

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 967**

51 Int. Cl.:
A61K 31/428 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08702047 .5**
96 Fecha de presentación: **06.02.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2117542**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.11.2009**

54 Título: **COMBINACIONES DE BENZOTIAZOL AGONISTA DEL ADRENORRECEPTOR BETA 2.**

30 Prioridad:
08.02.2007 GB 0702456

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.11.2011

73 Titular/es:
AstraZeneca AB
151 85 Södertälje, SE

72 Inventor/es:
CADOGAN, Elaine Bridget;
CONNOLLY, Stephen;
NICHOLLS, David, John;
WILEY, Katherine, Elisabeth y
YOUNG, Alan

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 368 967 T3

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

DESCRIPCIÓN

Combinaciones de benzotiazol agonista del adrenorreceptor beta 2

La presente invención se refiere a una combinación de dos o más sustancias farmacéuticamente activas para el uso en el tratamiento de enfermedades respiratorias (por ejemplo, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) o asma).

La función esencial de los pulmones requiere una estructura frágil con una exposición enorme al medio, que incluye contaminantes, microbios, alérgenos y carcinógenos. Los factores del hospedador, que son el resultado de las interacciones de las opciones del estilo de vida y de la composición genética, influyen en la respuesta a esta exposición. La lesión o la infección de los pulmones puede dar lugar a una amplia diversidad de enfermedades del sistema respiratorio (o enfermedades respiratorias). Varias de estas enfermedades tienen una gran importancia para la salud pública. Las enfermedades respiratorias incluyen la lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), enfermedad pulmonar ocupacional, cáncer de pulmón, tuberculosis, fibrosis, neumoconiosis, neumonía, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y asma.

Entre las enfermedades respiratorias más habituales está el asma. El asma se define en general como un trastorno inflamatorio de las vías respiratorias con síntomas clínicos que se presentan por la obstrucción intermitente del flujo de aire. Se caracteriza clínicamente por paroxismos de sibilancia, disnea y tos. Es un trastorno incapacitante crónico que parece estar incrementándose en prevalencia y gravedad. Se estima que un 15% de niños y un 5% de adultos en la población de los países desarrollados padecen asma. La terapia se debería dirigir, por lo tanto, a controlar los síntomas de forma que sea posible llevar una vida normal, y a la vez proporcionar una base para el tratamiento de la inflamación subyacente.

EPOC es un término que se refiere a un gran grupo de enfermedades pulmonares que pueden interferir con la respiración normal. Las directrices clínicas actuales definen EPOC como un estado patológico caracterizado por una limitación del flujo de aire que no es completamente reversible. La limitación del flujo de aire normalmente es progresiva y está asociada a una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones hacia partículas y gases nocivos. La fuente más importante que contribuye a tales partículas y gases, al menos en el mundo occidental, es el humo de tabaco. Los pacientes de EPOC tienen una diversidad de síntomas, que incluyen tos, disnea, y producción excesiva de esputo; tales síntomas surgen de la disfunción de varios compartimientos celulares, que incluyen neutrófilos, macrófagos y células epiteliales. Las dos afecciones más importantes cubiertas por EPOC son la bronquitis crónica y el enfisema.

La bronquitis crónica es una inflamación de larga duración de los bronquios que provoca una producción incrementada de mucosidad y otros cambios. Los síntomas de los pacientes son tos y expectoración de esputo. La bronquitis crónica puede conducir a infecciones respiratorias más frecuentes y graves, al estrechamiento y la obstrucción de los bronquios, disnea y discapacidad.

El enfisema es una enfermedad pulmonar crónica que afecta a los alveolos y/o los extremos de los bronquiolos. El pulmón pierde su elasticidad y, por lo tanto, estas áreas de los pulmones se agrandan. Estas áreas agrandadas atrapan el aire de espiración y no lo intercambian de manera eficaz por aire fresco. Esto da como resultado una respiración difícil, y puede dar como resultado un transporte de oxígeno insuficiente a la sangre. El síntoma predominante en los pacientes de enfisema es la disnea.

Los agentes terapéuticos usados en el tratamiento de las enfermedades respiratorias incluyen los corticoesteroides. Los corticoesteroides (también conocidos como glucocorticoesteroides o glucocorticoides) son agentes antiinflamatorios potentes. Aunque su mecanismo de acción exacto no está claro, el resultado final del tratamiento con corticoesteroides es una disminución del número, actividad y movimiento de células inflamatorias hacia la submucosa bronquial, lo que conduce a una sensibilidad disminuida de las vías respiratorias. Los corticoesteroides pueden provocar también una reducción de la descamación del tapizado epitelial bronquial, la permeabilidad vascular, y la secreción mucosa. Aunque el tratamiento con corticoesteroides puede proporcionar beneficios importantes, a menudo la eficacia de estos agentes está lejos de ser satisfactoria, en particular en EPOC. Además, aunque el uso de esteroides puede conducir a efectos terapéuticos, es deseable poder usar los esteroides a dosis bajas para minimizar la aparición y la gravedad de efectos secundarios indeseables que pueden estar asociados a la administración habitual. Los estudios recientes también han destacado el problema de la adquisición de resistencia a esteroides entre los pacientes que padecen enfermedades respiratorias. Por ejemplo, se ha descubierto que los fumadores de cigarrillos con asma son insensibles a la terapia con corticoesteroides inhalados a corto plazo, pero la disparidad de las respuestas entre los fumadores y los no fumadores parece reducirse con los corticoesteroides inhalados a dosis elevadas (Tomlinson et al., Thorax 2005;60:282-287).

Una clase adicional de agente terapéutico usado en el tratamiento de las enfermedades respiratorias son los broncodilatadores. Los broncodilatadores se pueden usar para aliviar los síntomas de las enfermedades respiratorias relajando los músculos lisos bronquiales, reduciendo la obstrucción de las vías respiratorias, reduciendo la hiperdistensión pulmonar y disminuyendo la disnea. Los tipos de broncodilatadores de uso clínico incluyen los agonistas de adrenoceptores β_2 , antagonistas de receptores muscarínicos y metilxantinas. Los broncodilatadores se

prescriben principalmente para el alivio sintomático, y no se considera que alteren la progresión de las enfermedades respiratorias.

N-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida y sus sales de dihidrocloruro y dihidrobromuro son agonistas de adrenoceptores β_2 , y se describen en el documento PCT/SE2006/000927 (publicado como el documento WO2007/018461, véanse los Ejemplos 7, 15 y 16). El compuesto y sus sales muestran una selectividad de al menos 10 veces por el agonismo de adrenoceptores β_2 respecto de las actividades adrenérgica α_1D , adrenérgica β_1 y dopamina D2.

Hay disponibles productos combinados que comprenden un agonista de adrenoceptores β_2 y un corticoesteroide. Uno de tales productos es una combinación de budesonida y fumarato de formoterol (comercializado por AstraZeneca con el nombre comercial Symbicort®), que se ha demostrado que es eficaz para controlar el asma y EPOC, y para mejorar la calidad de vida de muchos pacientes.

En vista de la complejidad de las enfermedades respiratorias, tales como asma y EPOC, es improbable que ningún mediador pueda tratar de manera satisfactoria la enfermedad por sí solo. Además, aunque los tratamientos combinados que usan un agonista de adrenoceptores β_2 y un corticoesteroide proporcionan beneficios significativos a los pacientes, sigue existiendo una necesidad médica de terapias nuevas contra las enfermedades respiratorias, tales como asma y EPOC, en particular para terapias con un potencial modificador de la enfermedad.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un producto farmacéutico que comprende, en combinación, un primer ingrediente activo que es dihidrobromuro de *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida, y un segundo ingrediente activo que es un antagonista muscarínico que es bromuro de Aclidinio, Glicopirrolato (tal como bromuro de R,R-, R,S-, S,R-, o S,S-glicopirronio), bromuro de Oxitropio, Pirenzepina, telenzepina o bromuro de Tiotropio.

En un aspecto particular, la presente invención proporciona un producto farmacéutico en el que el primer y el segundo ingredientes activos están en formas adecuadas para la administración oral (por ejemplo para la administración en los pulmones y/o las vías respiratorias).

El producto farmacéutico de la presente invención comprende un primer ingrediente activo y un segundo ingrediente activo, y puede comprender un tercer ingrediente activo. El tercer ingrediente activo se puede elegir de la lista de segundos ingredientes activos, pero normalmente tendría un mecanismo de acción diferente. Así, por ejemplo, el tercer ingrediente activo podría ser: un agonista de receptores de glucocorticoesteroides no esteroideo, corticoesteroide, un antagonista de CCR1 o un inhibidor de PDE4.

El primer y segundo ingredientes activos se pueden administrar de manera simultánea (en una única preparación farmacéutica {es decir, los ingredientes activos están en una mezcla} o por medio de preparaciones diferentes), o secuencial o por separado por medio de preparaciones farmacéuticas diferentes.

En un aspecto particular, la presente invención proporciona un producto farmacéutico que comprende el primer y segundo ingredientes activos en una mezcla. De manera alternativa, el producto farmacéutico puede ser, por ejemplo, un equipo que comprende una preparación del primer ingrediente activo y una preparación del segundo ingrediente activo y, opcionalmente, instrucciones para la administración simultánea, secuencial o por separado de las preparaciones a un paciente que lo necesita.

En un aspecto de la invención, el antagonista de receptores muscarínicos es un antagonista de receptores muscarínicos con actividad prolongada, es decir, un antagonista de receptores muscarínicos con una actividad que persiste durante más de 12 horas. Los ejemplos de antagonistas de receptores muscarínicos con actividad prolongada incluyen el bromuro de tiotropio.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto farmacéutico que comprende, en combinación, un primer ingrediente activo que es dihidrobromuro de *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida, y un segundo ingrediente activo que es bromuro de Tiotropio.

El primer ingrediente activo y el segundo ingrediente activo del producto farmacéutico de la presente invención se pueden administrar de manera simultánea, secuencial o por separado para tratar las enfermedades respiratorias. Simultáneamente significa que los ingredientes activos están en una mezcla, o que podrían estar en cámaras separadas del mismo inhalador. Secuencial significa que los ingredientes activos se administran, en cualquier orden, uno inmediatamente después del otro. Todavía tienen el efecto deseado si se administran por separado, pero cuando se administran de esta manera se administran generalmente con una separación menor de 4 horas, convenientemente una separación menor de dos horas, más convenientemente una separación menor de 30 minutos, y lo más convenientemente una separación menor de 10 minutos, por ejemplo menor de 10 minutos pero no inmediatamente el uno después del otro.

Los ingredientes activos de la presente invención se pueden administrar mediante administración oral o parenteral (p.ej. intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraarticular) mediante el uso de formas farmacéuticas sistémicas convencionales, tales como comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, soluciones o suspensiones acuosas u oleosas, emulsiones y soluciones o suspensiones acuosas u oleosas inyectables estériles. Los ingredientes activos se pueden administrar en el pulmón y/o las vías respiratorias mediante administración oral en forma de una formulación en solución, suspensión, aerosol o polvo seco. Estas formas farmacéuticas incluirán normalmente uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables que se pueden seleccionar, por ejemplo, de un adyuvante, vehículo, aglutinante, lubricante, diluyente, agente estabilizante, agente tamponador, agente emulsionante, agente regulador de la viscosidad, tensoactivo, conservante, aroma o colorante. Como entenderán los expertos en la técnica, el método de administración más adecuado de los ingredientes activos dependerá de varios factores.

En otra realización, el primer y segundo ingredientes activos se administran por medio de una única composición farmacéutica (es decir, el primer y segundo ingredientes activos están en una mezcla). Por lo tanto, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende, en una mezcla, un primer ingrediente activo que es dihidrobromuro de *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida, y un segundo ingrediente activo como se definió anteriormente. La composición farmacéutica comprende opcionalmente además un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar mezclando el primer ingrediente activo con el segundo ingrediente activo y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, en un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica, que comprende mezclar el primer y segundo ingredientes activos y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se entenderá que la dosis terapéutica de cada ingrediente activo administrado de acuerdo con la presente invención variará dependiendo del ingrediente activo particular empleado, el modo mediante el cual se va a administrar el ingrediente activo, y la afección o el trastorno a tratar.

En una realización de la presente invención, el primer ingrediente activo se administra por medio de inhalación. Cuando se administra por medio de inhalación, la dosis del primer ingrediente activo estará en general en el intervalo de 0,1 microgramos (μg) a 5000 μg , 0,1 a 1000 μg , 0,1 a 500 μg , 0,1 a 100 μg , 0,1 a 50 μg , 0,1 a 5 μg , 5 a 5000 μg , 5 a 1000 μg , 5 a 500 μg , 5 a 100 μg , 5 a 50 μg , 5 a 10 μg , 10 a 5000 μg , 10 a 1000 μg , 10 a 500 μg , 10 a 100 μg , 10 a 50 μg , 20 a 5000 μg , 20 a 1000 μg , 20 a 500 μg , 20 a 100 μg , 20 a 50 μg , 50 a 5000 μg , 50 a 1000 μg , 50 a 500 μg , 50 a 100 μg , 100 a 5000 μg , 100 a 1000 μg o 100 a 500 μg . La dosis se administrará en general de 1 a 4 veces al día, convenientemente una o dos veces al día, y lo más convenientemente una vez al día.

En una realización de la presente invención, el segundo ingrediente activo se administra mediante inhalación. Cuando se administra por medio de inhalación, la dosis del segundo ingrediente activo estará en general en el intervalo de 0,1 microgramos (μg) a 5000 μg , 0,1 a 1000 μg , 0,1 a 500 μg , 0,1 a 100 μg , 0,1 a 50 μg , 0,1 a 5 μg , 5 a 5000 μg , 5 a 1000 μg , 5 a 500 μg , 5 a 100 μg , 5 a 50 μg , 5 a 10 μg , 10 a 5000 μg , 10 a 1000 μg , 10 a 500 μg , 10 a 100 μg , 10 a 50 μg , 20 a 5000 μg , 20 a 1000 μg , 20 a 500 μg , 20 a 100 μg , 20 a 50 μg , 50 a 5000 μg , 50 a 1000 μg , 50 a 500 μg , 50 a 100 μg , 100 a 5000 μg , 100 a 1000 μg o 100 a 500 μg . La dosis se administrará en general de 1 a 4 veces al día, convenientemente una o dos veces al día, y lo más convenientemente una vez al día.

En otra realización, la presente invención proporciona un producto farmacéutico en el que la proporción molar del primer ingrediente activo respecto del segundo ingrediente activo es de 1:1000 a 1000:1, tal como de 1:100 a 100:1, por ejemplo de 1:50 a 50:1, por ejemplo 1:20 a 20:1.

En una realización, la presente invención proporciona un producto farmacéutico que comprende, en combinación, un primer ingrediente activo como se definió anteriormente, y un segundo ingrediente activo como se definió anteriormente, en el que cada ingrediente activo se formula para la administración mediante inhalación. En un aspecto adicional de esta realización, el producto farmacéutico está en forma de una composición farmacéutica que comprende el primer y segundo ingredientes activos en una mezcla, y cuya composición se formula para la administración mediante inhalación.

Los ingredientes activos de la presente invención se administran convenientemente por medio de administración oral mediante inhalación en el pulmón y/o las vías respiratorias en forma de una formulación en solución, suspensión, aerosol o polvo seco (tal como un aglomerado o una mezcla ordenada). Por ejemplo, se puede usar un dispositivo inhalador de dosis medidas para administrar los ingredientes activos, dispersos en un propelente adecuado y con o sin un excipiente adicional tal como etanol, un tensoactivo, lubricante o agente estabilizante. Un propelente adecuado incluye un propelente de hidrocarburo, clorofluorocarbono o un hidrofluoroalcano (p.ej. heptafluoroalcano), o una mezcla de cualquiera de tales propelentes, por ejemplo en un inhalador de dosis medidas presurizado (pMDI). Los propelentes preferidos son P134a y P227, cada uno de los cuales se puede usar solo o en combinación con otro propelente y/o tensoactivo y/o otro excipiente. También se puede emplear una suspensión o, preferiblemente, disolución acuosa nebulizada, con o sin un ajuste adecuado del pH y/o la tonicidad, en forma de una formulación de dosis unitaria o multidosis. Un dispositivo adecuado para administrar un polvo seco es Turbuhaler®.

El producto farmacéutico de la presente invención, por ejemplo, se puede administrar: por medio de un inhalador que tiene el primer y segundo ingredientes activos en cámaras separadas del inhalador, de forma que en la administración los ingredientes activos se mezclan en la boquilla del inhalador o en la boca del paciente o en ambos (para el uso simultáneo); o, cuando el primer y segundo ingredientes activos están en inhaladores diferentes, por medio de inhaladores diferentes (para el uso por separado o secuencial); o el primer y segundo ingredientes activos están en una mezcla en un inhalador cuando el inhalador se suministra a un paciente (para el uso simultáneo).

Se puede usar un inhalador de polvo seco para administrar los ingredientes activos, solos o en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable (tal como lactosa), en este último caso en forma de un polvo finamente dividido o en forma de una mezcla ordenada. El inhalador de polvo seco puede ser de una única dosis o multi-dosis, y puede utilizar un polvo seco o una cápsula que contiene un polvo.

Se conocen muy bien los dispositivos inhaladores de dosis medidas, nebulizadores e inhaladores de polvos secos, y hay disponible una diversidad de tales dispositivos.

El producto farmacéutico de la presente invención se puede usar para tratar enfermedades del aparato respiratorio tales como enfermedades obstructivas de las vías respiratorias que incluyen: asma, que incluye asma bronquial, alérgica, intrínseca, extrínseca, inducida por el ejercicio, inducida por fármacos (que incluye la inducida por aspirina y por NSAID) e inducida por polvo, tanto intermitente como persistente y de todas las gravedades, y otras causas de hipersensibilidad de las vías respiratorias; enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); bronquitis, que incluye la bronquitis infecciosa y eosinofílica, y bronquitis crónica; enfisema; bronquiectasia; fibrosis quística; sarcoidosis; pulmón del granjero y enfermedades relacionadas; alveolitis alérgica; fibrosis pulmonar, que incluye fibrosis pulmonar idiopática, neumonías intersticiales idiopáticas, terapia antineoplásica que complica la fibrosis, e infección crónica, que incluye tuberculosis y aspergilosis y otras infecciones fúngicas; complicaciones del trasplante de pulmón; trastornos vasculíticos y trombóticos de la vasculatura pulmonar, e hipertensión pulmonar; actividad antitusiva que incluye el tratamiento la tos crónica asociada a afecciones inflamatorias y secretoras de las vías respiratorias, y tos yatrógena; rinitis aguda y crónica, que incluye la rinitis medicamentosa, y rinitis vasomotora; rinitis alérgica perenne y estacional, que incluye la rinitis nerviosa (fiebre del heno); poliposis nasal; infección vírica aguda, que incluye del resfriado común, e infección debida a un virus sincitial respiratorio, gripe, coronavirus (que incluye SARS) y adenovirus.

Por lo tanto, la presente invención proporciona además un producto farmacéutico, equipo o composición según la invención para el uso en la terapia.

La presente invención proporciona además el uso de un producto farmacéutico según la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad respiratoria, en particular la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma, por ejemplo enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de un producto farmacéutico, equipo o composición como se describió anteriormente en la presente memoria para el tratamiento de una enfermedad respiratoria, en particular la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma, por ejemplo enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término "terapia" también incluye "profilaxis", a menos que haya indicaciones específicas de lo contrario. Los términos "terapéutico" y "terapéuticamente" deberían interpretarse en consecuencia. La profilaxis se espera que sea particularmente relevante para el tratamiento de personas que han sufrido un episodio previo, o que se considera de otra manera que tienen un riesgo incrementado, de la afección o trastorno en cuestión. Las personas que corren el riesgo de desarrollar una afección o trastorno particular incluyen en general las que tienen un historial familiar de la afección o trastorno, o las que se ha identificado que son especialmente susceptibles a desarrollar la afección o trastorno mediante ensayo o cribado genético.

Métodos Preparativos Generales

A continuación se exponen métodos preparativos para dihidrobromuro de *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida (Preparaciones 1 y 2) y también ensayos y datos que muestran la actividad de este compuesto (denominado Compuesto A en los ensayos y la Tabla 1 más adelante).

Los espectros de ¹H RMN se registraron en un instrumento Varian *Inova* de 400 MHz o un instrumento Varian *Mercury-VX* de 300 MHz. Los picos centrales de cloroformo-*d* (δ_{H} 7,27 ppm), sulfóxido de dimetilo-*d*₆ (δ_{H} 2,50 ppm), acetónitrilo-*d*₃ (δ_{H} 1,95 ppm) o metanol-*d*₄ (δ_{H} 3,31 ppm) se usaron como referencias internas. La cromatografía en columna se llevó a cabo mediante el uso de gel de sílice (0.040-0.063 mm, *Mercy*). A menos que se indique de otra manera, los materiales de partida estaban disponibles comercialmente. Todos los disolventes y reactivos comerciales fueron de grado de laboratorio, y se usaron como se recibieron.

Se usó el siguiente método para el análisis de LC/MS:

Instrumento Agilent 1100; Columna Symmetry 2,1 x 30 mm de Waters; Masa APCI; Caudal 0,7 ml/min; Longitud de onda 254 nm; Disolvente A: agua + 0,1% de TFA; Disolvente B: acetonitrilo + 0,1% de TFA; Gradiente 15-95% de B 8 min, 95% de B 1 min.

5 Se realizó la cromatografía analítica en una columna Symmetry C₁₈, 2,1 x 30 mm con un tamaño de partículas de 3,5 µm, con acetonitrilo/agua/0,1% de ácido trifluoroacético como fase móvil en un gradiente del 5% al 95% de acetonitrilo durante 8 minutos con un caudal de 0,7 ml/min.

Las abreviaturas o las expresiones usadas en los ejemplos tienen los siguientes significados:

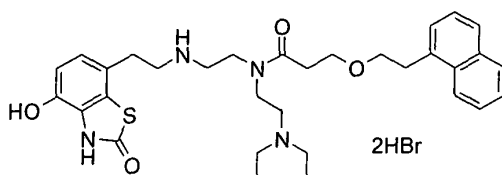
SCX: Extracción en fase sólida con un sorbente de ácido sulfónico

HPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento

10 DMF: N,N-Dimetilformamida

Preparación 1

Dihidrobromuro de N-[2-(dietilamino)etil]-N-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino]etil)-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida



15 a) 3-[2-(1-Naftil)etoxi]propanoato de *tert*-butilo

Se trató 1-naftaleno etanol (10 g) con hidróxido de benciltrimetilamonio (Triton B[®]; 0,9 mL de una disolución del 40% en metanol) y la mezcla resultante se agitó a vacío durante 30 minutos. La mezcla se enfrió después a 0 °C y se trató con acrilato de *tert*-butilo (8,19 g). La mezcla resultante se calentó lentamente a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. La mezcla bruta se absorbió posteriormente en óxido de aluminio (30 g) y se eluyó con dietiléter (200 mL). La fase orgánica se concentró para proporcionar un material bruto (16,6 g) que se purificó mediante cromatografía rápida en sílice eluyendo con 1:8, dietiléter : hexano para proporcionar el compuesto subtítuloado (12,83 g).

¹H RMN (CDCl₃) δ 8,05 (dd, 1H), 7,84 (dd, 1H), 7,72 (dd, 1H), 7,54-7,34 (m, 4H), 3,81-3,69 (m, 4H), 3,35 (t, 2H), 2,52-2,47 (m, 2H), 1,45 (s, 9H).

25 b) Ácido 3-[2-(1-naftil)etoxi]propanoico

Se suspendió 3-[2-(1-naftil)etoxi]propanoato de *tert*-butilo (6,19 g) en diclorometano (30 mL) y se trató con ácido trifluoroacético (5 mL). La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, se añadió 1 mL adicional de ácido trifluoroacético y la disolución se agitó durante la noche. La mezcla se concentró, se resuspendió en una disolución de hidróxido sódico 2 M (30 mL) y se lavó con éter (2 x 20 mL). La capa acuosa se acidificó posteriormente (mediante el uso de ácido clorhídrico 1 M) y se extrajo con éter (2 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera (20 mL), se secaron sobre sulfato magnésico anhidro, se filtraron y se concentraron a vacío para proporcionar el compuesto subtítuloado (5,66 g) en forma de un aceite claro.

¹H RMN (CDCl₃) δ 8,05 (s ancho, 1H), 7,85 (s ancho, 1H), 7,74 (s ancho, 1H), 7,50-7,38 (m, 4H), 3,84-3,75 (m ancho, 4H), 3,39 (s ancho, 2H), 2,65 (s ancho, 2H).

35 c) N-(2-Dietilaminoetil)-N-(2-hidroxietil)-3-[2-(1-naftil)etoxi]-propanamida

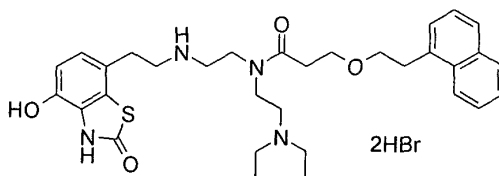
Se añadió cloruro de oxalilo (0,33 g) gota a gota a una disolución de ácido 3-[2-(1-naftil)etoxi]propanoico (0,53 g) en diclorometano (10 mL), se añadió dimetilformamida (1 gota) y la agitación continuó a temperatura ambiente durante 1 hora. La mezcla se concentró posteriormente, se redisolvió en diclorometano (10 mL) y se añadió gota a gota a una disolución de 2-(2-dietilaminoetilamino)etanol (0,35 g) y diisopropiletilamina (0,56 g) en diclorometano (10 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora, se diluyó (diclorometano, 50 mL), se lavó con agua (2 x 20 mL), salmuera (20 mL), se secó sobre sulfato magnésico y se concentró para proporcionar el producto bruto (0,91 g) que se purificó mediante cromatografía rápida en columna (eluyendo con un 5-7% de metanol en diclorometano) para proporcionar 0,63 g del compuesto subtítuloado.

45 ¹H RMN (CDCl₃) δ 8,05 (d, 1H), 7,85 (d, 1H), 7,73 (d, 1H), 7,52-7,47 (m, 2H), 7,42-7,35 (m, 2H), 3,84-3,78 (m, 6H), 3,72-3,70 (m, 1/2H), 3,45-3,35 (m, 6H), 2,79-2,77 (m, 1+1/2H), 2,62-2,58 (m, 2H), 2,54-2,49 (m, 4H), 1,04-1,01 (m, 6H).

d) *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida

Una disolución de sulfóxido de dimetilo (0,097 g) en diclorometano (1 mL) se añadió a una disolución de cloruro de oxalilo (0,079 g) en diclorometano (10 mL) a -78 °C. La reacción se agitó durante 15 minutos y después se añadió una disolución de *N*-(2-dietilaminoetil)-*N*-(2-hidroxi)etil-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida (0,22 g) en diclorometano (1 mL + 1 mL de lavado), y la mezcla de reacción se agitó durante otros 15 minutos. Se añadió trietilamina (0,29 g) y la reacción se dejó calentar a temperatura ambiente durante 1 hora, la mezcla se diluyó posteriormente (diclorometano 30 mL), la capa orgánica se lavó con bicarbonato sódico (20 mL), salmuera (20 mL), se secó sobre sulfato magnésico anhidro, se filtró y se concentró a vacío para proporcionar el compuesto subtítuloado (0,21 g).

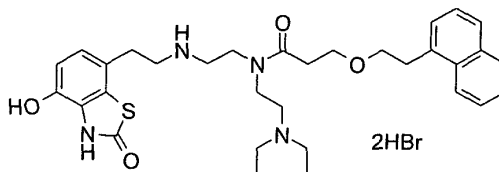
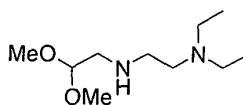
El producto bruto se disolvió en metanol (10 mL) y se añadió hidrocloreuro de 7-(2-aminoetil)-4-hidroxi-1,3-benzotiazol-2(3H)-ona (preparado según el procedimiento resumido en Organic Process Research & Development 2004, 8(4), 628-642; 0,131 g) junto con ácido acético (0,1 mL) y agua (0,1 mL). Después de agitar a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añadió cianoborohidruro sódico (0,020 g) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche. Se añadió amoniaco (7 N en metanol, 1 mL) y la mezcla se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía rápida en columna eluyendo con un 1% de amoniaco; 5%-7% de metanol en diclorometano. El producto en bruto se usó directamente en la siguiente etapa.

e) Dihidrobromuro de *N*-[2-(dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida

Se disolvió *N*-[2-(dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida (0,052 g) en etanol (1,5 mL) y se trató con ácido bromhídrico al 48 % (21 µl). La sal de dihidrobromuro sólida blanca (0,058 g) se recogió mediante filtración.

MS: APCI(+ve) 579 (M+1)

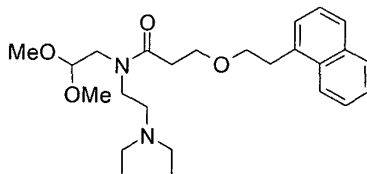
¹H RMN δ(DMSO) 11,78-11,71 (m, 1H), 10,11-10,06 (m, 1H), 9,51-9,43 (m, 0,33H), 9,21-9,13 (m, 0,66H), 8,75-8,66 (m, 1H), 8,59-8,51 (m, 1H), 8,06 (d, 1H), 7,95-7,90 (m, 1H), 7,79 (d, 1H), 7,60-7,48 (m, 2H), 7,47-7,39 (m, 2H), 6,87 (t, 1H), 6,76 (dd, 1H), 3,78-3,53 (m, 10H), 3,25-3,09 (m, 10H), 2,91-2,80 (m, 2H), 2,73-2,61 (m, 2H), 1,26-1,15 (m, 6H). La RMN indica una mezcla de aproximadamente 2:1 de rotámeros a 298 K.

Preparación 2**Dihidrobromuro de *N*-[2-(dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida****a) *N*-(2,2-Dimetoxietil)-*N,N*-dietil-etano-1,2-diamina.**

Una disolución de *N,N*-dietil-etilendiamina (150 g) en metanol (500 mL) se trató gota a gota rápidamente con glicoxal dimetilacetil (disol. al 60%p en agua, 225 g) a 10-15 °C. Tras completar la adición, la disolución se calentó a 15 °C, después a 22 °C y se dejó a esta temperatura durante 16 horas. La mezcla de reacción se trató con un 5% de paladio sobre carbono (pasta 38H de tipo Johnson-Matthey, 15 g) y se hidrogenó a 600 kPa hasta que se consideró que la reacción se había completado mediante GC/MS. El catalizador se eliminó mediante filtración y el filtrado se evaporó hasta sequedad (azeótropo de tolueno, 2,5 L), lo que proporcionó 196,2 g del compuesto subtítuloado.

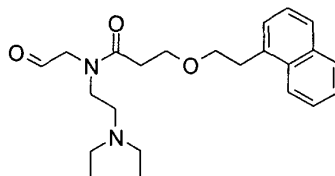
^1H RMN (CDCl_3): 4,48 (t, 1H), 3,39 (s, 6H), 2,75 (d, 2H), 2,69 (t, 2H), 2,57-2,48 (m, 6H), 1,01 (ts, 6H).

b) *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2,2-dimetoxietil)-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida.



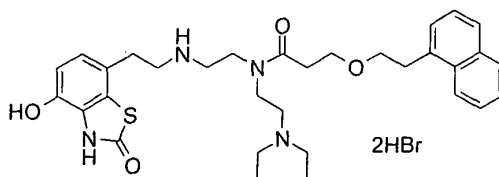
Se añadió cloruro de oxalilo (151 mL) gota a gota durante 45 minutos a una disolución de ácido 3-[2-(1-naftil)etoxi]propanoico (389 g) (Ejemplo 7, etapa b) en diclorometano (2,1 L) y DMF (0,5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante otras 16 horas. La mezcla se concentró posteriormente, se redisolvió en DCM (1,7 L) y se añadió gota a gota durante 1,75 horas a 0 °C a una disolución de *N*-(2,2-dimetoxietil)-*N,N*-dietiletano-1,2-diamina (325 g) e isopropildietilamina (551 mL) en DCM (1,7 L). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas, se lavó con una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (5x1 L), agua (1,5 L) y se secó sobre sulfato sódico, y se concentró para proporcionar 650 g del compuesto subtítulo. m/e 431 ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%)

c) *N*-[2-(Dietilamino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]-*N*-(2-oxoetil)propanamida.



Una disolución de *N*-[2-(dietilamino)etil]-*N*-(2,2-dimetoxietil)-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida (93 g) en DCM (270 mL) se trató gota a gota a 0 °C con ácido trifluoroacético (270 mL) durante 1,5 horas. Tras la adición, la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora adicional. La mezcla de reacción se concentró y el residuo se vertió en una disolución acuosa saturada de bicarbonato sódico (1800 mL, *precaución*). La mezcla acuosa se extrajo con DCM (4x400 mL) y los extractos combinados se secaron sobre sulfato magnésico y se concentraron. El residuo se usó directamente en la siguiente reacción.

d) Dihidrobromuro de *N*-[2-(dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino]etil)-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida.



Se calentó una suspensión de hidrocloreto de 7-(2-amino-etil)-4-hidroxi-3H-benzotiazol-2-ona (53 g) en NMP seca (216 mL) a 60 °C y se trató en una porción con una disolución de NaOH (8,2 g) en metanol (102 mL). La suspensión naranja brillante se enfrió a temperatura ambiente y se trató gota a gota con una disolución de *N*-[2-(dietilamino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]-*N*-(2-oxoetil)propanamida en diclorometano (475 mL) durante 20 minutos. La reacción se dejó con agitación durante 25 minutos. Después se añadió triacetoxiborohidruro sódico (91,5 g) en porciones durante 20 minutos y la mezcla se agitó durante otros 50 minutos. La mezcla de reacción se vertió en agua (1,8 L) y la disolución ácida (pH 5) se lavó con terc-butyl metil éter (TBME) (3x500 mL). La fase acuosa se basificó a pH 8 mediante la adición de carbonato potásico sólido y se extrajo con diclorometano (3x750 mL); los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato magnésico y se concentraron para proporcionar un aceite oscuro. Este se disolvió en etanol (200 mL) y se añadió ácido bromhídrico acuoso al 48% (73 mL). La disolución se dejó envejecer durante 30 minutos y después se evaporó hasta sequedad. El residuo se trituró con etanol (560 mL); el sólido resultante se recogió mediante filtración y se secó a vacío a 50 °C. El sólido pegajoso se suspendió en etanol en ebullición (100 mL) y se filtró mientras estaba caliente. El sólido recogido se secó a vacío a 50 °C. Este material se recrystalizó a partir de etanol/agua (3:1, 500 mL). Después de reposar durante la noche, el sólido resultante se recogió mediante filtración y se lavó con etanol helado (75 mL). El secado a vacío a 50 °C durante 24 hr proporcionó 57 g del compuesto del título.

Las sales alternativas de *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino]etil)-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida se pueden preparar mezclando un ácido adecuado con *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-

(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino]etil)-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida en un disolvente. Se proporcionan ejemplos más adelante.

Producción de cAMP mediada por receptor adrenérgico β_2

Preparación de células

- 5 Se cultivaron células H292 en incubadores de matraces de 225 cm² a 37 °C, 5% de CO₂ en medio RPMI que contenía un 10% (v/v) de FBS (suero bovino fetal) y L-glutamina 2 mM.

Método Experimental

- Se extrajeron células adherentes H292 de los matraces de cultivo de tejidos mediante tratamiento con disolución de desprendimiento de células Accutase™ durante 15 minutos. Los matraces se incubaron durante 15 minutos en un incubador humidificado a 37 °C, 5% de CO₂. Las células desprendidas se resuspendieron en medios RPMI (que contenían un 10% (v/v) de FBS y L-glutamina 2 mM) a 0,05 x 10⁶ células por mL. Se añadieron 5000 células en 100 μ L a cada pocillo de una placa de 96 pocillos tratada con cultivo de tejidos y las células se incubaron durante la noche en un incubador humidificado a 37 °C, 5% de CO₂. Los medios cultivados se eliminaron, y las células se lavaron dos veces con 100 μ L de tampón de ensayo y se sustituyeron con 50 μ L de tampón de ensayo (disolución HBSS que contenía HEPES 10 mM de pH 7,4 y glucosa 5 mM). Las células se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 minutos, tras lo cual se añadieron 25 μ L de rolipram (1,2 mM ajustado en tampón de ensayo que contenía un 2,4% (v/v) de sulfóxido de dimetilo). Las células se incubaron con rolipram durante 10 minutos, tras lo cual se añadió el Compuesto A y las células se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente. La concentración final de rolipram en el ensayo fue 300 μ M, y la concentración final de vehículo fue del 1,6% (v/v) de sulfóxido de dimetilo. La reacción se detuvo eliminando los sobrenadantes, lavando una vez con 100 μ L de tampón de ensayo y sustituyéndolo con 50 μ L de tampón de lisis. La monocapa de células se congeló a -80 °C durante 30 minutos (o durante la noche).

Detección de cAMP mediante AlphaScreen™

- Se determinó la concentración de cAMP (monofosfato cíclico de adenosina) en el lisado celular mediante el uso de la metodología AlphaScreen™. La placa de células congeladas se descongeló durante 20 minutos en un agitador de placas, y después se transfirieron 10 μ L del lisado celular a una placa blanca de 96 pocillos. Se añadieron 40 μ L de esferas de detección AlphaScreen™ mezcladas pre-incubadas con cAMP biotinilado a cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 10 horas en la oscuridad. La señal de AlphaScreen™ se midió mediante el uso de un espectrofotómetro EnVision (Perkin-Elmer Inc.) con los ajustes recomendados por el fabricante. Se determinaron las concentraciones de cAMP mediante referencia a una curva de calibración determinada en el mismo experimento mediante el uso de concentraciones patrón de cAMP. Se construyó una curva de respuesta a la concentración para el Compuesto A, y los datos se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros para determinar tanto la pCE₅₀ como la Actividad Intrínseca. La Actividad Intrínseca se expresó en forma de una fracción respecto de la actividad máxima determinada para formoterol en cada experimento. Se muestra el resultado para el Compuesto A en la Tabla 1.

Ensayos de Selectividad

Receptor Adrenérgico α_1D

Preparación de Membranas

- 40 Se prepararon membranas a partir de células 293 de riñón embrionario humano (HEK293) que expresaban el receptor α_1D humano recombinante. Estas se diluyeron en Tampón de Ensayo (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, 0,1% de gelatina, pH 7,4) para proporcionar una concentración final de membranas que proporcionó un intervalo claro entre la unión específica máxima y mínima.

Método Experimental

- 45 Los ensayos se llevaron a cabo en placas de polipropileno de 96 pocillos de fondo en forma de U. Se añadieron 10 μ L de [³H]-prazosina (concentración final 0,3 nM) y 10 μ L de Compuesto A (concentración final 10x) a cada pocillo de ensayo. Para cada placa de ensayo, se obtuvieron 8 réplicas para la unión de [³H]-prazosina en presencia de 10 μ L de vehículo (10% (v/v) de DMSO en Tampón de Ensayo; lo que definió la unión máxima) o 10 μ L de BMY7378 (concentración final 10 μ M; lo que definió la unión inespecífica (NSB)). Después se añadieron las membranas para alcanzar un volumen final de 100 μ L. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y después se filtraron en placas de filtro GF/B revestidas con PEI, empapadas previamente durante 1 hora con Tampón de Ensayo, mediante el uso de un recolector de células Tomtec para placas de 96 pocillos. Se llevaron a cabo cinco lavados con 250 μ L de tampón de lavado (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, pH 7,4) a 4 °C para eliminar la radiactividad sin unir. Las placas se secaron y después se sellaron por debajo mediante el uso de un sellador de placas Packard, y se añadió MicroScint-O (50 μ L) a cada pocillo. Las placas se sellaron (TopSeal A) y se midió la radiactividad asociada

al filtro con un contador de centelleo (TopCount, Packard BioScience) mediante el uso de un protocolo de recuento de 3 minutos.

Se determinó la unión específica total (B_0) restando la NSB media de la unión media máxima. También se restaron los valores de NSB de los valores de los demás pocillos. Estos datos se expresaron como el porcentaje de B_0 . Se determinaron las curvas de concentración del compuesto-efecto (inhibición de la unión de [3 H]-prazosina) mediante el uso de diluciones en serie en general en el intervalo de 0,1 nM a 10 μ M. Los datos se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros para determinar la potencia del compuesto, que se expresó como pCI₅₀ (logaritmo negativo de la concentración molar que induce un 50% de inhibición de la unión de [3 H]-prazosina). El resultado se muestra en la Tabla 1 más adelante.

10 **Receptor Adrenérgico β 1**

Preparación de Membranas

Se obtuvieron membranas que contenían receptores adrenérgicos beta 1 humanos recombinantes de Euroscreen. Estas se diluyeron en Tampón de Ensayo (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 120 mM, 0,1% de gelatina, pH 7,4) para proporcionar una concentración final de membranas que proporcionó un intervalo claro entre la unión específica máxima y mínima.

Método Experimental

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de polipropileno de 96 pocillos de fondo en forma de U. Se añadieron 10 μ L de [125 I]-Yodocianopindolol (concentración final 0,036 nM) y 10 μ L de Compuesto A (concentración final 10x) a cada pocillo de ensayo. Para cada placa de ensayo, se obtuvieron 8 réplicas para la unión de [125 I]-Yodocianopindolol en presencia de 10 μ L de vehículo (10% (v/v) de DMSO en Tampón de Ensayo; lo que definió la unión máxima) o 10 μ L de Propranolol (concentración final 10 μ M; lo que definió la unión inespecífica (NSB)). Después se añadieron las membranas para alcanzar un volumen final de 100 μ L. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y después se filtraron en placas de filtro GF/B revestidas con PEI, empapadas previamente durante 1 hora con Tampón de Ensayo, mediante el uso de un recolector de células Tomtec para placas de 96 pocillos. Se llevaron a cabo cinco lavados con 250 μ L de tampón de lavado (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 120 mM, pH 7,4) a 4 °C para eliminar la radiactividad sin unir. Las placas se secaron y después se sellaron por debajo mediante el uso de un sellador de placas Packard, y se añadió MicroScint-O (50 μ L) a cada pocillo. Las placas se sellaron (TopSeal A) y se midió la radiactividad asociada al filtro con un contador de centelleo (TopCount, Packard BioScience) mediante el uso de un protocolo de recuento de 3 minutos.

Se determinó la unión específica total (B_0) restando la NSB media de la unión media máxima. También se restaron los valores de NSB de los valores de los demás pocillos. Estos datos se expresaron como el porcentaje de B_0 . Se determinaron las curvas de concentración del compuesto-efecto (inhibición de la unión de [125 I]-Yodocianopindolol) mediante el uso de diluciones en serie en general en el intervalo de 0,1 nM a 10 μ M. Los datos se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros para determinar la potencia del compuesto, que se expresó como pCI₅₀ (logaritmo negativo de la concentración molar que induce un 50% de inhibición de la unión de [125 I]-Yodocianopindolol). El resultado se muestra en la Tabla 1 más adelante.

Receptor de Dopamina D2

Preparación de Membranas

Se obtuvieron membranas que contenían receptores de dopamina de subtipo D2s humanos recombinantes de Perkin Elmer. Estas se diluyeron en Tampón de Ensayo (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 120 mM, 0,1% de gelatina, pH 7,4) para proporcionar una concentración final de membranas que proporcionó un intervalo claro entre la unión específica máxima y mínima.

Método Experimental

Los ensayos se llevaron a cabo en placas de polipropileno de 96 pocillos de fondo en forma de U. Se añadieron 30 μ L de [3 H]-espiperona (concentración final 0,16 nM) y 30 μ L de Compuesto A (concentración final 10x) a cada pocillo de ensayo. Para cada placa de ensayo, se obtuvieron 8 réplicas para la unión de [3 H]-espiperona en presencia de 30 μ L de vehículo (10% (v/v) de DMSO en Tampón de Ensayo; lo que definió la unión máxima) o 30 μ L de Haloperidol (concentración final 10 μ M; lo que definió la unión inespecífica (NSB)). Después se añadieron las membranas para alcanzar un volumen final de 300 μ L. Las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y después se filtraron en placas de filtro GF/B revestidas con PEI, empapadas previamente durante 1 hora con Tampón de Ensayo, mediante el uso de un recolector de células Tomtec para placas de 96 pocillos. Se llevaron a cabo cinco lavados con 250 μ L de tampón de lavado (HEPES 50 mM, EDTA 1 mM, NaCl 120 mM, pH 7,4) a 4 °C para eliminar la radiactividad sin unir. Las placas se secaron y después se sellaron por debajo mediante el uso de un sellador de placas Packard, y se añadió MicroScint-O (50 μ L) a cada pocillo. Las placas se sellaron (TopSeal A) y se midió la radiactividad asociada al filtro con un contador de centelleo (TopCount, Packard BioScience) mediante el uso de un protocolo de recuento de 3 minutos.

Se determinó la unión específica total (B_0) restando la NSB media de la unión media máxima. También se restaron los valores de NSB de los valores de los demás pocillos. Estos datos se expresaron como el porcentaje de B_0 . Se determinaron las curvas de concentración del compuesto-efecto (inhibición de la unión de [3 H]-espiperona) mediante el uso de diluciones en serie en general en el intervalo de 0,1 nM a 10 μ M. Los datos se ajustaron a una ecuación logística de cuatro parámetros para determinar la potencia del compuesto, que se expresó como pCI_{50} (logaritmo negativo de la concentración molar que induce un 50% de inhibición de la unión de [3 H]-espiperona). Se muestra el resultado para el Compuesto A en la Tabla 1.

Tabla 1

Compuesto	pCE50 de $\beta 2$	Act. Int. de $\beta 2$	pCI50 de unión a $\alpha 1$	pCI50 de unión a $\beta 1$	pCI50 de unión a D2
A	8,2	0,8	6,6	<5	6,1

La presente invención se explicará adicionalmente a continuación mediante referencia a los siguientes ejemplos ilustrativos. Algunos de los Ejemplos se refieren a la siguiente Figura:

Figura 1. Broncoconstricción inducida por metacolina en conejillo de indias. Se administró a conejillos de indias vehículo, 1 μ g/kg y 27 μ g/kg de Compuesto A, 0,03 μ g/kg de bromuro de tiotropio o una combinación de 1 μ g/kg de Compuesto A y 0,03 μ g/kg de bromuro de tiotropio 2 horas antes de una exposición a metacolina.

15 Ejemplo 1

Estudio de la actividad del compuesto sobre la migración de neutrófilos intra-alveolar tras la exposición mediante aerosol con lipopolisacárido (LPS) en conejillo de indias.

Se colocan conejillos de indias Dunkin-Hartley macho (300-600 g) en conos de retención de conejillos de indias con frontal abierto unidos aleatoriamente alrededor de una cámara de aerosol cilíndrica. Los conejillos de indias se mantienen en los conos de exposición, y se exponen a un aerosol de vehículo, o LPS a concentraciones de 0,1-30 μ g/ml en solución salina al 0,9% por grupo. Los aerosoles se generan mediante el uso de 2 nebulizadores de chorro por columna con un caudal de 12 L/m. Se colocan 10 ml del agente de exposición en cada nebulizador. De manera alternativa, los animales reciben una dosis intratraqueal de 0,1-10 μ g/kg. Esto se repite hasta 8 veces, según el protocolo experimental.

Se administra a los conejillos de indias vehículo, compuesto estándar o compuesto de ensayo mediante la vía y la frecuencia adecuadas en diversos momentos antes y después de la exposición dependiendo del protocolo experimental. Los grupos de compuesto de ensayo podrían ser del mismo compuesto a diferentes dosis o dosis únicas de diferentes compuestos, o una combinación de los dos. Los compuestos de ensayo se administran mediante inyección intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, o mediante administración por inhalación o intratraqueal. Los conejillos de indias expuestos se sacrifican mediante una sobredosis de anestesia (0,5 ml de Eutetal i.p.) a las 4 h-24 h tras la exposición. Después se lavan los pulmones. Después de exponer la tráquea y colocar una cánula mediante el uso de una cánula con conector Luer (naranja = tamaño 8FG), los pulmones se lavan con 3 x alícuotas de 5 ml de solución salina tamponada de Hank (HBSS, sin EDTA). El lavado se lleva a cabo con un masaje suave del pecho para asegurar la agitación adecuada del líquido en los pulmones. Los lavados se recogen en un tubo de polipropileno cónico de 15 ml para centrifuga, se extrae una alícuota del líquido de LBA y se cuenta en un aparato Sysmex (Sysmex UK, Milton Keynes). Se preparan portaobjetos de citocentrífuga añadiendo una alícuota de 100 μ l de líquido de LBA en embudos de citocentrífuga en un aparato Shandon Cytospin3 que se hace funcionar a 700 rpm durante 5 min. Los portaobjetos se tiñen en el aparato de tinción automática de portaobjetos Hema-Tek-2000, mediante el uso de la tinción de Wright-Giemsa y, en general, se cuentan 200 células en un microscopio. Las células se clasifican como eosinófilos, neutrófilos y células mononucleares (las células mononucleares incluyen monocitos, macrófagos y linfocitos) y se expresan en forma de un porcentaje del recuento total.

Ejemplo 2

Estudio de la actividad del compuesto sobre la migración de neutrófilos intra-alveolar tras la exposición mediante aerosol con lipopolisacárido (LPS) en ratón.

Se colocan ratones C57BL/6/J o BALB/C macho (20-35 g) en cajas de exposición Perspex en grupos de hasta 20, y se exponen a un aerosol de 0,3 mg/ml de LPS o solución salina al 0,9% p/v. El LPS (Sigma, E. Coli, Ref L-3755, Serotipo 026: B6, Lote nº 111k4078) se reconstituye en solución salina al 0,9% p/v. Se genera un aerosol mediante el uso de dos nebulizadores de chorro que funcionan a un caudal de 12 L/min (6 L/min para cada nebulizador) durante 15 min. De manera alternativa, los animales reciben una dosis intratraqueal de 0,1-10 μ g/kg. Esto se puede repetir hasta 8 veces.

Se administra a los ratones vehículo, compuesto estándar o compuesto de ensayo mediante la vía y la frecuencia adecuadas en diversos momentos antes y después de la exposición dependiendo del protocolo experimental. Los grupos de compuesto de ensayo podrían ser del mismo compuesto a diferentes dosis o dosis únicas de diferentes

compuestos, o una combinación de los dos. Los compuestos de ensayo se administran mediante inyección intraperitoneal, intravenosa o subcutánea, o mediante administración por inhalación o intratraqueal.

- 5 Los ratones se sacrifican con una sobredosis de Eutatal i.p 30 minutos, 1-24 hr después de la exposición a LPS. Cuando cesa la circulación, se coloca una cánula en la tráquea (cánula intravenosa Portex) y se lavan las vías respiratorias con 3 x 0,3 ml de Isoton II (Beckman Coulter Ref. 8448011 Lote nº 25775). Para las citocentrifugaciones, se añaden 100 µl del LLBA a un embudo de citocentrifugación y se centrifugan, mediante el uso de un ThermoShandon Cytospin modelo 3 ó 4, a 700 rpm durante 5 min. Las células del portaobjetos se tiñen en el aparato de tinción automática de portaobjetos Hema-Tek-2000, mediante el uso de la tinción de Wright-Giemsa y se llevan a cabo recuentos celulares diferenciales para diferenciar los eosinófilos, neutrófilos y células linfomononucleares (que incluyen monocitos, macrófagos y linfocitos). En general, se cuentan 200 células por portaobjetos, y cada tipo celular se expresa como un porcentaje del recuento total. El recuento de leucocitos totales del LLBA se mide mediante el uso de un aparato Sysmex (Sysmex UK, Milton Keynes).

Ejemplo 3

Estudio de la función pulmonar en conejillos de indias anestesiados.

- 15 Se pesaron conejillos de indias Dunkin-Hartley macho (300-600 g) y se les administró vehículo (fosfato 0,05 M, 0,1% de Tween 80, solución salina al 0,6%, pH 6) o compuesto por medio de la vía intratraqueal con anestesia gaseosa recuperable (5% de halotano en oxígeno). Se administró a los animales compuesto o vehículo dos horas antes de la administración de histamina o metacolina.

- 20 Los conejillos de indias se anestesiaron con pentobarbitona (1 mL/kg de una disolución de 60 mg/mL *i.p.*) aproximadamente 30 minutos antes de la primera administración de broncoconstrictor. Se colocó una cánula en la tráquea y el animal se ventiló mediante el uso de una bomba respiratoria de volumen constante (Harvard Rodent Ventilator modelo 683) a una velocidad de 60 respiraciones/min y un volumen tidal de 5 ml/kg. Se colocó una cánula en la vena yugular para la administración de histamina, metacolina o la anestesia de mantenimiento (0,1 mL de disolución de pentobarbitona, 60 mg/mL, según sea necesario).

- 25 Los animales se transfirieron a un sistema Flexivent (SCIREQ, Montreal, Canadá) para medir la resistencia de las vías respiratorias. Los animales se ventilaron (patrón de ventilación cuasi-sinusoidal) a 60 respiraciones/min con un volumen tidal de 5 mL/kg. Se aplicó una presión espiratoria final positiva de 2-3 cmH₂O. Se midió la resistencia respiratoria mediante el uso de la instalación Flexivent "snapshot" (1 segundo de duración, frecuencia de 1 Hz). Una vez que se obtuvo un valor de resistencia basal estable, se administró a los animales histamina o metacolina a dosis crecientes (0,5, 1, 2, 3 y 5 mg/kg, *i.v.*) a aproximadamente intervalos de 4 minutos por medio del catéter yugular. Después de cada administración de broncoconstrictor, se registró el valor de resistencia máxima. Los conejillos de indias se sacrificaron con aproximadamente 1,0 mL de pentobarbitona sódica (Eutatal) de manera intravenosa tras la finalización de las medidas de la función pulmonar. El porcentaje de broncoprotección producida por un compuesto se calculó a cada dosis de de broncoconstrictor como sigue:

35

$$\% \text{ de broncoprotección} = \frac{\% \text{ de cambio } R_{veh} - \% \text{ de cambio } R_{comp}}{\% \text{ de cambio } R_{veh}}$$

En la que % de cambio R_{veh} es la media del cambio máximo en porcentaje de la resistencia de las vías respiratorias en el grupo tratado con vehículo. Los resultados informados se midieron después de 5 µg/kg de histamina o metacolina, y se expresaron como el porcentaje de broncoprotección (media ± e.e. de la media).

- 40 Combinación de Compuesto A y bromuro de tiotropio:

- Se administró a los conejillos de indias vehículo, 1 y 27 µg/kg de Compuesto A, 0,03 µg/kg de bromuro de tiotropio o una combinación de 1 µg/kg de Compuesto A y 0,03 µg/kg de bromuro de tiotropio a través de la vía intratraqueal. La administración de dosis intravenosas crecientes de metacolina (0,5, 1, 2, 3 y 5 µg/kg) provocó una broncoconstricción relacionada con la dosis en los animales tratados con vehículo que osciló del 7,8±4,1% a 0,5 µg/kg al 1898±211% a 5 µg/kg dos horas después de la administración del vehículo (n=9). La administración intratraqueal de bromuro de tiotropio a 0,03 µg/kg produjo un 13% de inhibición de la broncoconstricción inducida por metacolina (incremento del 1656±269% de la resistencia, n = 8). La administración intratraqueal del compuesto A (1 y 27 µg/kg) produjo una inhibición del 15 y 82% de la broncoconstricción inducida por metacolina (incremento del 1619±235 y 347±71% de la resistencia, respectivamente; n=8 y 6, respectivamente). La combinación de bromuro de tiotropio (0,03 µg/kg) y compuesto A (1 µg/kg) produjo una inhibición del 43% de la broncoconstricción inducida por metacolina (incremento del 1087±123% de la resistencia; n=8) (Figura 1).

50

Ejemplo 4**Estudio de los Compuestos sobre la Eosinofilia Inducida por Antígenos en Ratas Noruegas Marrones Sensibilizadas con Ovoalbúmina.**

5 En el día 0 del estudio, se administra a las ratas noruegas marrones una inyección subcutánea de 500 µg de ovoalbúmina adsorbida en 100 mg de hidróxido de aluminio en 0,4 mL de solución salina en dos sitios diferentes, aproximadamente 0,2 mL por sitio. Los días 14 y 15 tras la sensibilización, se expone a las ratas a ovoalbúmina en aerosol durante 15 minutos. Las ratas se colocan en grupos de 10 en una caja acrílica (dimensiones internas de 320 mm de anchura x 320 mm de profundidad x 195 mm de altura, volumen de 20 L). Se colocan 8 mL de 10 mg/mL de ovoalbúmina en solución salina al 0,9%, o solución salina al 0,9% sola, en dos nebulizadores de chorro (Sidestream[®], Profile Respiratory Systems Ltd.). Se hace pasar aire comprimido a 6 L/min a través de cada nebulizador, y la salida de los nebulizadores se hace pasar a la caja que contiene las ratas.

15 Se administra a las ratas a través de la vía adecuada vehículo, compuesto estándar o compuesto de ensayo en diversos momentos antes y después de la exposición, dependiendo del protocolo experimental. Las ratas se sacrifican con 0,5 mL de pentobarbitona sódica (Eutatal) de manera intraperitoneal en diversos momentos tras la exposición. Se lleva a cabo una traqueotomía, y se coloca una cánula en la tráquea. La vía respiratoria se lava después mediante el uso de 3 mL de PBS estéril a temperatura ambiente. El PBS se deja en la vía respiratoria durante 10 segundos antes de extraerlo. El PBS que contiene células se coloca en un tubo de centrifuga de 15 mL sobre hielo. Este procedimiento se repite tres veces. Se registra el volumen final recuperado. Se extrae una alícuota del líquido de LBA, y se cuenta mediante el uso de un aparato Sysmex (Sysmex UK, Milton Keynes).

20 Se preparan portaobjetos de citocentrifuga añadiendo una alícuota de 100 µl de líquido de LBA en embudos de citocentrifugación en un aparato Shandon Cytospin 3 que se hace funcionar a 700 rpm durante 5 min. Los portaobjetos se tiñen en el aparato de tinción automática de portaobjetos Hema-Tek-2000, mediante el uso de la tinción de Wright-Giemsa y, en general, se cuentan 200 células en un microscopio. Las células se clasifican como eosinófilos, neutrófilos y células mononucleares. Las células mononucleares incluían los monocitos, macrófagos y linfocitos.

Ejemplo 5**Estudio de los Compuestos sobre la Eosinofilia Inducida por Antígenos en Ratones Sensibilizados con Ovoalbúmina.**

30 Se sensibilizan ratones BALB/c macho de 20-25 g a ovoalbúmina mediante administración i.p. de 100 µg de ovoalbúmina de grado V (Sigma) adsorbida en 1 mg de mezcla de gel de hidróxido de aluminio (Fisher Scientific UK) en 0,3 ml de solución salina. Se realiza una pre-administración de compuesto a grupos de ratones si es necesario, un mínimo de dos semanas tras la sensibilización. Después se les administra diariamente durante 1-8 días, como especifique el protocolo del estudio, compuesto de ensayo o 0,25 ml de vehículo.

35 Cada día de los 1-8 días, 1 hora tras la administración, los ratones se colocan en cámaras Perspex (20x11x11 cm, 10 ratones max./cámara) y se administra una exposición en aerosol de 20 mg ml⁻¹ de ovoalbúmina durante 36 min (8 ml durante 18 min seguido de otros 8 ml durante 18 min). La administración en aerosol se lleva a cabo mediante el uso de un nebulizador de chorro DeVilbiss con un caudal de 61 min⁻¹. 24 h tras la última dosis, los ratones se sacrifican con 0,2 ml de eutatal i.p. y se toman muestras de sangre (en tubos de EDTA) para análisis mediante recuento celular diferencial, se coloca una cánula en la tráquea mediante el uso de una cánula Portex con un conector Luer rosa cortada a 1 cm, y los pulmones se lavan mediante el uso de 3 lavados de 1 ml de Isoton II. Para las citocentrifugaciones, se añaden 100 µl del LLBA a un embudo de citocentrifugación y se centrifugan, mediante el uso de un ThermoShandon Cytospin modelo 3 ó 4, a 700 rpm durante 5 min. Las células del portaobjetos se tiñen en el aparato de tinción automática de portaobjetos Hema-Tek-2000, mediante el uso de la tinción de Wright-Giemsa y se llevan a cabo recuentos celulares diferenciales para diferenciar los eosinófilos, neutrófilos y células linfomononucleares (que incluyen monocitos, macrófagos y linfocitos). En general, se cuentan 200 células por portaobjetos, y cada tipo celular se expresa como un porcentaje del recuento total. El recuento de leucocitos totales del LLBA se mide mediante el uso de un aparato Sysmex (Sysmex UK, Milton Keynes).

Ejemplo 6**Estudio del Efecto del Compuesto sobre la Función Pulmonar y LBA-Neutrofilia Tras la Exposición Aguda a Humo en Ratón**

50 Se sometió a ratones BALB/c o C57BL6/J a una exposición de cuerpo completo a humo directo (50 min/12 cigarrillos) y aire fresco una vez o dos veces al día durante 1-9 días. Se administra a los ratones a través de la vía adecuada vehículo, compuesto estándar o compuesto de ensayo en diversos momentos antes y después de la exposición, dependiendo del protocolo experimental. En el día final del experimento, se sacrifica a los ratones con 0,2 ml de eutatal i.p. y se obtiene el líquido del lavado broncoalveolar para el análisis de la infiltración de leucocitos (como se describió anteriormente), o se determina la función pulmonar mediante el uso de un sistema Flexivent (SCIREQ, Montreal, Canadá). De manera alternativa, se mide la mecánica pulmonar mediante el uso de un sistema de manobras forzadas (EMMS).

ES 2 368 967 T3

- 5 Los ratones se anestesian con pentobarbitona (dilución 1/10 a un volumen de dosis de 1 mL/kg de forma intraperitoneal). Se coloca una cánula en la traquea y el animal se transfiere al sistema Flexivent en el que se ventila (patrón de ventilación cuasi-sinusoidal) a una velocidad de 150 respiraciones/min y un volumen tidal de 10 ml/kg para medir la resistencia de las vías respiratorias. Se mide la resistencia respiratoria mediante el uso de la instalación Flexivent "snapshot" (1 segundo de duración, frecuencia de 1 Hz). Los ratones se sacrifican con aproximadamente 0,5 mL de pentobarbitona sódica (Eutatal) de manera intravenosa tras la finalización de las medidas de la función pulmonar.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un producto farmacéutico que comprende, en combinación, un primer ingrediente activo que es dihidrobromuro de *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida, y un segundo ingrediente activo que es un antagonista muscarínico que es bromuro de Aclidinio, Glicopirrolato, bromuro de Oxitropio, Pirenzepina, telenzepina o bromuro de Tiotropio.
- 10 **2.** Un equipo que comprende:
una preparación de un primer ingrediente activo que es dihidrobromuro de *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida,
una preparación de un segundo ingrediente activo que es un antagonista muscarínico que es bromuro de Aclidinio, Glicopirrolato, bromuro de Oxitropio, Pirenzepina, telenzepina o bromuro de Tiotropio, y opcionalmente,
instrucciones para la administración simultánea, secuencial o por separado de las preparaciones a un paciente que lo necesita.
- 15 **3.** Una composición farmacéutica que comprende, en una mezcla:
un primer ingrediente activo que es dihidrobromuro de *N*-[2-(Dietilamino)etil]-*N*-(2-[[2-(4-hidroxi-2-oxo-2,3-dihidro-1,3-benzotiazol-7-il)etil]amino)etil]-3-[2-(1-naftil)etoxi]propanamida;
un segundo ingrediente activo que es un antagonista muscarínico que es bromuro de Aclidinio, Glicopirrolato, bromuro de Oxitropio, Pirenzepina, telenzepina o bromuro de Tiotropio; y,
un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 **4.** Un producto farmacéutico, equipo o composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el segundo ingrediente activo es bromuro de Tiotropio.
- 5.** Un producto farmacéutico, equipo o composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso en la terapia.
- 6.** El uso de un producto farmacéutico, equipo o composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad respiratoria.
- 25 **7.** Un producto farmacéutico, equipo o composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para el uso en el tratamiento de una enfermedad respiratoria.
- 8.** El uso según la reivindicación 6 ó 7, en el que la enfermedad respiratoria es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma.

FIGURA 1

