

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 584**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07776093 .2**
96 Fecha de presentación: **24.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2010489**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **Compuestos de dialquilfenilo que tienen actividad agonista del receptor beta2-adrenérgico y antagonista del receptor muscarínico**

30 Prioridad:
25.04.2006 US 794702 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.11.2012

73 Titular/es:
THERAVANCE, INC. (100.0%)
901 GATEWAY BOULEVARD
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US

72 Inventor/es:
COLSON, PIERRE-JEAN;
HUGHES, ADAM;
HUSFELD, CRAIG;
MAMMEN, MATHAI y
RAPTA, MIROSLAV

74 Agente/Representante:
ISERN JARA, Jorge

ES 2 391 584 T3

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

DESCRIPCION

Compuestos de dialquilfenilo que tienen actividad agonista del receptor β_2 -adrenérgico y antagonista del receptor muscarínico

5

ANTECEDENTES Y TRANSFONDOS DE LA INVENCION

Sector de la invención

10 La presente invención, se refiere a nuevos compuestos de dialquilfenilo, que tienen actividad agonista del receptor β_2 -adrenérgico y antagonista del receptor muscarínico. La presente invención, se refiere, también, a composiciones farmacéuticas que comprenden tales tipos de compuesto, a procedimientos y a intermediarios para preparar tales tipos de compuestos, y al uso de tales tipos de compuestos, como por ejemplo, para tratar trastornos pulmonares.

15 Estado actual de la técnica

Los trastornos pulmonares, tales como el asma y la enfermedad obstructiva crónica (COPD – [del inglés, [chronic obstructive pulmonary disease]-]), se tratan, usualmente, mediante broncodilatadores. Un tipo de broncodilatador, utilizado para tratar los trastornos pulmonares, consiste los agonistas del receptor β_2 -adrenérgico (adrenorreceptor), tales como el albuterol, el formoterol y el salmeterol. Estos compuestos, se administran, generalmente, mediante inhalación. Otro tipo de broncodilatador, consisten en los agonistas del receptor muscarínico (compuestos anticolinérgicos), tales como el ipratropio y el tiotropio. Estos compuestos, se administran, típicamente, mediante inhalación.

25 Las composiciones farmacéuticas que contienen una combinación del agonista del receptor β_2 adrenérgico y un antagonista del receptor muscarínico, son conocidas, en el arte especializado de la técnica, para su uso en el tratamiento de las enfermedades pulmonares. Así, por ejemplo, el documento de patente estadounidense US nº 6,433,027, registrada en fecha 13 de Agosto del 2002, da a conocer composiciones farmacéuticas que contienen un antagonista del receptor muscarínico, tales como el bromuro de tiotropio, y un agonista del receptor β_2 adrenérgico, tales como el fumarato de formoterol.

Adicionalmente, además, los compuestos que tienen ambas, actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico y antagonista del receptor muscarínico, son ya conocidos, en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, el documento de patente estadounidense US 7,141,671, registrado en fecha 28 de Noviembre del 2006, da a conocer compuestos de bifenilo, los cuales contienen ambas, actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico y antagonista del receptor muscarínico. Los compuestos que contienen ambas, actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico y actividad antagonista del receptor muscarínico, son altamente deseables, debido al hecho de que, tales tipos de compuestos, proporcionan una broncodilatación, mediante dos formas de acción independientes, al mismo tiempo que tienen una farmacocinética de molécula individual.

40 Cuando se tratan trastornos pulmonares, es particularmente de utilidad, el hecho de proporcionar agentes terapéuticos que tengan una larga duración de acción, es decir, una duración de por lo menos 24 horas, cuando éstas se administran mediante inhalación, de tal forma que, los pacientes, sólo necesitan administrar el agente terapéutico, una vez al día, o menos. No todos los compuestos de acción dual que se han dado a conocer previamente, en el arte especializado de la técnica, poseen esta deseada propiedad.

Correspondientemente en concordancia, existe una necesidad, en cuanto al hecho de poder disponer de nuevos compuestos que tengan ambas, actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico y actividad antagonista del receptor muscarínico, los cuales posean una larga duración de la acción, cuando se administran a un paciente, mediante inhalación.

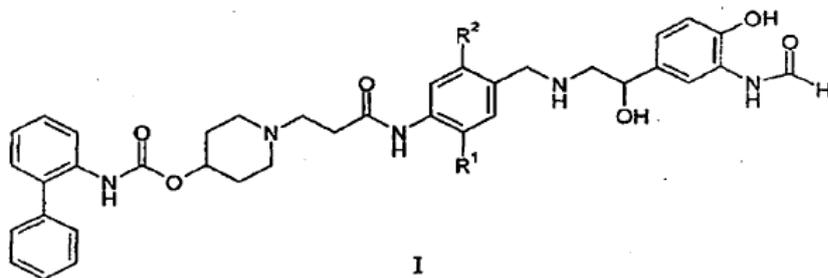
RESUMEN DE LA INVENCION

55 La presente invención, proporciona nuevos compuestos de dialquilfenilo, los cuales tengan ambas, actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico y actividad antagonista del receptor muscarínico. Entre otras propiedades, se ha encontrado que, un compuesto de la presente invención, posee un larga duración de acción, como por ejemplo, una duración de por lo menos un transcurso de tiempo de 24 horas, cuando se administran a un mamífero, mediante inhalación. Correspondientemente en concordancia, se espera que, los compuestos de la presente invención, sean de utilidad y ventajosos como agentes terapéuticos, para tratar trastornos pulmonares.

60 Correspondientemente en concordancia, en uno de sus aspectos, la presente invención, se refiere a un compuesto de la fórmula I:

5

10



en donde,

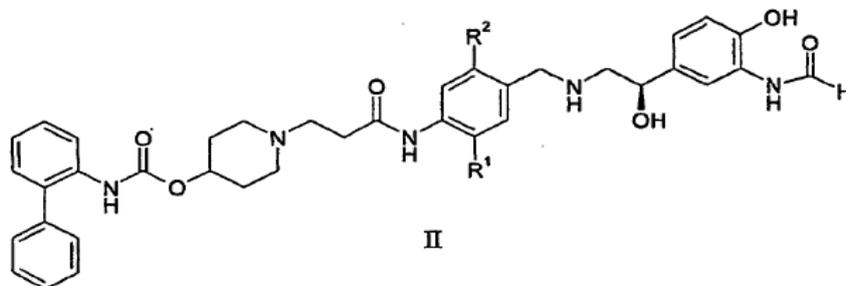
15

R^1 , es metilo ó etilo; R^2 , es metilo ó etilo; o una sal o solvato o estereoisómero de éste, farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto particular de la invención, el compuesto de la fórmula I, es un compuesto que tiene la fórmula II:

20

25



30

en donde,

35

R^1 y R^2 , son tal y como se definen aquí, en este documento (incluyendo a las formas específicas o preferidas de presentación), o una sal o solvato de éste, farmacéuticamente aceptables.

En otros aspectos de su composición, la presente invención, se refiere a una composición farmacéutica que comprende un portador o soporte, farmacéuticamente aceptables, y a un compuesto de la fórmula I.

40

En caso deseado, los compuestos de la presente invención, pueden administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como los consistentes en un agente antiinflamatorio. Correspondientemente en concordancia, en otro de sus aspectos de composición, la presente invención, se refiere a una composición farmacéutica, la cual comprende (a) un compuesto de la fórmula I; y (b) un segundo agente terapéutico. En todavía otro de sus aspectos de composición, la presente invención, se refiere a una composición farmacéutica, la cual comprende (a) un compuesto de la fórmula I; (b) un segundo agente terapéutico; y (c) un portador o soporte, farmacéuticamente aceptable.

45

En todavía otro de sus aspectos de composición, la presente invención, se refiere a una combinación de agentes terapéuticos, comprendiendo, la composición, (a) un compuesto de la fórmula I; y (b) un segundo agente terapéutico. En otro de sus aspectos de composición, la presente invención, se refiere a una combinación de composiciones farmacéuticas, comprendiendo, la combinación, (a) una primera composición farmacéutica, la cual comprende un compuesto de la fórmula I, y un primer portador o soporte, farmacéuticamente aceptable, y (b) una segunda composición farmacéutica, la cual comprende un segundo agente terapéutico, y un segundo portador o soporte, farmacéuticamente aceptable. La presente invención, se refiere, también, a un equipo, a modo de "Kit", que contiene tales tipos de composiciones farmacéuticas.

50

55

Los compuestos de la presente invención, poseen ambos tipos de actividades, actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico y actividad antagonista del receptor muscarínico. Correspondientemente en concordancia, se espera que, los compuestos de la fórmula I, sean de utilidad como agentes terapéuticos, para tratar trastornos pulmonares, tales como el asma, y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

60

Correspondientemente en concordancia, en uno de sus aspectos, la presente invención, se refiere a un compuesto de la fórmula I, para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno pulmonar, comprendiendo, el procedimiento, administrar, a un paciente en necesidad de tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva, de un compuesto de la fórmula I. La presente invención, se refiere, también, a un compuesto de la fórmula I, para su uso en un procedimiento para el tratamiento de la enfermedad obstructiva crónica, o el asma, comprendiendo, el

65

procedimiento, la administración, a un paciente, de una cantidad terapéuticamente efectiva, de un compuesto de la fórmula I. Adicionalmente, además, en uno de sus aspectos, la presente invención, se refiere a un compuesto de la fórmula I, para su uso en un procedimiento para producir broncodilatación, en un mamífero, comprendiendo, el procedimiento, la administración, a un mamífero, de una cantidad de compuesto de la fórmula I, la cual produzca broncodilatación. La presente invención, se refiere, también, a un compuesto de la fórmula I, para su uso en un procedimiento de antagonización de un receptor muscarínico, y la agonización de un receptor β_2 -adrenérgico, en un mamífero, comprendiendo, el procedimiento, la administración, al mamífero, de un compuesto de la fórmula I.

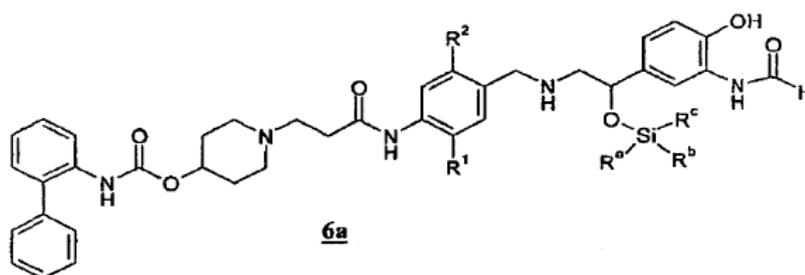
Puesto que, los compuestos de la presente invención, poseen ambas, actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico y actividad antagonista del receptor muscarínico, tales tipos de compuestos, son también de utilidad, como herramientas de investigación. Correspondientemente en concordancia, un compuesto de la fórmula I, es de utilidad en un procedimiento que comprende la realización de un ensayo biológico, mediante la utilización de un compuesto de la fórmula I.

Los compuestos de la presente invención, pueden también ser de utilidad, para evaluar nuevos compuestos químicos. Correspondientemente en concordancia, un compuesto de la fórmula I, es de utilidad en un procedimiento para evaluar un compuesto de ensayo, en un ensayo biológico, comprendiendo, el procedimiento, (a) realizar el ensayo biológico, con un compuesto de ensayo, para proporcionar un primer valor de ensayo; (b) conducir el ensayo biológico, con un compuesto de la fórmula I, para proporcionar un segundo valor de ensayo.; en donde, la etapa (a), se lleva a cabo, bien ya se antes, bien ya sea después, o bien ya sea simultáneamente con la etapa (b); y (c) comparar el primer valor de ensayo de la etapa (a), con el segundo valor de ensayo de la etapa (b).

La presente invención, se refiere, también, a un procedimiento y a nuevos intermediarios de utilidad para preparar un compuesto de la fórmula I. Correspondientemente en concordancia, en otro de sus aspectos, la presente invención, se refiere a procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula I, comprendiendo, el procedimiento, la desprotección de un compuesto de la fórmula 6 (tal y como ésta se define aquí, en este documento), para proporcionar un compuesto de la fórmula I.

En otro de sus aspectos, la presente invención, se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula I, comprendiendo, el procedimiento: (a) hacer reaccionar un compuesto de la fórmula 4, con un compuesto de la fórmula 5, en presencia de un agente reductor, para proporcionar un compuesto de la fórmula 6; y (b) desproteger el compuesto de la fórmula 6, para proporcionar un compuesto de la fórmula I, en donde, los compuestos 4, 5 y 6, son tal y como se definen aquí, en este documento.

En una forma particular de presentación de la presente invención, los compuestos de la fórmula I, se prepararan mediante la desprotección de un compuesto de la fórmula 6, en donde, el grupo protector hidroxilo, es un grupo sililo. Correspondientemente en concordancia, en todavía otro de sus aspectos, la presente invención, se refiere a un procedimiento para preparar un compuesto de la fórmula I, comprendiendo, el procedimiento, la desprotección de un compuesto de la fórmula 6a:



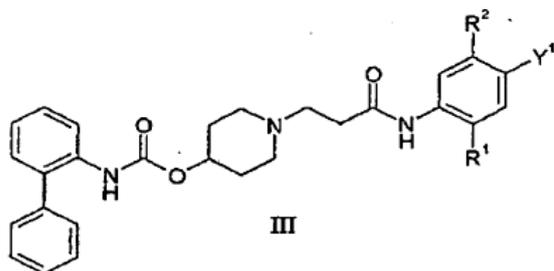
en donde, R^a , R^b y R^c , se seleccionan, de una forma independiente, de entre alquilo C_{1-4} , fenilo, -alquil C_{1-4} -(fenilo), ó una de las R^{1a} , R^{1b} y R^{1c} , es $-O$ -(alquilo C_{1-4}); para proporcionar un compuesto de la fórmula I.

En otras formas de presentación, el procedimiento que se describe aquí, en este documento, comprende adicionalmente la etapa de formar una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la fórmula I. En otras formas de presentación, la presente invención, se refiere a otros procedimientos que se describen aquí, en este documento; y al producto preparado mediante uno cualquiera de los procedimientos descritos aquí, en este documento.

En una forma particular de presentación, la presente invención, se refiere a compuestos de la fórmula III:

5

10



15

20

o a una sal o estereoisómero de éste, en donde, Y^1 , se selecciona de entre $-CHO$, $-CN$, $-CH_2OH$, $-CH(OR^{3a})OR^{3b}$, $-C(O)OH$, $-C(O)OR^{3c}$, bromo y yodo, en donde, R^{3a} y R^{3b} , se seleccionan, de una forma independiente, de entre alquilo C_{1-6} , ó R^{3a} y R^{3b} , se unen, para formar un alquileo C_{2-6} , R^{3c} , se selecciona de entre alquilo C_{1-6} ; y R^1 y R^2 , son tal y como se definen aquí, en este documento (incluyendo cualesquiera formas específicas o preferidas de presentación), compuestos éstos, los cuales son de utilidad como intermediarios, en la preparación de compuestos de la fórmula I. En una forma particular de presentación de la fórmula III, R^1 y R^2 , son metilo. En otra forma particular de presentación de la fórmula III, Y^1 , es $-CHO$. En todavía otra forma particular de presentación de la fórmula III; R^1 y R^2 , son metilo, e Y^1 , es $-CHO$.

25

La presente invención, se refiere, también, al uso de un compuesto de la fórmula I, para terapia. Adicionalmente, además, la presente invención, se refiere al uso de un compuesto de la fórmula I, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno pulmonar; y al uso de un compuesto de la fórmula I, como una herramienta de investigación. Otros aspectos y formas de presentación de la presente invención, se encuentran descritos aquí, en este documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

30

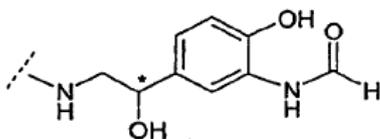
35

En uno de sus aspectos, la presente invención, se refiere a nuevos compuestos de la fórmula I. Estos compuestos de la fórmula I, contienen uno o más centros quirales y, así, por lo tanto, la presente invención, está dirigida a mezclas racémicas; estereoisómeros puros (a saber, enantiómeros o diastéromeros); mezclas enriquecidas de estereoisómeros, y por el etilo, a menos de que se encuentre indicado de otro modo. Cuando, aquí, en este documento, se muestra o se nombra un estereoisómero particular, se entenderá el hecho, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, de que, pueden encontrarse presentes cantidades menores de otros estereoisómeros, en las composiciones de la presente invención, a menos de que se indique de otro modo, con la condición de que, la utilidad de la composición, como un todo, no se elimine mediante la presencia de tales otros tipos de isómeros.

40

De una forma particular, los compuestos de la fórmula I, contienen un centro quiral, como el átomo de carbono, indicado mediante el símbolo *, en la siguiente fórmula parcial:

45



50

En una forma particular de presentación de la presente invención, el átomo de carbono identificado mediante el símbolo *, tiene la configuración (R). En esta forma de presentación, los compuestos de la fórmula I, tienen la configuración (R) en el átomo de carbono, identificada mediante el símbolo *, o éstas se encuentran enriquecidas en una forma estereoisomérica, teniendo la configuración (R), en este átomo de carbono.

55

Los compuestos de la fórmula I, contienen, también, varios grupos básicos (como, por ejemplo, grupos amino) y, así, por lo tanto, los compuestos de la fórmula I, pueden existir como la base libre, o en varias formas de sal. Todas estas formas, se encuentran incluidas en el ámbito de la presente invención. Adicionalmente, además, los solvatos de la fórmula, o las sales de éstas, se encuentran incluidos en el ámbito de la presente invención.

60

Correspondientemente en concordancia, aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, reconocerán el hecho de que, las referencias a un compuesto, aquí, en este documento, como por ejemplo, la referencia a un compuesto de la fórmula I ó a un compuesto de la fórmula 6, incluye la referencia a las sales y estereoisómeros y solvatos de dicho compuesto, a menos de que se indique de otro modo.

65

Adicionalmente, además, el uso, aquí, en este documento, de la formas, "un", "una" y "el" (o "la"), incluye a las correspondientes formas en plural, a menos de que, el contexto del uso, indique claramente lo contrario.

La nomenclatura utilizada aquí, en este documento, para nombrar a los compuestos de la presente invención y a los intermediarios de éstos, se han derivado, de una forma general, mediante la utilización del sistema programa informático consistente en el "AutoNom software" (MDL, San Leandro, California), el cual se encuentra comercialmente disponible en el mercado. De una forma típica, los compuestos de la fórmula I, se han denominado como derivados del éster piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-il carbámico.

Formas representativas de presentación

Los sustituyentes y valores que se facilitan a continuación, están previstos para proporcionar ejemplos representativos de varios aspectos y formas de presentación de la presente invención. Se pretende que, estos valores representativos, definan e ilustren adicionalmente tales aspectos y formas de presentación, y no pretenden excluir otras formas de presentación o limitar el alcance de la presente invención. En este sentido, no se pretende, en modo alguno, el que, la preferencia de la representación de un valor o sustituyente particular, excluya, de la presente invención, a otros valores o sustituyentes, a menos de que ello se indique de una forma específica.

En una forma de presentación, R¹, es metilo y R², es etilo.

En otra forma de presentación, R¹, es etilo y R², es etilo.

En otra forma de presentación, R¹, es metilo y R², es etilo.

En otra forma de presentación, R¹, es etilo y R², es metilo.

Así, de este modo, en unos de sus aspectos de competencia, la presente invención, se refiere a compuestos de la fórmula 1, seleccionados de entre:

1-[2-(4-[[R]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-

dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico (compuesto IIa);

1-[2-(4-[[R]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dietilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico (compuesto IIb);

1-[2-(4-[[R]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2-metil-5-etilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico (compuesto IIc);

1-[2-(4-[[R]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2-etil-5-metilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico (compuesto IId);

o a sales de éstos, farmacéuticamente aceptables.

Definiciones

Cuando se describen los compuestos, composiciones, procedimientos y procesos de la invención, los términos que siguen a continuación, tienen los siguientes significados, a menos de que se indique de otro modo.

El término "alquilo", significa un hidrocarburo saturado monovalente, el cual puede ser lineal o ramificado, o combinaciones de éste. A menos de que se defina de otro modo, tales tipos de grupos alquilo, contienen, de una forma típica, de 1 a 10 átomos de carbono. Los grupos alquilo representativos, incluyen, a título de ejemplo, a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, sec.-butilo, isobutilo, tert.-butilo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, n-decilo, y por el estilo.

Cuando se prevé un número específico de átomos de carbono, para un término particular utilizado aquí, en este documento, el número de átomos de carbono, se muestra después del término. Así, por ejemplo, el término "alquilo C₁₋₃", significa un grupo alquilo, el cual tiene de 1 a 3 átomos de carbono, en donde, los átomos de carbono, se encuentran en cualquier configuración químicamente aceptable.

El término "alquileo", significa un grupo hidrocarburo, saturado, divalente, el cual puede ser lineal o ramificado. A menos de que se defina de otro modo, tales tipos de grupos alquileo, contienen, típicamente, de 1 a 10 átomos de carbono. Los grupos alquileo representativos, incluyen, a título de ejemplo, a metileno, metileno, etano-1,2-diilo ("etileno"), propano-1,2-diilo, propano-1,3-diilo, butano-1,4-diilo, pentano-1,5-diilo, y por el estilo.

El término "grupo protector de amino" (o grupo amino-protector), significa un grupo protector, apropiado para evitar reacciones no deseadas en un grupo amino. Los grupos protectores de amino representativos, incluyen, pero no de una forma limitada en cuanto a éstos, a tert.-butoxicarbonilo (Boc); trietilo (Tr), benciloxicarbonilo (Cbz), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc); bencilo (Bn), formilo, trimetilsililo (TMS), y tert.-butildimetilsililo (TBS); y por el estilo.

El término "grupo protector de carboxilo (o grupo carboxilo-protector, significa un grupo protector, apropiado para prevenir reacciones no deseadas en un grupo carboxilo. Los grupos carboxilo-protectores apropiados, incluyen,

aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a ésteres, tales como metilo, etilo, tert.-butilo, bencilo (Bn), p-metoxibencilo (PMB), 9-fluorenilmetilo (Fm), trimetilsililo (TMS), tert.-butildimetilsililo (TBS), difenilmetilo (benzhidrilo, DPM) y por el estilo.

5 El término "compuesto de la invención" ó "compuesto de la fórmula I" o "compuesto de la fórmula II", tal y como se utiliza aquí, en este documento, significa el compuesto o los compuestos especificados, o una sal o solvato o estereoisómero de éstos, farmacéuticamente aceptable, a menos de que se indique de otro modo.

El término "halo, significa flúor, cloro, bromo y yodo.

10 El término "grupo protector de hidroxilo" (o grupo hidroxilo-protector), significa un grupo protector, apropiado para evitar o prevenir reacciones no deseables, en un grupo hidroxilo. LOs grupos hidroxilo-protectores, incluyen, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los grupos sililo, incluyendo a los grupos (alquil C₁₋₆)-sililo, tales como trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), tert.-butildimetilsililo (TBS) y por el etilo; y a ésteres (grupos acilo), que incluyen a los grupos alcanóilo C₁₋₆, tales como formilo, acetilo y por el estilo; grupos arilmetilo, tales como bencilo (Bn), p-metoxibencilo (PMB), 9-fluorenilmetilo (Fm), difenilmetilo (benzhidrilo, DPM) y por el estilo. Adicionalmente, además, pueden también encontrarse protegidos dos hidroxilo, como un grupo alquilideno, tal como prop-2-ilidina, formados, por ejemplo, mediante la reacción con a una cetona, tal como la acetona.

20 El término "grupo saliente", significa un grupo funcional o un átomo que puede desplazarse mediante otro grupo funcional o un átomo, en una reacción de sustitución, tal como una reacción de sustitución nucleofílica. A título de ejemplos, los grupos salientes representativos, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los grupos cloro, bromo y yodo; grupos de ésteres sulfónicos, tales como acetoxi, trifluoroacetoxi, y por el estilo.

25 El término "diámetro medio de masa" (MMD – [del ingles, mass median diameter]-), cuando se utiliza para hacer referencia a partículas, significa el diámetro, de tal forma que, la mitad de la masa de las partículas, se encuentre contenido en partículas con un diámetro mayor, y la mitad de las partículas, se encuentre contenido en partículas con un diámetro menor.

30 El término "micronizado(a)" o "en forma micronizada", significa partículas en las cuales, por lo menos un porcentaje de aproximadamente un 90 por ciento de las partículas, tienen un diámetro de por menos de 10 µm, a menos de que se indique de otro modo.

35 El término "o una sal o solvato o estereoisómero de éste, farmacéuticamente aceptable", tal y como se utiliza aquí, en este documento, pretende incluir todas las permutaciones de sales, solvatos y estereoisómeros, tales como un solvato de una sal farmacéuticamente aceptable de un estereoisómero de un compuesto de la fórmula I.

40 El término "sal farmacéuticamente aceptable", significa una sal que es aceptable para la administración a un paciente, tal como un mamífero (como por ejemplo, sales que tienen una seguridad aceptable en mamíferos, para un régimen dado de dosificación). Los ejemplos representativos de sales farmacéuticamente aceptables, incluyen a las sales del ácido ascórbico, del ácido benzenosulfónico, del ácido benzóico, del alcanforsulfónico, del ácido cítrico, del ácido etanosulfónico, del ácido edisílico, del ácido fumárico, del ácido genticónico, del ácido glucónico, del ácido glutámico, del ácido hipúrico, del ácido bromhídrico, del ácido clorhídrico, isetiónico, del ácido láctico, del ácido lactobiónico, del ácido maléico, del ácido málico, del ácido mandélico, del ácido metanosulfónico, del ácido múxico, 45 del ácido naftalenosulfónico, naftaleno-1,5-disulfónico, del ácido naftaleno-2,6-disulfónico, del ácido nicotínico, del ácido nítrico, del ácido erótico, del ácido pamóico, del ácido pentoténico, del ácido fosfórico, succínico, del ácido sulfúrico, del ácido tartárico, del ácido p-toluenosulfónico, del ácido xinafóico, y por el estilo.

50 El término "derivados protegidos de éste", significa un derivado del compuesto específico, en el cual, uno o más grupos funcionales del compuesto, se encuentran protegidos o bloqueados, para que no puedan acontecer reacciones no deseadas con un grupo protector o de bloqueo. Los grupos funcionales que pueden protegerse, incluyen, a título de ejemplo, a los grupos carboxi, los grupos amino, los grupos hidroxilo, los grupos tioles, lo grupos carbonilo, y por el estilo. Los grupos protectores apropiados, para tales tipos de grupos funcionales, se conocen bien, en el arte especializado de la técnica, y éstos se ejemplifican mediante las enseñanzas de T. W. Greene y G. M. Wuts, en Protective Groups in Organic Synthesis, Third Edition, - Grupos protectores en la síntesis orgánica, 55 Tercera Edición, Wiley, New York, 1999, y en las referencias citadas en dicho estudio.

60 El término "sal de éste", significa un compuesto formado cuando un hidrógeno de un ácido, se reemplaza mediante un catión, tal como un catión de metal, o un catión inorgánico, y por el estilo. En la presente invención, el catión, comprende, típicamente, una forma protonada de un compuesto de la fórmula I, es decir, en donde, uno o más grupos amino se han protonado mediante un ácido. De una forma preferible, la sal, es una sal farmacéuticamente aceptable, si bien este requisito no se requiere para las sales de los compuestos intermedios o intermediarios, los cuales no están previstos para la administración a un paciente.

El término "solvato", significa un complejo o agregado formado por uno o más moléculas de soluto, es decir, un compuesto de la fórmula I, o una sal de éste farmacéuticamente aceptable, y una no más moléculas de un disolvente. Tales tipos de disolventes, de una forma típica, son sólidos cristalinos, que tiene un factor de relación molar substancialmente fijo, del soluto con respecto al disolvente. Los ejemplos representativos de disolventes, incluyen, a título de ejemplo, al agua, al metanol, al etanol, al isopropanol, al ácido acético, y por el estilo. Cuando el disolvente es agua, el solvato formado, es un hidrato.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva", tal y como se utiliza aquí, en este documento, significa una cantidad suficientemente efectiva, para efectuar el tratamiento, cuando éste se administra a un paciente en necesidad de tratamiento.

El término "tratar" ó "tratamiento", tal y como se utiliza aquí, en este documento, significa el tratar o el tratamiento de una enfermedad o condición médica (tal como la COPD ó el asma), en un paciente, tal como un mamífero (de una forma particular, un humano), el cual incluye:

(a) evitar que acontezca la enfermedad, trastorno, o condición médica, a saber, el tratamiento profiláctico de un paciente;

(b) mejorar la enfermedad, trastorno, o condición médica, a saber, eliminando o provocando la regresión de la enfermedad, trastorno, o condición médica, en un paciente,

(c) suprimir la enfermedad, trastorno, o condición médica, a saber, enlenteciendo o interrumpiendo el desarrollo de la enfermedad, trastorno o condición médica, en un paciente; ó

(d) aliviar los síntomas de la enfermedad, trastorno, o condición médica, en un paciente.

La totalidad de los otros términos utilizados aquí, en este documento, pretenden tener su significado ordinario, tal y como éste se entiende, por parte de aquéllas personas usualmente expertas en el arte especializado de la técnica.

Procedimientos Sintéticos generales

Los compuestos de la invención, pueden prepararse a partir de materiales de partida fácilmente obtenibles en el mercado, utilizando los métodos y procedimientos generales que se presentan más abajo, a continuación, o mediante la utilización de otra información fácilmente disponible o conocida por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Si bien, en los procedimientos que se facilitan abajo, a continuación, pueden ilustrar una forma particular de presentación o aspecto de la presente invención, aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, reconocerán el hecho de que, pueden prepararse otros aspectos o procedimientos de la presente invención, mediante la utilización de los mismos procedimientos o procedimientos similares descritos aquí, en este documento, o mediante la utilización de otros procedimientos, reactivos o materiales de partida, los cuales se conocen, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Se apreciará también el hecho de que, allí en donde se facilitan condiciones de los procedimientos, que son típicas o preferentes (es decir, las temperaturas de reacción, los tiempos de reacción, los factores de relación molar de los reactivos, disolventes, presiones, etc.), pueden utilizarse también otras condiciones, a menos de que se indique de otra forma. Mientras que, las condiciones óptimas de reacción, pueden variar, de una forma típica, en dependencia de los varios parámetros de la reacción, tales como los reactivos, los disolventes, y las cantidades utilizadas, aquéllas personas usualmente expertas en el arte especializado de la técnica, pueden determinar fácilmente las condiciones apropiadas de la reacción, mediante las utilización de procedimientos de optimización de rutina.

Adicionalmente, además, tal y como resultará evidente, para aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, pueden ser necesarios grupos convencionales protectores, o éstos pueden ser deseables, con objeto de evitar que ciertos grupos funcionales, experimenten reacciones no deseadas. La elección de un grupo protector apropiado, para una grupo funcional particular, así como las condiciones y reactivos apropiados, para la protección y desprotección de tales tipos de grupos funcionales, son bien conocidos, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica. Pueden utilizarse grupos protectores distintos a los que ilustran en los procedimientos que se describen en los procedimientos que se describe aquí, en este documento.

En una forma de presentación, los compuestos de la fórmula I, se sintetizan de la forma que se ilustra en el Esquema I.

Esquema I

5

10

15

20

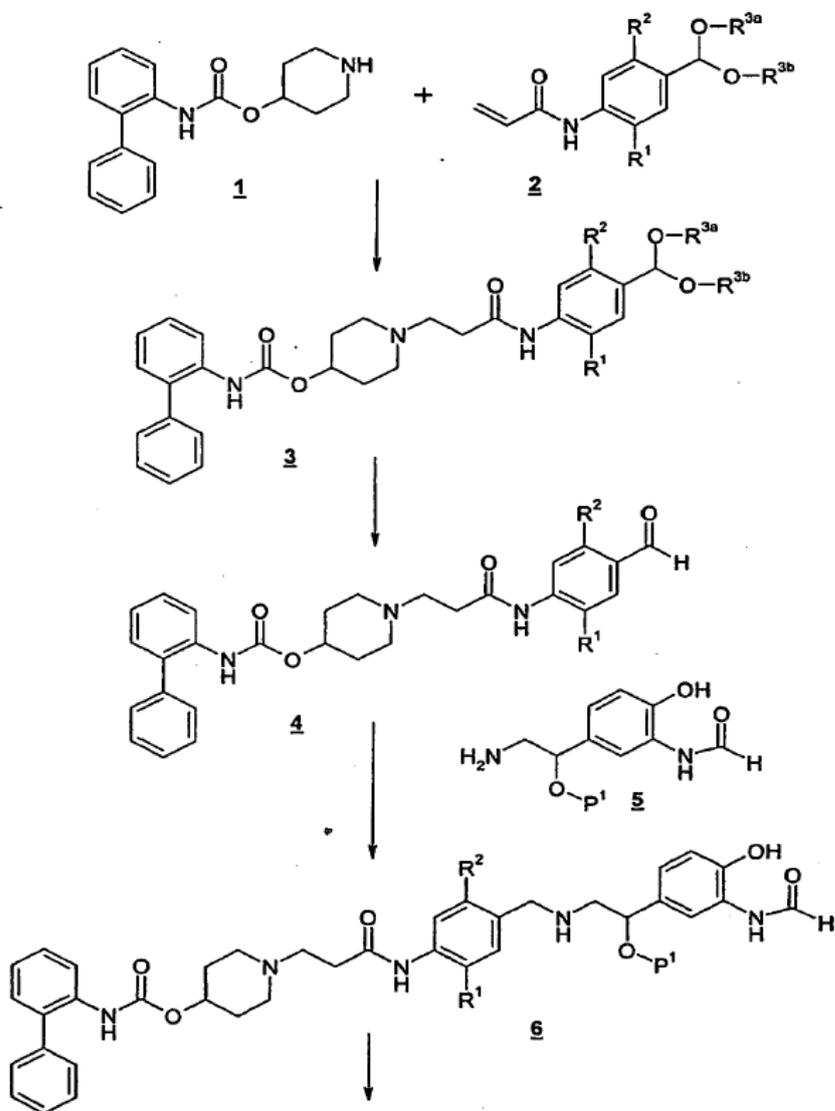
25

30

35

40

45



Compuesto de la fórmula I

50

En donde, P^1 , es un grupo hidroxilo-protector; y R^{3a} y R^{3b} , se seleccionan, de una forma independiente, de entre alquilo C_{1-6} , ó R^{3a} y R^{3b} , se unen, para formar alquileno C_{2-6} .

55

60

Tal y como se muestra en el Esquema I, el compuesto 1, puede hacerse reaccionar con aproximadamente 0,95 a aproximadamente 1,05 equivalentes molares del compuesto 2, para proporcionar el compuesto 3. Esta reacción de Michael, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 75°C , de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 40°C hasta aproximadamente 45°C , durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 8 horas hasta aproximadamente 24 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. De una forma general, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como el diclorometano, o una mezcla de diclorometano y metanol o etanol, y por el estilo. Después de haberse completado la reacción, de una forma típica, el producto, se aísla, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como la extracción, la recrystalización, la cromatografía y por el estilo. De una forma alternativa, la mezcla de reacción que contiene el compuesto 2, puede utilizarse directamente en la siguiente etapa de la síntesis.

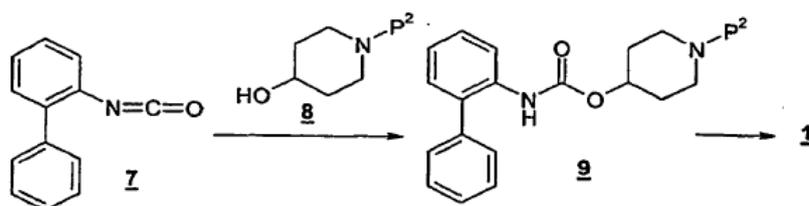
El compuesto 3, se hace reaccionar, a continuación, con ácido acuoso, con objeto de hidrolizar el grupo acetal y proporcionar el compuesto de aldehído 4. Puede emplearse cualquier ácido apropiado, en esta reacción, incluyendo, a título de ejemplo, el ácido clorhídrico, el ácido sulfúrico, el ácido metanosulfónico, el ácido p-toluenosulfónico, y por el estilo. La reacción de la hidrólisis, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 30°C, llevándose a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 25°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 6 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como metanol, etanol, isopropanol, diclorometano/etanol, acetonitrilo y por el estilo. Después de haberse completado la reacción, el producto, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo.

El compuesto 4, se hace reaccionar, a continuación, con aproximadamente 0,95 a aproximadamente 1,5 equivalentes molares del compuesto 5, en presencia de un agente reductor, para proporcionar el compuesto 6. En esta reacción, puede utilizarse cualquier tipo de agente reductor apropiado, incluyendo, a título ilustrativo, un reactivo de hidruro metálico, tal como el borohidrato sódico, el triacetoxiborohidrato sódico, el cianoborohidrato sódico, y por el estilo, o hidrógeno y un catalizador metálico, tal como el paladio sobre carbono, y por el estilo. Esta reacción de alquilación reductora, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente -20°C hasta aproximadamente 30°C, llevándose a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 5°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 1 hora hasta aproximadamente 6 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado y un disolvente aprótico, tal como diclorometano y metanol, y por el estilo. Después de haberse completado la reacción, el producto, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo.

El compuesto 6, se desprotege, a continuación, para proporcionar el compuesto de la fórmula I. Las condiciones particulares utilizadas para desproteger el compuesto 6, dependerán del grupo protector empleado. Así, por ejemplo, cuando P¹ es un grupo protector de sililo (como, por ejemplo, un compuesto de la fórmula 6a, tal y como ésta se define aquí, en este documento,) tal como tert.-butildimetilsilo, tert.-butildifenilsilo, difenilmethylsilo, di-tert.-butilmethylsilo, tert.-butoxidifenilsilo y por el estilo, esta reacción de desprotección, se lleva a cabo, de una forma típica, procediendo a poner en contacto un compuesto 6a, con una fuente del ión flúor. En una forma particular de presentación, la fuente del ión flúor, es el trihidroxifluoruro de trietilamina. Otras fuentes apropiadas del ión fluoruro, incluyen al fluoruro de tetrabutylamonio, al fluoruro potásico con 18-crown-6, al fluoruro de hidrógeno, al hidrofúoruro de piridina, y por el estilo. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 50°C, llevándose a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 10°C hasta aproximadamente 25°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 24 horas hasta aproximadamente 72 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como diclorometano y por el estilo. Después de haberse completado la reacción, el producto, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo.

El compuesto 1, es conocido, en el arte especializado de la técnica, o éste puede prepararse mediante materiales de partida y reactivos, los cuales se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, utilizando procedimientos que son conocidos. Véase, por ejemplo, el documento de solicitud de patente estadounidense US n° 2004/0167167 A1 y R. Naito et al., Chem. Pharm. Bull., 46(8) 1286-1294 (1998). A título de ejemplo, el compuesto 1, puede prepararse de la forma que se ilustra en el Esquema II

Esquema II



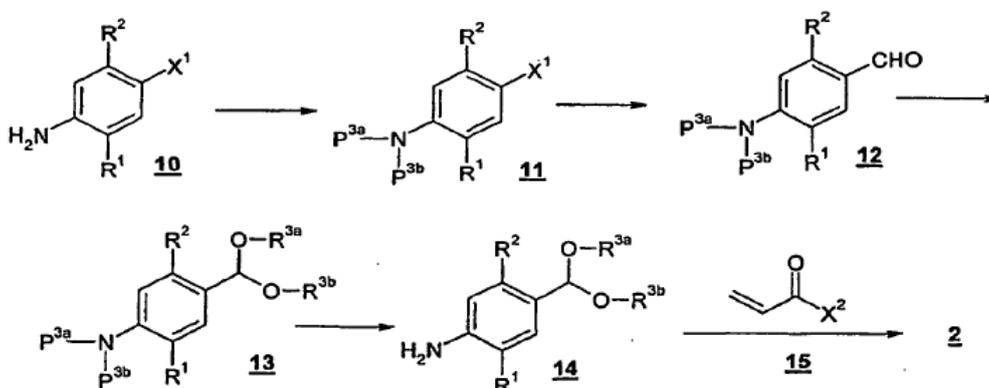
Tal y como se muestra en el esquema II, se procede a hacer reaccionar el 2-isocianato de bisfenilo (7), con una 4-hidroxipiperidina N-protégida 8, en donde, P², es un grupo amino-protector, tal como bencilo, para proporcionar el

intermediario carbamato 9. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 100°C, llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 60°C hasta aproximadamente 80°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 24 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. En caso deseado, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como diclorometano, tolueno y por el estilo. De una forma alternativa, esta reacción, puede llevarse a cabo en ausencia de un diluyente. Después de haberse completado la reacción, el producto 9, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo. De una forma alternativa, la mezcla de reacción que contiene el compuesto 9, se utiliza directamente, en la siguiente etapa de la síntesis.

Se procede, a continuación, a retirar el grupo amino-protector, P², del compuesto 2, mediante la utilización de procedimientos convencionales, para proporcionar el compuesto 1. Así, por ejemplo, cuando P² es un grupo bencilo, el compuesto 9, puede desprotegerse mediante la utilización de hidrógeno o formiato amónico, en presencia de un catalizador, tal como un catalizador de paladio. Los ejemplos representativos de catalizadores, incluyen, a título de ilustración, al paladio sobre carbono, hidróxido de paladio sobre carbono, o por el estilo. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 50°C, llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor de aproximadamente 40°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 24 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como diclorometano y por el estilo. Después de haberse completado la reacción, el producto 1, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo.

Los compuestos de la fórmula 2, son conocidos, en el arte especializado de la técnica, o éstos pueden prepararse mediante materiales de partida y reactivos, los cuales se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, utilizando procedimientos que son conocidos. A título de ilustración, los compuestos de la fórmula 2, pueden prepararse de la forma que se muestra en el Esquema III:

Esquema III



Tal y como se muestra en el esquema III, se procede, en primer lugar, a proteger un compuesto de anilina de la fórmula 10, en donde, X¹, es bromo ó yodo, en el grupo amino, para proporcionar un compuesto de la fórmula 11, en donde, P^{3a}, es un grupo amino-protector, y P^{3b}, es hidrógeno ó un grupo amino-protector. Puede utilizarse cualquier grupo amino-protector apropiado, tal como bencilo, 4-metoxibencilo, trifluoroacetilo, y por el estilo. Así, por ejemplo, un compuesto de la fórmula 10, puede hacerse reaccionar con aproximadamente 2 ó mas equivalentes molares, de una forma preferible, con aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,0 equivalentes molares, de un haluro de bencilo, tal como el cloruro de bencilo, el bromuro de bencilo ó el yoduro de bencilo, con objeto de proporcionar el compuesto 11, en donde, P^{3a} y P^{3b}, son ambas bencilo. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 50°C, llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor de aproximadamente 30°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 18 horas hasta aproximadamente 24 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como metanol, etanol isopropanol y por el estilo. De una forma típica, esta reacción, se conduce, también, en presencia de una base apropiada, tal como el carbonato potásico, el carbonato sódico, y por el estilo. Después de haberse completado la reacción, el producto 11, se aísla,

de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo.

Los compuestos representativos de la fórmula 10 que pueden emplearse en esta reacción, incluyen a la 2,5-dimetil-4-yodoanilina, 2,5-dietil-4-yodoanilina, 2-etil-4-yodo-5-metil-anilina, 5-etil-4-yodo-2-metil-anilina, 4-bromo-2,5-dimetilanilina, 4-bromo-2,5-dietilanilina, 4-bromo-2-etil-5-metil-anilina, 4-bromo-5-etil-2-metil-anilina y por el estilo. Dichos compuestos, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado (como, por ejemplo, de procedencia de la firma Spectra Grupo Limited, Inc., Millbury, OH), ó estos pueden prepararse a partir de materiales de partida y reactivos comercialmente disponibles en el mercado, mediante la utilización de procedimientos convencionales.

Se procede, a continuación, a poner en contacto el compuesto 11, con aproximadamente 1 a aproximadamente 2 equivalentes molares de un reactivo de alquil-litio, tal como el n-butil-litio ó el tert.-butil-litio, para formar el correspondiente anión, en el cual, el grupo X¹, se ha intercambiado por litio. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente -70°C hasta aproximadamente 0°C, llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor de aproximadamente -20°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 0,25 horas hasta aproximadamente 1 hora, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como tolueno, xileno, tetrahidrofurano y por el estilo.

El anión litio resultante, no se aísla, sino que, éste, se hace reaccionar in situ, con un exceso molar de N,N-dimetilformamida, para proporcionar el compuesto 12. Generalmente, se utilizan desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4 equivalentes molares de N,N-dimetilformamida. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente -70°C hasta aproximadamente 0°C, llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente -20°C hasta aproximadamente 0°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 0,5 horas hasta aproximadamente 2 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Después de haberse completado la reacción, el producto 12, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo.

El grupo aldehído del compuesto 12, se protege, a continuación, como un acetal, procediendo a hacer reaccionar el compuesto 12 con un alcohol ó un diol, en presencia de un catalizador de ácido. En esta reacción, puede utilizarse cualquier alcohol ó diol apropiados. así, por ejemplo, los alcoholes y dioles representativos, incluyen al metanol, etanol, n-propanol, etilenglicol, propilenglicol y por el estilo. Generalmente, se emplea, en esta reacción, un exceso molar del alcohol ó diol, de una forma preferible, desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 4 equivalentes molares.

En esta reacción, puede utilizarse cualquier catalizador de ácido apropiado, con objeto de facilitar la formación del acetal. Los ejemplos representativos de catalizadores de ácidos, incluyen, a título de ejemplo, al ácido p-toluenosulfónico, al ácido bencenosulfónico, al ácido clorhídrico, y por el estilo.

La reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 50°C hasta aproximadamente 100°C, llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 60°C hasta aproximadamente 80°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 12 horas hasta aproximadamente 24 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en diluyente apropiado, tal como tolueno, xileno y por el estilo. De una forma típica, la reacción, se lleva a cabo de tal forma que ésta permita el hecho de que, el agua producida, pueda retirarse, tal como, por ejemplo, mediante destilación azeotrópica, o mediante el uso de tamices moleculares. Después de haberse completado la reacción, el producto 13, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo. De una forma alternativa, la mezcla de reacción que contiene el compuesto 13, puede utilizarse directamente, en la siguiente etapa de la síntesis.

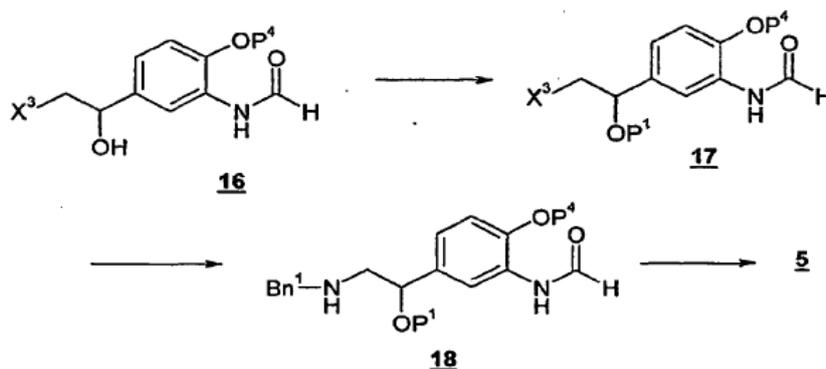
Después de la formación del acetal, el grupo amino del compuesto 1, se desprotege, mediante la utilización de reactivos y condiciones estándar, para formar el compuesto 14. Así, por ejemplo, si P^{3a} y P^{3b}, son grupos bencilos, el compuesto 13, puede desprotegerse mediante la utilización de hidrógeno, y de un catalizador, tal como un catalizador de paladio. Los ejemplos representativos de catalizadores, incluyen, a título de ilustración, al paladio sobre carbono, hidróxido de paladio sobre carbono, o por el estilo. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 50°C, llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 30°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 4 horas hasta aproximadamente 12 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta

reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como metanol, el etanol, las mezclas de etanol / acetato de etilo, y por el estilo. Después de haberse completado la reacción, el producto 14, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo.

El compuesto 14, se hace reaccionar, a continuación, con haluro de acríloilo 14, en donde, X^2 , es cloro, bromo ó yodo, para formar el compuesto 2. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente -20°C hasta aproximadamente 25°C , llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 5°C , durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 0,5 horas hasta aproximadamente 6 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como diclorometano y por el estilo, en presencia de una base apropiada, tal como la diisopropilamina, la trietilamina, y por el estilo. Generalmente, en esta reacción, se utilizan de aproximadamente 1 a aproximadamente 1,2 equivalentes molares del haluro de acríloilo, y de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 equivalentes molares, de la base. Después de haberse completado la reacción, el compuestos 2, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo.

Los compuestos de la fórmula 2, son conocidos, en el arte especializado de la técnica, o éstos pueden prepararse mediante materiales de partida y reactivos, los cuales se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, utilizando procedimientos que son conocidos. A título de ilustración, los compuestos de la fórmula 2, pueden prepararse de la forma que se muestra en el Esquema III:

Esquema IV



Tal y como se muestra en el esquema IV, los compuestos de la fórmula 5, pueden prepararse a partir de la fórmula 14, en donde, P^4 , es un grupo hidroxilo-protector, tal como bencilo, y X^3 , es un grupo saliente, tal como cloro, bromo ó yodo. Los compuestos de la fórmula 16, son conocidos, en el arte especializado de la técnica. Así, por ejemplo, en el documento de patente estadounidense US nº 6,268,533 B1, registrada en fecha 31 de Julio del 2001; y en el trabajo realizado por parte de R. Hett et al., en *Organic Process Research & Development* 1998, 2, 96-99; se describe la preparación de la N-[2-benciloxi-5-((R)-2-bromo-1-hidroxi-etil)fenil]formamida (a saber, el enantiómero (R) del compuesto 16, en donde, P^4 , es bencilo y, X^3 , es bromo), a partir de la 2-bromo-4'-benciloxi-3'-nitroacetofenona, cuya síntesis, se describe, por parte de K. Murase et al., en *Chem. Pharm. Bull.*, 25(6) 1368-1377 (1977). En caso deseado, la forma racémica del compuesto 16, puede prepararse, mediante la utilización de un agente reductor no quiral, tal como el complejo de borano y sulfuro de dimetilo, para reducir la 2-bromo-4'-benciloxi-3'-nitroacetofenona.

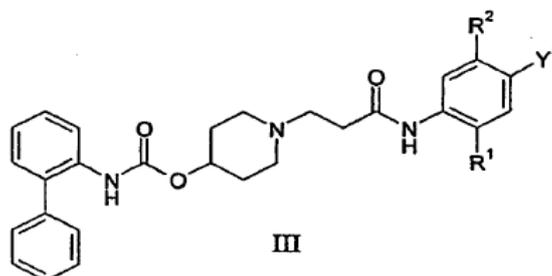
El grupo hidroxilo del compuesto 16, se protege mediante la utilización de procedimientos y reactivos convencionales, para proporcionar el compuesto 17, en donde, P^1 , es un grupo hidroxilo-protector. En una forma particular de presentación, el grupo hidroxilo-protector, es un grupo protector de sililo, tal como dimetilisopropilsililo, dietilisopropilsililo, dimetilhexilsililo, tert.-butildimetilsililo, tertbutildifenilsililo, difenilmetsililo y por el estilo. Así, por ejemplo, el compuesto 16, puede hacerse reaccionar con aproximadamente 0,95 equivalentes molares a aproximadamente 1,2 equivalentes molares de cloruro de tert.-butildimetilsililo, en presencia de aproximadamente 1,1 equivalentes molares a aproximadamente 1,3 equivalentes molares de imidazol, para proporcionar el compuesto 17, en donde, P^1 , es tert.-butildimetilsililo. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 50°C , llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 24 horas hasta aproximadamente 48 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente

apropiado, tal como la N,N-dimetilformamida, y por el estilo. Después de haberse completado la reacción, el producto 17, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo. A título de ilustración adicional, la síntesis de la N-{2-benciloxi-5-[(R)-2-bromo-1-(tert.-butildimetilsilanilo)etil]fenil}formamida, se describe en el Ejemplo 2, del documento de publicación de patente estadounidense US nº 2004/0248985 A1, publicada en fecha 9 de Diciembre del 2004.

Se procede, a continuación, a hacer reaccionar el compuesto 17, con una bencilamina (como por ejemplo, Bu¹-NH₂), para proporcionar el compuesto 18, en donde, Bn¹, es un grupo bencilo insustituido, o un grupo bencilo sustituido, que tiene de 1 a 3 sustituyentes en el anillo de fenilo del grupo bencilo, seleccionado, de una forma independiente, de entre alquilo C₁₋₄ ó alcoxi C₁₋₄. Los ejemplos representativos de las bencilaminas, incluyen a las bencilamina, 3,4-dimetoxibencilamina, 4-metoxibencilamina, 4-metilbencilamina, y por el estilo. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, procediendo a poner en contacto el compuesto 17, con aproximadamente 2 a aproximadamente 4 equivalentes molares de bencilamina, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 40°C hasta aproximadamente 100°C, llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van desde 80°C hasta 90°C, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 5 horas hasta aproximadamente 24 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como la N-metil-2-pirrolidona (NMP), y por el estilo. Después de haberse completado la reacción, el producto 18, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo.

La eliminación del grupo bencilo, Bn¹, y P⁴, utilizando procedimientos y reactivos convencionales, proporciona, a continuación, el compuesto 5. En una forma de presentación, ambos, Bn¹ y Bn², son grupo bencilo, los cuales se eliminan en la misma mezcla de reacción. De una forma típica, esta reacción, se lleva a cabo mediante la utilización de hidrógeno, y de un catalizador, tal como un catalizador de paladio. Los ejemplos representativos de catalizadores, incluyen, a título de ilustración, al paladio sobre carbono, hidróxido de paladio sobre carbono, o por el estilo. Generalmente, esta reacción de desbencilación, se lleva a cabo en presencia de un ácido, como el ácido acético, el ácido fórmico, y por el estilo. Esta reacción, se lleva a cabo, de una forma típica, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 10°C hasta aproximadamente 50°C, llevándose ésta a cabo, de una forma típica, a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo que va desde aproximadamente 6 horas hasta aproximadamente 24 horas, o hasta que la reacción, se haya completado substancialmente. Generalmente, esta reacción, se lleva a cabo en un diluyente apropiado, tal como metanol, el etanol, y por el estilo. Después de haberse completado la reacción, el compuesto 5, se aísla, de una forma típica, mediante la utilización de procedimientos convencionales, tales como los consistentes en la extracción, la recristalización, la cromatografía, y por el estilo. En una forma particular de presentación, el compuesto 5, se aísla como la sal del ácido acético.

Aquellas personas usualmente expertas en el arte especializado de la técnica, reconocerán el hecho de que, los compuestos de la fórmula I, pueden también prepararse mediante otros procedimientos sintéticos. Así, por ejemplo, el orden particular, mediante el cual se llevan a cabo los pasos o etapas de la síntesis, pueden ser intercambiados, o bien pueden emplearse diferentes intermediarios. A título de ilustración, los compuestos de la fórmula III:



en donde, Y¹, es -CN, -C(O)OH ó -C(O)OR^{3c}, pueden reducirse, mediante la utilización de procedimientos y reactivos convencionales, para proporcionar el aldehído 4 (es decir, en donde, Y¹, es -CHO). Adicionalmente, además, tales tipos de compuestos, pueden reducirse al alcohol, a saber, en donde, Y¹, es -CH₂OH, y el alcohol, puede oxidarse, utilizando procedimientos y reactivos estándar, para proporcionar el aldehído 4 (a saber, en donde, Y¹, es -CHO).

En caso deseado, pueden prepararse sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la fórmula I, procediendo a poner en contacto la forma de base libre de un compuesto de la fórmula I, con una ácido farmacéuticamente aceptable.

Detalles adicionales referentes a las condiciones específicas de reacción y otros procedimientos para la preparación de compuestos representativos de la presente invención, o intermediarios de éstos, se describen en los ejemplos que se proporcionan más abajo, a continuación.

Composiciones, Combinaciones y Formulaciones farmacéuticas

Los compuestos de la invención, de una forma típica, se administran, a un paciente, en forma de una composición o formulación farmacéutica. Tales tipos de composiciones farmacéuticas, pueden administrarse, al paciente, mediante cualquier ruta o vía aceptable de administración, incluyendo, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstas, a las formas de administración inhalatoria, oral, nasal, tópica (incluyendo la vía transdérmica) y parenteral. Se entenderá el hecho de que, en las composiciones farmacéuticas que se discuten aquí, en este documento, puede utilizarse cualquier forma de un compuesto de la presente invención (a saber, una base libre, una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato, etc.) que sea apropiada para una forma particular de administración.

Correspondientemente en concordancia, en uno de los aspectos de sus composiciones, la invención, se dirige a una composición farmacéutica, la cual comprende un portador (soporte) o excipiente farmacéuticamente aceptable, y una cantidad terapéuticamente efectiva, de un compuesto de la fórmula I. De una forma opcional, tales composiciones, pueden contener otros agentes terapéuticos y / o agentes de formulación, en caso deseado.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención, contienen, de una forma típica, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula I. Aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, reconocerán, no obstante, el hecho de que, una composición farmacéutica, puede contener más de una cantidad terapéuticamente efectiva, es decir, composiciones a granel, o menos una cantidad terapéuticamente efectiva, es decir, dosis unitarias individuales, designadas para la administración múltiple para lograr una cantidad terapéuticamente efectiva.

De una forma típica, las composiciones farmacéuticas, contendrán una cantidad correspondiente a un rango comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente un 0,01 hasta aproximadamente un 95%, en peso, del agente activo; de una forma preferible, una cantidad correspondiente a un rango comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente un 0,01% hasta aproximadamente un 30%, en peso, del agente activo, tal como una cantidad correspondiente a un rango comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente un 0,1 hasta aproximadamente un 10%, en peso, del agente activo.

Puede utilizarse cualquier portador (soporte), o excipiente, del tipo convencional, en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. La elección de un portador o soporte, o excipiente particular, o combinaciones de los portadores o soportes, o los excipientes, dependerá de la forma o modo de administración que se esté utilizando para tratar a un paciente particular, o tipo particular de condición médica, o estado de la enfermedad. En este sentido, la preparación de una composición apropiada, para una forma particular de administración, se encuentra efectivamente dentro del ámbito de los conocimientos de aquéllas personas expertas en los artes especializados de la técnica farmacéutica.

Los portadores (soportes) o excipientes utilizados en las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado. Así, por ejemplo, tales materiales, pueden comprarse en el mercado, de procedencia de la firma Sigma (St. Louis, MO). A título de ilustración adicional, las técnicas convencionales de formulación, se encuentran descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, - La ciencia y la práctica de la farmacia, 20ª Edición -, Lippincott Williams & White, Baltimore, Marily (2000); y en H. C. Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7th Edition, - Formas de dosificación farmacéuticas y sistemas de suministro de fármacos, 7ª Edición -, Lippincott Williams & White, Baltimore, Marily (1999).

Los ejemplos representativos de los materiales que pueden servir como portadores o soportes farmacéuticamente aceptables, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los siguientes: (1) los azúcares, tales como la lactosa, la glucosa y la sacarosa; (2) los almidones, tales como el almidón de maíz y el almidón de patata; (3) la celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, la etilcelulosa, y el acetato de celulosa; (4) la goma tragacanto en polvo; (5) la malta; (6) la gelatina; (7) el talco; (8) los excipientes, tales como la manteca de cacao, y las ceras para supositorios; (9) los aceites, tales como el aceite de cacahuate, el aceite de semilla de algodón, el aceite de cártamo, el aceite de sésamo, el aceite de oliva, el aceite de maíz, y el aceite de semilla de soja; (10) los glicoles, tales como el propilenglicol; (11) los polioles, tales como la glicerina, el sorbitol, el manitol, y el polietilenglicol; (12) los ésteres, tales como el oleato de etilo, y el laurato de etilo; (13) el agar; (14) los agentes tamponizantes, tales como el hidróxido magnésico y el hidróxido de aluminio; (15) el ácido algínico; (16) el agua exenta de pirógenos; (17) el suero salino isotónico; (18) la solución de Ringer; (18) el alcohol etílico; (20) soluciones tampón fosfato; (21) gases propelentes, tales como los clorofluorocarbonos y los hidrofluorocarbonos; y (22) otras sustancias no tóxicas, compatibles, empleadas en las composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se preparan, de una forma típica, procediendo a mezclar o batir a fondo e íntimamente, un compuesto de la invención, con un portador o soporte farmacéuticamente

aceptable y uno o más ingredientes opcionales. La mezcla resultante, uniformemente mezclada o batida, puede conformarse, a continuación, o bien cargarse en tabletas, cápsulas, píldoras, y por el estilo, utilizando procedimientos y equipos convencionales.

5 En una forma de presentación, las composiciones farmacéuticas de la presente invención, son apropiadas para la administración mediante inhalación. Las composiciones farmacéuticas apropiadas para a administración mediante inhalación, serán, típicamente, en forma de un aerosol, o en forma de una materia en polvo. Tales tipos de composiciones, se administran, de una forma general, mediante la utilización de dispositivos de suministro que se conocen bien, en el arte especializado de la técnica, tales como los consistentes en un inhalador de dosis medida (dosificada)(MDI- [del inglés metered-dose inhaler]-), un inhalador de materia seca en polvo (DPI- [del inglés, dry powder inhaler]-), o dispositivos de suministro similares.

15 En una forma específica de presentación de la presente invención, la composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico, se administra mediante inhalación, mediante la utilización de un inhalador nebulizador. Tales tipos de dispositivos nebulizadores, de una forma típica, producen una corriente de aire de alta velocidad, el cual provoca el que la composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico, se proyecte mediante pulverización (spray), como una neblina, la cual se transporta al interior del tracto respiratorio del paciente. Correspondientemente en concordancia, cuando se formula para su uso en un inhalador nebulizador, el agente terapéutico, de una forma típica, se disuelve en un portador o soporte apropiado, en forma de una solución. De una forma alternativa, el agente terapéutico, puede micronizarse y combinarse con un portador o soporte apropiado, para formar una suspensión de partículas micronizadas. Los dispositivos nebulizadores apropiados para la administración de agentes terapéuticos, mediante inhalación, se conocen bien, por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, o bien, estos dispositivos, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado. Así, por ejemplo, los dispositivos o productos nebulizadores representativos, incluyen al inhalador del tipo "Respiant Softmist Inhaler" (Boehringer Ingelheim); al sistema de suministro pulmonar del tipo "AERx Pulmonary Delivery System" (Aradigm Corp.); al nebulizador del tipo "PARI LC Plus Reusable Nebulizer (Pari GmbH)"; y por el estilo.

20 Una composición farmacéutica representativa para su uso en un inhalador nebulizador, comprende una solución acuosa, isotónica, que comprende una cantidad correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0,05 µg/ml, hasta aproximadamente 10 mg/ml de un compuesto de la fórmula I. En una forma de presentación, tal tipo de solución, tiene un valor pH correspondiente a un valor que va desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6.

35 En otra forma específica de presentación de la presente invención, la composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico, se administra mediante inhalación, mediante la utilización de un inhalador de materia seca en polvo, Tales tipos de inhaladores de materias secas en polvo, de una forma típica, administran el agente terapéutico, como una materia en polvo, que fluye libremente (materia en polvo suelta), la cual se dispensa, a la corriente de aire de un paciente, durante la inspiración. Con objeto de lograr una materia que fluya libremente, el agente terapéutico, de una forma típica, se formula con un excipiente apropiado, tal como la lactosa, el almidón, el manitol, la dextrosa, el ácido poliláctico (PLA), el poliláctido co-glicólido (PLGA), o combinaciones de entre éstos. De una forma típica, el agente terapéutico, se microniza y se combina con un portador o soporte apropiado, para formar una mezcla o batido apropiado para la inhalación. Correspondientemente en concordancia, en una forma de presentación de la invención, el compuesto de la fórmula I, se encuentra en forma micronizada.

45 Una composición farmacéutica representativa, para su uso en un inhalador de materia seca en polvo, comprende lactosa molida, seca, y partículas micronizadas de un compuesto de la fórmula I.

50 Tal tipo de formulación en polvo, seco, puede realizarse, por ejemplo, procediendo a combinar la lactosa con el agente terapéutico y, a continuación, procediendo a mezclar los componentes, en seco. De una forma alternativa, en caso deseado, el agente terapéutico, puede formularse sin un excipiente. La composición farmacéutica, se carga, a continuación, al interior del dispensador de materia en polvo, seca, o al interior de cartuchos o cápsulas de inhalación, para su uso con un dispositivo de suministro de materia en polvo, seca.

55 Los dispositivos de suministro inhaladores de materia en polvo, seca, apropiados para la administración de agentes terapéuticos por inhalación, se conocen bien, por parte de aquellas personas expertas en el arte especializado de la técnica, o bien, dichos dispositivos, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado. Así, por ejemplo, los dispositivos o productos de suministro inhaladores de materia en polvo, seca, incluyen a los siguientes: 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); y por el estilo.

65 En todavía otra forma específica de presentación de la presente invención, la composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico, se administra mediante inhalación, utilizando un inhalador de dosis dosificada. Tales tipos de inhaladores de dosis dosificadas, descargan, típicamente, una cantidad medida del agente

terapéutico, mediante la utilización de un gas propelente. Correspondientemente en concordancia, las composiciones farmacéuticas administradas mediante la utilización de un inhalador de dosis dosificadas, comprenden, de una forma típica, una solución o suspensión del agente terapéutico, en un propelente licuado. Puede emplearse cualquier propelente licuado, incluyendo a los clorofluorocarbonos, tales como el CCl₃F, y los hidrofluoroalcanos (HFAs), tales como el 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134a) y el 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-n-propano, (HFA 227). Debido a las preocupaciones concernientes a los clorofluorocarbonos, en cuanto a lo referente a que éstos afectan a la capa de ozono, se preparan, generalmente, formulaciones que contienen HFA. Los compuestos opcionales adicionales de unos las formulaciones de HFA, incluyen a co-disolventes, tales como el etanol o el pentano, y los tensioactivos, tales como el triolato de sorbitán, el ácido oléico, la lecitina, y la glicerina.

Una composición farmacéutica representativa para su uso en un inhalador de dosis dosificada, comprende un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente un 0,01% hasta aproximadamente un 5%, en peso, de un compuesto de la fórmula I; un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente un 0% hasta aproximadamente un 20%, en peso, de etanol; y un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente un 0% hasta aproximadamente un 5%, en peso, de tensioactivo; siendo, el resto, un propelente de HFA.

Tales tipos de composiciones, se prepararan, típicamente, mediante la adición de un hidrofluoroalcano enfriado o presurizado, a un recipiente contenedor que contiene el agente terapéutico, etanol (en caso de que éste se encuentre presente), y el tensioactivo (en caso de que éste se encuentre presente). Para preparar una suspensión, el agente terapéutico, se microniza y, a continuación, éste se combina con el propelente. Se procede, a continuación, a cargar la formulación, en el interior de una lata o bote de aerosol, el cual forma una porción de dispositivo inhalador de dosis dosificadas.

Los dispositivos inhaladores de dosis dosificadas apropiados para la administración de agentes terapéuticos mediante inhalación, se conocen bien, por parte de aquéllas personas usualmente expertas en el arte especializado de la técnica, o bien, tales tipos de dispositivos, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado. Así, por ejemplo, los dispositivos o productos inhaladores de dosis dosificadas, incluye a los siguientes: Flovent (GlaxoSmithKline); Maxair Inhaler (3M); Proventil Inhaler (Schering); Serevent Inhalation Aerosol (GlaxoSmithKline); y por el estilo.

En otra forma de presentación, las composiciones farmacéuticas de la presente invención, son apropiadas para la administración oral. Las composiciones farmacéuticas apropiadas para la administración oral, pueden ser en forma de cápsulas, de tabletas, de píldoras, de pastillas, de comprimidos, de grageas, de materias en polvo, de gránulos (granulados); o en forma de una solución o suspensión, en un líquido acuoso o no acuoso; o en forma de una emulsión del tipo aceite en agua o del tipo agua en aceite; o en forma de un elixir o un jarabe; conteniendo, cada uno de ellas, una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención, como un ingrediente activo.

Cuando las composiciones farmacéuticas de la invención están previstas para la administración oral, en una forma de dosificación sólida (a saber, como cápsulas, tabletas, píldoras, y por el estilo), éstas, comprenderán, de una forma típica, el compuesto de la presente invención, como agente activo y uno o más portadores o soportes farmacéuticamente aceptables, tales como el citrato sódico o el fosfato dicálcico. Opcionalmente, o de una forma alternativa, tales tipos de formas de dosificación sólida, pueden también comprender: (1) cargas o extensores, tales como los almidones, la celulosa microcristalina, la lactosa, la sacarosa, la glucosa, el manitol, y / o el ácido silícico; (2) ligantes, tales como la carboximetilcelulosa, los alginatos, la gelatina, la polivinilpirrolidona, la sacarosa y / o la acacia; (3) humectantes, tales como el glicerina; (4) agentes desintegrantes, tales como el agar – agar, el carbonato cálcico, el almidón de patata o de tapioca, el ácido algínico, ciertos silicatos, y / o el carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la solución, tales como la parafina; (6) acelerantes de la absorción, tales como los compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes hidratantes, tales como el cetilalcohol y / o el monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como el caolín y / o la arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como el talco, el estearato cálcico, el estearato magnésico, los polietilenglicoles sólidos, el lauril-sulfato sódico, y / o mezclas de entre éstos; (10) agentes colorantes; y (11) agentes tamponizantes.

Agentes de liberación, agentes humectantes o hidratantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, saborizantes (condimentos), agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes, pueden también encontrarse presentes en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables, incluyen a: (1) los antioxidantes solubles en agua, tales como el ácido ascórbico, el clorhidrato de cisteína, el bisulfato sódico, el metabisulfito sódico, el sulfito sódico, y por el estilo; (2) los antioxidantes solubles en aceite, tales como el palmitato de ascorbilo, el hidroxianisol butilado (BHA), el hidroxitolueno butilado (BHT), la lecitina, el galato de propilo, el alfa-tocoferol, y por el estilo; y (3) los agentes quelantes de metales, tales como el ácido cítrico, el ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), el sorbitol, el ácido tartárico, el ácido fosfórico y por el estilo. Los agentes de recubrimiento, para tabletas, cápsulas, píldoras y por el estilo, incluyen a aquéllos que se utilizan para recubrimientos entéricos, tales como el ftalato-acetato de celulosa (CAP), el ftalato-acetato de polivinilo (PVAP), el ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, los copolímeros de ácido metacrílico – éster del ácido metacrílico, el acetato-

trimelitato de celulosa (CAT), la carboximetilcelulosa (CMEC), el acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), y por el estilo.

5 En caso deseado, las composiciones farmacéuticas de la presente invención, pueden también formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del agente activo, utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa, en proporciones variables, u otras matrices de polímeros, liposomas y / o microesferas.

10 Adicionalmente, además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención, pueden contener, de una forma opcional, agentes opacificantes, y éstos pueden formularse de tal forma que, éstos, liberen el ingrediente activo, únicamente, o de una forma preferente, en una determinada porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, en una forma retardada. Los ejemplos de composiciones integradas, las cuales pueden utilizarse, incluyen a las sustancias poliméricas y a las ceras. El agente activo, puede también ser en una forma micro-encapsulada, en caso apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente descritos, arriba.

15 Las formas de dosificación líquidas apropiadas, para la administración oral, incluyen, a título de ilustración, a las emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires, farmacéuticamente aceptables. Tales tipos de formas de dosificación líquidas, comprenden el ingrediente activo, y un diluyente inerte, tal como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes, y emulsionantes, tal como el alcohol etílico, el alcohol isopropílico, el carbonato de etilo, el acetato de etilo, el alcohol bencílico, el benzoato de etilo, el propilenglicol, el 20 1,3-butilenglicol, los aceites (como por ejemplo, el aceite de semilla de algodón, el aceite de cacahuete, el aceite de maíz, el aceite de germen (de trigo), el aceite de oliva, el aceite de ricino y el aceite de sésamo), el la glicerina, el tetrahidrofuril-alcohol, los polietilenglicoles, y los ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y las mezclas de entre éstos. Las suspensiones, pueden contener agentes de suspensión, tales como, por ejemplo, los isoestearil-alcoholes etoxilados, el polioxietilensorbitol y los ésteres de sorbitán, la celulosa microcristalina, el metahidróxido de aluminio, la bentonita, el agar – agar y la goma de tragacanto, y mezclas de entre éstos.

25 Cuando las composiciones farmacéuticas de la presente invención, están previstas para la administración oral, éstas pueden entonces envasarse en una forma de dosificación unitaria. El término “forma de dosificación unitaria”, se refiere a una unidad físicamente discreta, apropiada para dosificar, a un paciente, a saber, comprendiendo, cada 30 unidad, una cantidad predeterminada de agente activo, calculado para producir el efecto terapéutico deseado, bien ya sea sola, o en combinación con uno o más unidades adicionales. Así, por ejemplo, tales tipos de formas de dosificación unitaria, pueden ser cápsulas, tabletas, píldoras, y por el estilo, o envases unitarios apropiados para la administración parenteral.

35 Los compuestos de la invención, pueden también administrarse transdermalmente, utilizando sistemas de suministro y excipientes, los cuales son conocidos. Así, por ejemplo, el compuesto, puede mezclarse con mejorantes de permeación, tales como los consistentes en propilenglicol, monolaurato de polietilenglicol, azacicloalcan-2-onas, y por el estilo, e incorporarse en un parche, o un sistema similar de suministro. Pueden utilizarse excipientes 40 adicionales, tales como los consistentes en agentes gelificantes, emulsionantes y tampones, en tales tipos de composiciones transdérmicas, en caso deseado.

45 Los compuestos de la presente invención, pueden también administrarse parenteralmente (como por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, o intraperitoneal). Para la administración parenteral, un compuesto de la fórmula I, de una forma típica, se disuelve en un vehículo apropiado para la administración parenteral, tal como una solución acuosa estéril, una solución salina, un aceite vegetal y por el estilo. A título de ilustración, una composición intravenosa, comprende, de una forma típica, una solución acuosa, estéril, de un compuesto de la fórmula I, en donde, la solución, tiene un pH correspondiente a un valor que va desde 50 aproximadamente 4 hasta aproximadamente 7.

55 En caso deseado, los compuestos de la presente invención, pueden administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, distintos. En esta forma de presentación, un compuesto de la presente invención, o bien se mezcla físicamente con el otro agente terapéutico, para formar una composición que contiene ambos agentes; o cada agente se encuentra presente en composiciones separadas y distintas, las cuales se administran, al paciente, simultáneamente o secuencialmente.

60 Así, por ejemplo, un compuesto de la fórmula I, puede combinarse con un segundo agente terapéutico, utilizando procedimientos y equipos convencionales, para formar una composición que comprende un compuesto de la fórmula I y un segundo agente terapéutico. Adicionalmente, además, los agentes terapéuticos, pueden combinarse con un portador o soporte, farmacéuticamente aceptable, para formar una composición farmacéuticamente aceptable, que comprende un compuesto de la fórmula I, un segundo agente terapéutico, y un portador o soporte farmacéuticamente aceptable. En esta forma de presentación, los componentes de la composición, de una forma 65 típica, se mezclan o se batan, para crear una mezcla física. La mezcla física, se administra, a continuación, en una cantidad terapéuticamente efectiva, utilizando cualesquiera rutas o vías de administración que se han descrito aquí, en este documento.

De una forma alternativa, los agentes terapéuticos, pueden permanecer separados y distintos, antes de la administración al paciente. En esta forma de presentación, los agentes, no se mezclan físicamente, conjuntamente, antes de la administración, sino que, éstos, se administran simultáneamente, o en tiempos separados, como composiciones separadas. Así, por ejemplo, un compuesto de la fórmula I, puede administrarse simultáneamente o puede administrarse secuencialmente, con otro agente terapéutico, mediante la utilización de un dispositivo de inhalación, el cual emplea compartimientos separados (como por ejemplo, envases ampollas (tiras de ampollas envasadoras), para cada agente terapéutico. De una forma alternativa, la combinación, puede administrarse mediante la utilización de dispositivos de suministro separados, es decir, mediante un dispositivo de suministro, para cada agente terapéutico. De una forma alternativa, los agentes terapéuticos, pueden administrarse mediante la misma ruta de administración, o mediante diferentes rutas de administración, por ejemplo, uno de ellos mediante inhalación y, el otro, mediante administración oral.

Puede utilizarse cualquier agente terapéutico compatible con los compuestos de la presente invención, en combinación con tales tipos de compuestos. En una forma particular de presentación, el segundo agente terapéutico, es un agente que se administra, de una forma efectiva, mediante inhalación. A título de ilustración, los tipos de agentes terapéuticos representativos que pueden utilizarse con los compuestos de la presente invención, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los agentes antiinflamatorios, tales como los agentes antiinflamatorios esteroideos (incluyendo a los corticosteroides y a los glucocorticoides), agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs – [del inglés, esferoidal anti-inflammatory agents]-), y los inhibidores de la PDE₄; los broncodilatadores, tales como los inhibidores de la PDE₃, los moduladores de la adenosina 2b y los agonistas del receptor β_2 adrenérgico; los agentes anti-infectivos, tales como los antibióticos Gram-positivos, los antibióticos Gram-negativos, y los agentes anti-víricos; las antihistaminas; los inhibidores de proteasa, los bloqueantes aferentes, tales como los agonistas D₂ y los moduladores de neuroquinina; y los antagonistas del receptor muscarínico (agentes anticolinérgicos). En el arte especializado de la técnica, se conocen numerosos ejemplos de tales tipos de agentes terapéuticos. Las dosis apropiadas de los otros agentes terapéuticos administrados en combinación con un compuesto de la presente invención, de una forma típica, son las correspondientes a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0,05 $\mu\text{g}/\text{día}$ hasta aproximadamente 500 mg/día.

En una forma particular de presentación de la presente invención, se administra un compuesto de la fórmula I, en combinación con un agente antiinflamatorio esteroideo. Los agentes representativos de agentes antiinflamatorios esteroideos que pueden utilizarse en combinación con el compuesto de la presente invención, incluyen, pero no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a los siguientes: dipropionato de beclometasona; budesonida; propionato de butixocort; 20R-16 α ,17 α -[butilidenebis(oxi)]-6 α ,9 α -difluoro-11 β -hidroxi-17 β -(metiltio)androsta-4-en-3-ona (RPR-106541); ciclesonida; dexametasona; S-fluorometil-éster del ácido 6 α ,9 α -difluoro-17 α -[(2-furanilcarbonil)oxi]-11 β -hidroxi-16 α -metil-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17 β -carbotióico; S-fluorometil-éster del ácido 6 α ,9 α -difluoro-11 β -hidroxi-16 α -metil-17 α -[(4-metil-1-1,3-tiazol-5-carbonil)oxi]-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17 β -carbotióico; (S)-(2-oxotetrahidrofuran-3S-il)éster del ácido 6 α ,9 α -difluoro-11 β -hidroxi-16 α -metil-3-oxo-17 α -propioniloxiandrosta-1,4-dieno-17 β -carbotióico; flunisolida; propionato de fluticasona; metilprednisolona; fuorato de mometasona; prednisolona; prednisona; rofleponida; ST-126; triamcinolonacetona; y por el estilo, o sales de éstos, farmacéuticamente aceptables. Tales tipos de agentes antiinflamatorios, se encuentran comercialmente disponibles en el mercado, o éstos pueden prepararse mediante la utilización de procedimientos y reactivos convencionales. Así, por ejemplo, la preparación y el uso de agentes antiinflamatorios esteroideos, se encuentra descrita en los documentos de patente estadounidenses US No. 6,750,210 B2, registrada en fecha 5 de Junio del 2004; US No. 6,759,398 B2, registrada en fecha 6 de Julio del 2004; U.S. No. 6,537,983, registrada en fecha 25 de Marzo del 2003; en el documento de solicitud de patente europea No. US 2002/0019378 A1, publicada en fecha 14 de Febrero del 2002; y en las referencias que se citan en dichos documentos.

Cuando se emplea, el agente anti-inflamatorio esteroideo, éste se administra en una cantidad que produce un efecto terapéuticamente beneficioso, cuando se administra con un compuesto de la presente invención. De una forma típica, el agente antiinflamatorio antiesteroideo, se administra en una cantidad suficiente como para proporcionar una cantidad correspondiente a un valor que va desde aproximadamente 0,05 μg hasta aproximadamente 500 μg por dosis.

Los ejemplos que se facilitan a continuación, ilustran composiciones farmacéuticas representativas de la presente invención:
Ejemplo A

Composición en forma de materia en polvo, seca

Se procede a mezclar un compuesto micronizado de la presente invención (100 mg), con lactosa molida (25 g)(por ejemplo, lactosa, en la cual, un porcentaje de partículas, no mayor de un 85%, tiene un MMD correspondiente a un tamaño comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 60 μm hasta aproximadamente 90 μm , y un porcentaje de partículas no menor de un 15%, tiene un MMD correspondiente a un valor de menos de 15 μm). Esta mezcla batida (mezclada), se carga, a continuación, en ampollas envasadoras individuales, de una tira de

empollas envasadoras, pelable, en una cantidad suficiente como para proporcionar una cantidad de producto de la invención, por dosis, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 500 µg. Los contenidos de las ampollas envasadoras, se administran mediante la utilización de un inhalador de materias en polvo, secas.

5

Ejemplo B

Composición en forma de materia en polvo, seca

10 Se procede a mezclar un compuesto micronizado de la presente invención (1 g), con lactosa molida (200 g), para formar una composición a granel, la cual tiene un factor de relación de compuesto, con respecto a la lactosa molida, correspondiente a un valor de 1 : 200. La composición mezclada, se envase en un dispositivo inhalador de materias en polvo, capaz de suministrar una cantidad del compuesto de la invención, por dosis, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 500 µg.

15

Ejemplo C

Composición en forma de materia en polvo, seca

20 Se procede a mezclar un compuesto micronizado de la presente invención (100 mg), y un agente antiinflamatorio esteroideo micronizado (500 mg), con lactosa molida (30 g). (Esta mezcla batida (mezclada), se carga, a continuación, en ampollas envasadoras individuales, de una tira de empollas envasadoras, pelable, en una cantidad suficiente como para proporcionar una cantidad de producto de la invención, por dosis, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 500 µg. Los contenidos de las ampollas envasadoras, se administran mediante la utilización de un inhalador de materias en polvo, secas.

25

Ejemplo D

30 Composición para inhalador de dosis dosificadas

Se procede a dispersar un compuesto micronizado de la presente invención (10 g), en una solución preparada mediante la disolución de lecitina (0,2 g) en agua desmineralizada (200 ml). La suspensión resultante, se seca mediante proyección pulverizada (spray) y, a continuación, ésta se microniza, para formar una composición micronizada, la cual comprende partículas que tienen un diámetro medio correspondiente a un valor de aproximadamente 1,5 µm. La composición micronizada, se carga, a continuación, al interior de cartuchos de inhalador de dosis dosificadas, los cuales contienen 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado, en una cantidad suficiente como para proporcionar una cantidad de producto de la invención, por dosis, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 500 µg, cuando ésta se administra mediante el inhalador de dosis dosificadas o medidas.

35

40

Ejemplo E

45 Se procede a disolver un compuesto de la presente invención (25 mg) en una solución salina isotónica (12 ml), tamponada con citrato (pH 5). La mezcla, se agita, y ésta se sonifica (es decir, se trata con ultrasonidos), hasta que se haya disuelto el compuesto. Se procede a comprobar el valor pH de la solución y, en caso necesario, éste se ajusta a un valor de pH 5, mediante una lenta adición de hidróxido sódico acuoso, 1N. La solución, se administra mediante la utilización de un dispositivo nebulizador, el cual proporciona una cantidad de producto de la invención, por dosis, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 10 µg hasta aproximadamente 500 µg.

50

Ejemplo F

55 Cápsulas de gelatina dura

Se procede a mezclar, íntimamente, un compuesto de la invención (50 g), lactosa secada mediante proyección pulverizada (spray) (440 g) y estearato magnésico (10 g). La composición resultante, se carga, a continuación, en las cápsulas de gelatina dura (500 mg de composición por cápsula), las cuales se administran oralmente.

60

Ejemplo G

Suspensión oral

65 Se procede a mezclar, de una forma íntima, los siguientes ingredientes, para formar una suspensión, para la administración oral:

	Ingredientes	Cantidad
	Compuesto de la invención	1,0 g
5	Ácido fumárico	0,5 g
	Cloruro sódico	2,0 g
	Metilparabeno	0,15 g
	Propilparabeno	0,05 g
	Azúcar granulado	25,5 g
10	Sorbitol (solución al 70%)	12,85 g
	VEEGUM® K (silicato aluminico magnésico)	1,0 g
	Agente saborizante (condimento)	0,035 ml
	Colorantes	0,5 mg
15	Agua destilada	q.s. hasta 100 ml

Ejemplo H

Composición inyectable:

Se procede a mezclar un compuesto de la invención (0,2 g) con una solución tampón 0,4 M de acetato sódico (2,0 ml). El valor pH de la solución resultante, se ajusta a un valor pH 4, utilizando ácido clorhídrico acuoso 0,5 N, ó hidróxido sódico acuoso 0,5 N, en la cantidad que sea necesaria y, a continuación, la mezcla, se filtra, a través de un filtro estéril (0,22 micrómetros), para proporcionar una solución estéril, apropiada para la administración mediante inyección

Utilidad

Los compuestos de la presente invención, poseen ambas actividades, actividad agonista del receptor β_2 -adrenérgico y actividad antagonista del receptor muscarínico y, así, por lo tanto, se espera que, tales tipos de compuestos, sean de utilidad como agentes terapéuticos para tratar las condiciones médicas mediatizadas por recetores β_2 -adrenérgicos o receptores muscarínicos, es decir, condiciones médica que se mejoran mediante el tratamiento con un agonista del receptor β_2 -adrenérgico o un antagonista del receptor muscarínico. Tales tipos de condiciones médicas, se conocen bien, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, tal y como bien ejemplificado por parte de las enseñanzas de Eglén et al., en Muscarinic Receptor Subtypes: Pharmacology and Therapeutic Potential, - Subtipos de Receptores Muscarínicos: Farmacología y Potencial Terapéutico, - DN&P 10(8), 462-469 (1997); por parte de las enseñanzas de Emilien et al., en Current Therapeutic Uses and Potential of beta-Adrenoceptor Agonists and Antagonists, - Usos Potenciales y Terapéuticos de los Agonistas y Antagonistas de Beta-adrenoreceptores -, European J. Clinical Pharm., 53(6), 389-404 (1998); y en las referencias citadas en dichos trabajos. Tales tipos de condiciones médicas, incluyen, a título de ejemplo, a los trastornos o enfermedades pulmonares asociadas con la obstrucción reversible de vías respiratorias, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (como, por ejemplo, la bronquitis sibilante o ruidosa y el enfisema), el asma, la fibrosis pulmonar, y por el estilo. Otras condiciones, incluyen a la fatiga prematura, la depresión, el fallo cardíaco congestivo, las enfermedades de la piel (como por ejemplo, las enfermedades psoriáticas y proliferativas de la piel), las condiciones en donde se desea disminuir la acidez péptica (como por ejemplo, la ulceración péptica y gástrica), y la enfermedad de la pérdida muscular.

Correspondientemente en concordancia, en una forma de presentación, la presente invención, se refiere a un compuesto de la fórmula I, para su uso en procedimiento para tratar un trastorno pulmonar, comprendiendo, el procedimiento, la administración, a un paciente en necesidad de tratamiento, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula I. Cuando se usan para tratar un trastorno pulmonar, los compuestos de la presente invención, se administrarán, de una forma típica, mediante inhalación en múltiples dosis por día, en una dosis individual por día, o en una dosis individual por semana. De una forma general, la dosis para el tratamiento de un trastorno pulmonar, será la correspondiente a una tasa comprendida dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{día}$ hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{día}$.

En uno de sus aspectos, la presente invención, se refiere a un compuesto de la fórmula I, para su uso en un procedimiento para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, comprendiendo, el procedimiento, la administración, a un paciente, de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la fórmula I. De una forma general, la dosis para tratar la COPD ó el asma, será la correspondiente a una tasa comprendida dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 10 $\text{g}/\text{día}$ hasta aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{día}$. El término "COPD", se entiende, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de la técnica, como incluyendo una variedad de condiciones respiratorias, incluyendo a la bronquitis obstructiva crónica y al enfisema, tal y como se ejemplifica mediante las enseñanzas de Barnes, en Chronic Obstructive Pulmonary Disease, - Enfermedad pulmonar obstructiva crónica -, N. Engl. J. Med., 2000: 343:269-78, y en las referencias citadas en dicho trabajo.

5 Cuando se administran mediante inhalación, los compuestos de la presente invención, tienen, de una forma típica, el efecto de producir una broncodilatación. Correspondientemente en concordancia, en otro de sus aspectos, la presente invención, se refiere a un compuesto de la fórmula I, para uso en un procedimiento de broncodilatación en un mamífero, comprendiendo, el procedimiento, la administración, a un mamífero, de una cantidad del compuesto de la fórmula I, la cual produzca broncodilatación. De una forma general, la dosis para el tratamiento de un trastorno pulmonar, será la correspondiente a una tasa comprendida dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 10 µg/día hasta aproximadamente 500 µg/día.

10 Cuando se utiliza como un agente terapéutico, los compuestos de la presente invención, se administran, de una forma opcional, en combinación con otro u otros agentes terapéuticos. De una forma particular, mediante la administración de los compuestos de la presente invención con un agente anti-inflamatorio esteroideo, puede conseguirse una triple terapia, a saber, actividad agonista del receptor β_2 -adrenérgico, actividad antagonista del receptor muscarínico, y actividad antiinflamatoria, mediante la utilización de únicamente dos agentes terapéuticos. Puesto que, las composiciones (y combinaciones) farmacéuticas que contienen dos agentes terapéuticos son típicamente más fáciles de formular y / o administrar, en comparación con las composiciones que contienen tres agentes terapéuticos, tales tipos de composiciones de dos componentes, proporcionan una significativa ventaja, con respecto a las composiciones que contienen tres agentes terapéuticos. Correspondientemente en concordancia, en una forma particular de presentación, las composiciones y combinaciones farmacéuticas de la presente invención, comprenden, de una forma adicional, un agente antiinflamatorio esteroideo.

25 Puesto que, los compuestos de la presente invención, poseen ambas actividades, actividad agonista del receptor β_2 -adrenérgico y actividad antagonista del receptor muscarínico, tales tipos de compuestos, son también de utilidad como herramientas de investigación, para investigar sistemas biológicos de muestras que tengan receptores β_2 -adrenérgicos, o receptores muscarínicos. Adicionalmente, además, tales tipos de compuestos, son de utilidad para el rastreo de ensayos, para descubrir, por ejemplo, nuevos compuestos que tengan ambas, actividad agonista del receptor β_2 -adrenérgico y actividad antagonista del receptor muscarínico. Tales tipos de sistemas o muestras biológicas, pueden comprender receptores β_2 -adrenérgicos y o receptores muscarínicos. En dichos estudios, pueden emplearse cualesquiera sistemas biológicos o muestra biológica que tengan receptores β_2 -adrenérgicos y/o receptores muscarínicos, estudios éstos, los cuales pueden realizarse in vitro o in vivo. Los sistemas o muestras biológicas apropiadas para tales tipos de estudios, incluyen, aunque no de una forma limitativa en cuanto a éstos, a células, extractos celulares, membranas de plasma, muestras de tejidos, mamíferos (tales como ratones, ratas, conejillos de indias, conejos, perros, cerdos, etc.). y por el estilo.

35 Cuando se utiliza como herramienta de investigación, un sistema o muestra biológica, que comprende un receptor β_2 -adrenérgico y/o un receptor muscarínico, de una forma típica, se pone en contacto con una cantidad agonista del receptor β_2 -adrenérgico o antagonista del receptor muscarínico de un compuesto de la presente invención. Los efectos en el sistema biológico o muestra biológica, provocados por el compuesto se determinan o se miden, entonces, mediante la utilización de procedimientos o equipos convencionales, tales como mediante la medición, en ensayos de unión de radioligandos, cambios mediatizados mediante ligandos, en un ensayo funcional o mediante la determinación de la cantidad de broncoprotección proporcionada por el compuesto en un ensayo de broncoprotección, en un mamífero. Los ejemplos representativos de los cambios mediatizados mediante ligandos, en un ensayo funcional, incluyen a los cambios mediatizados mediante ligandos, en monofosfato de adenosina cíclico intracelular (cAMP); los cambios mediatizados mediante ligandos, en la actividad de la enzima adenilil ciclasa (la cual sintetiza a la cAMP); los cambios mediatizados mediante ligandos, en la incorporación del 5'-O)-(tio)fosfato de guanosina ($[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$), en membranas aisladas, vía intercambio catalizado del receptor del ($[^{35}\text{S}]\text{GTP S}$); cambios mediatizado mediante ligandos, en los iones de calcio intracelulares, libres (medidos, por ejemplo, vía un lector de placa de imágenes ligado a fluorescencia, o un dispositivo lector imágenes por fluorescencia del tipo FLIPR®, de la firma Molecular Devices, Inc.), y por el estilo. Se espera que, los compuestos de la presente invención, sean agonistas o provoquen la activación del receptor β_2 -adrenérgico y antagonistas o reductores de la activación de los receptores muscarínicos, en los ensayos funcionales dados aquí a conocer, en este documento, o en ensayos de una naturaleza similar. Los compuestos de la presente invención, se utilizarán, de una forma típica, en estos estudios, en una concentración correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0,1 nanomolar hasta aproximadamente 100 nanomolar.

55 Adicionalmente, además, los compuestos de la presente invención, pueden utilizarse como herramientas de investigación, para evaluar otros compuestos químicos. En un aspecto de la presente invención, un compuesto de la fórmula I, se utiliza, como patrón estándar, en un ensayo, para permitir la comparación de los resultados obtenidos con un compuesto de ensayo de la fórmula I. Así, por ejemplo, los datos de unión del receptor β_2 -adrenérgico y / o receptor muscarínico (según de determinan, por ejemplo, en ensayos de desplazamiento de radioligandos, in vitro), para un compuesto de ensayo o para un grupo de compuestos de ensayo, se compara con los datos de unión del receptor β_2 -adrenérgico y / o receptor muscarínico, para un compuesto de la fórmula I, con objeto de identificar aquéllos compuestos de ensayo, los cuales tienen un enlace o unión deseable, es decir, los compuestos de ensayo que tienen un enlace o unión correspondiente a un valor igual o superior de un compuesto de la fórmula I, si es que hay alguno. De una forma alternativa, por ejemplo, pueden determinarse los efectos broncoprotectores para los

compuestos de ensayo y un compuesto de la fórmula I, en un ensayo de broncoprotección, en un mamífero, y compararse estos datos, con objeto de identificar los compuestos de ensayo que proporcionan unos efectos broncoprotectores iguales o superiores. Este aspecto de la invención, incluye, como formas de presentación separadas, ambas (i) la generación de datos de comparación mediante la utilización de ensayos apropiados) y (ii) los análisis de datos de ensayo, para identificar los compuesto de ensayo de interés.

Las propiedades y utilidad de los compuestos de la presente invención, pueden demostrarse, mediante la utilización de varios ensayos "in vitro" e "in vivo", los cuales se conocen bien, por parte de aquéllas personas expertas en el arte especializado de técnica. Así, por ejemplo, se describen ensayos representativos, en mayor detalle, en los ejemplos que se facilitan a continuación.

EJEMPLOS

Las siguientes preparaciones y ejemplos, se proporcionan para ilustrar las formas específicas de presentación y los aspectos específicos de la presente invención. La ilustración de las formas específicas de presentación y de los aspectos específicos de la presente invención, no pretende, no obstante, limitar el aspecto de la presente invención, en modo alguno, a menos de que ello se indique de una forma específica.

Todos los reactivos, materiales de partida y disolventes utilizados en los ejemplos que se facilitan a continuación, se compraron de procedencia de proveedores comerciales (tales como las firmas Aldrich, Fluka, Sigma y por el estilo), y éstos se utilizaron sin ninguna purificación adicional, a menos de que se indique de otro modo.

En los siguientes ejemplos, los análisis de HPLC, se llevaron a cabo, de una forma típica, mediante la utilización de un instrumento de la firma Agilent (Palo Alto, CA), de la serie 100, con columnas del tipo Zorbax Bonus RP 1,2 x 50 mm, suministradas por la firma Agilent (una columna C14), que tenía un tamaño de partícula de 2,5 micrómetros. La detección, se realizó mediante absorbancia de UV, a 214 nm. La fase móvil "A", era de un 2% de acetonitrilo, un 97,9% de agua, y un 0,1% de ácido trifluoroacético (volumen / volumen / volumen); y la fase móvil "B" era de un 98,9% de acetonitrilo, un 10% de agua, y un 0,1% de ácido trifluoroacético (volumen / volumen / volumen); Los datos de HPLC (10-70), se obtuvieron con un caudal de 0,5 ml/minuto de un gradiente del 10% al 70% de la fase móvil B, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos; los datos de HPLC (5-35), se obtuvieron con un caudal de 0,5 ml/minuto de un gradiente del 5% al 35% de la fase móvil B, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos; y los datos de HPLC (10-90), se obtuvieron con un caudal de 0,5 ml/minuto de un gradiente del 10% al 90% de la fase móvil B, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos.

Los datos de la espectrometría de masas de la cromatografía líquida (LCMS), se obtuvieron, de una forma típica, con un instrumento de la firma Applied Biosystems (Foster City, CA), modelo API-150EX. Los datos de LCMS-10-90, se obtuvieron con gradiente del 10% al 90% de la fase móvil B, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos.

Las purificaciones a pequeña escala, se llevaron a cabo, de una forma típica, mediante la utilización de un sistema de estación de trabajo del tipo "API 150EX Prep Workstation system" de la firma Applied Biosystems. La fase móvil "A", era agua, que contenía un porcentaje del 0,05% de ácido trifluoroacético (volumen / volumen / volumen); y la fase móvil "B", era acetonitrilo, el cual contenía un porcentaje del 0,05% de ácido trifluoroacético (volumen / volumen / volumen). Para las partícula pequeñas (tamaño de la muestra recuperada de un peso d aproximadamente 30 a 50 mg), se utilizaron, de una forma típica, las siguientes condiciones: 20 ml/minuto de caudal; gradientes de 15 minutos, y una columna de 20 mm x 50 mm del tipo Prisma RP, con partículas de un tamaño de 3 micrómetros (de la firma Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA). Para las muestras más grandes (a saber, mayores de un tamaño de muestra cruda de aproximadamente 100 mg), se utilizaron, de una forma típica, las siguientes condiciones. 60 ml/minuto de caudal; gradientes de 30 minutos, y columna Microsorb de 41,4 mm x 250 mm, con partículas de 10 micrómetros (de la firma Varian, Palo Alto, CA).

Ejemplo 1

Piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Se procedió a calentar, conjuntamente, isocianatos de 2 bifeníl (97,5 g, 521 mmol) y 4-hidroxi-1-bencilpiperidina (105 g, 549 mmol) (ambos, comercialmente disponibles, en el mercado, de procedencia de la firma Aldrich, Milwaukee, WI), a una temperatura de 70 °C, durante un transcurso de tiempo de 12 horas, durante cuyo transcurso de tiempo, se controló la formación del 1-bencilpiperidin-4-il-éster de l ácido bifeníl-2-ilcarbámico, mediante LCMS. La mezcla de reacción, se enfrió, a continuación, a una temperatura de 50°C, y añadió etanol (1 l), y a continuación, ácido clorhídrico 6M (191 ml), de una forma lenta. Se procedió, a continuación, a enfriar la mezcla de reacción, a la temperatura ambiente, y se añadió formiato amónico (98,5 g, 1,56 mol), y se hizo burbujear gas nitrógeno, a través de la solución, de una forma vigorosa, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos. Se procedió, a continuación, a añadir Paladio (10%, en peso (referido a base seca) sobre carbono (20 g). La mezcla de reacción se calentó, a una temperatura de 40°C, durante un transcurso de tiempo de 12 horas y, a continuación, ésta se filtró, a través de un tampón de Celite. Se procedió, a continuación, a eliminar el disolvente, bajo la acción de presión reducida, y se

añadió ácido clorhídrico 1M(40 ml), al residuo crudo. Se procedió, a continuación, a añadir hidróxido sódico, con objeto de ajustar el pH a un valor de 12. La capa acuosa, se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 ml) y ésta se seco (sulfato magnésico) y, a continuación, el disolvente, se eliminó, bajo la acción de presión reducida, para proporcionar el piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (155 g, 100%). HPLC (10-70) Rt = 2,52; MS m/z: [M + H⁺] calculado para C₁₈H₂₀N₂O₂ 297,15; encontrado 297,3.

Ejemplo 2

Ácido 3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propiónico

A una solución de piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (50 g, 67,6 mmol) en diclorometano (500 ml) se le añadió ácido acrílico (15,05 ml, 100 mmol). La mezcla resultante, se calentó, a una temperatura de 50 °C bajo la acción del reflujo, durante un transcurso de tiempo de 18 horas, y a continuación, se eliminó el disolvente. Después, se añadió metanol (600 ml) y, esta mezcla, se calentó, a una temperatura de 75 °C, durante un transcurso de tiempo de 2 horas y a continuación, ésta se enfrió, a la temperatura ambiente, para formar una suspensión espesa. El sólido, se recolectó mediante filtrado, se lavó con metanol (50 ml) y se secó al aire, para proporcionar el ácido 3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propiónico (61 g, 96% pureza) como una materia en polvo de color blanco.

Ejemplo 3

Sal del ácido acético de la N-{5-[(R)-2-amino-1-(tert.-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}-formamida

Etapa A

N-{5-[(R)-2-Bencilamino-1-(tert.-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benciloxifenil}formamida

Se procedió a añadir, a un matraz de tres bocas, de fondo redondeado, de 500 ml de capacidad útil, N-{2-benciloxi-5-[(R)-2-bromo-1-(tert.-butildimetilsilaniloxi)etil]fenil}formamida (100 g, 215 mmol) y N-metil-2-pirrolidona (300 ml). A continuación, se añadió bencilamina (69,4 ml, 648 mol) y, la mezcla de reacción, se roció con nitrógeno. A continuación, la mezcla de reacción, se calentó, a una temperatura de 90 °C, y se agitó durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 8 horas. La mezcla de reacción, se enfrió, a continuación, a la temperatura ambiente, y se procedió a añadir agua (1,5 l) y acetato de etilo (1,5 l). Las capas, se separaron y la capa orgánica, se lavó con agua (500 ml), una mezcla 1:1 de agua y salmuera saturada (500 ml total), y a continuación, otra vez con agua (500 ml). La capa orgánica se secó, a continuación, sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró, y se concentró, bajo la acción de presión reducida, para proporcionar la N-{5-[(R)-2-bencilamino-1-(tert.-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benciloxifenil}formamida cruda (100 g, 90% de rendimiento productivo, 75-80% de pureza), como un aceite espeso, de tonalidad naranja – marrón.

Etapa B

Sal del ácido acético de la N-{5-[(R)-2-amino-1-(tert.-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}-formamida

Se procedió a disolver N-{5-[(R)-2-bencilamino-1-(tert.-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benciloxifenil}formamida (100 g, 194 mmol), en metanol (1 l) y ácido acético (25 ml, 291 mmol). La mezcla resultante, se purgó con nitrógeno puro y a continuación, se añadió hidróxido de paladio sobre carbono (20 g, 20% en peso, aproximadamente 50% de agua). Se procedió a hacer burbujear hidrógeno, a través de la mezcla de reacción, mediante agitación, a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 10 horas. Se procedió, a continuación, a purgar la mezcla con nitrógeno puro y, la mezcla, se filtró a través de Celite. El filtrado, se concentró en un evaporador rotativo, y a continuación, se procedió a añadir acetato de etilo (600 ml) al residuo. Esta mezcla, se agitó, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 2 horas, después de cuyo transcurso de tiempo, se había desarrollado una suspensión espesa, de color amarillo. La suspensión, se filtró, y el precipitado, se secó al aire, para proporcionar la sal del ácido acético de la N-{5-[(R)-2-amino-1-(tert.-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida (48 g, 98% de pureza) como un sólido de color amarillo-blanco. LCMS (10-70) R_t = 3,62; [M + H⁺] encontrado 311,3.

Ejemplo 4

1-[2-(4-[(R)-2-(3-Formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Etapa A

2,5-Dimetil-4-nitrobenzoato de metilo

A una solución en régimen de agitación de ácido 2,5-dimetil-4-nitrobenzóico (480 mg, 2,4 mmol) en metanol seco (8,2 ml), a una temperatura de 0°C, y bajo nitrógeno puro, se le añadió cloruro de tionilo (0,538 ml, 7,38 mmol). La

mezcla resultante, se dejó calentar a la temperatura ambiente, y ésta agitó, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 7 horas. Se le añadió cloruro de tionilo adicional (0,300 ml), y se continuó con el régimen de agitación, a la temperatura ambiente, durante el transcurso de toda la noche. Se procedió a eliminar el disolvente, bajo la acción de presión reducida, y el residuo, se disolvió, en acetato de etilo. Esta solución, se lavó con bicarbonato sódico, acuoso, saturado, se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró bajo la acción de presión reducida, para proporcionar el 2,5-dimetil-4-nitrobenzoato de metilo (578 mg) como un sólido de color amarillo pálido. HPLC (10-70) $R_t = 4,61$; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2,57 (3 H, s), 2,61 (3 H, s), 3,94 (3 H, s), 7,82 (1 H, s), 7,87 (1 H, s).

10 Etapa B

4-Amino-2,5-dimetilbenzoato de metilo

15 A una solución en régimen de agitación de 2,5-dimetil-4-nitrobenzoato de metilo (523 mg, 2,5 mmol) en una mezcla 9:1 de metanol y agua (25 ml total), a una temperatura de 0°C , se le añadió cloruro amónico (401 mg, 7,5 mmol). Se procedió a añadir zinc (1,63 g, 25 mmol), mediante procedimiento de goteo y, la mezcla resultante, se agitó, a la temperatura ambiente, durante el transcurso de toda la noche. La mezcla de reacción, se filtró, a continuación, a través de Celite y el tampón de Celite, se lavó con metanol. Se procedió a concentrar el filtrado, bajo la acción de presión reducida, y el residuo resultante, se disolvió, en acetato de etilo. Esta solución, se lavó con bicarbonato sódico, acuoso, saturado, se secó sobre sulfato sódico anhidro, y se concentró bajo la acción de presión reducida, para proporcionar el 4-amino-2,5-dimetilbenzoato de metilo (450 mg) como un aceite de color amarillo. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 2,14 (3 H, s), 2,53 (3 H, s), 3,83 (3 H, s), 3,85 (2 H, br s), 6,48 (1 H, s), 7,72 (1 H, s).

25 Etapa C

25 4-{3-[4-(Bifenil-2-ilcarbamoilo)oxi]piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metilo

A una solución en régimen de agitación de ácido 3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoilo)oxi]piperidin-1-il]propiónico (670 mg, 1,82 mmol) y

30 4-amino-2,5-dimetilbenzoato de metilo (390 mg, 2,18 mmol) en diclorometano (3,6 ml) y diisopropiletilamina (0,413 ml) se le añadió hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) (829 mg, 2,18 mmol). La mezcla resultante, se agitó, a la temperatura ambiente, durante el transcurso de toda la noche. Se procedió, a continuación, a lavar la mezcla, con bicarbonato sódico acuoso, saturado, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y se concentró, bajo la acción de presión reducida. El residuo se purificó, mediante cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con diclorometano, con un contenido del 3% al 5% de metanol, para proporcionar el 4-{3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoilo)oxi]piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metilo (568 mg, 59% de rendimiento productivo). LCMS (10-70) $R_t = 4,55$; $[\text{M} + \text{H}^+]$ encontrado 530,4.

40 Etapa D

40 1-[2-(4-Hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido 4-bifenil-2-ilcarbámico

A una solución en régimen de agitación de hidruro de litio y aluminio 1M en THF (1,52 ml, 1,52 mmol), a una temperatura de 0°C , se le añadió 4-{3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoilo)oxi]piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metilo (400 mg, 0,76 mmol). La mezcla resultante, se agitó, a una temperatura de 0°C , durante un transcurso de tiempo de 30 minutos y a continuación, se le añadió una mezcla 1:1 de hidróxido sódico acuoso 1M (5 ml) y agua (5 ml), y se continuó con el régimen de agitación, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. Se procedió, después, a añadir diclorometano y, la capa orgánica, se separó, se secó sobre sulfato sódico y, el disolvente, se eliminó, bajo la acción de presión reducida. El residuo, se purificó, mediante cromatografía sobre gel de sílice, eluyendo con diclorometano que contenía un porcentaje del 5% metanol, para proporcionar el 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico. LCMS (10-70) $R_t = 3,94$; $[\text{M} + \text{H}^+]$ encontrado 502,5.

55 Etapa E

55 1-[2-(4-Formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A una solución de 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico (151 mg, 0,3 mmol) en diclorometano (3 ml), a una temperatura de 0°C , se le añadió dimetilsulfóxido (128 μl , 1,8 mmol) y diisopropiletilamina (157 μl , 0,9 mmol). Después de un transcurso de tiempo de 15 minutos, se procedió a añadir un complejo de trióxido de azufre y piridina (143 mg, 0,9 mmol), y se continuó con el régimen de agitación, a una temperatura de 0°C , durante un transcurso de tiempo de 1 hora. Se procedió a añadir agua, con objeto de extinguir la reacción y, las capas, se separaron. La capa orgánica, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró y, el disolvente, se eliminó, bajo la acción de presión reducida, para proporcionar el 1-[2-(4-formil-2,5-

dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-carbámico (150 mg, 100% de rendimiento productivo), el cual se utilizó, sin ninguna purificación adicional. $[M + H^+]$ encontrado 500,4.

Etapa F

- 5 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(tert.-Butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Se procedió a agitar una solución de 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (150 mg, 0,30 mmol) y N-{5-[[*(R)*]-2-amino-1-(tert.-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida (112 mg, 0,36 mmol) en una mezcla 1:1 de diclorometano y metanol (3,0 ml total), a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Se procedió a añadir triacetoxiborohidrato sódico (191 mg, 0,9 mmol) y, la mezcla resultante, se agitó, a la temperatura ambiente, durante el transcurso de toda la noche. Después, se procedió a añadir ácido acético, con objeto de extinguir la reacción y, la mezcla, se concentró, bajo la acción de presión reducida, para proporcionar el 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(tert.-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico, el cual se utilizó, sin ninguna purificación adicional. LCMS (10-70) $R_t = 4,55$; $[M + H^+]$ encontrado 794,6.

Etapa G

- 20 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-Formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A una suspensión del 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(tert.-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (238 mg, 0,30 mmol) en diclorometano (3,0 ml), se le añadió tetrahidrofluoruro de trietilamina (147 μ g, 0,90 mmol). Esta mezcla, se agitó, a la temperatura ambiente, durante el transcurso de toda la noche y, a continuación, la mezcla, se concentró, bajo la acción de presión reducida. El residuo, se purificó, mediante prep-RP-HPLC (gradiente: de un 2% a un 50% de acetonitrilo en agua, con un porcentaje del 0,05% de TFA). Las fracciones apropiadas, se recolectaron, y éstas de combinaron y liofilizaron, para proporcionar el 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico, como la sal de ditrifluoroacetato (50 mg, 97% de pureza). LPLC (2-90) $R_t = 2,76$; $[M + H^+]$ encontrado 680,8.

Ejemplo 5

- 35 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-Formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Etapa A

- 40 Dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina

A un matraz de fondo redondeado, de 2 litros de capacidad útil, y equipado con un agitador de suspendido, un dispositivo de control de temperatura y un embudo de adición, se le añadió 4-yodo-2,5-dimetilanilina (100,0 g, 0,405 mol) (procedente de la firma Spectra Group Limited, Inc., Millbury, OH). Se añadieron etanol (1 l) y carbonato potásico sólido (160 g, 1,159 mol) y, a continuación, se añadió bromuro de bencilo puro (140 ml, 1,179 mol), en una porción. La mezcla resultante, se agitó, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 18 horas, después de cuyo transcurso de tiempo, la HPLC, mostraba un grado de conversión superior a un porcentaje del 98% de conversión. La mezcla, se enfrió, a continuación, a la temperatura ambiente, y se procedió a añadir hexanos (1 l). Se procedió a agitar esta mezcla, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos y, a continuación, ésta se filtró, a través de un filtro de papel, para eliminar los sólidos, y se lavó la torta de filtrado, con hexanos (200 ml), con objeto de retirar los sólidos. Mediante la utilización de un rotoevaporador, el volumen del filtrado, se redujo a un volumen de aproximadamente 500 ml y, a continuación, se procedió a añadir ácido clorhídrico concentrado (30 ml). El disolvente remanente, se eliminó, a continuación, mediante la utilización de un rotoevaporador. Al residuo resultante, se le añadieron hexanos (500 ml) y, esta mezcla, se agitó, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 30 minutos, después de cuyo transcurso de tiempo, se había formado una suspensión de flujo libre (suelta). Se procedió a filtrar la suspensión y, la torta de filtrado, se lavó con hexanos (200 ml) y ésta se secó, para proporcionar clorhidrato de dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina (115 g, 62% de rendimiento productivo, 97,5% de pureza) como un sólido coloreado de tonalidad verdosa.

- 60 El clorhidrato de dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina, se transfirió a un matraz de 3 l de capacidad útil, y se procedió a añadir tolueno (1 l) e hidróxido sódico acuoso 1 M (1 l). La mezcla resultante, se agitó, durante un transcurso de tiempo de 1 hora y, a continuación, las capas, se separaron. La capa orgánica, se lavó con salmuera diluida (500 ml), y se procedió a eliminar el disolvente, mediante rotoevaporación, para proporcionar la dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina (80 g) como un aceite espeso, semisólido. (De una forma alternativa, puede utilizarse

diclorometano, en lugar de tolueno, en esta etapa). ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2,05 (3 H, s), 2,19 (3 H, s), 3,90 (4 H, s), 6,91 (1 H, s), 7,05-7,20 (10 H, m), 7,42 (1 H, s); MS [$M + H^+$] encontrado 428.

Etapa B

5

Clorhidrato de 4-dibencilamino-2,5-dimetilbenzaldehído

A un matraz de tres bocas, de fondo redondeado, de 1 litro de capacidad útil y equipado con un agitador suspendido, un dispositivo de control de temperatura y un embudo de adición, se le añadió dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina (15 g, 35 mmol). Después, se procedió a añadir tolueno (300 ml) y, la mezcla resultante, se agitó, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 15 minutos. La el matraz de reacción, se purgó con nitrógeno puro y, éste se enfrió, a una temperatura de aproximadamente -20°C y se procedió a añadir n-butil-litio en hexanos, 1,6 M (33 ml, 53 mmol), mediante procedimiento de goteo, vía el embudo de adición. Durante el proceso de adición, la temperatura interna de la mezcla de reacción, se mantuvo a un nivel por debajo de -10°C . Cuando se hubo completado el proceso de adición, la mezcla resultante, se agitó, a una temperatura de aproximadamente -15°C , durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 15 minutos. A continuación, se procedió a añadir N,N-dimetilformamida (10 ml, 129 mmol), mediante procedimiento de goteo, al mismo tiempo que se mantenía la temperatura interna de reacción, a un nivel por debajo de 0°C . La mezcla resultante, se agitó, a continuación, a una temperatura correspondiente a un nivel comprendido dentro de unos márgenes que iban desde -20°C hasta 0°C , durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 1 hora. Se procedió, a continuación, a añadir ácido clorhídrico acuoso 1 M (200 ml), en un transcurso de tiempo de 5 minutos y, la mezcla resultante, se agitó, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos. A continuación, las capas, se separaron y, la capa orgánica, se lavó con salmuera diluida (100 ml). La capa orgánica, se secó, a continuación, sobre sulfato sódico anhidro, ésta se filtró y, el disolvente, se eliminó, bajo la acción de presión reducida, para proporcionar el clorhidrato de 4-dibencilamino-2,5-dimetilbenzaldehído (11,5 g, 90% de rendimiento productivo, 95% de pureza), como un aceite espeso, el cual solidificó, después de mantenerse en reposo. El producto, contenía un porcentaje de aproximadamente un 3% a aproximadamente un 5% de desoido, como producto secundario. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 2,42 (3 H, s), 2,50 (3 H, s), 4,25 (4 H, s), 6,82 (1 H, s), 7,10-7,30 (10 H, m), 7,62 (1 H, s), 10,15 (1 H, s); MS [$M + H^+$] encontrado 330,3.

Etapa C

4-[1,3]Dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilamina

A un matraz de fondo redondeado, de 500 ml de capacidad útil, se le añadió clorhidrato de 4-dibencilamino-2,5-dimetilbenzaldehído (11,5 g, 31,4 mmol) y tolueno (150 ml) y, la mezcla resultante, se agitó, hasta que la sal se hubo disuelto completamente. El matraz de reacción, se purgo, a continuación, con nitrógeno puro, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos. A continuación, se procedió a añadir etilenglicol (5,25 ml, 94,2 mmol) y ácido p-toluenosulfónico (760 mg, 6,2 mmol) y, la mezcla resultante, se calentó, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que iban desde los 60°C hasta los 80°C , durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 20 horas. A continuación, el disolvente, se eliminó lentamente (en un transcurso de tiempo de aproximadamente 40 minutos), a una temperatura de 40°C , en un evaporador rotativo. Al residuo, se añadió tolueno (100 ml) y, el disolvente, se eliminó otra vez, de una forma lenta, a una temperatura de 40°C , en un evaporador rotativo. Este procedimiento, se repitió, mediante la utilización de otro alícuoto de tolueno (100 ml) y, la mezcla, se evaporó hasta secado. Se procedió a añadir, al residuo, acetato de etilo (150 ml) y una solución acuosa, saturada, de bicarbonato sódico (100 ml) y, las capas, se separaron. La capa orgánica, se lavó con salmuera (50 ml) y, a continuación, ésta se secó sulfato sódico anhidro, se filtró, y se concentró, bajo la acción de presión reducida, para proporcionar la dibencil-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)amina cruda (11,4 g).

La dibencil-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetil-fenil)amina cruda, se disolvió, en una mezcla 2:1 de etanol y agua (150 ml en total) y, la mezcla resultante, se purgó con nitrógeno puro, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos. Se procedió a añadir Paladio sobre carbono (2,3 g, 10% en peso, con un contenido de agua de aproximadamente un 50%) y se añadió bicarbonato sódico (1,0 g) y, la mezcla resultante, se hidrogenó, a una presión de aproximadamente 1 atmósfera de hidrógeno, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que iban desde los 25°C hasta los 30°C , durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 8 horas. La mezcla, se filtró, a continuación, a través de Celite, y se procedió a concentrar el filtrado, en un evaporador rotativo, para proporcionar la 4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilamina cruda (5,6 g, 92% de rendimiento productivo) como un aceite espeso. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 2,05 (3 H, s), 2,22 (3 H, s), 3,7-3,9 (4 H, m), 3,95 (4 H, s), 5,59 (1 H, s), 6,72 (1 H, s), 7,0-7,25 (11 H, m).

Etapa D

N-(4-[1,3]Dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida

A un matraz de fondo redondeado, de 500 ml de capacidad útil, se le añadió 4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilamina cruda (5,6 g, 29 mmol), diclorometano (100 ml) y diisopropiletilamina (7,6 ml, 43,5 mmol). La mezcla resultante, se

agitó, a la temperatura ambiente, hasta que los ingrediente se hubieron disuelto y, a continuación, la mezcla, se enfrió, a una temperatura de 0°C. Se procedió, a continuación, a añadir cloruro de acrilóilo (2,35 ml, 29 mmol), mediante procedimiento de goteo, en un transcurso de tiempo de 5 minutos. La mezcla de reacción, se agitó, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que iban desde los 0°C hasta los 5 °C, durante un transcurso de tiempo de 1 hora y, a continuación, se procedió a añadir agua (50 ml), y se continuó con el régimen de agitación, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 30 minutos, al final de cuyo período de tiempo, se habían formado sólidos finos. La mezcla, se filtró, para recolectar los sólidos. Las capas del filtrado, se separaron, a continuación y, la capa orgánica, se concentró, bajo la acción de presión reducida, hasta secado. Se procedió a añadir diclorometano (50 ml) al residuo y, esta mezcla, se agitó, hasta que se hubo desarrollado una suspensión que fluía libremente (es decir, una suspensión suelta). La suspensión, se filtró, (mediante la utilización del mismo embudo que se había utilizado para recolectar los sólidos finos anteriores) y, la torta de filtrado, se lavó con diclorometano (10 ml) y se secó, para proporcionar la N-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (3,1 g, 97% de pureza) como un sólido de una tonalidad que iba desde el blanco, hasta un tono blanquecino.

El filtrado procedente de arriba, se evaporó, a continuación, hasta secado, y al residuo, se le añadió metanol (10 ml). Esta mezcla, se agitó, a continuación, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos y, a continuación, el precipitado, se recolectó mediante filtrado, se lavó con metanol (5 ml) y se secó, para proporcionar una segunda cosecha 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 (3 H, s), 2,23 (3 H, s), 3,85-4,10 (4 H, m), 5,60-6,40 (3 H, m), 5,59 (1 H, s), 7,18 (1 H, s), 7,23 (1 H, s).

Etapa E

Clorhidrato del 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un matraz de fondo redondeado, de 50 ml de capacidad útil, se le añadió piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (1,2 g, 4,04 mmol) y N-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (1,0 g, 4,04 mmol). Se procedió, a continuación, a añadir etanol (10 ml) y diclorometano (10 ml) para formar una suspensión. La mezcla de reacción se calentó, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que iban desde los 45°C hasta los 50°C, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 18 horas y a continuación, ésta se enfrió, a la temperatura ambiente. Se procedió, a continuación, a añadir ácido clorhídrico 1M (10 ml) y, la mezcla resultante, se agitó, de una forma vigorosa, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 3 horas. Después, se procedió a añadir diclorometano (10 ml) y, la mezcla resultante, se agitó, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 5 minutos. A continuación, las capas, se separaron y, la capa orgánica, se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y se concentró, en un evaporador rotativo, para proporcionar el clorhidrato del 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (1,9 g). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1,2-1,4 (2 H, m), 1,58-1,75 (2 H, m), 2,0-2,17 (2 H, m), 2,19 (3 H, s), 2,38 (3 H, s), 2,41-2,50 (4 H, m), 2,5-2,75 (2 H, m), 4,31-4,42 (1 H, m), 7,10-7,35 (9 H, m), 7,55 (1 H, s), 7,75 (1 H, s), 8,59 (1 H, s), 9,82 (1 H, s), 9,98 (1 H, s); MS [M + H⁺] encontrado 500,2.

Etapa F

1-[2-(4-[[[2-(tert.-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un matraz de tres bocas, de fondo redondeado, de 2 litros de capacidad útil, se le añadió clorhidrato del 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (38 g, 70 mmol) y sal del ácido acético de la N-{5-[[[2-amino-1-(tert.-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil]formamida (33,6 g, 91 mmol). Se procedió a añadir diclorometano (500 ml) y metanol (500 ml) y, la mezcla resultante, se agitó, a la temperatura ambiente, bajo nitrógeno puro durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió, a continuación, a una temperatura correspondiente a un nivel comprendido dentro de unos márgenes que iban desde los 0 °C hasta los 5 °C y se procedió a añadir triacetoxiborohidrato sódico, sólido (44,5 g, 381 mmol), en porciones, en un transcurso de tiempo de 10 minutos. La mezcla de reacción se calentó lentamente, desde los 0°C, hasta la temperatura ambiente, en un transcurso de tiempo de aproximadamente 2 horas y, a continuación, ésta se enfrió, a una temperatura de 0°C. Después, se procedió a añadir bicarbonato sódico, acuoso, saturado, (500 ml) y diclorometano (500 ml). Esta mezcla, se agitó a fondo, cuidadosamente y, a continuación, las capas, se separaron. La capa orgánica, se lavó con salmuera (500 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y se concentró, bajo la acción de presión reducida, para proporcionar el 1-[2-(4-[[[2-(tert.-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (55 g, 86% de pureza) como un sólido de color amarillo.

El producto crudo (30 g) se disolvió en diclorometano que contenía de un porcentaje de metanol del 2% (150 ml total) y se cargó en una columna de gel de sílice (300 g), la cual se había cargado y equilibrado con diclorometano que contenía un porcentaje del 2% de metanol y un porcentaje del 0,5% de hidróxido amónico. El producto, se eluyó, desde la columna, mediante la utilización de diclorometano que contenía un 2% de metanol y un 0,5% hidróxido

amónico (1 l); diclorometano que contenía un 4% de metanol y un 0,5% de hidróxido amónico (1 l) y diclorometano que contenía un 5% de metanol y un 0,5% de hidróxido amónico (aproximadamente 3 l). Se recolectaron las fracciones (200 ml) y, aquéllas fracciones que tenían una pureza mayor de un 90%, se combinaron, y se concentraron, bajo la acción de presión reducida, para proporcionar el 1-[2-(4-{{(R)-2-(tert-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-il éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico (21,6 g, 96,5% de pureza), como un sólido de tonalidad amarillenta. MS [M + H⁺] encontrado 794,6.

Etapa G

10 Sal de hidrofuro del 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico

15 A un matraz de fondo redondeado, de 1 litro de capacidad útil, se le añadió 1-[2-(4- {{(R)-2-(tert.-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico (21,5 g, 27,1 mmol) y diclorometano (200 ml). La mezcla resultante, se agitó, a la temperatura ambiente, hasta que los ingredientes se hubieron disuelto y, a continuación, se procedió a añadir trihidrofluoruro de trietilamina (8,85 ml, 54,2 mmol) y, la mezcla resultante, se agitó, a una temperatura de 25 °C, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 48 horas. Se procedió a eliminar el disolvente, en un evaporador rotativo, para proporcionar una pasta espesa. Se procedió a añadir, a la pasta, diclorometano (100 ml) y acetato de etilo (200 ml) y, la mezcla resultante, se agitó, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. La suspensión resultante, se filtró lentamente, bajo nitrógeno puro y, la torta de filtrado, se lavó con una mezcla 1:2 de de diclorometano y acetato de etilo (100 ml total), se secó bajo la acción de nitrógeno, durante un transcurso de tiempo de 2 horas y a continuación, se secó, bajo la acción del vacío, durante el transcurso de toda la noche, para proporcionar la sal de hidrofuro del 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico (25 g, 96,9% de pureza), la cual consistía en un sólido duro, parecido a la arcilla. MS [M + H⁺] encontrado 680,8.

Etapa H

30 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-Formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico

35 Se procedió a purificar la sal de hidrofuro del 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etil-amino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico (25 g), en columna de fase inversa, de 6 pulgadas (fase sólida de Microsorb) en tres lotes iguales, utilizando una mezcla que iba de un 10 % a un 50 % de acetonitrilo en agua con un contenido de ácido trifluoroacético del 1%, como fase móvil. Las fracciones con un grado de pureza mayor del 99%, se combinaron, y, a continuación, éstas diluyeron, con un volumen de agua. La mezcla resultante, se enfrió, a una temperatura de 0°C, y se añadió bicarbonato sódico, hasta que el pH de la mezcla, fuese de un valor de aproximadamente 7,5 a 8. Se desarrolló una suspensión blanca, en un transcurso de tiempo de aproximadamente 5 minutos. La suspensión, se agitó, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos y, a continuación, ésta se filtró. La torta de filtrado, se lavó con agua (500 ml) y se secó al aire, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 4 horas y, a continuación, ésta se secó, bajo la acción del vacío, durante el transcurso de toda la noche, para proporcionar el 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico (12 g, 99+% de pureza), como una base libre semi-cristalina.

Ejemplo 6

50 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-Formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico

Etapa A

55 1-[2-(4-[1,3]Dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico

60 A un matraz de fondo redondeado, de 500 ml de capacidad útil, se le añadieron piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-il-carbámico (17,0 g, 58 mmol) y N-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (13,1 g, 52,9 mmol). Se añadieron etanol (150 ml) y diclorometano (150 ml), para formar una suspensión. La mezcla de reacción, se calentó, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que iban de 50 °C a 55 °C, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 24 horas y, a continuación, ésta se enfrió, a la temperatura ambiente. Se procedió a eliminar la mayor parte del disolvente, en un evaporador rotativo, dando ello como resultado una suspensión espesa. Después, se le añadió etanol (grado reactivo), para formar un volumen total de aproximadamente 200 ml y, la mezcla resultante, se calentó a una temperatura de 80 °C y, a continuación, ésta se enfrió, lentamente, a la temperatura ambiente. La suspensión espesa y de tonalidad blanca resultante, se filtró, se lavó con etanol (20 ml) y ésta se secó, bajo la acción del vacío, para proporcionar el 1-[2-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-

dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (23,8 g, aproximadamente 98% de pureza), como un sólido de color blanco.

Etapa B

5

1-[2-(4-Formil-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un matraz de fondo redondeado, de 500 ml de capacidad útil, se le añadió 1-[2-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (15 g, 27,6 mmol) y acetonitrilo (150 ml), para formar una suspensión. Se procedió a añadir, a continuación, ácido clorhídrico acuoso 2 M (75 ml) y, la mezcla resultante, se agitó, a una temperatura de 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 1 hora. A continuación, la mezcla, se enfrió, a la temperatura ambiente, y se procedió a añadir acetato de etilo (150 ml). Después, se añadió hidróxido sódico 2 M (75 ml), se comprobó el valor pH y, a continuación, se procedió a añadir hidróxido sódico 2 M, hasta que el valor pH de la solución, fuera el correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 9 a 10. Las capas, se separaron y la capa orgánica, se lavó con salmuera diluida (75 ml; 1:1 salmuera/agua), se secó sobre sulfato sódico anhidro, y el disolvente, se eliminó, en un evaporador rotativo, para proporcionar el 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-il éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (12,5 g, aproximadamente 98% de pureza). En caso deseado, la pureza de este intermediario, podría incrementarse, mediante la formación de una suspensión con etanol (3 volúmenes de etanol), procediendo a calentar la suspensión, a una temperatura de 80°C, y a continuación, enfriando lentamente, a la temperatura ambiente, y procediendo a aislar mediante filtrado.

Etapa C

25 1-[2-(4-[(R)-2-(tert.-Butildimetilsilanilo)xi]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilimino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un matraz de fondo redondeado, de 250 ml de capacidad útil, se le añadió 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (7,1 g, 14,2 mmol) y sal del ácido acético de la N-{5-[(R)-2-amino-1-(tert.-butildimetilsilanilo)xi]etil]-2-hidroxifenil}formamida (5,8 g, 15,6 mmol). Se procedió, a continuación, a añadir metanol (100 ml), para formar una suspensión y, esta mezcla, se agitó, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que iban desde los 45°C hasta los 50°C, bajo atmósfera de nitrógeno, durante un transcurso de tiempo de 1 hora. La mezcla, se enfrió, a continuación, a la temperatura ambiente, y se procedió a añadir tolueno (50 ml) y después, a eliminar el disolvente, en un evaporador rotativo, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que iban desde los 35 °C hasta los 45 °C. Se procedió a añadir tolueno (50 ml), al residuo y, después, se eliminó el disolvente, para proporcionar el 1-[2-(4- [(R)-2-(tert.-butildimetilsilanilo)xi]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilimino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (12 g), como un sólido de tonalidad amarillo-naranja.

Etapa D

40 1-[2-(4-[(R)-2-(tert.-Butildimetilsilanilo)xi]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un matraz de hidrogenación, se le añadió 1-[2-(4-[(R)-2-(tert.-butildimetilsilanilo)xi]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilimino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (4,6 g) y 2-metiltetrahidrofurano (50 ml). La mezcla resultante, se agitó, hasta que el sólido se disolvió (en un transcurso de tiempo de aproximadamente 5 min.) y a continuación, la mezcla, se purgó con nitrógeno. Se procedió a añadir Platino sobre carbono (920 mg, 5%, en peso, soporte, carbón activado) y, la mezcla, se hidrogenó, a una presión de 50 psi (agitador del tipo Parr shaker), durante un transcurso de tiempo de 6 horas. La mezcla, se filtró, a continuación, a través de Celite y, el Celite, se lavó con 2-metiltetrahidrofurano (10 ml). Al filtrado, se le añadió a gel de sílice, modificada con tiopropilo (20% en peso de solución, Silicycle) y, la mezcla, se agitó, a una temperatura correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde los 25 C° hasta los 30 °C, durante un transcurso de tiempo de 3 horas. La mezcla, se filtró, a continuación, a través de Celite y ésta se concentró, para eliminar el disolvente. El residuo, se disolvió en metanol (5 ml por gramo de residuo) y, a continuación, la solución resultante se añadió lentamente a una mezcla 1:1 de bicarbonato sódico, acuoso, saturado, y agua, vigorosamente agitada (40 ml por gramo de residuo). La suspensión blanquecina resultante, se agitó, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos y a continuación, ésta se filtró. La torta de filtrado, se lavó con agua (20 volúmenes), se secó al aire, durante un transcurso de tiempo de 3 horas y a continuación, se secó, bajo la acción del vacío, a la temperatura ambiente, durante el transcurso de toda la noche, para proporcionar el 1-[2-(4-[(R)-2-(tertbutildimetilsilanilo)xi]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (80% de recuperación, aproximadamente 96% de pureza).

Etapa E

65 Sal de L-tartrato del 1-[2-(4-[(R)-2-(3-Formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un matraz de fondo redondeado de 200 ml de capacidad útil, se le añadió 1-[2-(4-((R)-2-(tert.-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino)metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (3,8 g, 4,8 mmol) y 2-metiltetrahidrofurano (40 ml). La mezcla resultante, se agitó, a la temperatura ambiente, hasta que los ingredientes se hubieron diluido (aproximadamente 15 minutos) y a continuación, se procedió a añadir tetrahidrofluoruro de trietilamina (0,94 ml, 5,76 mmol) y, la mezcla resultante, se agitó, a una temperatura de 25 °C, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 24 horas. A esta mezcla, se le añadió una mezcla 1:1 de bicarbonato sódico acuoso, saturado, y agua (40 ml) y 2-metiltetrahidrofurano y, la mezcla resultante, se agitó, hasta que el sólido se hubo disuelto (pH de la solución, aproximadamente 8). Las capas, se separaron y, la capa orgánica, se lavó con salmuera (30 ml), se secó sobre sulfato sódico anhidro, se filtró, y se concentró, en un evaporador rotativo. El residuo, se disolvió, in 2-metiltetrahidrofurano (50 ml) y se añadió ácido L-tartárico sólido (650 mg). La mezcla resultante, se agitó, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 25°C a 30°C, durante un transcurso de tiempo de 18 horas y, a continuación, ésta se filtró a través de un papel de filtro. La torta de filtrado, se lavó con 2-metiltetrahidrofurano (10 ml), isopropanol (10 ml) y ésta se puso inmediatamente bajo la acción del vacío, para proporcionar la sal del ácido L-tartárico del 1-[2-(4-((R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino)metil)-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (3,7 g, >97 % de pureza).

Etapa F

1-[2-(4-((R)-2-(3-Formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino)metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un matraz de fondo redondeado de 250 ml de capacidad útil, se le añadió la sal del ácido L-tartárico del 1-[2-(4-((R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino)metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (3,5 g) y metanol (35 ml) y, la mezcla resultante, se agitó, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos. Se procedió a añadir una mezcla 1:1 de bicarbonato sódico acuoso, saturado, y agua (70 ml), en un transcurso de tiempo de 5 minutos, y se continuó con el régimen de agitación, durante un transcurso de tiempo de 2 horas. La suspensión de tonalidad blanquecina resultante, se filtró, y la torta de filtrado, se lavó con agua (20 ml), se secó al aire, durante un transcurso de tiempo de 2 horas y a continuación, se secó, bajo la acción del vacío, durante el transcurso de toda la noche, para proporcionar el 1-[2-(4-((R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino)metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (2,3 g), como una base libre, semicristalina.

Se obtuvieron los espectros de ¹H y de ¹³C NMR, para una muestra de 1-[2-(4-((R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino)metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (22,2 mg en aproximadamente 0,75 ml de DMSO-d₆), a la temperatura ambiente, mediante la utilización de un espectrómetro del tipo JEOL ECX-400 NMR spectrometer:

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), isómero mayor, 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 (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 y ~3,60 (par AB, 2H), 2,68 (br m, 2H), ~2,59 (nd, 4H), 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).

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆), isómero menor, 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 (dd, J = 8,3, 1,8, 1H), 6,83 (d, J = 8,3, 1H), 5,15 (br, 1H), 4,47 (m, 1H), ~3,65 y ~3,60 (par AB, 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).

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), isómero mayor, 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.

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆), isómero menor, 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.

Los espectros de ¹H y ¹³C NMR, mostraron la presencia de un isómero mayor (aproximadamente un porcentaje molar del 82 por ciento) y un isómero menor (aproximadamente un porcentaje molar del 18 por ciento), los cuales se creía que eran isómeros rotativos, resultantes del impedimento de la rotación alrededor del -NH-C(O)H. El grupo fenilo, se cree que es "syn" al oxígeno del carbonilo, en el isómero mayor, y "anti", en el isómero menor.

Ejemplo 7

5 Cristales de siembra de la forma II del 1-[2-(4-[[R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico

10 Se procedió a disolver el 1-[2-(4-[[R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico (500 mg), semicristalino, en metanol (50 ml), y se añadió agua, hasta que se alcanzó el punto de enturbiamiento. La mezcla resultante, se agitó, a una temperatura de 5 °C, durante un transcurso de tiempo de 3 horas y, el material cristalino resultante, se aisló, mediante filtrado, para proporcionar el 1-[2-(4-[[R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico, cristalino (420 mg). Se determinó el hecho de que, esta base libre cristalina, tenía un trazado de la calorimetría de exploración diferencial, la cual exhibía un pico en el flujo de calor endotérmico, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 142°C hasta aproximadamente 150°C; y un modelo de difracción de rayos x de la materia en polvo (PXRD), que tenía unos significativos picos de difracción, entre otros picos, a unos valores de 2θ de aproximadamente 20,7±0,3, 21,6±0,3, 22,5±0,3 y 23,2±0,3. Esta forma de base libre cristalina, se designa como Forma II. Una información adicional sobre la Forma II, y otras formas de base libre cristalina de este compuesto, se dan a conocer en el documento de solicitud de patente estadounidense, usualmente asignado, US n° _____ registrado en la misma fecha que este documento (Attorney Docket – certificado de procuración – n° P-222-US1) y n° provisional de solicitud U.S. n° 60/794.709, registrado en fecha 25 de abril del 2006.

Ejemplo 8

Cristalización de la forma II del 1-[2-(4-[[R)-2-(3-Formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico

30 A un matraz de tres bocas, de fondo redondeado, equipado con un agitador suspendido, un dispositivo de control de temperatura y un embudo de adición, se le añadió el 1-[2-(4-[[R)-2-(3-formilamino,4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico, semicristalino (14 g) y metanol (1,4 l). Después, se le añadió agua (500 ml), en una porción y, a continuación, se procedió a añadir agua adicional(200 ml), lentamente, hasta que se hubo alcanzado el punto de enturbiamiento. Se añadieron cristales de siembra de 1-[2-(4-[[R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico, Forma II (50 mg) y, la mezcla resultante, se agitó, a una temperatura de 25 °C, durante un transcurso de tiempo de 3 horas, después de cuyo transcurso de tiempo, se había desarrollado un suspensión que fluía libremente (es decir, suelta). Se procedió a añadir agua (300 ml), en un transcurso de tiempo de 15 minutos y, la mezcla resultante, se agitó, a una temperatura de 25 °C durante el transcurso de toda la noche. La mezcla, se filtró, a continuación, y la torta de filtrado, se lavó con agua (100 ml), se secó al aire, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 2 horas y a continuación, se secó, bajo la acción del vacío, a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo de 48 horas, para proporcionar el 1-[2-(4-[[R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico, cristalino (12,5 g, 99,6% de pureza). Se determinó el hecho de que, esta sal cristalina, era la Forma II.

Ejemplo 9

1-[2-(4-Formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Etapa A

4-Yodo-2,5-dimetilfenilamina

55 A una solución de 2,5-dimetilanilina (20g, 165 mmol) in a 1:1 mezcla de diclorometano y metanol (400 ml) se le añadió bicarbonato sódico (20,8g, 250 mmol) y dicloroyodato de tetrametilammonio (I) (44,7g, 165 mmol). La mezcla resultante, se agitó, a la temperatura ambiente, durante un transcurso de tiempo de 1 hora y a continuación, se procedió a añadir agua (500 ml). La capa orgánica, se retiró, se lavó con trisulfato sódico al 5% (500 ml) y salmuera (500 ml). A continuación, la capa orgánica, se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró, y se concentró, bajo la acción del vacío, para proporcionar la 4-yodo-2,5-dimetilfenilamina (39,6 g, 98% de rendimiento productivo). El producto, se utilizó sin ninguna purificación adicional.

Etapa B

65 N-(4-Yodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida

A una solución de 4-yodo-2,5-dimetilfenilamina (37,2 g, 151 mmol) en diclorometano (500 ml) se le añadió bicarbonato sódico (25,4 g, 302 mmol). La mezcla resultante, se enfrió, a una temperatura de 0 °C y se añadió cloruro de acrilóilo (12,3 ml, 151 mmol), lentamente, en un transcurso de tiempo de 25 minutos. La mezcla resultante, se agitó, a la temperatura ambiente, durante el transcurso de toda la noche y, a continuación, ésta se filtró. El volumen del filtrado, se redujo a aproximadamente 100 ml, y se formó un precipitado. El precipitado, se filtró, se lavó con agua (1 l) y, a continuación, éste se secó otra vez, para proporcionar la N-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida (42,98 g, 95% de pureza, 90 % de rendimiento productivo). El producto, se utilizó sin ninguna purificación adicional.

Etapa C

1-[2-(4-Yodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A una solución de N-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida (32,2 g, 107 mmol) en una mezcla 6:1, referido a volumen / volumen, de N,N-dimetilformamida e isopropanol (700 ml) se le añadió piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (36,3 g, 123 mmol). La mezcla resultante, se calentó, a una temperatura de 50°C, durante un transcurso de tiempo de 24 horas y a continuación, a una temperatura de 80 °C, durante un transcurso de tiempo de 24 horas. A continuación, se procedió a enfriar la mezcla de reacción, a la temperatura ambiente, y se concentró bajo la acción del vacío. El residuo se disolvió en diclorometano (1 l) y, esta solución, se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1N (500 ml), agua (500 ml), salmuera (500 ml) y una solución acuosa, saturada, de bicarbonato sódico (500 ml). A continuación, la capa orgánica, se secó, sobre sulfato magnésico anhidro, y se filtró. Se añadió etanol (400 ml) y la mezcla resultante, se concentró, bajo la acción del vacío, a un volumen de aproximadamente 400 ml, después de cuyo transcurso de tiempo, se había formado un precipitado. El precipitado, se filtró, y se secó, para proporcionar el 1-[2-(4-yodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (59,6g, 84% de pureza, 79% de rendimiento productivo). m/z: [M + H⁺] calculado para C₂₉H₃₂N₃O₃ 598,49; encontrado 598,5.

Etapa D

Éster metílico del ácido 4-{3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzóico

A una solución de 1-[2-(4-yodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (56 g, 94 mmol), en una mezcla 5:1, referido a volumen / volumen, de N,N-dimetilformamida y metanol (600 ml), se añadió diispropiletilamina (49 ml, 281 mmol), 1,3-bis(difenilfosfino)propano (3,9 g, 9,4 mmol) y acetato de paladio (II) (2,1 g, 9,4 mmol). La mezcla resultante, se purgó con monóxido de carbono y, a continuación, se agitó, durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van desde los 70 °C hasta los 80 °C, bajo atmósfera de monóxido de carbono (presión de globo). La mezcla de reacción, se concentró, bajo la acción del vacío, y el residuo, se disolvió en diclorometano (500 ml). Esta mezcla, se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1N (500 ml), con agua (500 ml) y a continuación, con salmuera (500 ml). La capa orgánica, se secó, a continuación, sobre sulfato magnésico anhidro, ésta se secó y, a continuación, se concentró bajo la acción del vacío. El residuo, se mezcló con etanol (en un valor de relación de aproximadamente 5:1 volumen / peso, de etanol con respecto al residuo) y la mezcla, se calentó, hasta que la totalidad del material sólido se hubo disuelto. Se dejó que esta solución, se enfriara lentamente, a la temperatura ambiente, y el precipitado resultante, se aisló mediante filtrado, para proporcionar el éster metílico del ácido 4-{3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzóico (47,3 g, 97% de pureza, 92% de rendimiento productivo). m/z: [M + H⁺] calculado para C₃₁H₃₅N₃O₅ 530,63; encontrado 530,4.

Etapa E

1-[2-(4-Hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Se procedió a enfriar una solución del éster metílico del ácido 4-{3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzóico 49,8 g, 93,9 mmol) in tetrahidrofurano (200 ml), a una temperatura de 0°C, y se añadió hidruro de litio-aluminio (10,7 g, 281,7 mmol), en porciones (10 x 1,07 g). La mezcla resultante, se agitó, durante un transcurso de tiempo de 3 horas y, a continuación, se añadió agua (10,7 ml), seguido de una hidróxido sódico acuoso 1N (10,7 ml) y agua adicional (32,1 ml). Esta mezcla, se agitó, durante el transcurso de toda la noche y a continuación, se filtró. La capa orgánica se concentró, bajo la acción del vacío, y el residuo, se mezcló con acetato de etilo (en una relación de mezcla de aproximadamente 5:1, referido a volumen / peso, del acetato de etilo con respecto al residuo). Esta mezcla, se calentó, hasta que la totalidad del material sólido se hubo disuelto y, a continuación, la solución, se dejó enfriar a la temperatura ambiente. El precipitado resultante, se filtró y se secó, para proporcionar el 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (24,6 g, 95% de pureza, 47,5% de rendimiento productivo). Este material, se utilizó, sin ninguna purificación adicional. m/z: [M + H⁺] calculado para C₃₀H₃₅N₃O₄ 502,62; encontrado 502,5.

Etapa F

5

1-[2-(4-Formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

10 A una solución del 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (5,0 g, 10 mmol) en diclorometano (200 ml), se le añadió diisopropiletilamina (8,7 ml, 50 mmol) y dimetilsulfóxido (5,6 ml, 100 mmol). La mezcla resultante, se enfrió, a una temperatura de 0°C, y se añadió un complejo de trióxido de azufre y piridina (8,0 g, 50 mmol). La mezcla de reacción, se agitó, durante un transcurso de tiempo de 1 hora, a una temperatura de 0°C y a continuación, se añadió agua (300 ml). La capa orgánica, se retiró, y ésta se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1N (300 ml) y salmuera (300 ml). A continuación, la capa orgánica, se secó sobre sulfato magnésico anhidro y se filtró. La solución resultante, la cual contenía el 1-[2-(4-formil-2,5-

15 dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico, se utilizó, sin ninguna purificación adicional. m/z: [M + H₊] calculado para C₃₀H₃₃N₃O₄ 500,60; encontrado 500,4.

Ejemplo 10

20 Cultivo de células y preparación de membranas procedentes de células que expresan los receptores muscarínicos M₁, M₂, M₃ y M₄, humanos

25 Se procedió a cultivar líneas celulares CHO que expresaban los subtipos de los receptores muscarínicos hM₁, hM₂, hM₃ y hM₄, humanos, respectivamente, hasta la casi confluencia, en medio Hams F-12, suplementado con 10% FBS y 250 µg/ml de Genitocina. Las células, se cultivaron en un incubador con 5% CO₂, a una temperatura de 37°C, y se estimularon con 2 mM EDTA en dPBS. Las células, se recolectaron y agruparon, mediante 5 minutos de centrifugación, a 650 x g, y los gránulos celulares, o bien se almacenaron, congelándose, a una temperatura de -80°C, ó bien, las membranas, se utilizaron para su uso inmediato. Para la preparación de membranas, los gránulos de células, se resuspendieron en un tampón de lisis, y se homogeneizaron, con un disruptor de tejidos del tipo

30 Polytron PT 2100 (de la firma Kinematica AG; 20 segundos x 2 ráfagas). Las membranas crudas, se centrifugaron a 40.000 x g, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, a una temperatura de 4°C. El gránulo de membranas, se resuspendió, a continuación, con un tampón de resuspensión, y éste se homogeneizó otra vez, con el disruptor de tejidos Polytron. La concentración de proteínas, en la suspensión membranaria, se determinó mediante el procedimiento descrito por parte de Lowry et al., en 1951, en el Journal of Biochemistry, 193, 265. Todas las

35 membranas, se congelaron, en alícuotos, a una temperatura de -80°C, o éstas se utilizaron inmediatamente. Los alícuotos, de las membranas del receptor HM₅, preparados, se compraron directamente en el mercado, de procedencia de la firma PerkinElmer, Inc. (Wellesley, MA), y se almacenaron, a una temperatura de -80°C, hasta su uso.

40 Ejemplo 11

Ensayo de Unión de Radioligandos, para los Receptores Muscarínicos

45 Los ensayos de enlace o unión de radioligandos, para los receptores muscarínicos clonados, se realizaron en una placa de microtitulación de 96 pozos, en un volumen total de ensayo de 100 µl. Se procedió a diluir membranas de células CHO, las cuales expresaban, de una forma estable, los subtipos muscarínicos hM₁, hM₂, hM₃, hM₄ ó hM₅, en tampón de ensayo, a las siguientes concentraciones de proteína diana µg/pozo) 10 µg para hM₁, 10 – 15 para hM₂, 10 – 20 µg para hM₃, 10 – 20 µg para hM₄ y 10 – 12 µg para hM₅, para obtener señales similares (cpm). Las membranas, se homogeneizaron brevemente, mediante la utilización de un disruptor de tejido del tipo Polytron (10 segundos), previamente al ensayo de adición en placa. Los estudios de unión de saturación, para determinar los valores de K_D del radioligando, se realizaron mediante la utilización de L-[N-metil³H]escopolamina-cloruro de metileno (³H-NMS) (TRK666, 84,0 Ci/mmol, de la firma Amersham Pharmacia Biotechoras, Buckinghamshire, England), a unas concentraciones comprendidas dentro de unos márgenes que iban desde 0,001 nM hasta 20 nM. Los ensayos de desplazamiento, para la determinación de los valores de K_i de los compuestos de ensayo, se

50 realizaron con ³H-NMS, a un 1 nM, y once diferentes concentraciones de compuestos de ensayo. Los compuestos de ensayo, se disolvieron, inicialmente, a una concentración de 400 µM, en tampón de dilución y, a continuación, éstos se disolvieron, en serie, 5 x, con tampón de dilución, a una concentración final correspondiente a un valor que iba desde los 10 pM hasta los 100 µM. El orden de adición y los volúmenes de las placas de ensayo, eran de la forma que sigue: 25 µl de radioligando 25 µl de compuesto de ensayo diluido, y 50 µl de membranas. Se procedió a

60 incubar las placas de ensayo, durante un transcurso de tiempo de 60 minutos, a una temperatura de 37°C. Las reacciones de enlace o unión, se terminaron mediante un rápido filtrado sobre placas de filtro de fibra de vidrio GF/B (Perkin Elmer, Inc.) PRE-tratadas en 1% BSA. Las placas de filtro, se lavaron tres veces con tampón de lavado (10 mM HEPES), con objeto de eliminar la radioactividad enlazada. Se procedió, a continuación, a secar las placas, con aire, y se añadieron, a cada pozo, 50 µl de fluido de centelleo del tipo "Microsint-20 liquid Scintillation fluid" (de la

65 firma Perkin Elmer). A continuación, se procedió a contar las placas, en un contador de centelleo para líquidos, del

tipo "PerkinElmer Topcount liquid scintillation counter" (de la firma PerkinElmer, Inc.). Los datos de enlace o unión, se analizaron mediante un análisis de regresión, no lineal, con el paquete de "software" informático del tipo "GraphPad Prism Software package" (de la firma GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), utilizando un modelo de competición de un sitio. Los valores K_j , para los compuestos de ensayo, se calcularon a partir de los valores observados de IC_{50} , y del valor K_D del radioligando, mediante la utilización de la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y; Prusoff WH. (1973) *Biochemical Pharmacology*, 22(23):3099-108). Los valores de K_j , se convirtieron a los valores de pK_j , con objeto de determinar la media geométrica y los intervalos de confianza a un 95%. pK_i . A continuación, estas estadísticas resumidas, se convirtieron de nuevo a los valores de K_j , para el informe de datos.

En este ensayo, un valor inferior de K_j , indica el hecho de que, el compuesto de ensayo, tiene una mayor afinidad de enlace o unión, para el receptor ensayado. Se encontró que, el 1-[2-(4-[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxi-fenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (compuesto IIa), tenía un valor de K_j , de menos de 10 nM para los subtipos de receptores M_1 , M_2 , M_3 , M_4 y M_5 .

Ejemplo 12

Cultivo de células y preparación de membranas procedentes de células que expresaban los receptores β_1 -, β_2 -, ó β_3 -adrenérgicos, humanos

Se procedió a incubar líneas celulares del riñón embrionario humano (HEK-293), que expresaban los receptores β_1 - ó β_2 -adrenérgicos, humanos, clonados, o líneas celulares del ovario de hamster chino (CHO), que expresaban los receptores β_3 -adrenérgicos, humanos, clonados, hasta la casi confluencia, en medios DMEM ó Ham's F12, con 10 FBS, en presencia de 500 μ g/ml de Geneticin. La monocapa celular, se estimuló con 2 mM EDTA en PBS. Las células, se granularon mediante centrifugación, a una velocidad angular de 1.000 revoluciones por minuto y, los gránulos celulares, o bien se congelaron y almacenaron, a una temperatura de -80°C , o bien, las membranas, se prepararon inmediatamente para su uso. Para la preparación de membranas que expresaban los receptores β_1 y β_2 , se resuspendieron los gránulos celulares, en un tampón de (10 mM HEPES/HCl, 10 mM EDTA, pH 7,4, a 4°C) y se homogeneizaron, mediante la utilización de homogeneizador de vidrio, de ajuste hermético, del tipo Dounce (30 golpes), sobre hielo. Para las membranas que expresaban más receptores β_3 sensibles a la proteasa, se homogeneizaron gránulos celulares, en tampón de lisis (10 mM Tris/HCl, pH 7,4), suplementado con una tableta de cóctel completo inhibidor de proteasa, provisto de 2 mM EDTA, del tipo "Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets with 2 mM EDTA" por 50 ml de tampón (de la firma Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). El homogeneizado, se centrifugó, a 20.000 x g, y el gránulo resultante, se lavó, una vez, con tampón de lisis, mediante resuspensión y centrifugación, de la forma descrita anteriormente, arriba. El gránulo final, se resuspendió, a continuación, en tampón de ensayo de enlace, enfriado en hielo. La concentración de proteína, se determinó mediante procedimientos descritos por parte de Lowry et al., 1951, en *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265; y en Bradford, *Analytical Biochemistry*, 1976, 72, 248-54. Todas las membranas, se almacenaron, congeladas, en alícuotos, a una temperatura de -80°C , ó éstas se utilizaron inmediatamente.

Ejemplo 13

Ensayo de unión de radioligandos, para los receptores β_1 -, β_2 -, y β_3 -adrenérgicos, humanos

Se procedió a realizar ensayos de unión, en placas de microtitulación de 96 pozos, en un volumen total de ensayo de 100 μ g, con 10 – 15 μ g de proteína membranaria que contenía los receptores β_1 -, β_2 -, ó β_3 -adrenérgicos, humanos, en tampón de ensayo (75 mM Tris/HCl pH 7,4 a 25°C , 12,5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA, 0,2% BSA). Los estudios de unión de saturación, para determinar los valores de K_d del radioligando, se realizaron mediante la utilización de [^3H]-dihidroalprenolol (NET-720, 100 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), para los receptores β_1 y β_2 , y [^{125}I]-(-)-yodocianopindolol (NEX-189, 220 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), a 10 u 11 diferentes concentraciones, de un valor comprendido dentro de unos márgenes que iban desde 0,01 nM hasta 20 nM. Los ensayos de desplazamiento, para la determinación de los valores de K_j de los compuestos de ensayo, se realizaron [^3H]-dihidroalprenolol a 1 nM y [^{125}I]-(-)-yodocianopindolol a 0,5 nM, para 10 u 11 diferentes concentraciones del compuesto de ensayo, de un valor correspondiente a un rango comprendido dentro de unos márgenes que iban desde los 10 pM hasta los 10 μ M. Los ensayos de unión no específica, se determinaron en presencia de 10 μ M de propranolol. Los ensayos, se incubaron, durante un transcurso de tiempo de 1 hora, a una temperatura de 37°C , y a continuación, se determinaron las reacciones de unión, mediante filtrado rápido GF/B, para los receptores β_1 y β_2 , ó placas de fibra de vidrio GF/C, para los receptores β_3 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) pre-empapados en 0,3% polietilénimina. Las placas de filtrado, se lavaron tres veces, con tampón de filtrado (75 mM Tris/HCl pH 7,4 a 4°C , 12,5 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA), para eliminar la radioactividad no unida. Se procedió, a continuación, a secar las placas, y se añadieron 50 μ l de fluido de centelleo del tipo "Microsint-20 liquid Scintillation fluid" (de la firma Perkin Elmer) y, a continuación, se procedió a contar las placas, en un contador de centelleo para líquidos, del tipo "PerkinElmer Topcount liquid scintillation counter" (de la firma PerkinElmer, Inc.). Los datos de enlace o unión, se analizaron mediante un análisis de regresión, no lineal, con el paquete de "software" informático del tipo "GraphPad Prism Software package" (de la firma GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), utilizando un modelo de competición de un sitio, de 3 parámetros. El mínimo de la curva, se fijó al valor para el ensayo no

específico, según se determina mediante la presencia de 10 μM de propanolol. Los valores K_j , para los compuestos de ensayo, se calcularon a partir de los valores observados de IC_{50} , y del valor K_D del radioligando, mediante la utilización de la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y; Prusoff WH. (1973) *Biochemical Pharmacology*, 22(23):3099-108).

En este ensayo, un valor inferior de K_j , indica el hecho de que, el compuesto de ensayo, tiene una mayor afinidad de enlace o unión, para el receptor ensayado. Se encontró que, el 1-[2-(4-((R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino)metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa), tenía un valor de K_j , de menos de 10 nM para el receptor β_1 - y β_3 -adrenérgicos.

Ejemplo 14

Ensayos funcionales de antagonismo para los subtipos de receptores muscarínicos

Ensayo A

Bloqueo de la inhibición de la acumulación de cAMP, mediatizada por agonistas

En este ensayo, se procedió a determinar la potencia funcional de un compuesto de ensayo, como un antagonista para el receptor hM_2 , mediante la medición de la capacidad del compuesto de ensayo, para bloquear la inhibición de oxotremorina de la acumulación de cAMP mediatizada por forskolina, en células CHO-K1, que expresan el receptor hM_2 . Los ensayos de cAMP, se realizaron en un formato de radioinmunoensayo, utilizando el sistema de ensayo de activación de adenilil-ciclasa, de placa del tipo Flashplate, consistente en el "Flashplate Adenilil Cyclase Activation Ensayo System" con ^{125}I -cAMP (NEN SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), en concordancia con las instrucciones del fabricante. Las células, se lavaron una vez, con el dPBS, y se estimularon con solución de Trypsina-EDTA (0,05% de tripsina/0,53 mM EDTA), tal y como se describe en la sección correspondiente al cultivo de células y preparación de membranas, facilitado anteriormente, arriba. Las células separadas, se lavaron dos veces, mediante centrifugación, a 650 x g, durante un transcurso de tiempo de cinco minutos, en 50 ml de dPBS. El gránulo de células, se volvió a suspender en 10 ml de dPBS y, las células, se contaron con un contador de partículas del tipo "Coulter Z1 Dual Particle Counter" (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Las células, se centrifugaron otra vez, a 650 x g, durante un transcurso de tiempo de cinco minutos, y se volvieron a suspender, en un tampón de estimulación, para un ensayo de centrifugación, de $1,6 \times 10^6$ a $2,8 \times 10^6$ células/ml.

El compuesto de ensayo, se disolvió, inicialmente, a una concentración de 400 μM en tampón de dilución (dPBS suplementado con 1 mg/ml BSA (0,1%)) y, a continuación, éste se disolvió en series, a unas concentraciones finales correspondientes a un valor comprendido dentro de unos márgenes que iban desde 100 μM hasta 0,1 nM. La oxotremorina, se disolvió de una forma similar.

Para medir la inhibición de oxotremorina, de la actividad adeniliciclasa se procedió a añadir, a los pozos de ensayo de agonistas, 25 μl de forskolina (25 μM de concentración final, diluido en dPBS), 25 μl de oxotremorina diluida, y 50 μl de células. Para medir la capacidad del compuesto de ensayo, para bloquear la actividad adenil-ciclasa inhibida con oxotremorina, se añadieron, a los pozos de ensayo restantes, 25 μl de forskolina y oxotremorina (concentraciones finales de 25 μM y 5 μM , respectivamente, diluidas en dPBS), 25 μl de compuesto de ensayo diluido, y 50 μl de células.

Las reacciones, se incubaron durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a una temperatura de 37°C, y se pararon mediante la adición de 100 μl de un tampón de detección, enfriado en hielo. Se procedió a sellar las placas, éstas se incubaron, durante el transcurso de toda la noche, a la temperatura ambiente, y se contaron, a la mañana siguiente, en un contador de centelleo para líquidos, del tipo "PerkinElmer Topcount liquid scintillation counter" (de la firma PerkinElmer, Inc.). la cantidad de cAMP producida (pmol / pozo), se calculó en base a los recuentos observados para las muestras y los patrones estándar de cAMP, de la forma que se describe en el manual de usuario proporcionado por el fabricante. Los datos, se analizaron mediante un análisis de regresión, no lineal, con el paquete de "software" informático del tipo "GraphPad Prism Software package" (de la firma GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), utilizando un modelo de competición de un sitio. Se utilizó la ecuación de Cheng-Prusoff, para calcular el valor de K_{obs} , mediante la utilización de la curva de respuesta con respecto a la concentración de oxotremorina y la concentración de ensayo de oxotremorina, como K_D y $[L]$, respectivamente.

En ese ensayo, un valor más bajo de K_{obs} , indica el hecho de que, el compuesto de ensayo tiene una mayor actividad funcional más alta, para el receptor ensayado. Se encontró que, el 1-[2-(4-((R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino)metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa), tenía un valor de K_{obs} , menor de aproximadamente 10 nM, para el bloqueo de inhibición de oxotremorina, para la acumulación de cAMP mediatizada por forskolina, en células CHO-K1, que expresaban el receptor hM_2 .

Ensayo B

5 Bloqueo de unión del [³⁵S]GTPγS, mediatizado mediante agonista

En este ensayo funcional, se procedió a determinar la potencia funcional de un compuesto de ensayo, como antagonista del receptor hM₂, mediante la medición de la capacidad del compuesto de ensayo, para bloquear la unión de [³⁵S]GTPγS estimulada mediante oxotremorina, mediante la utilización de un disruptor de tejido Polytron PT-2100, en células DHO-K1, que expresaban el receptor hM₂.

En el momento de su utilización, se procedió a descongelar las membranas congeladas, y éstas de diluyeron, en un tampón de ensayo, con una concentración final de tejido, correspondiente a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van desde 3 hasta 10 μg de proteína por pozo. Las membranas, se homogeneizaron brevemente, mediante la utilización de un disruptor de tejido Polytron PT-2100 y, a continuación, éstas se añadieron a las placas de ensayo.

Se procedió a determinar, en cada experimento, el valor de EC₉₀ (concentración efectiva para una respuesta máxima del 90%), para la estimulación de la unión del [³⁵S]GTPγS, mediante la oxotremorina agonista.

Con objeto de determinar la capacidad del compuesto de ensayo, para inhibir la unión de [³⁵S]GTPγS estimulada mediante oxotremorina, se procedió a añadir, a cada pozo de las placas de 96 pozos, lo siguiente: tampón de ensayo con [³⁵S]GTPγS (0,4nM), 25 μl de oxotremorina (EC₉₀) y GDP (3μM), 25 μl de compuesto de ensayo diluido y 25 μl de membranas de células CHO, que expresaban el receptor hM₂. Las placas de ensayo, se incubaron, a continuación, a una temperatura de 37°C, durante un transcurso de tiempo de 60 minutos. Las placas de ensayo, se filtraron sobre filtros de GF/S, pretratados con 1%BSA, mediante la utilización de un recolector del tipo PerkinElmer, de 96 pozos. Las placas, se lavaron en tampón lavado con agua fría, 3 veces, durante un transcurso de tiempo de 3 segundos cada vez y, a continuación, se secaron al aire o mediante la aplicación de vacío. Se procedió a añadir, a cada pozo, líquido de centelleo del tipo "Microscint-20 scintillation liquid" (50 μl) y, cada placa, se selló, y se procedió a hacer un recuento de la radioactividad, en un contador del tipo "Topcounter" (PerkinElmer). Los datos, se analizaron mediante un análisis de regresión, no lineal, con el paquete de "software" informático del tipo "GraphPad Prism Software package" (de la firma GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), utilizando un modelo de competición de un sitio. Se utilizó la ecuación de Cheng-Prusoff, para calcular el valor de K_{obs}, mediante la utilización de los valores de IC₅₀, de la curva de respuesta con respecto a la concentración para el compuesto de ensayo, y la concentración de oxotremorina, como concentración de ligandos, K_D y [L], respectivamente.

En ese ensayo, un valor más bajo de K_{obs}, indica el hecho de que, el compuesto de ensayo tiene una actividad funcional más alta, para el receptor ensayado. Se encontró que, el 1-[2-(4-[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (compuesto IIa), tenía un valor de K_{obs}, menor de aproximadamente 10 nM, para el bloqueo de inhibición de la unión del [³⁵S]GTPγS, estimulada mediante oxotremorina, en células que expresaban el receptor hM₂.

Ensayo C

45 Bloqueo de la liberación de calcio mediatizada mediante agonistas, vía ensayos mediante FLIPR

En este ensayo funcional, se procedió a determinar la potencia funcional de compuesto de ensayo, como antagonista de los receptores hM₁, hM₃ y cM₅, mediante la medición de la capacidad del compuesto de ensayo, para inhibir los incrementos mediatizados mediante agonistas, en el calcio intracelular.

Se procedió a sembrar células CHO que expresaban de una forma estable los receptores, en placas de FLIPR de 96 pozos, la noche anterior a la que se procedió a realizar el ensayo. Las células sembradas, se lavaron dos veces con tampón FLIPR (10 mM HEPES, pH 7,4, 2 mM cloruro cálcico, 2,5 mM probenecida en solución de sal tamponada de Hank (HBSS), sin calcio ni magnesio (mediante la utilización de un sistema de lavado de células, de laboratorio, del tipo "Cellwash" (MTX Labsystems, Inc.), para retirar el medio de cultivo. Después de haber procedido al lavado, cada pozo, contenía 50 μl de tampón FLIPR. Se procedió, a continuación, a incubar las células, con 50 μl/pozo de FLUO-4AM (se preparó una solución 2 X) durante un transcurso de tiempo de 40 minutos, a una temperatura de 27°C, y 5% óxido de carbono. A continuación del transcurso de tiempo (días) de incubación, las células, se lavaron dos veces, con tampón FLIPR, dejando un volumen final de 50 μl, en cada pozo.

Se procedió a determinar la estimulación dependiente de la dosis de la liberación de Ca⁺ intracelular, de tal forma que, el compuesto de ensayo, pudiera medirse, frente la estimulación con oxotremorina, a una concentración de EC₉₀. En primer lugar, se procedió a incubar las células, con un tampón de dilución, durante un transcurso de tiempo de 20 minutos, y, a continuación, se procedió a añadir oxotremorina. Se generó un valor EC₅₀ para la oxotremorina, en concordancia con los datos de la sección de reducción facilitados posteriormente, abajo, conjuntamente con la

fórmula $EC_F = ((F/100-F)^{1/H}) * EC_{50}$. Se preparó una concentración de oxotremorina de $3 \times EC_{50}$, en placas de estimulación, de tal forma que, se añadiera, a cada pozo, en las placas de ensayo, una concentración de oxotremorina EC_{90} .

5 Los parámetros utilizados para el FLIPR, eran: una longitud de exposición de 0,4 segundos, una tensión de láser de 0,5 watt, una longitud de onda de excitación de 488 nm, y una emisión de longitud de onda de 550 nm. La línea básica, se determinó procediendo a medir el cambio en la fluorescencia, durante un transcurso de tiempo de 10 segundos, previamente a la adición de la oxotremorina. A continuación de la estimulación con oxotremorina, el FLIPR, midió, de una forma continua, el cambio de la fluorescencia, cada 0,5 segundos a 1 segundo, durante un transcurso de tiempo de 1,5 minutos, con objeto de capturar el cambio máximo de fluorescencia.

El cambio de fluorescencia, se expresó como el máximo de fluorescencia menos la fluorescencia de línea básica, para cada pozo. Se procedió a analizar los datos brutos, con respecto al logaritmo de la concentración del compuesto de ensayo, mediante regresión, no lineal, con el paquete de "software" informático del tipo "GraphPad Prism Software package" (de la firma GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), mediante la utilización de un modelo incorporado, para una respuesta sigmoideal con respecto a la dosis. Los valores K_{obs} del antagonista, se determinaron mediante Prisma, con la utilización de valor EC_{50} de oxotremorina, como el K_D , y un valor de EC_{90} de oxotremorina, para la concentración de ligandos, en concordancia con la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng & Prusoff, 1973).

20 En ese ensayo, un valor más bajo de K_{obs} , indica el hecho de que, el compuesto de ensayo tiene una mayor actividad funcional, para el receptor ensayado. Se encontró que, el 1-[2-(4-[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (compuesto IIa), tenía un valor de K_{obs} , menor de aproximadamente 10 nM, para el bloqueo de la liberación de calcio, mediatizada mediante agonistas, en las células CHO que expresaban, de una forma estable, los receptores hM_1 , hM_3 y cM_5 .

25 Ejemplo 15

Ensayo en microplacas del tipo Flashplate, de cAMP de células enteras, en líneas celulares HEK-293 y líneas celulares CHO, las cuales expresan, heterológicamente, los receptores β_1 -, β_2 - ó β_3 -adrenérgicos, humanos

30 Se realizaron ensayos de cAMP, en un formato de radioligandos, que utilizaba el sistema de activación de adenilil ciclasa de microplaca del tipo "flasplate", con [^{125}I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), en concordancia con las instrucciones del fabricante. Para la determinación de la potencia agonista (EC_{50}) de los receptores β_1 y β_2 , se cultivaron líneas celulares HEK-293, las cuales expresaban, de una forma estable, los receptores β_1 y β_2 , humanos, hasta la casi confluencia, en DMEM, suplementado con un porcentaje del 10% de PBS, y Genitcina (500 μ g/ml). Para la determinación de la potencia agonista del receptor β_3 (EC_{50}), se cultivó la línea celular CHO-K1, la cual expresaba receptores clonados humanos, o receptores β_3 -adrenérgicos, hasta la casi confluencia, en medio Hams F-12, suplementado con 10%FBS y Genitcina (250 μ l/mg). Las células, se lavaron con PBS, y se separaron en dPBS (Solución salina tamponado de fosfato, Dulbecco, $CaCl_2$ y $MgCl_2$), la cual contenía 2 mM EDTA ó una solución de Tripsina-EDTA (0,05% tripsina/0,53 mM EDTA). Después de proceder al recuento de células, en un contador de células Coulter, las células se granularon mediante centrifugación, a una velocidad angular de 1.000 revoluciones por minuto, y se volvieron a suspender en un tampón de estimulación, el cual contenía IBMX (equipo, a modo de "kit", de la firma PerkinElmer), precalentado, a la temperatura ambiente, a una concentración correspondiente a un rango comprendido dentro de unos márgenes que van desde $1,6 \times 10^6$ hasta $2,8 \times 10^6$ células/ml. En este ensayo, se utilizaron aproximadamente 40.000 a 80.000 células por pozo. Estos compuestos de ensayo (10 mM en DMSO), se diluyeron en PBS que contenía 0,1% BSA en Beckman Biomek-2000, y se sometieron a tests de ensayo, en 11 concentraciones diferentes, correspondientes a un rango comprendido dentro de unos márgenes que van desde 100 μ M a 1 pM. Las reacciones, se incubaron, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a una temperatura de 37°C, y se extinguieron (se pararon), mediante la adición de 100 μ l de tampón de detección que contenía [^{125}I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). La cantidad producida de cAMP (pmol/pozo), se calculó en base a los recuentos observados para las muestras y para los patrones estándar de cAMP, de la forma descrita por parte del manual del usuario proporcionado por el fabricante. Los datos, se analizaron mediante un análisis de regresión, no lineal, con el paquete de "software" informático del tipo "GraphPad Prism Software package" (de la firma GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), con la ecuación sigmoideal. Se utilizó la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y, y Prusoff WH, Biochemical Pharmacology, 1973, 22, 23, 3099-108), para calcular los valores de EC_{50} .

60 En ese ensayo, un valor más bajo de EC_{50} , indica el hecho de que, el compuesto de ensayo tiene una actividad funcional más alta, para el receptor ensayado. Se encontró que, el 1-[2-(4-[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (compuesto IIa), tenía un valor de EC_{50} , menor de aproximadamente 10 nM, para el receptor β_2 -adrenérgico; y un valor de EC_{50} , menor de aproximadamente 700 nM, para el receptor β_3 -adrenérgico.

65

Ejemplo 16

Ensayo en microplacas del tipo Flashplate, de cAMP de células enteras, con una línea celular epitelial del pulmón, que expresa, heterológicamente, el receptor β_2 -adrenérgico, humano

En este ensayo, se procedió a determinar la potencia antagonista y la actividad intrínseca de un compuesto de ensayo, mediante la utilización de una línea celular que expresaba niveles endógenos de células del receptor β_2 -adrenérgico. Se cultivaron células procedentes de la línea celular epitelial del pulmón, humana (BEAS-2B)(ATCC CRL-9609, American Type Culture Collection, Manassas, VA) (January B, et al., British Journal of Pharmacology, 1998, 123, 4, 701-11), haciéndolas crecer hasta un 75 - 90% de confluencia, en medio complete, exento de suero (medio LHC-9 que contenía epinefrina y ácido retinóico, de la firma Biosource International, Camarillo, CA). El día anterior al ensayo, el medio, se cambió al medio LHC-8 (sin epinefrina ni ácido retinóico, de la firma Biosource International, Camarillo, CA). Los ensayo de cAMP, de llevaron a cabo en un formato de radioinmunoensayo, mediante la utilización de un sistema de ensayo de activación de Flashplate Adenilil Ciclasa, en una microplaca del tipo Flashplate, con [125 I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), en concordancia con las instrucciones para el usuario, proporcionadas por el fabricante.

En el día del ensayo, las células, se lavaron con PBS, se estimularon, procediendo a rasparlas con 5mM EDTA en PBS, y se procedió a su recuento. Las células, se granularon, mediante centrifugación, a una velocidad angular de 1.000 revoluciones por minuto, y se volvieron a suspender en tampón de estimulación, pre-calentado a una temperatura de 37°C, a una concentración final de 600.000 células/ml. Las células, se utilizaron a una concentración final de 100.000 a 120.000 células/pozo, en este ensayo. Los compuestos de ensayo, se diluyeron, en serie, en el tampón de ensayo (75 mM Tris/HCl pH 7,4, a una temperatura de 25 °C, 12,5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 0,2% BSA) en Beckman Biomek-2000. Los compuestos de ensayo, se ensayaron, en este test de ensayo, en 11 concentraciones diferentes, correspondientes a un rango comprendido dentro de unos márgenes que van desde 10 μ M a 10 pM. Las reacciones, se incubaron, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, a una temperatura de 37°C, y se extinguieron (se pararon), mediante la adición de 100 μ l de tampón de detección, enfriado con hielo. Las placas, se sellaron, se incubaron durante el transcurso de toda la noche, a una temperatura de 4°C, y se procedió a su recuento, al día siguiente, en un contador de centelleo del tipo "Topcount scintillation counter (Packard BioScience Co., Meriden, CT). La cantidad producida de cAMP por ml de la reacción, se calculó en base a los recuentos observados para las muestras y para los patrones estándar de cAMP, de la forma descrita por parte del manual del usuario proporcionado por el fabricante. Los datos, se analizaron mediante un análisis de regresión, no lineal, con el paquete de "software" informático del tipo "GraphPad Prism Software package" (de la firma GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), utilizando el modelo de 4 parámetros, para una respuesta sigmoidal con respecto a la dosis.

En ese ensayo, un valor más bajo de EC₅₀, indica el hecho de que, el compuesto de ensayo tiene una actividad funcional más alta, para el receptor ensayado. Se encontró que, el 1-[2-(4-[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (compuesto IIa), tenía un valor de EC₅₀, menor de aproximadamente 10 nM, con un valor de actividad intrínseca mayor de 0,3, comparado con un agonista β_2 , completo, isoproterenol (1,0)

Ejemplo 17

Ensayo de Einthoven para la determinación la eficacia broncoprotectora y su duración

En este ensayo, se procedió a determinar la eficacia broncoprotectora y la duración, de los compuestos de ensayo, mediante la utilización de conejillos de indias. Este ensayo, se derivaba del procedimiento descrito en Einthoven (1892) Pflugers Arch. 51: 367 - 445; y Mohammed et al. (2000) Pulm Pharmacol Ther. 13(6):287-92. En este ensayo, los cambios en la presión de ventilación, sirven como una medición sustitutiva de la resistencia de las vías aéreas (vías respiratorias). A continuación del tratamiento previo con un compuesto de ensayo, se procedió a determinar la potencia antagonista muscarínica, mediante la utilización de curvas de la respuesta con respecto a la dosis de broncoconstrictor, a la metacolina intravenosas, en presencia de propranolol. De una forma similar, se procedió a determinar la potencia broncoprotectora β_2 , mediante la utilización de la histamina. La potencia broncoprotectora combinada, se determinó mediante la utilización de metacolina, en ausencia de propranolol.

El ensayo, se condujo mediante la utilización de conejillos de indias Duncan-Harley (Harlan, Indianapolis, IN), los cuales pesaban de 250 a 400 g. Se procedió a dosificar un compuesto de ensayo o vehículo (a saber, agua estéril), mediante inhalación (IH), durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, en una cámara de dosificación de exposición corporal (R+S Molds, San Carlos, CA), mediante la utilización de 5 ml de solución de dosificación. Los animales, se expusieron a un aerosol generado por un equipo nebulizador "LC Star Nebulizer Set" (Model 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA), conducido por una mezcla biológica del tipo "Bioblend" (una mezcla de 5% CO₂, 21% O₂; y 74% N₂), a una presión de 22 psi. Se evaluó la función pulmonar, en varios puntos de tiempo, después de la dosificación de la inhalación.

A los setenta y cinco minutos previos al inicio del ensayo, los conejillos de indias, se anestesiaron, con una inyección intramuscular (IM) de una mezcla de cetamina (43,7 mg/kg/xilazina (3,5 mg/kg)/acepromazina (1,05 mg/kg). Se procedió a administrar, según necesidades, una dosis suplemental de esta mezcla (50% de dosis inicial), según necesidades. La vena yugular y la arteria carótida, se aislaron, y éstas se canularon o intubaron con catéteres de polietileno cargados con solución salina, (micro-renatano, y PE-50, respectivamente, Beckton Dickinson, Sparks, MS). La arteria carótida, se conectó a un transductor de presión, para permitir la medición de la presión sanguínea y, la cánula de vena yugular, se utilizó para la inyección IV de metacolina o de histamina. Se procedió, a continuación, a la disección de la tráquea, y ésta se canuló (se intubó), con una aguja 14G (#NE-014, Small Parts, Miami Lakes, FL). Una vez que se hubo completado la canulación (intubación), los conejillos de indias, se ventilaron, mediante la utilización de un respirador juego de respirador (Modelo 683, Harvard Apparatus, Inc., MA), a un volumen de ataque de 1 ml/100 g de peso corporal, pero que, de todos modos, que no excediera de un volumen de 2,5 ml, a una tasa de 100 ataques por minuto. Se procedió a medir la presión de ventilación (VP), en la cánula de la tráquea, mediante la utilización de un transductor del tipo BioPac, conectado a un pre-amplificador Biopac (TSD 137°C). La temperatura corporal, se mantuvo a un nivel de 37°C, mediante la utilización de un tampón de calentamiento. Previamente al inicio de la recolección de datos, se procedió a administrar pentobarbital (25 mg/kg), intraperitonealmente (IP), para suprimir la respiración instantánea y obtener una línea de base estable. Se procedió a registrar los cambios en una interfase de recolección de datos, del tipo "Biopac Windows data collection interface". Los datos de la línea de base, se recolectaron durante un transcurso de tiempo de por lo menos 5 minutos, después de cuyo transcurso de tiempo, los conejillos de indias, se trataron IV, de una forma no acumulativa, con un incremento doble, de la dosis del broncoconstrutor (metacolina o histamina). Cuando se utilizó metacolina, como agente broncoprotector, los animales se trataron previamente con propranolol (5 mg/kg, IV), para aislar los efectos antimuscarínicos del compuesto de ensayo. El propranolol, se administró 30 minutos antes a la construcción de la curva de la respuesta con respecto a la dosis, a la metacolina o histamina. Los cambios en VP, se registraron, mediante la utilización de un sistema de software informático del tipo "Acknowledge Data Collection Software" (Santa Barbara, CA). Después de haberse completado el estudio, se procedió a eutanizar a los animales.

El cambio en la VP (presión de ventilación), se midió en cm de agua. Los cambios en VP (cm H₂O) = presión pico (después del la aplicación del broncoconstrutor) - presión de línea básica de pico. La curva de la respuesta con respecto a la dosis, de la metacolina o de la histamina, se ajustó a una ecuación logística de cuatro parámetros, mediante la utilización del GraphPad Prism, versión 3,00, para Windows (GraphPad Software, San Diego, California). Se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{(\log \text{ID}_{50} - x) \cdot \text{pendiente de Hill}})$$

en donde, X, es el logaritmo de la dosis, Y, es la respuesta, Y empieza en Min y se aproxima, asintóticamente, a Max, con una forma sigmoideal.

Se procedió a calcular, para cada dosis del compuesto de ensayo, el porcentaje de inhibición de la respuesta broncoconstrictora, a una dosis sub-máxima de metacolina o histamina, mediante la utilización de la siguiente ecuación:

% de inhibición de respuesta = 100 - ((presión pico (después del reto del broncoconstrutor, tratado) - presión de línea de base pico (tratado) * 100%) / (presión pico (después del reto del broncoconstrutor, agua) - presión de línea de base pico (agua) * 100). Las curvas de inhibición, se ajustaron, mediante la utilización de ecuación logística de cuatro parámetros, procedente del sistema de software informático "GraphPad software". Se procedió, también a estimar del valor de ID₅₀ (dosis requerida para producir el 50% de inhibición del broncoconstrutor) y el valor de E_{max} (inhibición máxima), allí en donde fuese apropiado.

Se procedió a determinar la magnitud de la broncoprotección, en diferentes puntos de tiempo, después de la inhalación del compuesto de ensayo, para estimar el tiempo de vida media farmacodinámica (PD T_{1/2}), mediante la utilización de un ajuste de regresión no lineal, utilizando un ecuación de degradación exponencial de una fase (GraphPad Prism, Versión 4,00): Y = Extensión * exp(-K * X) + Meseta; Inicios a Extensión + Meseta, y degradación con respecto a la Meseta, con una tasa constante K. El valor de PD T_{1/2} = 0,69/K. La meseta, se restringió a un valor de 0.

Después de un transcurso de tiempo de 1,5 horas, post-dosis, se encontró que, el 1-[2-(4-((R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino)metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa), tenía un valor de EC₅₀, menor de aproximadamente 50 µg/ml, para ambas, la broncoconstricción inducida mediante metacolina, y la broncoconstricción inducida mediante histamina.

Adicionalmente, además, este compuesto, producía una broncoprotección significativa, para un transcurso de tiempo de hasta 72 horas, cuando se éste se administraba a una dosis sub-máxima individual. En este ensayo, el salmeterol (3 µg/ml)(un agonista del receptor β₂-adrenérgico), exhibía una significativa broncoprotección, durante un transcurso de tiempo de 6 a 14 horas; y el tiotropio (10 µg/ml)(un antagonista del receptor muscarínico), exhibía una significativa broncoprotección, para un transcurso de tiempo superior a 72 horas.

Ejemplo 18

Ensayo de conejillos de indias, pletismográfico, para determinar la eficacia broncoprotectora y su duración

En este ensayo, se procedió a determinar la eficacia y la duración broncoprotectora de los compuestos de ensayo, mediante la determinación de un ensayo de conejillos de india.

Se procedió a identificar individualmente, grupos de 6 conejillos de indias macho (Duncan-Hartley (HsdPoc:DH) Harlan, Madison, WI), los cuales tenían un peso comprendido entre 250 g y 350 g, mediante tarjetas para jaulas. Durante la totalidad del estudio, desde el principio hasta al final, se permitió el libre acceso de los animales, a los alimentos y al agua, ad libitum. Los compuestos de ensayo, se administraron vía inhalación, en un transcurso de tiempo de 10 minutos, en una cámara de dosificación, con exposición del cuerpo antero. (R&S Molds, San Carlos, CA). Las cámaras de dosificación, se organizaron de tal forma que se suministrara simultáneamente un aerosol, vía la inhalación, a seis cámaras individuales, desde el distribuidor central. Los conejillos de indias, se expusieron a un aerosol de un compuesto de ensayo o de un vehículo (WFI). Los aerosoles, se generaron a partir de soluciones acuosas, mediante la utilización de un equipo respiratorio con juego nebulizador del tipo "LC Star Nebulizer Set" (Modelo 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA), conducido por una mezcla de gases ($\text{CO}_2 = 5\%$, $\text{O}_2 = 21\%$ y $\text{N}_2 = 74\%$), a una presión de 22 psi. El flujo de gas, a través del nebulizador, a esta presión operativa, era de aproximadamente 3 litros por minuto. Los aerosoles generados, se condujeron al interior de las cámaras, mediante una presión positiva. No se utilizó ninguna dilución de ariá, durante el suministro de las soluciones en forma de aerosol. Durante el transcurso de los 10 minutos de nebulización, se nebulizaron aproximadamente 1,8 ml de solución. Este valor, se midió gravimétricamente, procediendo a comparar los pesos pre-nebulización y post-nebulización del nebulizador cargado.

Los efectos broncoprotectores de los compuestos de ensayo, administrados vía inhalación, se evaluaron mediante la utilización de pletismografía del cuerpo entero, a unos intervalos de tiempo de 1,5 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas post-dosis. A los cuarenta y cinco minutos previos al inicio de la evolución pulmonar, cada conejillo de indias, se anestesió, vía una inyección intramuscular de cetamina (43,75 mg/kg), xilazina (3,50 mg/kg) y acepromazina (1,05 mg/kg). El sitio quirúrgico, se afeitó y se limpió con alcohol al 70%, y se realizó a un incisión de 2, a 3 cm de la línea media, del aspecto ventral del cuello. La vena yugular, se aisló y se canuló (se intubó) con un catéter de polietileno cargado con solución salina (PE-50, Becton Dickinson, Sparks, MD), para permitir la infusiones intravenosas de la acetilcolina o histamina en solución salina. Se procedió, a continuación, a diseccionar libremente y a entubar la tráquea, con un tubo 14G de teflón (#NE- 014, Small Parts, Miami Lakes, FL). En caso necesario, se mantuvo la anestesia mediante inyecciones intramusculares adicionales, de la mezcla anestésica. La profundidad de la anestesia, se controló y se ajustó, si el animal respondía al pellizcado en su pata, si la tasa respiratoria, era superior a las 100 respiraciones por minuto.

Una vez que se hubieron completado las canulaciones (intubaciones), el animal, se emplazó en un pletismógrafo (#PLY3114, Buxco Electronics, Inc., Sharon, CT) y se procedió a insertar una cánula de presión esofágica, (PE-160, Becton Dickinson, Sparks, MD), para medir la presión de conducción pulmonar. El tubo traqueal de teflón, se unió a la apertura del pletismógrafo, para permitir que el conejillo de indias respirara aire de entorno medioambiental procedente del exterior de la cámara. Se procedió, a continuación, a sellar la cámara. Se utilizó una lámpara de calentamiento, para mantener la temperatura corporal, y se procedió a llenar tres veces los pulmones de los conejillos de indias, con 4 ml de aire, mediante la utilización de una jeringa de de calibración, de 10 ml (#5520 Series, Hans Rudolph, Kansas City, MO), con objeto de asegurar el hecho de que no se colapsaran las vías respiratorias inferiores y que el animal no sufriera por la hiperventilación.

La evaluación pulmonar, se inició después de determinar los valores de línea básica, dentro de unos márgenes comprendidos dentro de unos márgenes que iban desde los 0,3 ml hasta los 0,9 ml por cm de H_2O , para la condescendencia de conformidad, y dentro de unos márgenes que iban desde los 0,1 hasta los 0,199 cm H_2O por ml por segundo, para la resistencia. Se procedió a utilizar un programa computerizado de medición pulmonar del tipo Buxco, para la recolección y la derivación de los valores pulmonares. El inicio del programa, inició el protocolo experimental y la recolección de datos. Se procedió a medir los cambios en el volumen, con respecto al tiempo, que habían acontecido dentro del pletismógrafo, con cada respiración, vía un transductor de presión del tipo Buxto. Mediante la integración de esta señal, con respecto al tiempo, se procedió a calcular una medición del flujo, para cada respiración. Esta señal y los cambios de la conducción pulmonar, mediante la utilización de un transductor de presión del tipo Sensym (TRD4100), se conectaron, vía un pre-amplificador del tipo Buxco (MAX 2270), a una interfase de recolección de datos (SFT3400 y SFT3813). La totalidad de los otros parámetros pulmonares, se derivan de estas dos entradas (de señales).

Los valores de línea de base, se recolectaron durante un transcurso de tiempo de 5 minutos, después de cuyo transcurso de tiempo, los conejillos de indias, se estimularon, bien ya sea con acetilcolina o bien ya sea con histamina. Cuando se evaluaron los efectos de los antagonistas muscarínicos de un compuesto de ensayo, se procedió a administrara propanolol (5 mg/Kg, iv) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), en un transcurso de tiempo de

15 minutos, previamente al tratamiento con acetilcolina. La acetilcolina, se infundió intravenosamente, (Sigma-Aldrichoras, St. Louis, MO) (0,1 mg/ml), durante un transcurso de tiempo de 1 minuto, desde una bomba de jeringa (sp210iw, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, Fl), a las siguientes dosis, y los siguientes tiempos de prescripción, a partir del inicio del experimento: a razón de 1,9 µg/minuto, a los 5 minutos, a razón de 3,8 µg/minuto, a los 10 minutos, a razón de 7,5 µg/minuto, a los 15 minutos, a razón de 15,0 µg/minuto, a los 20 minutos, a razón de 30 µg/minuto, a los 25 minutos y a razón de 60 µg/minuto a los 30 minutos. De una forma alternativa, se procedió a valorar efectos del compuesto de ensayo, en el modelo de estimulación con acetilcolina, sin el tratamiento previo con propanolol.

Cuando se valoraron los efectos del receptor β₂-adrenérgico del compuesto de ensayo, se infundió histamina (25 µg/ml) (Sigma-Aldrichoras, St. Louis, MO), intravenosamente, durante un transcurso de tiempo de 1 minuto, desde una bomba de jeringa, a las siguientes dosis, y los siguientes tiempos de prescripción, a partir del inicio del experimento: a razón de: a razón de 0,5 µg/minuto, a los 5 minutos, a razón de 0,9 µg/minuto, a los 10 minutos, a razón de 1,9 µg/minuto, a los 15 minutos, a razón de 3,8 µg/minuto, a los 20 minutos, a razón de 7,5 µg/minuto, a los 25 minutos y a razón de 15 µg/minuto, a los 30 minutos. Si la resistencia o la conformidad de condescendencia no volvía a los valores de línea de base, después de un transcurso de tiempo de 3 minutos, a continuación de cada dosis de acetilcolina o histamina, los pulmones de los conejillos de indias, se inflaron, tres veces, con 4 ml de aire, desde una jeringa de calibración de 10 ml. Los parámetros pulmonares registrados, incluían la frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto), la conformidad de condescendencia (mol por cm H₂O) y la resistencia pulmonar (cm H₂O por ml, por segundo). Una vez que se hubieron completado las mediciones de la función pulmonar, en el minuto 35 de este protocolo, el conejillo de indias, se retiró del pletismógrafo, y se eutanzaron mediante asfixia con dióxido de carbono.

Los datos, se evaluaron de una o dos formas:

(a) Se procedió a calcular la resistencia pulmonar (R_L)(cm H₂O por ml por Segundo), a partir del factor de relación del cambio en la presión, con respecto al cambio en el flujo). Se procedió a computar la respuesta de la R_L a la acetilcolina (60 µg/minuto, IH), para el vehículo y el compuesto de ensayo. Se procedió a calcular La respuesta media a la acetilcolina, en los animales tratados con el vehículo, a cada tiempo de tratamiento previo, y ésta se utilizó para computar el porcentaje de inhibición de la respuesta de acetilcolina, al correspondiente tiempo de tratamiento previo, a cada dosis de compuesto de ensayo. Se ajustaron las curvas de inhibición de la respuesta con respecto a la dosis, para 'R_L', con una ecuación logística de cuatro parámetros, mediante la utilización de un sistema de software informático del tipo "GraphPad Prism, version 3,00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California), para estimar el valor broncoprotector ID₅₀ (dosis requerida para inhibir la acetilcolina (60 µg/minuto)(respuesta de broncorestricción al 50%). Se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y = \text{Min} + (\text{Max} - \text{Min}) / (1 + 10^{(\log \text{ID}_{50} - x) \cdot \text{pendiente de Hill}})$$

en donde, X, es el logaritmo de la dosis, Y, es la respuesta (porcentaje de inhibición del incremento en R_L, inducido por acetilcolina), Y empieza en Min y se aproxima, asintóticamente, a Max, con una forma sigmoideal.

(b) La cantidad de PD₂, la cual se define como la cantidad de acetilcolina o de histamina necesaria para provocar un valor doble de la resistencia pulmonar de línea de base, se calculó mediante los valores de la resistencia pulmonar, derivados del flujo y de la presión con respecto a los rangos de estimulación con acetilcolina o con histamina, mediante la utilización de la siguiente ecuación (la cual se derivó a partir de la ecuación utilizada para calcular los valores de PC₂₀, descritos en American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing, - Sociedad Americana de toracidad. Guía para el ensayo con metacolina y para los ejercicios de estimulación con ésta -, 1999. Am JRespir Crit Care Med. 2000; 161: 309-329):

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

en donde,

C₁ = Concentración de acetilcolina o histamina que precede a C₂

C₂ = Concentración de acetilcolina o histamina resultante en por lo menos un incremento de dos veces en la resistencia pulmonar (R_L)

R₀ = valor de R_L de línea de base

R₁ = valor de R_L después de C₁

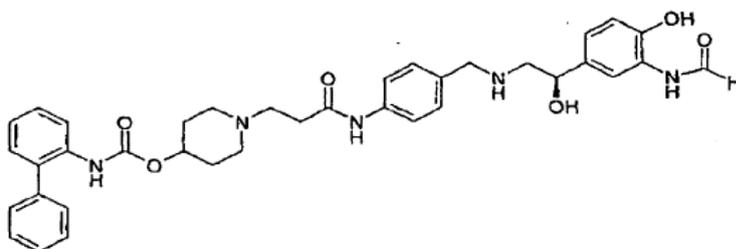
R₂ = valor de R_L después de C₂

Los valores estadísticos de los datos, se realizaron mediante la utilización de un “test de ensayo t de dos colas” (two tailed Students t-test). Un valor de $P < 0,05$, se consideró como significativo.

5 En este ensayo, se ensayó el Compuesto 50 descrito en el documento de publicación de patente estadounidense nº US 2004/0167167A1, publicado en fecha 21 de Agosto del 2004. La estructura química del compuesto 50, es la siguiente:

10

15



20

Ejemplo comparativo 50

este compuesto, está exento de los grupos alquilo presentes en el anillo fenilo de los compuestos de la presente invención. En este ensayo, los compuestos 50, no mostraron una broncoprotección significativa, a las 24 horas post-dosis, por dosis, correspondiente a un rango comprendido dentro de unos márgenes que iban desde los 3 $\mu\text{g/ml}$ hasta los 300 $\mu\text{l/ml}$. Los valores de PD_{2x}, para el compuesto 50, a las 24 horas, eran similares a los del grupo de los vehículos (agua).

25

30

En este ensayo, el salmeterol (100 $\mu\text{g/ml}$) (un agonista del receptor β_2 -adrenérgico, exhibía una significativa broncoprotección, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 24 horas; y el tiotropio (10 $\mu\text{g/ml}$)(un antagonista del receptor muscarínico), exhibía una significativa broncoprotección, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 24 horas.

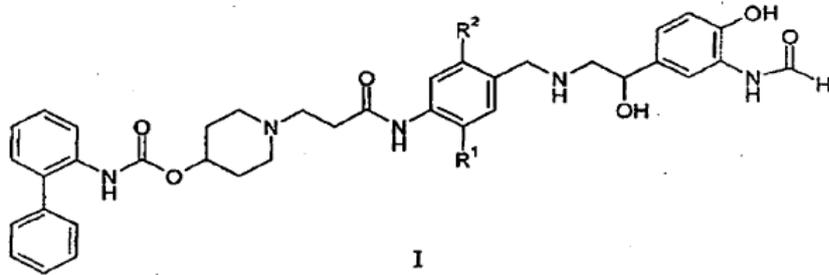
35

REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto de la fórmula I

5

10



I

en donde,
 R^1 , es metilo ó etilo;
 R^2 , es metilo ó etilo;
 o una sal o solvato o estereoisómero de éste, farmacéuticamente aceptables.

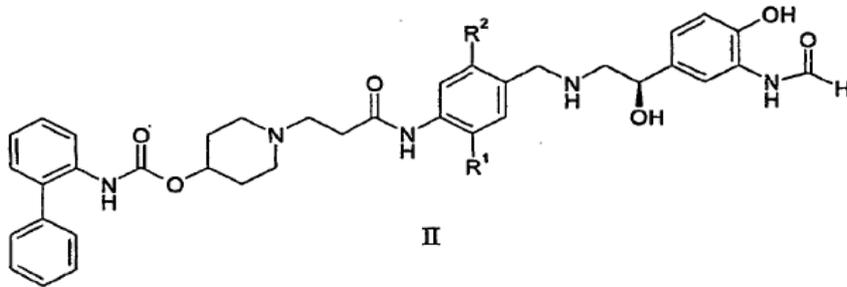
15

2.- Un compuesto de la reivindicación 1, que tiene la fórmula II:

20

25

30



II

en donde,
 R^1 , es metilo ó etilo;
 R^2 , es metilo ó etilo;
 o una sal de éste, farmacéuticamente aceptable.

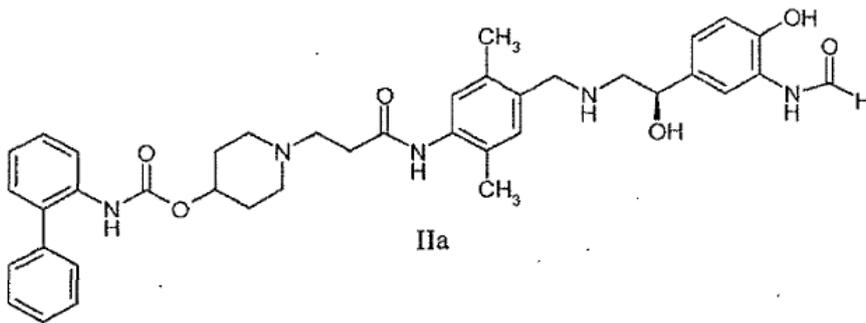
35

3.- Un compuesto de la reivindicación 1, que tiene la fórmula IIa:

40

45

50

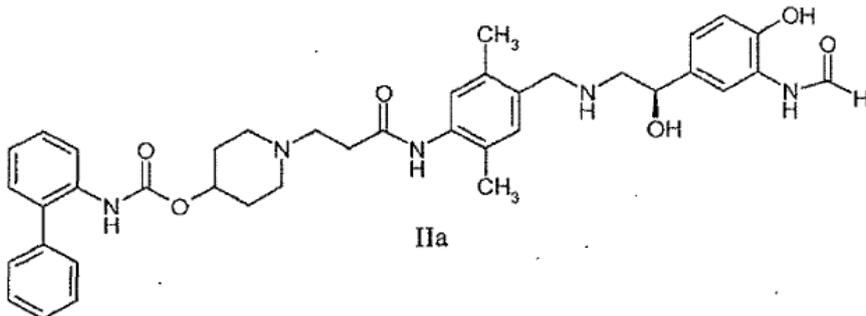


IIa

4.- Un compuesto de la reivindicación 1, en donde, el compuesto, es una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de la fórmula II:

55

60



IIa

65

5.- Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un portador o soporte farmacéuticamente aceptable y un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6.- Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende:

- (a) un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
- (b) un agente esteroideo, antiinflamatorio; y
- (c) un portador o soporte farmacéuticamente aceptable.

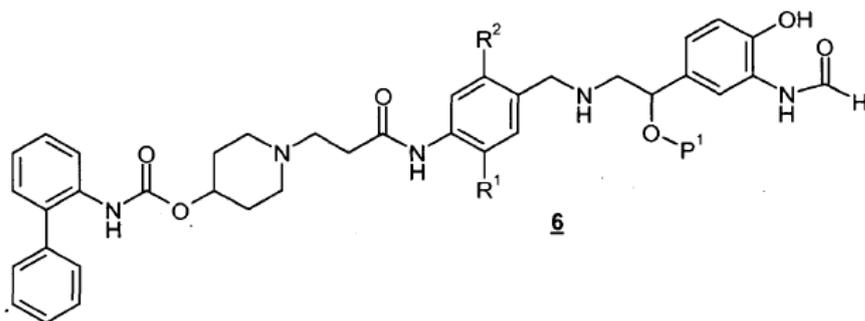
7.- Una combinación de agentes terapéuticos, que comprende:

- (a) un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
- (b) un agente esteroideo, antiinflamatorio.

8.- Un equipo, a modo de "kit", que comprende:

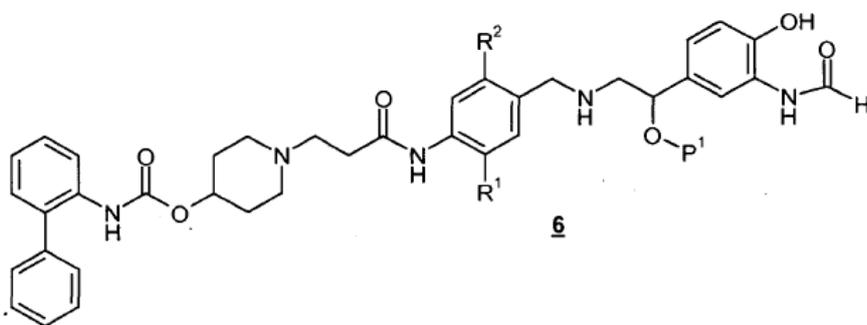
- (a) una primera composición farmacéutica, que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un primer portador o soporte farmacéuticamente aceptable; y
 - (b) una segunda composición farmacéutica, que comprende un agente esteroideo antiinflamatorio y un segundo portador o soporte, farmacéuticamente aceptable;
- en donde, la primera y la segunda composiciones farmacéuticas, son composiciones farmacéuticas separadas.

9.- Un procedimiento para preparar el compuesto de la reivindicación 1, comprendiendo, el procedimiento, la desprotección de un compuesto de la fórmula 6:



en donde, P¹, es un grupo protector de hidroxilo, para proporcionar el compuesto de la fórmula 1.

10.- Un intermediario, para preparar un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde, el intermediario, es un compuesto de la fórmula III:



en donde,

Y¹, se selecciona de entre -CHO, -CN, -CH₂OH, -CH(OR^{3a})OR^{3b}, -C(O)OH, -C(O)OR^{3c}, bromo y yodo, en donde, R^{3a} y R^{3b}, se seleccionan, de una forma independiente, de entre alquilo C₁₋₆, ó R^{3a} y R^{3b}, se unen, para formar un alquileno C₂₋₆, R^{3c}, se selecciona de entre alquilo C₁₋₆;

R¹, es metilo ó etilo;

R², es metilo ó etilo;

o una sal o estereoisómero de éste.

11.- El compuesto de la reivindicación 10, en donde, R¹ y R², son metilo.

12.- El compuesto de la reivindicación 10 ó la reivindicación 11, en donde, Y¹, es –CHO.

5 13.- Un compuesto de la reivindicación 4, en donde, el compuesto, es la sal del ácido L-tartárico del 1-[2-(4-[[*(R)*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil]-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-il éster del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

14.- Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en terapia.

10 15.- Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno pulmonar.