $\mu\text{g}/\text{minuto}$ em 30 minutos. Se a resistência ou compatibilidade não retornaram aos valores de referência em 3 minutos após cada dose de acetilcolina ou histamina, os pulmões dos porquinhos da índia foram inflados 3 vezes com 4 mL de ar a partir de uma seringa de calibração de 10mL. Os parâmetros pulmonares registrados incluíam a frequência de respiração (respirações/minuto), compatibilidade (mL/cm H₂O) e resistência pulmonar (mL por cm H₂O por segundo). Uma vez que as medições da função pulmonar foram completadas em 35 minutos deste protocolo, o porquinho-da-índia foi removido do pletismógrafo e sofreram eutanásia por asfixia com dióxido de carbono.

Os dados foram avaliados de uma das duas maneiras:

15 (a) a resistência pulmonar (R_L , cm H₂O/mL por segundo) foi calculada a partir da relação entre mudança de pressão e mudança no fluxo. A resposta R_L à acetilcolina (60 $\mu\text{g}/\text{minuto}$, IH) foi computada para o veículo e o composto de teste. A resposta à acetilcolina média em animais tratados com veículo, em cada momento de pré-tratamento, foi calculada e usada para computar o % de inibição da resposta à acetilcolina, no momento do pré-tratamento correspondente, em cada dose do composto de teste. As curvas de resposta à dose de inibição para " R_L " foram ajustadas a uma equação logística de 4 parâmetros usando-se GraphPad Prism, versão 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California) para estimar a ID_{50} broncoprotetora (dose exigida para inibir a resposta broncoconstritora da acetilcolina (60 $\mu\text{g}/\text{minuto}$) em 50%). A seguinte formulação foi usada:

$$Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{((\log \text{ID50-X}) * \text{inclinação de Hill})})$$

onde X é o logaritmo da dose, Y é a resposta (% de inibição de aumento induzido por acetilcolina em R_L). Y inicia no Min e aproxima-se assintoticamente de Max com uma
5 forma sigmoidal.

(b) A quantidade de PD_2 , que é definida como a quantidade de acetilcolina ou histamina necessária para dobrar a resistência pulmonar de referencia, foi calculada usando-se os valores de resistência pulmonar derivados do
10 *fluxo* e da *pressão* sobre uma faixa de ataques com acetilcolina ou histamina usando-se a seguinte equação (que é derivada de uma equação usada para calcular os valores de PC_{20} descritos em American Thoracic Society. *Guidelines for methacholine and exercise challenge testing* 1999. *Am J. Respir. Crit. Care Med.* 161: 309-329):
15

$$PD_2 = \text{antilog}\{\log C_1 + [((\log C_2 - \log C_1) (2R_0 - R_1)) / (R_2 - R_1)]\}$$

onde:

C_1 = concentração de acetilcolina ou histamina precedendo C_2

20 C_2 = Concentração de acetilcolina ou histamina resultando em um aumento de pelo menos 2 vezes na resistência pulmonar (R_L)

R_0 = Valor de R_L de referência

R_1 = valor de R_L após C_1

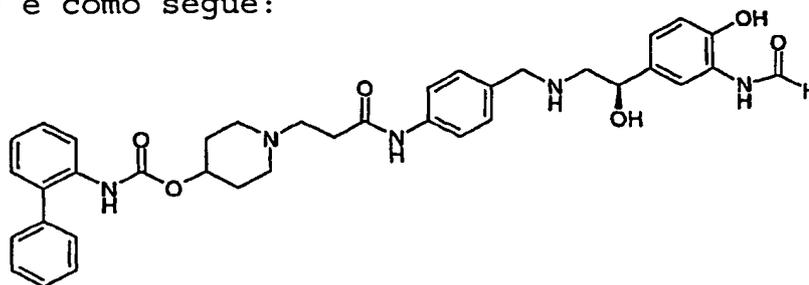
25 R_2 = valor de R_L após C_2

Análise estatística dos dados foi executada usando-se um *two-tailed Students T-test*. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo.

O composto 50 descrito na Publicação de Patente U. S.
30 de número US 2004/0167167A1, publicada em 24 de agosto de

2004, foi testada neste ensaio. A estrutura química do composto 50 é como segue:

5



Composto Comparativo 50

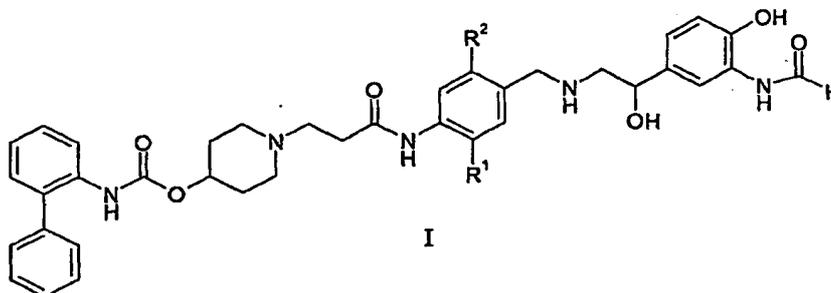
Este composto carece de grupos alquil's presentes no anel fenil dos compostos da presente invenção. Neste ensaio, o composto 50 não apresentou nenhuma broncoproteção significativa em 24 horas após a dose para doses variando de 3 µg/mL a 300 µg/mL. Os valores de PD_{2x} para o composto 50 em 24 horas eram similares ao grupo do veículo (água).

Neste ensaio, salmeterol (100 µg/mL) (um agonista de receptor β₂-adrenérgico) exibiu broncoproteção significativa por pelo menos 24 horas; e tioprópio (10 µg/mL) (um antagonista de receptor muscarínico) exibiu significativa broncoproteção por pelo menos 24 horas.

Embora a presente invenção tenha sido descrita com referência aos aspectos específicos ou modalidades desta, deve ser compreendido por aqueles habilitados na técnica que várias mudanças podem ser feitas ou equivalentes podem ser substituídos sem se afastar do verdadeiro espírito e escopo da invenção. Adicionalmente, à extensão permitida por estatutos e regulamentações de patente aplicáveis, todas as publicações, patentes e pedidos de patente aqui citados estão desta forma incorporados por referencia em sua totalidade à extensão como se cada documento estivesse individualmente aqui incorporado por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto caracterizado por ter a fórmula I:



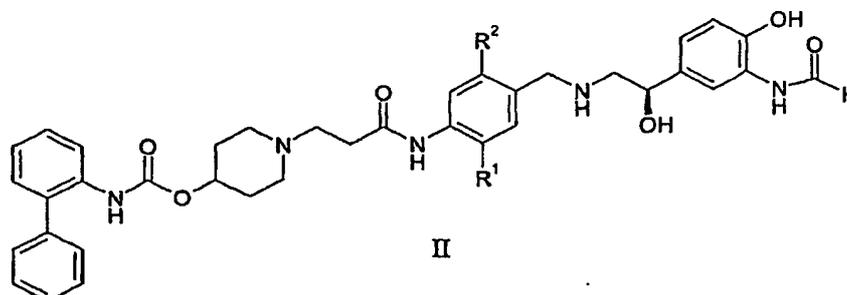
onde:

R¹ é metil ou etil;

5 R² é metil ou etil;

ou um sal ou solvato ou estereoisômero farmacologicamente aceitável destes.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por possuir a fórmula II:



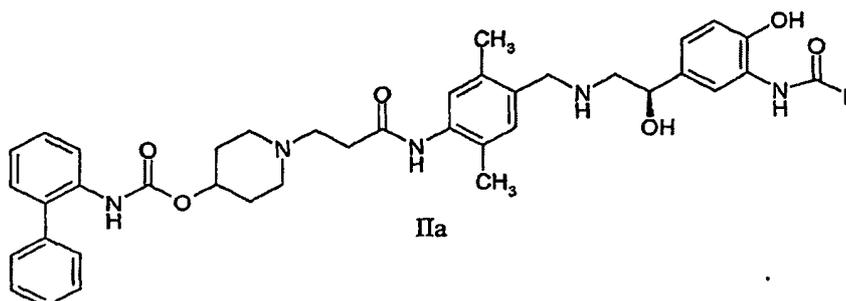
10 onde:

R¹ é metil ou etil;

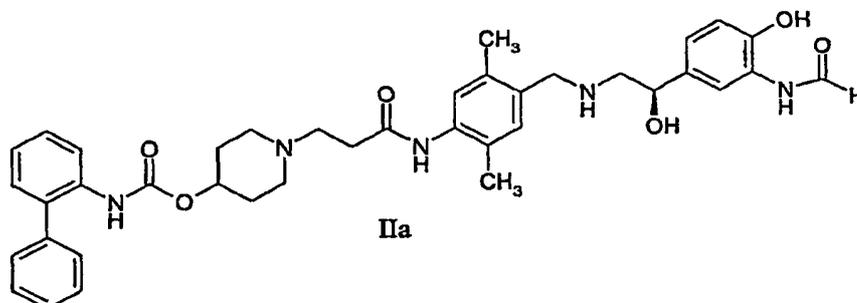
R² é metil ou etil;

ou um sal farmacologicamente aceitável deste.

15 3. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por possuir a fórmula IIa:



4. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o composto é um sal farmacologicamente aceitável de um composto da fórmula IIa:



5. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de compreender um veículo farmacologicamente aceitável e um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4.

6. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de compreender:

(a) um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4;

(b) um agente anti-inflamatório esteroidal; e

(c) um veículo farmacologicamente aceitável.

7. Combinação de agentes terapêuticos, caracterizada pelo fato de compreender:

(a) um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4; e

(b) um agente anti-inflamatório esteroidal.

8. Kit caracterizado pelo fato de compreender:

(a) uma primeira composição farmacêutica compreendendo um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4 e um primeiro veículo farmacologicamente aceitável; e

(b) uma segunda composição farmacêutica compreendendo um agente anti-inflamatório esteroidal e um segundo veículo farmacologicamente aceitável;

onde a primeira e segunda composições farmacêuticas

são composições farmacêuticas distintas.

9. Método de tratamento de uma disfunção pulmonar, o método caracterizado por compreender a administração a um paciente em necessidade de tratamento de uma quantidade
5 terapêuticamente efetiva de um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4.

10. Método para tratar uma doença pulmonar obstrutiva crônica ou asma, o método caracterizado por compreender a administração a um paciente uma quantidade terapêuticamente
10 efetiva de um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4.

11. Método de produção de broncodilatação em um mamífero, o método caracterizado por compreender administrar a um mamífero uma quantidade produtora de
15 broncodilatação de um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4.

12. Método de antagonizar um receptor muscarínico e agonizar um receptor β_2 -adrenérgico em um mamífero, o método caracterizado por compreender administrar no
20 mamífero um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4.

13. Método para utilizar um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4 como uma ferramenta de pesquisa, o método caracterizado por compreender conduzir
25 um ensaio biológico utilizando um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4.

14. Método de avaliação de um composto teste em um ensaio biológico, o método caracterizado pelo fato de compreender:

30 (a) conduzir um ensaio biológico com um composto de

teste para fornecer um primeiro valor de ensaio;

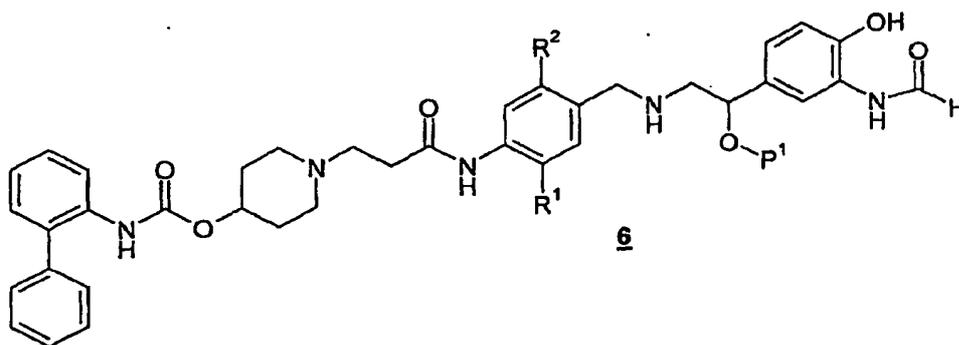
(b) conduzir o ensaio biológico com um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4 para fornecer um segundo valor de ensaio; onde a etapa (a) é conduzida
5 antes, após ou simultaneamente à etapa (b); e

(c) comparar o primeiro valor de ensaio da etapa (a) com o segundo valor de ensaio da etapa (b).

15 15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o ensaio biológico é um ensaio de ligação de receptor muscarínico ou um ensaio de ligação de um receptor β_2 -adrenérgico.

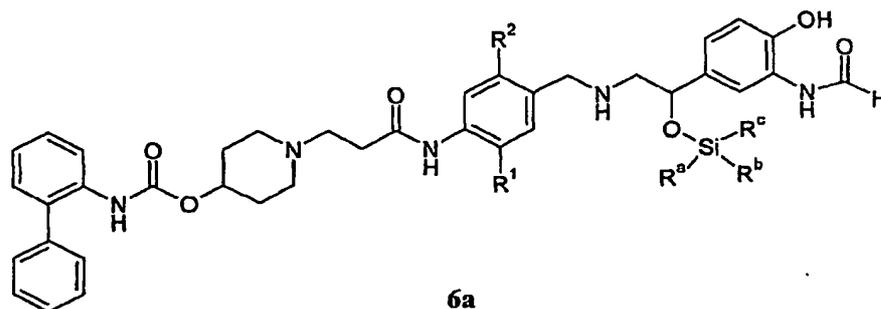
16. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o ensaio biológico é um ensaio de broncoproteção em um mamífero.

15 17. Processo de preparação do composto da reivindicação 1, o processo caracterizado por compreender a desproteção de uma composição da fórmula 6:



onde P^1 é um grupo de proteção de hidroxil, para fornecer um composto de fórmula I.

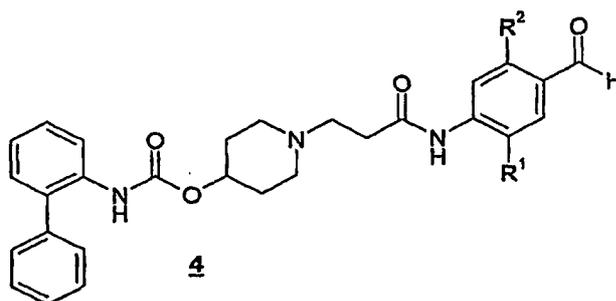
20 18. Processo de preparação do composto da reivindicação 1, o processo caracterizado por compreender a desproteção de uma composição da fórmula 6a:

**6a**

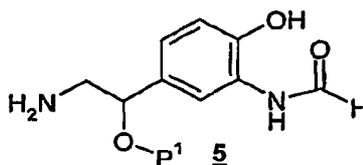
onde R^a , R^b e R^c são independentemente selecionados a partir de alquil de C_{1-4} , fenil, -alquil de C_{1-4} -(fenil), ou um entre R^{1a} , R^{1b} e R^{1c} é -O-(alquil de C_{1-4}); para fornecer um composto da fórmula I.

5 19. Processo para preparar um composto da reivindicação 1, o processo caracterizado por compreender:

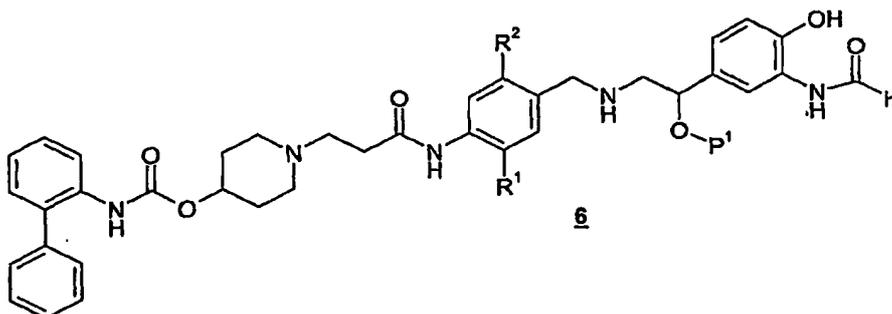
(a) reagir um composto da fórmula 4:

**4**

com um composto da fórmula 5:

**5**

10 onde P^1 é um grupo de proteção de hidroxil, na presença de um agente de redução para fornecer um composto da fórmula 6:

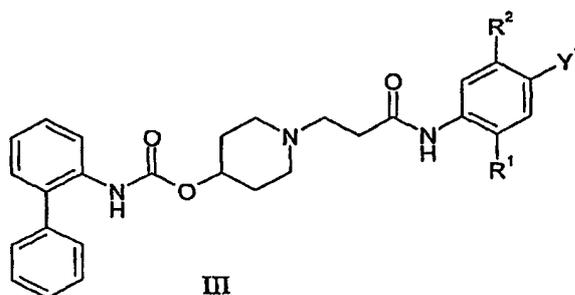
**6**

e

(b) desproteger o composto da fórmula 6 para fornecer um composto da fórmula I.

20. Processo para preparação de um sal farmacologicamente aceitável do composto da reivindicação 1, o processo caracterizado por compreender contatar um composto da fórmula I em base livre com um ácido farmacologicamente aceitável.

21. Intermediário para a preparação de um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de que o intermediário é um composto da fórmula III,



onde:

Y^1 é selecionado a partir de $-CHO$, $-CN$, $-CH_2OH$, $-CH(OR^{3a})OR^{3b}$, $-C(O)OH$, $-C(O)OR^{3c}$, bromo e iodo, onde R^{3a} e R^{3b} são selecionados independentemente a partir de alquil C_{1-6} , ou R^{3a} e R^{3b} são unidos para formar alquilenos C_{2-6} , R^{3c} é selecionado a partir de alquil C_{1-6} ;

R^1 é metil ou etil;

R^2 é metil ou etil;

ou um sal ou estereoisômero deste.

22. Intermediário, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que R^1 e R^2 são metil.

23. Intermediário, de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que Y^1 é $-CHO$.

24. Intermediário, de acordo com a reivindicação 21,

caracterizado pelo fato de que R¹ e R² são metil.

25. Composto, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o composto é sal do ácido L-tartárico do éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-
5 hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico do ácido bifenil-2-ilcarbâmico.

26. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de ser
10 para uso em terapia.

27. Uso de um composto de qualquer uma das reivindicações 1, 2, 3 ou 4, caracterizado pelo fato de ser para a produção de um medicamento para tratamento de uma disfunção pulmonar.

COMPOSTOS DE DIALQUILFENIL POSSUINDO ATIVIDADE AGONISTA DE REPECTOR β_2 -ADRENÉRGICO E ANTAGONISTA DE RECEPTOR MUSCARÍNICO

Esta invenção está relacionada a compostos da fórmula
 5 (I), onde R^1 e R^2 estão conforme definido na especificação, ou um sal farmacêuticamente aceitável ou um solvato ou estereoisômero deste. A invenção também está relacionada a composições farmacêuticas e combinações compreendendo tais compostos, processos e intermediários para preparação de
 10 tais compostos, e métodos para utilização de tais compostos para, por exemplo, tratar disfunções pulmonares, como doença pulmonar obstrutiva crônica e asma.

