



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 371 425**

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: **07794375 .1**
96 Fecha de presentación : **24.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2010490**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **Formas cristalinas de un compuesto de dimetilfenilo.**

30 Prioridad: **25.04.2006 US 794709 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.01.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.01.2012

73 Titular/es: **THERAVANCE, Inc.**
901 Gateway Boulevard
South San Francisco, California 94080, US

72 Inventor/es: **Bolton, Jennifer;**
Chao, Robert;
Rapta, Miroslav;
Williams, Lisa y
Wilson, Richard D.

74 Agente: **Blanco Jiménez, Araceli**

ES 2 371 425 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formas cristalinas de un compuesto de dimetilfenilo.

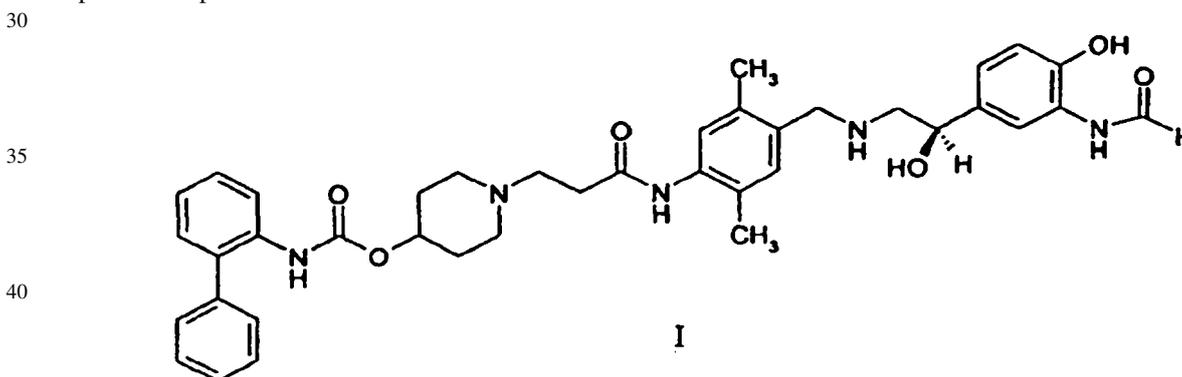
5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a nuevas formas cristalinas de base libre de un compuesto de dimetilfenilo, cuyo compuesto se espera que sea útil como agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades pulmonares. Esta invención se refiere también a composiciones farmacéuticas que contienen o están preparados a partir de esta forma cristalina, los procesos y productos intermedios útiles para preparar dichas formas cristalinas, y tales formas cristalinas para su uso en, por ejemplo, el tratamiento de una enfermedad pulmonar.

15 WO 2004/074246 describe el compuesto del ejemplo 72, que tiene una estructura cercana a la del presente compuesto para usar en el tratamiento de enfermedades pulmonares.

Estado de la técnica

20 La solicitud Internacional de titularidad compartida PCT n° 2007/009925, solicitada en la misma fecha que la presente, y la solicitud provisional n° 60/794,702, solicitada el 25 de abril de 2006, divulgan nuevos compuestos de dialquilfenilo que son útiles como agentes terapéuticos para tratar enfermedades pulmonares, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y el asma. En particular, el compuesto éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etil-amino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico se describe específicamente en esta solicitud como poseedor de actividad tanto de antagonista muscarínico como de agonista del receptor adrenérgico β_2 . La estructura química del éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etil-amino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico está representada por la fórmula I:



45 Los agentes terapéuticos útiles para tratar enfermedades pulmonares se administran ventajosamente de forma directa en el tracto respiratorio por inhalación. A este respecto, se han desarrollado varios tipos de dispositivos farmacéuticos de inhalación para administrar agentes terapéuticos por inhalación incluyendo los inhaladores de polvo seco (DPI), inhaladores dosificadores (MDI) e inhaladores nebulizadores. Al preparar composiciones y formulaciones farmacéuticas para el uso en tales dispositivos, es sumamente deseable tener una forma cristalina del agente terapéutico que no sea higroscópica ni deliquescente y que tenga un punto de fusión relativamente alto (es decir, superior a aproximadamente 130°C) permitiendo así que el material se micronice sin descomposición o pérdida significativas de su cristalinidad.

50 No se han divulgado formas cristalinas del compuesto de la fórmula I anteriormente. Por consiguiente, existe una necesidad de una forma cristalina estable y no deliquescente del compuesto de la fórmula I que tenga un nivel aceptable de higroscopicidad y un punto de fusión relativamente alto.

Sumario de la invención

60 La presente invención se refiere a formas cristalinas de base libre de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etil-amino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo. Sorprendentemente, se ha descubierto que tales formas cristalinas de base libre del compuesto de la fórmula I no son deliquescentes ni siquiera al ser expuestas a la humedad atmosférica. Además, tales formas cristalinas tienen un nivel aceptable de higroscopicidad y un punto de fusión alto, por ejemplo, superior a aproximadamente 130°C.

ES 2 371 425 T3

En un aspecto particular, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo en forma micronizada.

5 Entre otros usos, una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I sirve para preparar composiciones farmacéuticas que se esperan que sean útiles para tratar enfermedades pulmonares. Por consiguiente, en otro de los aspectos de su composición, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo.

Si se desea, las formas cristalinas de la presente invención pueden administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos, como un agente antiinflamatorio esteroideo.

15 En consecuencia, en otro de los aspectos de su composición, esta invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (a) una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo; y (b) un segundo agente terapéutico. En aún otro de los aspectos de su composición, esta invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (a) una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo; y (c) un soporte farmacéuticamente aceptable.

En aún en otro de los aspectos de su composición, esta invención se refiere a una combinación de agentes terapéuticos, la combinación comprendiendo (a) una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo; y (b) un segundo agente terapéutico. En otro de los aspectos de su composición, esta invención se refiere a una combinación de composiciones farmacéuticas, la combinación comprendiendo (a) una composición farmacéutica que comprende una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo y un soporte farmacéuticamente aceptable; y (b) una composición farmacéutica que comprende un segundo agente terapéutico y un soporte farmacéuticamente aceptable.

El compuesto de la fórmula I posee tanto actividad de agonista del receptor adrenérgico β_2 como actividad de antagonista del receptor muscarínico. Por consiguiente, se espera que las formas cristalinas de base libre del compuesto de la fórmula I sirvan como agentes terapéuticos para tratar enfermedades pulmonares, como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Por consiguiente, en uno de sus aspectos, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina de un compuesto de la fórmula I para usar en un método para tratar una enfermedad pulmonar, el método comprendiendo administrar a un paciente necesitado de tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo.

Esta invención también se refiere a una forma de base libre cristalina de un compuesto de la fórmula I para su uso en un método para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el asma, el método comprendiendo administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo.

Adicionalmente, en otro de los aspectos de sus métodos, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina de un compuesto de la fórmula I para usar en un método para producir broncodilatación en un mamífero, el método comprendiendo administrar a un mamífero una cantidad que produzca la broncodilatación de una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo.

Esta invención también se refiere a una forma de base libre cristalina de un compuesto de la fórmula I para usar en un método de antagonización de un receptor muscarínico y agonizar un receptor adrenérgico β_2 en un mamífero, el método comprendiendo administrar al mamífero una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo.

Esta invención también se refiere a procesos para preparar una forma de base libre del compuesto de la fórmula I. Por consiguiente, en otro de sus aspectos, esta invención se refiere a un proceso para preparar una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico I, el proceso comprendiendo:

- (a) proporcionar una solución de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico en un diluyente;

ES 2 371 425 T3

(b) añadir un solvente antagónico a la solución del paso (a) para producir un punto de enturbiamiento.

Opcionalmente, este proceso incluye además el paso de:

(c) añadir un cristal semilla de una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxi-fenil)-2-hidroxi-etil-amino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico al producto del paso (b). En una forma de realización particular de estos procesos, el diluyente es metanol y el solvente antagónico es agua.

Además, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxi-fenil)-2-hidroxi-etil-amino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo para usarla en terapia. Esta invención también se refiere al uso de esta forma de base libre cristalina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad pulmonar. Se describen los aspectos y formas de realización de esta invención en la presente memoria.

Descripción breve de los dibujos

Se ilustran varios aspectos de la presente invención con referencia a los dibujos que se acompañan.

Las figuras 1, 2 y 3 muestran los patrones de difracción de rayos X en polvo (PXRD) para las Formas I, II y III, respectivamente, de la base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxi-fenil)-2-hidroxi-etil-amino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico.

Las figuras 4, 5 y 6 muestran las trazas de una calorimetría diferencial de barrido (DSC) para las Formas I, II y III, respectivamente, de la base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxi-fenil)-2-hidroxi-etil-amino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico.

Las figuras 7, 8 y 9 muestran las trazas de un análisis gravimétrico térmico (TGA) para las Formas I, II y III, respectivamente, de la base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxi-fenil)-2-hidroxi-etil-amino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico.

Las figuras 10, 11 y 12 muestran las trazas de una absorción dinámica de humedad (DMS) para las Formas I, II y III, respectivamente, de la base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxi-fenil)-2-hidroxi-etil-amino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se refiere a formas cristalinas de base libre de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxi-fenil)-2-hidroxi-etil-amino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato del mismo. El agente terapéutico activo en estas sales (es decir, el compuesto de la fórmula I) contiene un centro quiral que tiene la configuración (R). Sin embargo, los expertos en la materia entenderán que puede haber pequeñas cantidades del estereoisómero (S) en las composiciones de esta invención a menos que se indique otra cosa, siempre que la presencia de dicho isómero no elimine ninguna utilidad de la composición en su conjunto.

El compuesto de la fórmula I ha sido nombrado utilizando el software AutoNom (MDL, San Leandro, California) disponible en el mercado.

Definiciones

Al describir los compuestos, las composiciones, los métodos y los procesos de esta invención, los términos siguientes tienen los significados siguientes a menos que se indique otra cosa.

El término “punto de fusión” como se utiliza aquí significa la temperatura en la que se observa un flujo de calor endotérmico máximo por calorimetría diferencial de barrido.

El término “diámetro medio de masa” o “MMD” cuando se utiliza para referirse a partículas, significa aquel diámetro en el que la mitad de la masa de las partículas está contenida en partículas con un diámetro más grande y la mitad está contenida en partículas con un diámetro más pequeño.

El término “micronizado” o “en forma micronizada” significa partículas en las que por lo menos aproximadamente el 90 por ciento de las partículas tienen un diámetro de menos de aproximadamente 10 μm a menos que se indique otra cosa.

ES 2 371 425 T3

El término “solvato” significa un complejo o agregado formado por una o más moléculas de un soluto, es decir, una forma de base libre del compuesto de la fórmula I y una o más moléculas de un solvente. Tales solvatos suelen tener una relación molar sustancialmente fija de soluto y solvente. Este término también incluye clatratos, incluidos los clatratos con agua. Los solventes representativos incluyen, a título de ejemplo, agua, metanol, etanol, isopropanol, ácido acético y similares. Cuando el solvente es agua, el solvato formado es un hidrato.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” significa una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un paciente con necesidad de tratamiento.

El término “tratar” o “tratamiento” como se utiliza aquí significa el tratamiento de una enfermedad o condición médica (tal como COPD) en un paciente como un mamífero (particularmente un humano) que incluye:

- (a) evitar que ocurra la enfermedad o condición médica, es decir, el tratamiento profiláctico de un paciente;
- (b) mejorar la enfermedad o condición médica, es decir, eliminando o provocando la regresión de la enfermedad o condición médica en un paciente;
- (c) suprimir la enfermedad o condición médica, es decir, retrasando o parando el desarrollo de la enfermedad o condición médica en un paciente; o
- (d) aliviar los síntomas de la enfermedad o condición médica en un paciente.

El término “forma de dosificación unitaria” significa una unidad físicamente diferenciada adecuada para la dosificación a un paciente, es decir, cada unidad conteniendo una cantidad predeterminada de una sal de la invención calculada para producir el efecto terapéutico deseado ya sea solo o en combinación con una o más unidades adicionales. Por ejemplo, tales formas de dosificación unitaria pueden ser cápsulas de polvos secos para inhalador, una dosificación de un inhalador dosificador, cápsulas, comprimidos, píldoras, y similares.

Todos los otros términos utilizados aquí tienen su significado normal como lo entienden los expertos en la materia a la que pertenecen.

Formas cristalinas de base libre representativas de la invención

Se ha descubierto que el éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino}metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil}etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico existe en por lo menos tres formas cristalinas de base libre diferentes. A efectos de esta invención, estas formas se identifican aquí como Forma I, Forma II y Forma III. Estas formas cristalinas del compuesto de la fórmula I pueden distinguirse por al menos las siguientes propiedades:

- Forma I: Una traza de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que exhibe un pico en el flujo de calor endotérmico de aproximadamente 132°C a aproximadamente 138°C; y un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción, entre otros picos, en valores 2θ de aproximadamente 17,7±0,3, 18,2±0,3, 21,7±0,3 y 23,2±0,3.
- Forma II: Una traza de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que exhibe un pico en el flujo de calor endotérmico de aproximadamente 142°C a aproximadamente 150°C; y un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción, entre otros picos, en valores 2θ de aproximadamente 20,7±0,3, 21,6±0,3, 22,5±0,3 y 23,2±0,3.
- Forma III: Una traza de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que exhibe un pico en el flujo de calor endotérmico de aproximadamente 134°C a aproximadamente 140°C; y un patrón de difracción de rayos X en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción, entre otros picos, en valores 2θ de aproximadamente 15,50±0,3, 18,10±0,3, 19,20±0,3 y 21,80±0,3.

La presente invención se refiere a formas cristalinas de base libre de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino}metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil}etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico que se preparan mediante la cristalización de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino}metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil}etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato del mismo.

En un método de preparación, las formas cristalinas de base libre del compuesto de la fórmula I se preparan mediante la formación de una suspensión del compuesto en un solvente y se agita la suspensión resultante por un período de tiempo suficiente para formar el material cristalino. Normalmente, las suspensiones se agitan durante aproximadamente 24 hasta aproximadamente 72 horas a temperatura ambiente (es decir, a unos 20°C a 30°C). Generalmente, la suspensión comprenderá entre unos 35 mg y unos 45 mg, es decir, alrededor de 40 mg de compuesto por mililitro de solvente. En algunos casos, la elección del solvente determinará qué forma de base libre cristalina es producida de

ES 2 371 425 T3

la suspensión. Por ejemplo, cuando el solvente es acetonitrilo, se produce la Forma I como la forma predominante. Alternativamente, cuando el solvente es isopropanol, se produce la Forma II como la forma predominante. Adicionalmente, cuando el solvente es etanol, se produce la Forma III como la forma predominante. Además del solvente, otros factores pueden afectar en la forma sólida que se produce.

En otro método de preparación, se disuelve éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)2-hidroxietilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico en un diluyente, tal como metanol, etanol, isopropanol, acetato de etilo, acetonitrilo y similares, y se añade un solvente antagónico (antisolvente), como agua y similar, teniendo como resultado la formación de la base libre cristalina. Generalmente; el procedimiento de cristalización puede ser realizado a temperatura ambiente o calentando la mezcla y luego dejando que se enfríe a temperatura ambiente. En una forma de realización particular de este método, el diluyente es metanol y el solvente antagónico es agua.

El éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)2-hidroxietilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico empleado en esta invención puede ser preparado fácilmente a partir de materiales y reactivos disponibles comercialmente utilizando los procedimientos descritos en los Ejemplos abajo; o utilizando los procedimientos descritos en la solicitud de patente de EE. UU de titularidad compartida descrita en el apartado de antecedentes de esta solicitud.

Un proceso para preparar una forma de base libre cristalina de esta invención puede incluir opcionalmente el uso de un cristal semilla para producir predominantemente una forma de base libre particular. Por ejemplo, utilizando un cristal semilla de la Forma II, se puede preparar una forma de base libre cristalina de un compuesto de la fórmula I teniendo esencialmente la misma forma que el cristal semilla, es decir, la Forma II. Tales cristales semilla pueden ser utilizados al formar inicialmente la forma de base libre cristalina o pueden utilizarse para recrystallizar una forma cristalina o parcialmente cristalina de base libre.

Normalmente, los cristales semilla se preparan por cristalización lenta sin agitar y sin aplicar refrigeración. A modo de ejemplo, para obtener cristales semilla, normalmente se disuelve el compuesto de la fórmula I en un diluyente a una temperatura suficiente para proporcionar disolución. Por ejemplo, el compuesto de la fórmula I se disuelve en una mezcla al 1:2 de acetonitrilo y agua a entre aproximadamente 75°C y aproximadamente 80°C y entonces se deja enfriar a temperatura ambiente durante aproximadamente 12 horas a 24 horas para proporcionar una forma de base libre cristalina. En otra forma de realización, se usa metanol conteniendo aproximadamente 40% a aproximadamente 80% de agua por volumen como diluyente. Los cristales resultantes son aislados por filtración u otros medios convencionales. Alternativamente, los cristales semilla pueden obtenerse de una preparación anterior de material cristalino.

En una forma de realización particular del proceso de recrystallización utilizando cristales semilla, una forma de base libre del compuesto de la fórmula I se disuelve en metanol (típicamente entre unos 120 ml y unos 160 ml, inclusive 140 ml, de metanol por gramo de compuesto) a temperatura ambiente y se le añade agua hasta que se alcance el punto de enturbiamiento. Entonces se añaden los cristales semilla (normalmente entre alrededor de 1 y 5 mg de cristal semilla por gramo de compuesto). La mezcla resultante es agitada a temperatura ambiente durante el tiempo necesario para que el compuesto de la fórmula I se cristalice. Los cristales resultantes son aislados utilizando procedimientos convencionales, como filtración. Se tendrá en cuenta que las temperaturas específicas utilizadas para el proceso de cristalización o recrystallización se seleccionarán dependiendo del carácter del diluyente y la concentración de la sal cristalina en el diluyente. Además, el proceso de recrystallización puede realizarse utilizando evaporación o un solvente antagónico, en lugar de refrigeración, para facilitar la cristalización.

En un aspecto de esta invención, las formas cristalinas de base libre de esta invención se definen por sus características físicas y/o espectrales. Por consiguiente, en una forma de realización, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I caracterizada por un patrón de difracción de rayos x en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción en valores 2θ de aproximadamente 17,7±0,3, 18,2±0,3, 21,7±0,3 y 23,2±0,3. En un aspecto particular de esta forma de realización, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina caracterizada por un patrón de difracción de rayos x en polvo en el que las posiciones de los picos se corresponden substancialmente con los mostrados en la Figura 1.

En otra forma de realización, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I caracterizada por un patrón de difracción de rayos x en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción en valores 2θ de aproximadamente 20,70±0,3, 21,60±0,3, 22,50±0,3 y 23,2±0,3. En un aspecto particular de esta forma de realización, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina caracterizada por un patrón de difracción de rayos x en polvo en el que las posiciones de los picos se corresponden substancialmente con los mostrados en la Figura 2.

En aún otra forma de realización, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I caracterizada por un patrón de difracción de rayos x en polvo (PXRD) que tiene picos significativos de difracción en valores 2θ de aproximadamente 15,50±0,3, 18,10±0,3, 19,20±0,3 y 21,80±0,3. En un aspecto particular de esta forma de realización, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina caracterizada por un patrón de difracción de rayos x en polvo en el que las posiciones de los picos se corresponden substancialmente con los mostrados en la Figura 3.

ES 2 371 425 T3

En aún otra forma de realización, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I que tiene una traza DSC que se corresponde substancialmente con la traza mostrada en la Figura 4. En otra forma de realización, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I que tiene una traza DSC que se corresponde substancialmente con la traza mostrada en la Figura 5. En aún otra forma de realización, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I que tiene una traza DSC que se corresponde substancialmente con la traza mostrada en la Figura 6.

Se ha demostrado que una forma de base libre cristalina de Forma II tiene un perfil reversible de absorción/desorción con un aumento de peso inferior a aproximadamente 0,5% en el rango de humedad de 40% de humedad relativa a 75% de humedad relativa.

Estas propiedades de las formas cristalinas de base libre de esta invención se ilustran con más detalle en los Ejemplos abajo.

Composiciones, combinaciones y formulaciones farmacéuticas

Las formas cristalinas de base libre de esta invención suelen ser administradas a un paciente en forma de una composición o formulación farmacéutica. Tales composiciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente por cualquier vía de administración aceptable incluyendo, aunque no exclusivamente, modos de administración por inhalación, oral, nasal, tópica (incluyendo transdérmica) y parenteral.

Por consiguiente, en uno de los aspectos de sus composiciones, esta invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un soporte o excipiente farmacéuticamente aceptable y una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I. Opcionalmente, tales composiciones farmacéuticas pueden contener otros agentes terapéuticos y/o de formulación si se desea.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención contienen típicamente una cantidad terapéuticamente efectiva de una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I. Los expertos en la materia reconocerán, sin embargo, que una composición farmacéutica puede contener más de una cantidad terapéuticamente efectiva, es decir, composiciones a granel, o menos que una cantidad terapéuticamente efectiva, es decir, dosis unitarias individuales diseñadas para una administración múltiple para lograr una cantidad terapéuticamente efectiva. Normalmente, la composición farmacéutica contendrá desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 95 por ciento en peso del agente terapéutico, incluyendo, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 30 por ciento en peso, tal como desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10 por ciento en peso del agente terapéutico.

Se puede usar cualquier soporte o excipiente convencional en las composiciones farmacéuticas de esta invención. La elección de un soporte o excipiente particular o combinaciones de soportes y excipientes, dependerá del modo de administración que se esté utilizando para tratar a un paciente o tipo de condición médica o estado de enfermedad particular. A este respecto, la preparación de una composición farmacéutica adecuada para un modo particular de administración entra en la competencia de los expertos en técnicas farmacéuticas.

Los soportes o excipientes utilizados en las composiciones farmacéuticas de esta invención están comercialmente disponibles. Por ejemplo, tales materiales pueden comprarse a Sigma (St. Louis, MO). Como otro ejemplo, las técnicas convencionales de formulación son muy conocidos por los expertos en la materia como ilustran las teorías de Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000) y H.C. Ansel *et al.*, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ª edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Los ejemplos representativos de materiales que pueden servir como soportes farmacéuticamente aceptables incluyen, aunque no exclusivamente, los siguientes: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propileno-glicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes de tamponación tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua exenta de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones de tampón de fosfato; (21) gases propulsores comprimidos, tales como clorofluorocarbonos e hidrofurocarbonos; y (22) otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención suelen prepararse mezclando o combinando cuidadosamente y a fondo una forma de base libre cristalina de la invención con un soporte farmacéuticamente aceptable y uno o más ingredientes opcionales. Si se necesita o desea, la mezcla uniformemente combinada resultante puede ser formada o cargada en comprimidos, cápsulas, píldoras, frascos, cartuchos, dosificadores y similares utilizando procedimientos y equipos convencionales.

ES 2 371 425 T3

En una forma de realización, las composiciones farmacéuticas de esta invención son adecuadas para la administración inhalada. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración inhalada estarán normalmente en forma de un aerosol o polvo. Tales composiciones se administran generalmente utilizando dispositivos de administración muy conocidos, tales como un inhalador nebulizador, un inhalador dosificador (MDI), un inhalador de polvo seco (DPI) o un dispositivo de administración similar.

En una forma de realización específica de esta invención, la composición farmacéutica comprendiendo el agente terapéutico es administrada por inhalación utilizando un inhalador nebulizador. Tales dispositivos nebulizadores suelen producir una corriente de aire a gran velocidad que hace que la composición farmacéutica comprendiendo el agente terapéutico se pulverice como una niebla que es llevada al tracto respiratorio del paciente. En consecuencia, cuando se formula para usar en un inhalador nebulizador, el agente terapéutico suele ser disuelto en un soporte adecuado para formar una solución. Alternativamente, el agente terapéutico puede ser micronizado y combinado con un soporte adecuado para formar una suspensión de partículas micronizadas. Los dispositivos nebulizadores adecuados para administrar agentes terapéuticos por inhalación son muy conocidos por los expertos en la materia o tales dispositivos están disponibles comercialmente. Por ejemplo, los dispositivos nebulizadores o productos representativos incluyen el inhalador RespiMat Softmist (Boehringer Ingelheim); el sistema de administración pulmonar AERx (Aradigm Corp.); el nebulizador reutilizable PARI LC Plus (Pari GmbH); y similares.

Una composición farmacéutica representativa para el uso en un inhalador nebulizador comprende una solución acuosa isotónica que comprende desde aproximadamente 0,05 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 10 mg/ml de un compuesto de la fórmula I. Tales composiciones son preparadas típicamente disolviendo una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I en solución salina isotónica. En una forma de realización, esta solución tiene un pH de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 6.

En otra forma de realización específica de esta invención, la composición farmacéutica comprendiendo el agente terapéutico es administrada por inhalación utilizando un inhalador de polvo seco. Estos inhaladores de polvo seco suelen administrar el agente terapéutico como un polvo suelto que se dispersa en una corriente de aire del paciente durante la inspiración. Para lograr un polvo suelto, el agente terapéutico se formula normalmente con un excipiente adecuado como lactosa, almidón, manitol, dextrosa, ácido poliláctico (PLA), poliláctido-co-glicólidos (PLGA) o combinaciones de los mismos. Normalmente, el agente terapéutico es micronizado y combinado con un soporte adecuado para formar una mezcla adecuada para su inhalación.

Una composición farmacéutica representativa para usar en un inhalador de polvo seco comprende partículas molidas secas y micronizadas de lactosa de una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I.

Esta formulación de polvo seco puede hacerse, por ejemplo, combinando la lactosa con el agente terapéutico y entonces mezclando en seco los componentes. Alternativamente, si se desea, el agente terapéutico puede formularse sin excipiente. La composición farmacéutica se carga entonces normalmente en un dispensador de polvo seco o en cartuchos o cápsulas de inhalación para usarlos con un dispositivo de administración de polvo seco.

Los dispositivos administradores inhaladores de polvo seco adecuados para administrar agentes terapéuticos por inhalación son muy conocidos por los expertos en la materia o tales dispositivos están disponibles comercialmente. Por ejemplo, los dispositivos administradores inhaladores de polvo seco o productos representativos incluyen 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 similares.

En otra forma de realización específica más de esta invención, la composición farmacéutica comprendiendo el agente terapéutico es administrada por inhalación utilizando un inhalador dosificador. Estos inhaladores dosificadores descargan típicamente una cantidad medida del agente terapéutico utilizando un gas propelente comprimido. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas administradas utilizando un inhalador dosificador normalmente comprenden una solución o suspensión del agente terapéutico en un propelente líquido. Se puede emplear cualquier propelente líquido incluyendo clorofluorocarbonos, tales como CCl_3F , e hidrofluoroalcanos (HFA), tales como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134a) y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-n-propano, (HFA 227). Considerando que los clorofluorocarbonos afectan a la capa de ozono, generalmente se prefieren las formulaciones conteniendo HFA. Otros componentes opcionales de las formulaciones de HFA incluyen cosolventes, tales como etanol o pentano y surfactantes, tales como trioleato de sorbitán, ácido oléico, lecitina y glicerina.

Una composición farmacéutica representativa para usar en un inhalador dosificador comprende desde aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 5% en peso de una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I, desde aproximadamente 0% hasta aproximadamente 20% en peso de etanol y desde aproximadamente 0% hasta aproximadamente 5% en peso de surfactante con el resto siendo un propelente de HFA.

Tales composiciones suelen prepararse añadiendo hidrofluoroalcano enfriado o presurizado a un recipiente adecuado conteniendo el agente terapéutico, etanol (si está presente) y el surfactante (si está presente). Para preparar una suspensión, el agente terapéutico es micronizado y luego combinado con el propelente. Entonces se carga la formulación en un frasco de aerosol que forma parte de un dispositivo inhalador dosificador.

ES 2 371 425 T3

Los dispositivos inhaladores dosificadores adecuados para administrar agentes terapéuticos por inhalación son muy conocidos por los expertos en la materia o tales dispositivos están disponibles comercialmente. Por ejemplo, los dispositivos inhaladores dosificadores o productos incluyen el sistema inhalador AeroBid (Forest Pharmaceuticals); el aerosol de inhalación Atrovent (Boehringer Ingelheim); Flovent (GlaxoSmithKline); el inhalador Maxair (3M); el inhalador Proventil (Schering); el aerosol de inhalación Serevent (GlaxoSmithKline); y similares.

En otra forma de realización, las composiciones farmacéuticas de esta invención son adecuadas para la administración oral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, sellos, grageas, polvos, gránulos; o como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe; y similares; cada uno conteniendo una cantidad predeterminada de una forma de base libre cristalina de la presente invención como principio activo.

Cuando están destinadas a la administración oral en una forma de dosificación sólida (es decir, en forma de cápsulas, tabletas, píldoras y similares), las composiciones farmacéuticas de esta invención normalmente comprenderán una forma de base libre cristalina de la presente invención como principio activo y uno o más soportes farmacéuticamente aceptables, como citrato sódico o fosfato dicálcico. Opcional o alternativamente, tales formas de dosificación sólidas pueden comprender también: (1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinipirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, algunos silicatos y/o carbonato sódico; (5) agentes retardadores de disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y/o arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico, y/o mezclas de los mismos (10); agentes colorantes y (11) agentes de tamponación. En las composiciones farmacéuticas de esta invención también pueden presentarse agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de revestimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfato sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares. Los agentes de revestimiento para comprimidos, cápsulas, píldoras y similares, incluyen aquellos utilizados para revestimientos entéricos, tales como acetato ftalato de celulosa (CAP), acetato ftalato de polivinilo (PVAP), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de ácido metacrílico-éster de ácido metacrílico, acetato trimelitato de celulosa (CAT), carboximetilcelulosa (CMC), acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), y similares.

Si se desea, las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden ser formuladas para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo utilizando, a modo de ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables, o matrices de otros polímeros, liposomas y/o microesferas.

Además, las composiciones farmacéuticas de la invención, opcionalmente, puede contener agentes opacificantes y pueden ser formuladas de manera que liberen el principio activo sólo, o preferentemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de inclusión que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si fuera apropiado, con uno o más de los excipientes descritos arriba.

Las formas adecuadas de dosificación líquida para la administración oral incluyen, a título ilustrativo, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, elixires y jarabes farmacéuticamente aceptables. Estas formas de dosificación líquidas suelen comprender el principio activo y un diluyente inerte, tal como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulgentes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenoglicol, aceites (por ej., aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Las suspensiones, además del ingrediente activo, pueden contener agentes de suspensión, tales como, por ejemplo, alcoholes isostearílicos etoxilados, ésteres de polioxietileno sorbitol y sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos. Obviamente, cuando se administra como una solución en forma de dosis líquida, la forma de base libre cristalina ya no está en forma cristalina sino que está disuelta en el soporte líquido.

Cuando están previstas para la administración oral, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden envasarse en una forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria" significa una unidad físicamente diferenciada adecuada para la dosificación a un paciente, es decir, cada unidad conteniendo una cantidad predeterminada de agente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado ya sea solo o en combinación con una o más unidades adicionales. Por ejemplo, tales formas de dosificación unitarias pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras y similares.

ES 2 371 425 T3

Las formas cristalinas de base libre de esta invención también pueden administrarse transdérmicamente utilizando sistemas y excipientes de administración transdérmica. Por ejemplo, se puede mezclar una forma de base libre cristalina con potenciadores de permeación, tales como propilenglicol, monolaurato de polietilenglicol, azacicloalcan-2-onas y similares, e incorporarlos en un parche o sistema de administración similar. Se pueden utilizar otros excipientes, incluyendo agentes gelificantes, emulgentes y tampones en tales composiciones transdérmicas si se desea.

Adicionalmente, las formas cristalinas de base libre de esta invención pueden ser administradas parenteralmente, es decir, intravenosa, subcutánea o intramuscularmente. Para la administración parenteral, se disuelve normalmente una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I en un soporte aceptable para la administración parenteral, como agua estéril, solución salina, aceite vegetal y similares. A modo de ejemplo, una composición intravenosa comprende típicamente una solución acuosa estéril preparada a partir de una forma de base libre cristalina de un compuesto de la fórmula I, donde la solución tiene un pH en el rango de aproximadamente 4 a aproximadamente 7.

Si se desea, las formas cristalinas de base libre de esta invención pueden ser administradas en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. En esta forma de realización, una forma de base libre cristalina de esta invención es ya sea físicamente mezclada con el agente terapéutico para formar una composición conteniendo los dos agentes, o cada agente está presente en composiciones distintas y separadas que se administran al paciente simultánea o secuencialmente.

Por ejemplo, una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I puede ser combinada con el segundo agente terapéutico utilizando procedimientos y equipos convencionales para formar una composición que comprenda una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I y un segundo agente terapéutico. Además, los agentes terapéuticos pueden ser combinados con un soporte farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica comprendiendo una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I, un segundo agente terapéutico y un soporte farmacéuticamente aceptable. En esta forma de realización, los componentes de la composición son mezclados o combinados normalmente para crear una mezcla física. La mezcla física es entonces administrada en una cantidad terapéuticamente eficaz utilizando cualquiera de las vías descritas en esta memoria.

Alternativamente, los agentes terapéuticos pueden permanecer separados y diferenciados antes de la administración al paciente. En esta forma de realización, los agentes terapéuticos no están mezclados físicamente antes de la administración sino que son administrados simultánea o secuencialmente como composiciones separadas. Por ejemplo, una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I puede administrarse por inhalación simultánea o secuencialmente con otro agente terapéutico utilizando un dispositivo de administración por inhalación que emplee compartimentos separados (por ejemplo blísteres) para cada agente terapéutico. Alternativamente, la combinación puede ser administrada utilizando dispositivos separados de administración, es decir, un dispositivo de administración para cada agente terapéutico. Adicionalmente, los agentes terapéuticos pueden ser administrados por vías diferentes de administración, es decir, uno por inhalación y el otro por administración oral.

Cualquier agente terapéutico compatible con las formas cristalinas de base libre de la presente invención puede ser utilizado en combinación con tales formas. En una forma de realización particular, el segundo agente terapéutico es uno que es administrado efectivamente por inhalación. A modo de ejemplo, los tipos representativos de agentes terapéuticos que pueden ser utilizados con los compuestos de esta invención incluyen, aunque no exclusivamente, agentes antiinflamatorios, como agentes antiinflamatorios esteroideos (incluidos corticoesteroides y glucocorticoides), agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSAID) e inhibidores PDE₄; broncodilatadores, como los inhibidores PDE₃, moduladores 2b de adenosina y agonistas del receptor adrenérgico β_2 ; agentes antiinfecciosos, como antibióticos contra bacterias Gram-positivas, antibióticos contra bacterias Gram-negativas, y agentes antivirales; antihistamínicos; inhibidores de la proteasa; bloqueadores de las vías nerviosas aferentes, como agonistas de D₂ y moduladores neuroquininas; y antagonistas del receptor muscarínico (agentes anticolinérgicos). En la técnica se conocen bien numerosos ejemplos de tales agentes terapéuticos. Las dosis adecuadas para el resto de agentes terapéuticos administrados en combinación con un compuesto de la invención se encuentran normalmente en el rango de aproximadamente 0,05 $\mu\text{g}/\text{día}$ a 500 $\text{mg}/\text{día}$.

En una forma de realización particular de esta invención, una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I es administrada en combinación con un agente antiinflamatorio esteroideo. Los ejemplos representativos de agentes antiinflamatorios esteroideos que pueden ser utilizados en combinación con las formas cristalinas de base libre de esta invención incluyen, aunque no exclusivamente, dipropionato de beclometasona; budesonida; propionato de butixocort; 20R-16 α ,17 α -[butilidenobis(oxi)]-6 α ,9 α -difluoro-11 β -hidroxi-17 β -(metiltio)androsta-4-dien-3-ona (RPR-106541); ciclesonida; dexametasona; éster S-fluorometílico 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 -carbotiólico; éster S-fluorometílico del ácido 6 α ,9 α -difluoro-11 β -hidroxi-16 α -metil-17 α -[(4-metil-1,3-tiazol-5-carbonil)oxi]-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17 β -carbotiólico; éster (S)-(2-oxotetrahidrofuran-3S-ílico) del ácido 6 α ,9 α -difluoro-11 β -hidroxi-16 α -metil-3-oxo-17 α -propioniloxi-androsta-1,4-dieno-17 β -carbotiólico; flunisolida; propionato de fluticasona; metilprednisolona; furoato de mometasona; prednisolona; prednisona; rofleponida; ST-126; triamcinolona acetónido; y similares, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Estos agentes antiinflamatorios esteroideos están disponibles comercialmente o pueden ser preparados utilizando procedimientos y reactivos convencionales. Por ejemplo, la preparación y el uso de agentes antiinflamatorios esteroideos se describe en la patente US 6.750.210 B2, concedida el 15 de junio de 2004; la patente US 6.759.398 B2, concedida el 6 de julio de 2004; la patente US 6.537.983, concedida el 25 de marzo de 2003; la publicación de la solicitud de patente US 2002/0019378 A1, publicada el 14 de febrero de 2002; y las referencias citadas en las mismas.

ES 2 371 425 T3

Cuando se emplea, el agente antiinflamatorio esteroide es administrado típicamente en una cantidad que tiene un efecto terapéuticamente beneficioso cuando es administrado junto con una forma de base libre cristalina de la invención. Generalmente, el agente antiinflamatorio esteroideo se administrará en una cantidad suficiente para proporcionar desde aproximadamente 0,05 μg hasta aproximadamente 500 μg por dosis.

5

Los siguientes ejemplos ilustran las composiciones farmacéuticas representativas de la presente invención:

Ejemplo A

10

Composición de polvo seco

Se mezcla una forma de base libre cristalina micronizada del compuesto de la fórmula I (100 mg) con lactosa molida (25 g) (por ejemplo, lactosa en la que no más de aproximadamente el 85% de las partículas tiene un MMD de aproximadamente 60 μm hasta aproximadamente 90 μm y no menos del 15% de las partículas tiene un MMD de menos de 15 μm). Entonces se carga esta mezcla en blísteres individuales de un envase con blísteres rasgable en una cantidad suficiente para proporcionar aproximadamente 10 μg hasta aproximadamente 500 μg del compuesto de la fórmula I por dosis. El contenido de los blísteres se administra utilizando un inhalador de polvo seco.

20

Ejemplo B

Composición de polvo seco

Se mezcla una forma de base libre cristalina micronizada del compuesto de la fórmula I (1 g) con lactosa molida (200 g) para formar una composición a granel que tiene una relación de peso de forma de base libre cristalina a lactosa molida de 1:200. La composición mezclada se envasa en un dispositivo de inhalación de polvo seco capaz de administrar entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 500 μg del compuesto de la fórmula I por dosis.

30

Ejemplo C

Composición de polvo seco

Se mezclan una forma de base libre cristalina micronizada del compuesto de la fórmula I (100 mg) y un agente antiinflamatorio esteroideo micronizado (500 mg) con lactosa molida (30 g). Entonces se carga esta mezcla en blísteres individuales de un envase con blísteres rasgable en una cantidad suficiente para proporcionar aproximadamente 10 μg hasta aproximadamente 500 μg del compuesto de la fórmula I por dosis. El contenido de los blísteres se administra utilizando un inhalador de polvo seco.

40

Ejemplo D

Composición para inhalador dosificador

45

Se dispersa una forma de base libre cristalina micronizada del compuesto de la fórmula I (10 g) en una solución preparada disolviendo lecitina (0,2 g) en agua desmineralizada (200 ml). La suspensión resultante es secada por pulverización y luego micronizada para formar una composición micronizada que comprende partículas que tiene un diámetro medio inferior a aproximadamente 1,5 μm . Entonces se carga la composición micronizada en cartuchos para inhalador dosificador conteniendo 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado en una cantidad suficiente para proporcionar aproximadamente 10 μg hasta aproximadamente 500 μg del compuesto de la fórmula I por dosis cuando se administra con el inhalador dosificador.

Ejemplo E

Composición para nebulizador

Se disuelve una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I (25 mg) en solución salina (125 ml) tamponada con citrato (pH 5). Se agita la mezcla y se somete a sonicación hasta que se disuelve el compuesto. El pH de la solución es verificado y ajustado, en caso de ser necesario, a pH 5 añadiendo lentamente hidróxido de sodio IN acuoso. La solución se administra utilizando un dispositivo nebulizador que proporciona entre aproximadamente 10 μg y aproximadamente 500 μg del compuesto de la fórmula I por dosis.

65

ES 2 371 425 T3

Ejemplo F

Cápsulas duras de gelatina

- 5 Se mezclan cuidadosamente una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I (50 g), lactosa secada por pulverización (440 g) y estearato de magnesio (10 g). Se carga la composición resultante en una cápsula de gelatina dura (500 mg de composición por cápsula) que se administra oralmente.

10 Ejemplo G

Suspensión oral

15 Se mezclan los siguientes ingredientes exhaustivamente para formar una suspensión para la administración oral:

Ingredientes	Cantidad
Forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I	1,0 g
20 Ácido fumárico	0,5 g
Cloruro sódico	2,0 g
25 Metil parabeno	0,15 g
Propil parabeno	0,05 g
Azúcar granulada	25,5 g
30 Sorbitol (solución al 70%)	12,85 g
VEEGUM® K (silicato de aluminio de magnesio)	1,0 g
Saborizante	0,035 ml
35 Colorante	0,5 mg
Agua destilada	c.s. para 100 ml

- 40 La suspensión resultante contiene 100 mg de principio activo por 10 ml de suspensión. La suspensión se administra oralmente.

45 Ejemplo H

Composición inyectable

- 50 Se mezcla una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I (0,2 g) con 0,4 M de solución tampón de acetato de sodio (2,0 ml). El pH de la solución resultante se ajusta a pH 4 utilizando 0,5 N de ácido clorhídrico acuoso o 0,5 N de hidróxido de sodio acuoso, según sea necesario, tras lo cual se añade suficiente agua para inyección para proporcionar un volumen total de 20 ml. La mezcla se filtra entonces con un filtro estéril (0,22 micras) para proporcionar una solución estéril adecuada para la administración por inyección.

55 *Utilidad*

- 60 El compuesto de la fórmula I posee actividad tanto de agonista del receptor adrenérgico β_2 como de antagonista del receptor muscarínico y por lo tanto, se espera que una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I sea útil como agente terapéutico para tratar condiciones médicas mediadas por los receptores adrenérgicos β_2 o los receptores muscarínicos, es decir, condiciones médicas que mejoran con el tratamiento con un agonista del receptor adrenérgico β_2 o un antagonista del receptor muscarínico. Estas condiciones médicas son muy conocidas por los expertos en la materia como ilustran las teorías de Eglen *et al.*, Muscarinic Receptor Subtypes: Pharmacology and Therapeutic Potential, DN&P 10(8), 462-469 (1997); Emilien *et al.*, Current Therapeutic Uses and Potential of beta-Adrenoceptor Agonists and Antagonists, European J. Clinical Pharm., 53(6), 389-404 (1998); y las referencias citadas en los mismos. Tales condiciones médicas incluyen, a título de ejemplo, trastornos o enfermedades pulmonares asociadas a la obstrucción reversible de las vías respiratorias, tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (por ej., bronquitis crónica y jadeante y enfisema), asma, fibrosis pulmonar y similares. Otras condiciones incluyen

ES 2 371 425 T3

parto prematuro, depresión, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedades de la piel (por ejemplo, enfermedades de la piel inflamatorias, alérgicas, psoriásicas y proliferativas), condiciones en las que es deseable bajar la acidez péptica (por ejemplo, ulceración péptica y gástrica) y atrofia muscular.

5 Por consiguiente, en una forma de realización, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina de un compuesto de la fórmula I para usar en un método para tratar una enfermedad pulmonar, el método comprendiendo administrar a un paciente que requiere tratamiento una cantidad terapéuticamente efectiva de una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I. Cuando se usa para tratar una enfermedad, las formas cristalinas de base libre de esta invención serán administradas típicamente por aspiración en varias dosis al día, en una dosis única al día o una
10 dosis única a la semana. Generalmente, la dosis para tratar una enfermedad pulmonar variará entre aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{día}$ y aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{día}$.

En uno de sus aspectos, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina de un compuesto de la fórmula I para usar en el método de tratar la enfermedad pulmonar de obstrucción crónica o el asma, el método comprendiendo
15 administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una forma de base libre cristalina del compuesto de la fórmula I. Generalmente, la dosis para tratar la COPD o asma variará entre aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{día}$ y aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{día}$. Los expertos en la materia entenderán que el término "COPD" incluye una variedad de condiciones respiratorias, inclusive bronquitis y enfisema obstructivas crónicas, como ilustran las teorías de Barnes, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, N. Engl. J. Med, 2000: 343.269-78 y las referencias citadas en las mismas.
20

Cuando se administran por inhalación, los compuestos de la fórmula I tendrán normalmente el efecto de producir broncodilatación. Por consiguiente, en otro de sus aspectos, esta invención se refiere a una forma de base libre cristalina de un compuesto de la fórmula I para usar en un método para producir broncodilatación en un mamífero, el método comprendiendo administrar a un mamífero una cantidad que produzca broncodilatación de una forma de
25 base libre cristalina del compuesto de la fórmula I. Generalmente, la dosis para producir broncodilatación variará entre aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{día}$ y aproximadamente 500 $\mu\text{g}/\text{día}$.

Cuando se usa como agente terapéutico, las formas cristalinas de base libre de esta invención son administradas opcionalmente combinadas con otro agente o agentes terapéuticos. En particular, al administrar una forma de base libre cristalina de esta invención con un agente antiinflamatorio esteroideo, se puede conseguir una terapia triple, es decir, actividad de agonista del receptor adrenérgico β_2 , actividad de antagonista del receptor muscarínico y actividad antiinflamatoria, utilizando sólo dos agentes terapéuticos. Como las composiciones farmacéuticas (y sus combinaciones) conteniendo dos agentes terapéuticos suelen ser más fáciles de formular y/o administrar en comparación con las composiciones que contienen tres agentes terapéuticos, tales composiciones de dos componentes proporcionan una
35 ventaja significativa sobre las composiciones que contienen tres agentes terapéuticos. Por consiguiente, en una forma de realización particular, las composiciones y las combinaciones farmacéuticas de esta invención comprenden además un agente antiinflamatorio esteroideo.

Las propiedades, así como la utilidad de las formas cristalinas de base libre de los compuestos de la fórmula I, pueden demostrarse utilizando varios ensayos *in vitro* e *in vivo* muy conocidos para los expertos en la materia. Por ejemplo, se describen unos ensayos representativos con mayor detalle en los siguientes Ejemplos.
40

Ejemplos

45 Las preparaciones y ejemplos siguientes se proporcionan para ilustrar las formas de realización y los aspectos específicos de esta invención. No obstante, la ilustración de las formas de realización y de los aspectos específicos no pretende limitar el alcance de esta invención en ninguna manera a menos que se indique específicamente.

50 Todos los reactivos, materiales iniciales y solventes utilizados en los ejemplos siguientes fueron comprados a proveedores comerciales (como Aldrich, Fluka, Sigma, y similares) y fueron utilizados sin purificación adicional a menos que se indique otra cosa.

En los ejemplos siguientes, el análisis de HPLC se realizó normalmente utilizando un equipo Agilent (Palo Alto, CA) Serie 1100 con columnas Zorbax Bonus RP 2,1 x 50 mm, suministrados por Agilent, (una columna C14), teniendo un tamaño de partícula de 3,5 μm . La detección fue por absorbancia UV a 214 nm. La fase móvil "A" fue de acetonitrilo al 2%, agua al 97,9% y ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v/v); y la fase móvil "B" fue de acetonitrilo al 89,9%, agua al 10% y ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v/v). Los datos de la HPLC (10-70) se obtuvieron con un caudal de 0,5 ml/minuto con un gradiente del 10% al 70% de la fase móvil B durante un período de 6 minutos; los datos de la HPLC (5-35) se obtuvieron con un caudal de 0,5 ml/minuto con un gradiente del 5% al 35% de la fase móvil B durante un período de 5 minutos; y los datos de la HPLC (10-90) se obtuvieron con un caudal de 0,5 ml/minuto con un gradiente del 10% al 90% de la fase móvil B durante un período de 5 minutos.
60

Los datos de la cromatografía líquida con espectrometría de masas (LCMS) se obtuvieron normalmente con un equipo modelo API-150EX de Applied Biosystems (Foster City, CA). Los datos de la LCMS 10-90 se obtuvieron con un gradiente de la fase móvil B del 10% al 90% durante un período de 5 minutos.
65

ES 2 371 425 T3

Se realizaron purificaciones a pequeña escala utilizando un sistema API 150EX Prep Workstation de Applied Biosystems. La fase móvil "A" era agua conteniendo ácido trifluoroacético al 0,05% (v/v); y la fase móvil "B" era acetonitrilo conteniendo ácido trifluoroacético al 0,05% (v/v). Para las muestras pequeñas (tamaño de aproximadamente 3 a 50 mg de la muestra recuperada) se utilizaron normalmente las siguientes condiciones: caudal 20 ml/min; gradientes de 15 minutos y una columna de 20 mm x 50 mm Prism RP con partículas de 5 mieras (Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA). Para muestras más grandes (es decir, superiores a aproximadamente 100 mg de la muestra cruda) se utilizaron normalmente las siguientes condiciones: caudal 60 ml/min; gradientes de 30 minutos y una columna de 41,4 mm x 250 mm Microsorb BDS con partículas de 10 mieras (Varian, Palo Alto, CA).

Para los datos de la RMN ¹H, se utilizan las siguientes abreviaturas: s = singlete, d = doblete, t = triplete, q = cuarteto, m = multiplete, br = ancho, nd = no determinado.

Ejemplo 1

Éster piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Se calentaron bifeníl-2-isocianato (97,5 g, 521 mmol) y 4-hidroxi-1-bencilpiperidina (105 g, 549 mmol) (ambos comercializados por Aldrich, Milwaukee, WI) juntos a 70°C durante 12 hr, tiempo durante el cual se vigiló la formación de éster 1-bencilpiperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico mediante LCMS. Entonces se enfrió la mezcla de reacción a 50°C y se añadió etanol (1 l) tras lo cual se añadió 6M de ácido clorhídrico (191 ml) lentamente. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se le añadió formato de amonio (98,5 g, 1,56 mol) y se borboteó gas nitrógeno en la solución vigorosamente durante 20 min. Entonces se añadió paladio (10% en peso (en seco) en carbón activo) (20 g). La mezcla de reacción se calentó a 40°C durante 12 hr y luego se filtró a través de un soporte de celita. Entonces se eliminó el solvente bajo presión reducida y se añadió 1M de ácido clorhídrico (40 ml) al residuo crudo. Entonces se añadió hidróxido de sodio (10N) para ajustar el pH a 12. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 ml) y se secó (sulfato de magnesio), y entonces el solvente se eliminó bajo presión reducida para dar éster piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (155 g, 100%). HPLC (10-70) R_t = 2,52; MS m/z: [M+H]⁺ calculado para C₁₈H₂₀N₂O₂: 297,15; hallado: 297,3.

Ejemplo 2

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

A una solución de éster piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (50 g, 67,6 mmol) en diclorometano (500 ml) se añadió ácido acrílico (15,05, 100 mmol). La mezcla resultante se calentó a 50°C bajo reflujo durante 2 horas y luego se eliminó el solvente. Se añadió metanol (600 ml) y se calentó esta mezcla a 75°C durante 2 horas y entonces se enfrió a temperatura ambiente para formar una pasta espesa. El sólido se recogió por filtración, se lavó con metanol (50 ml) y se secó al aire para proporcionar ácido 3-(4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propiónico (61 g, 96% de pureza) como polvo blanco.

Ejemplo 3

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

Paso A

N-{5-[(R)-2-benzilamino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benciloxifenil}formamida

A un frasco de fondo redondo y tres cuellos de 500 ml se le añadió N-{2-benciloxi-5-[(R)-2-bromo-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]fenil}formamida (100 g, 215 mmol) y N-metil-2-pirrolidona (300 ml). Se añadió bencilamina (69,4 ml, 648 mol) y se purgó la mezcla de reacción con nitrógeno. Luego se calentó la mezcla de reacción a 90°C y se agitó durante aproximadamente 8 horas. Entonces se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se añadieron 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 al 1:1 de agua y salmuera saturada (500 ml total), y nuevamente con agua (500 ml). La capa orgánica se secó entonces sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y concentró bajo presión reducida para proporcionar N-{5-[(R)-2-benzilainino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benciloxifenil}formamida cruda (100 g, 90% de rendimiento, 75-80% de pureza) como un aceite espeso naranja-marrón.

Paso B

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

Se disolvió la N-{5-[(R)-2-benzilamino-1-(terc-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 seco y en-

ES 2 371 425 T3

tonces se le añadió hidróxido de paladio en carbón (20 g, 20% en peso, aproximadamente 50% de agua). Se borboteó hidrógeno en la mezcla de reacción con agitación a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 horas. Entonces se purgó la mezcla con nitrógeno seco y la mezcla se filtró con celita. El filtrado se concentró en un evaporador giratorio y se añadió acetato de etilo (600 ml) al residuo. Esta mezcla se agitó durante aproximadamente 2 horas, momento en el que se desarrolló una pasta espesa amarilla. La pasta se filtró y el precipitado se secó al aire para proporcionar sal de ácido acético de *N*-{5-[(*R*)-2-amino-1-(terc-butildimetilsilanilo)etil]-2-hidroxifenil}formamida (48 g, 98% de pureza) como un sólido amarillo-blanco. LCMS (10-70) $R_t = 3,62$; $[M+H]^+$ hallado 311,3.

Ejemplo 4

*Éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-{3-formilamino-4-hidroxifenil}-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico*

Paso A

2,5-Dimetil-4-nitrobenzoato de metilo

A una solución agitada de ácido 2,5-dimetil-4-nitrobenoico (480 mg, 2,4 mmol) en metanol seco (8,2 ml) a 0°C bajo nitrógeno seco se le añadió cloruro de tionilo (0,538 ml, 7,38 mmol). La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente y se agitó durante aproximadamente 7 horas. Se añadió más cloruro de tionilo (0,300 ml) y se continuó la agitación a temperatura ambiente durante la noche. El solvente se eliminó a presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo. Esta solución se lavó con bicarbonato sódico acuoso saturado, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para proporcionar 2,5-dimetil-4-nitrobenzoato de metilo (578 mg) como un sólido amarillo pálido. HPLC (10-70) $R_t = 4,61$; RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,57 (s, 3H), 2,61 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 7,82 (s, 1H), 7,87 (s, 1H).

Paso B

4-Amino-2,5-dimetilbenzoato de metilo

A una solución agitada de 2,5-dimetil-4-nitrobenzoato de metilo (523 mg, 2,5 mmol) en una mezcla al 9:1 de metanol y agua (25 ml total) a 0°C se le añadió cloruro de amonio (401 mg, 7,5 mmol). Se añadieron porciones de zinc (1,63 g, 25 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de celita y el soporte de celita se lavó con metanol. El filtrado se concentró a 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 de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para proporcionar 4-amino-2,5-dimetilbenzoato de metilo (450 mg) como un aceite amarillo. RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,14 (s, 3H), 2,53 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,85 (br s, 2H), 6,48 (s, 1H), 7,72 (s, 1H).

Paso C

4-{3-[4-(Bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metilo

A una solución agitada de ácido 3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propiónico (670 mg, 1,82 mmol) y 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)-1,3,3-tetrametiluronio (HATU) (829 mg, 2,18 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Entonces se lavó la mezcla con bicarbonato sódico acuoso saturado, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con diclorometano conteniendo metanol del 3% al 5%, para proporcionar 4-{3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metilo (568 mg, 59% de rendimiento). LCMS (10-70) $R_t = 4,55$; $[M+H]^+$ hallado 530,4.

Paso D

Éster 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A una solución agitada de 1M de hidruro de aluminio de litio en THF (1,52 ml, 1,52 mmol) a 0°C se le añadió 4-{3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metilo (400 mg, 0,76 mmol). La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 30 minutos y entonces se añadió una mezcla al 1:1 de 1M de hidróxido de sodio acuoso (5 ml) y agua (5 ml) y la agitación se continuó durante 2 horas. Se añadió diclorometano y la capa orgánica se separó, se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se eliminó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en gel de sílice eluyendo con diclorometano conteniendo metanol al 5% para proporcionar éster 1-[2-

ES 2 371 425 T3

(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico. LCMS (10-70) $R_t=3,94$; $[M+H^+]$ hallado 502,5.

5 Paso E

Éster de 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

10 A una solución de éster 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (151 mg, 0,3 mmol) en diclorometano (3 ml) a 0°C se le añadió sulfóxido de dimetilo (128 μ l, 1,8 mmol) y diisopropiletilamina (157 μ l, 0,9 mmol). Después de 15 minutos, se añadió el complejo de trióxido de sulfuro y piridina (143 mg, 0,9 mmol) y se continuó la agitación a 0°C durante 1 hora. Se añadió agua para extinguir la reacción y se separaron las capas. La capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida para dar éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (150 mg, 100% de rendimiento), que fue utilizado sin purificación adicional. $[M+H^+]$ hallado 500,4.

20 Paso F

*Éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico*

25 Se agitó una solución de éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (150 mg, 0,30 mmol) y *N*-{5-[[*R*]-2-amino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida (112 mg, 0,36 mmol) en una mezcla al 1:1 de diclorometano y metanol (3,0 ml total) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro de sodio (191 mg, 0,9 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió ácido acético para extinguir la reacción y la mezcla se concentró a presión reducida para dar éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico, que fue utilizado sin purificación adicional. LCMS (10-70) $R_t=4,55$; $[M+H^+]$ hallado 794,6.

35 Paso G

*Éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico*

40 A una suspensión de éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(terc-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (238 mg, 0,30 mmol) en diclorometano (3,0 ml) se le añadió trihidrofluoruro de trietilamino (147 μ l, 0,90 mmol). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche y entonces la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante RP-HPLC preparatoria (gradiente: 2 a 50% de acetonitrilo en agua con TFA al 0,05%). Las fracciones apropiadas se recogieron y liofilizaron para dar éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico como sal de ditrifluoroacetato (50 mg, 97% de pureza). LPLC (2-90) $R_t=2,76$; $[M+H^+]$ hallado 680,8.

50 Ejemplo 5

*Éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico*

55 Paso A

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

60 A un frasco de fondo redondo de 2 litros equipado con un agitador superior, control de temperatura y un embudo se le añadió 4-yodo-2,5-dimetilanilina (100,0 g, 0,405 mol) (de Spectra Group Limited, Inc., Millbury, OH). Se añadieron etanol (1 l) y carbonato potásico sólido (160 g, 1,159 mol) y luego se añadió bromuro de bencilo puro (140 ml, 1,179 mol) en una porción. La mezcla resultante se agitó a 30°C durante aproximadamente 18 horas, momento en el que la HPLC muestra una conversión superior al 98%. Entonces se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se añadieron hexanos (1 l). Esta mezcla se agitó durante 15 minutos y entonces se filtró con un filtro de papel para quitar los sólidos y la torta de filtración se lavó con hexanos (200 ml). Utilizando un evaporador giratorio, el volumen del filtrado se redujo a aproximadamente 500 ml y se añadió ácido clorhídrico concentrado (30 ml). El solvente restante se quitó entonces utilizando un evaporador giratorio. Al residuo resultante se le añadieron hexanos (500 ml) y esta mezcla se agitó durante aproximadamente 30 minutos, momento en el cual se formó una pasta fluida. La pasta se filtró y la

ES 2 371 425 T3

torta de filtración se lavó con hexanos (200 ml) y se secó para proporcionar hidrocloreto de dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina (115 g, 62% de rendimiento, 97,5% de pureza) como un sólido de color verdoso.

El hidrocloreto de dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina fue transferido a un frasco de 3 l y se le añadió tolueno (1 l) y 1 M de hidróxido de sodio acuoso (1 l). La mezcla resultante se agitó durante 1 hora y entonces las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con salmuera diluida (500 ml) y el solvente se eliminó por evaporación giratoria para proporcionar dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina (80 g) como un aceite espeso semisólido. (Alternativamente, se puede utilizar diclorometano en lugar de tolueno en este paso). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,05 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 3,90 (s, 4H), 6,91 (s, 1H), 7,05-7,20 (m, 10H), 7,42 (s, 1H); [M+H⁺] hallado 428.

Paso B

Hidrocloreto de 4-dibencilamino-2,5-dimetilbenzaldehído

A un frasco de fondo redondo y 3 cuellos de 1 l equipado con un agitador superior, control de temperatura y un embudo de adición se le añadió dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina (15 g, 35 mmol). Se añadió tolueno (300 ml) y la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 15 minutos. El frasco de reacción se purgó con nitrógeno seco y se enfrió a aproximadamente -20°C y se añadió 1,6 M de *n*-butilitio en hexanos (33 ml, 53 mmol) gota a gota a través del embudo de adición. Durante la adición, la temperatura interna de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de -10°C. Cuando se completó la adición, la mezcla resultante se agitó a aproximadamente -15°C durante 15 minutos. Entonces se añadió *N,N*-dimetilformamida (10 ml, 129 mmol) gota a gota mientras se mantenía la temperatura interna de reacción por debajo de 0°C. Luego se agitó la mezcla resultante a entre -20°C y 0°C durante aproximadamente 1 hora. Entonces se añadió 1 M de ácido clorhídrico acuoso (200 ml) durante un período de 5 minutos y la mezcla resultante se agitó durante 15 minutos. Entonces se separaron las capas y la capa orgánica se lavó con salmuera diluida (100 ml). La capa orgánica se secó entonces sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida para proporcionar hidrocloreto de 4-dibencilamino-2,5-dimetilbenzaldehído (11,5 g, 90% de rendimiento, 95% de pureza) como un aceite espeso que se solidificó tras su reposo. El producto contuvo aproximadamente 3 a 5% del producto secundario de des-yodo. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 2,42 (s, 3H), 2,50 (s, 3H), 4,25 (s, 4H), 6,82 (s, 1H), 7,10-7,30 (10H, m), 7,62 (1H, s), 10,15 (1H, s); MS [M+H⁺] hallado 330,3.

Paso C

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

A un frasco de fondo redondo de 500 ml se le añadió hidrocloreto 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 disolvió completamente. El frasco de reacción se purgó entonces con nitrógeno seco durante 5 minutos. Se añadieron etilenglicol (5,25 ml, 94,2 mmol) y ácido *p*-toluenosulfónico (760 mg, 6,2 mmol) y la mezcla resultante se calentó a entre 60°C y 80°C durante aproximadamente 20 horas. Entonces se quitó el solvente lentamente (durante aproximadamente 40 minutos) a 40°C en un evaporador giratorio. Se añadió tolueno (100 ml) al residuo y el solvente se quitó de nuevo lentamente a 40°C en un evaporador giratorio. Este proceso se repitió utilizando otra alícuota de tolueno (100 ml) y la mezcla fue evaporada hasta secarse. Se añadieron acetato de etilo (150 ml) y bicarbonato sódico acuoso saturado (100 ml) al residuo y las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con salmuera (50 ml) y entonces se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró a presión reducida para proporcionar 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-dimetilfenil)amina cruda se disolvió en una mezcla al 2:1 de etanol y agua (150 ml total) y la mezcla resultante se purgó con nitrógeno seco durante 5 minutos. Se añadieron paladio sobre carbón (2,3 g, 10% en peso conteniendo aproximadamente 50% de agua) y bicarbonato sódico sólido (1,0 g) y la mezcla resultante fue hidrogenada a aproximadamente 1 atm de hidrógeno a entre 25°C y 30°C durante aproximadamente 8 horas. La mezcla se filtró con celita y el filtrado se concentró en un evaporador giratorio para proporcionar 4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilamina cruda (5,6 g, 92% de rendimiento) como un aceite espeso. RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2,05 (s, 3H), 2,22 (s, 3H), 3,7-3,9 (m, 4H), 3,95 (s, 4H), 5,59 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 7,0-7,25 (m, 11H).

Paso D

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

A un frasco de fondo redondo de 500 ml 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 temperatura ambiente hasta que los ingredientes se disolvieron y entonces se enfrió la mezcla a 0°C. Entonces se añadió cloruro de acrililo (2,35 ml, 29 mmol) gota a gota durante un período de 5 minutos. La mezcla de reacción se agitó a entre 0°C y 5°C durante 1 hora y entonces se añadió agua (50 ml) y se continuó la agitación durante aproximadamente 30 minutos, momento en el que los sólidos se formaron. La mezcla se filtró para recoger los sólidos. Las capas del

ES 2 371 425 T3

filtrado se separaron y la capa orgánica se concentró a presión reducida hasta secarse. Se añadió diclorometano (50 ml) al residuo y esta mezcla se agitó hasta que se desarrolló una pasta fluida. La pasta se filtró (utilizando el mismo embudo que se utilizó para recoger los sólidos finos arriba) y la torta de filtración se lavó con diclorometano (10 ml) y se secó para proporcionar N-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (3,1 g, 97% de pureza) como un sólido de color blanco a blanquecino.

El filtrado de arriba se evaporó hasta secarse y se añadió metanol (10 ml) al residuo. Esta mezcla se agitó durante 15 minutos y entonces el precipitado se recogió por filtración, se lavó con metanol (5 ml) y se secó para dar una segunda producción de N-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (0,8 g, 95% de pureza). RMN ¹H (300 MHz, CD₃OD) δ 2,10 (s, 3H), 2,23 (s, 3H), 3,85-4,10 (m, 4H), 5,60-6,40 (M, 3H), 5,59 (s, 1H), 7,18 (s, 1H), 7,23 (s, 1H).

Paso E

Éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-il-carbámico

A un frasco de fondo redondo de 50 ml se le añadió éster piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-il-carbámico (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 añadieron etanol (10 ml) y diclorometano (10 ml) para formar una pasta. La mezcla de reacción se calentó a entre 45°C y 50°C durante aproximadamente 18 horas y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadió 1M de ácido clorhídrico acuoso (10 ml) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante aproximadamente 3 horas. Se añadió diclorometano (10 ml) y la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 5 minutos. Las capas se separaron entonces y la capa orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró en un evaporador giratorio para proporcionar hidrocloreuro de éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-il-carbámico crudo (1,9 g). RMN ¹H (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,2-1,4 (m, 2H), 1,58-1,75 (m, 2H), 2,0-2,17 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,41-2,50 (m, 4H), 2,5-2,75 (m, 2H), 4,31-4,42 (m, 1H), 7,10-7,35 (m, 9H), 7,55 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 9,82 (s, 1H), 9,98 (s, 1H); MS [M+H⁺] hallado 500,2.

Paso F

Éster 1-[2-(4-[(R)-2-(terc-butildimetilsilanilo)xi]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-il-carbámico

A un frasco de fondo redondo de 2 l se le añadió hidrocloreuro de éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-il-carbámico (38 g, 70 mmol) y sal de ácido acético de N-{5-[(R)-2-amino-1-(terc-butildimetilsilanilo)xi]etil}-2-hidroxifenil}formamida (33,6 g, 91 mmol). Se añadieron diclorometano (500 ml) y metanol (500 ml) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno seco durante aproximadamente 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió entonces a entre 0°C y 5°C y se añadió triacetoxiborohidruro de sodio sólido (44,5 g, 381 mmol) en porciones durante un período de 10 minutos. La mezcla de reacción se calentó lentamente desde 0°C hasta la temperatura ambiente durante un período de aproximadamente 2 horas y entonces se enfrió a 0°C. Se añadieron bicarbonato sódico acuoso saturado (500 ml) y diclorometano (500 ml). Esta mezcla se agitó en profundidad y entonces se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con salmuera (500 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhídrico, se filtró y concentró a presión reducida para dar éster 1-[2-(4-[(R)-2-(terc-butildimetilsilanilo)xi]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-il-carbámico como un sólido amarillo.

El producto crudo (30 g) se disolvió en diclorometano conteniendo metanol al 2% (150 ml total) y se cargó en una columna de gel de sílice (300 g) que había sido cargada y equilibrada con diclorometano conteniendo metanol al 2% e hidróxido de amonio al 0,5%. El producto se eluyó de la columna utilizando diclorometano conteniendo metanol al 2% e hidróxido de amonio al 0,5% (1 l); diclorometano conteniendo metanol al 4% e hidróxido de amonio al 0,5% (1 l) y diclorometano conteniendo metanol al 5% e hidróxido de amonio al 0,5% (aproximadamente 3 l). Se recogieron fracciones (200 ml), y aquellas fracciones que tenían una pureza superior al 90% se combinaron y concentraron a presión reducida para proporcionar éster 1-[2-(4-[(R)-2-(terc-butildimetilsilanilo)xi]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-il-carbámico (21,6 g, 96,5% de pureza) como un sólido amarillento. MS [M+H⁺] hallado 794,6.

Paso G

Sal de hidrocloreuro de éster 1-[2-(4-[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi]etilaminometil)-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico

A un frasco de fondo redondo de 1 l se le añadió éster 1-[2-(4-[(R)-2-(terc-butildimetilsilanilo)xi]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-il-carbámico (21,5 g, 27,1 mmol) y diclorometano (200 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que los

ES 2 371 425 T3

ingredientes se disolvieron y entonces se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (8,85 ml, 54,2 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 25°C durante aproximadamente 48 horas. El solvente se quitó en un evaporador giratorio para proporcionar una pasta espesa. Se añadieron diclorometano (100 ml) y acetato de etilo (200 ml) a la pasta y la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos. La pasta resultante se filtró lentamente bajo nitrógeno seco y la torta de filtración se lavó con una mezcla al 1:2 de diclorometano y acetato de etilo (100 ml total), se secó bajo nitrógeno durante 2 horas y entonces se secó al vacío durante la noche para proporcionar éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico como una sal de hidrocloreto (25 g, 96,9% de pureza) que fue un sólido duro parecido a la arcilla. MS [M+H⁺] hallado 680,8.

Paso H

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

Se purificó la sal de hidrocloreto de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (25 g) en una columna de 6 pulgadas de fase inversa (Microsorb de fase sólida) en tres series iguales utilizando una mezcla del 10% al 50% de acetonitrilo en agua conteniendo ácido trifluoroacético al 1% como fase móvil. Las fracciones con una pureza superior al 99% se combinaron y luego se diluyeron con un volumen de agua. La mezcla resultante se enfrió a 0°C y se le añadió bicarbonato sódico sólido hasta que el pH de la mezcla fue de aproximadamente 7,5 a 8,0. En aproximadamente 5 minutos se desarrolló una pasta blanca. La pasta se agitó durante 30 minutos y luego se filtró. La torta de filtración se lavó con agua (500 ml), se secó al aire durante aproximadamente 4 horas y entonces se secó al vacío durante la noche para proporcionar éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (12 g, 99 +% de pureza), como una base libre semicristalina.

Ejemplo 6

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

Paso A

Éster 1-[2-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un frasco de fondo redondo de 500 ml se le añadió éster piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (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 pasta. La mezcla de reacción se calentó a entre 50°C y 55°C durante aproximadamente 24 horas y se enfrió a temperatura ambiente. La mayor parte del solvente se quitó en un evaporador giratorio para proporcionar una pasta espesa. Se añadió etanol (grado reactivo) para formar un volumen total de aproximadamente 200 ml y la mezcla resultante se calentó a 80°C y luego se enfrió lentamente a la temperatura ambiente. La pasta blanca espesa resultante se filtró, lavó con etanol (20 ml) y secó al vacío para proporcionar éster 1-[2-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (23,8 g, aproximadamente 98% de pureza) como un sólido blanco.

Paso B

Éster de 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un frasco de fondo redondo de 500 ml se le añadió éster 1-[2-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (15 g, 27,6 mmol) y acetonitrilo (150 ml) para formar una pasta. Se añadieron 2 M de ácido clorhídrico acuoso (75 ml) y la mezcla resultante se agitó a 30°C durante 1 hora. Entonces se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se añadió acetato de etilo (150 ml). Se añadieron 2 M de hidróxido de sodio acuoso (75 ml), se verificó el pH y entonces se agregaron otros 2 M de hidróxido de sodio hasta que el pH de la solución se encontró en el rango 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 de sodio anhidro y el solvente se eliminó en un evaporador giratorio para dar éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico (12,5 g, aproximadamente 98% de pureza). Si se desea, la pureza de este producto intermedio puede aumentarse formando una pasta con etanol (3 volúmenes de etanol), calentando la pasta a 80°C, y entonces enfriando lentamente a temperatura ambiente y aislando por filtración.

ES 2 371 425 T3

Paso C

Éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etiliminó]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un frasco de fondo redondo de 250 ml se le añadió éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (7,1 g, 14,2 mmol) y sal de ácido acético de *N*-{5-[[*R*]-2-amino-1-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida (5,8 g, 15,6 mmol). Se añadió metanol (100 ml) para formar una pasta y esta mezcla se agitó a entre 15°C y 50°C bajo nitrógeno durante 1 hora. Entonces se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se añadió tolueno (50 ml) y se eliminó el solvente en un evaporador giratorio a una temperatura que oscilaba entre 35°C y 45°C. Se añadió tolueno (50 ml) al residuo y el solvente se eliminó para proporcionar éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilimino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (12 g) como un sólido amarillo-naranja.

Paso D

Éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un frasco de hidrogenación se le añadió éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilimino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (4,6 g) y 2-metiltetrahidrofurano (50 ml). La mezcla resultante se agitó hasta que el sólido se disolvió (aproximadamente 5 min.) y entonces la mezcla se purgó con nitrógeno. Se añadió platino sobre carbón (920 mg, 5% en peso, soporte de carbón activo) y la mezcla se hidrogenó a 50 psi (agitador Parr) durante 6 horas. La mezcla se filtró con celita (5 g), y la celita se lavó con 2-metiltetrahidrofurano (10 ml). Al filtrado se le añadió un gel de sílice modificado con tiopropilo (20% de peso de la solución, Silicycle) y esta mezcla se agitó a entre 25°C y 30°C durante 3 horas. Entonces la mezcla se filtró con celita y se concentró para quitar el solvente. El residuo se disolvió en metanol (5 ml por gramo de residuo) y entonces la solución resultante se añadió lentamente a una mezcla vigorosamente agitada al 1:1 de bicarbonato sódico acuoso y agua (40 ml por gramo de residuo). La pasta blanquecina resultante se agitó durante 20 minutos y luego se filtró. La torta de filtración se lavó con agua (20 volúmenes), se secó al aire durante 3 horas y entonces se secó al vacío a temperatura ambiente durante la noche para proporcionar éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (recuperación del 80%, aproximadamente 96% de pureza).

Paso E

Sal de *L*-tartrato de éster 1-12-(4-1[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un frasco de fondo redondo de 200 ml se le añadió éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(*terc*-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (3,8 g, 4,8 mmol) y 2-metiltetrahidrofurano (400 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que los ingredientes se disolvieron (aproximadamente 15 min.) y entonces se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (0,94 ml, 5,76 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 25°C durante aproximadamente 24 horas. A esta mezcla se añadió una mezcla al 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 disolvió (pH de la solución de aproximadamente 8). Las capas se separaron y la capa orgánica se lavó con salmuera (30 ml), se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y concentró en un evaporador giratorio. El residuo se disolvió en 2-metiltetrahidrofurano (50 ml) y se añadió ácido *L*-tartárico frío (650 mg). La mezcla resultante se calentó a entre 25°C y 30°C durante 18 horas y luego se filtró con un filtro de papel. La torta de filtración se lavó con 2-metiltetrahidrofurano (10 ml), isopropanol (10 ml) y se puso inmediatamente al vacío para proporcionar sal de ácido *L*-tartárico de éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (3,7 g, >97% de pureza).

Paso F

Éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A un frasco de fondo redondo de 250 ml se añadió sal de ácido *L*-tartárico de éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (3,5 g) y metanol (35 ml) y la mezcla resultante se agitó durante 15 min. Se añadió una mezcla al 1:1 de bicarbonato sódico acuoso saturado y agua (70 ml) durante un período de 5 min y se continuó la agitación durante 2 horas. La pasta blanquecina resultante se filtró y la torta de filtración se lavó con agua (20 ml), se secó al aire durante 2

ES 2 371 425 T3

horas y entonces se secó al vacío durante la noche para proporcionar éster 1-[2-(4-[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (2,3 g) como una base libre semicristalina.

5 Se obtuvieron los espectros de la RMN ¹H y ¹³C para una muestra de éster 1-[2-(4-[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]-etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (22,2 mg en aproximadamente 0,75 ml de DMSO-*d*₆) a temperatura ambiente utilizando un espectrómetro de RMN JEOL ECX-400:

10 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), 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, 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).

15 RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆), 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 (brt, 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).

20 RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), 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.

25 RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), 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.

30 Los espectros de la RMN ¹H y ¹³C mostraron la presencia de un isómero mayor (aproximadamente 82 por ciento en mol) y un isómero menor (aproximadamente 18 por ciento en mol) que se creyó que eran los isómeros resultantes de la rotación restringida alrededor del enlace -NH-C(O)H. Se cree que el grupo fenilo es *syn* para el oxígeno carbonílico en el isómero mayor y *anti* en el isómero menor.

35 Ejemplo 7

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

40 Paso A

4-yodo-2,5-dimetilfenilamina

45 A una solución de 2,5-dimetilanilina (20 g, 165 mmol) en una mezcla al 1:1 de diclorometano y metanol (400 ml) se le añadió bicarbonato sódico (20,8 g, 250 mmol) y dicloroyodato de tetrametilamonio (I) (44,7 g, 165 mmol). Se agitó la mezcla resultante a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se añadió agua (500 ml). La capa orgánica se eliminó y se lavó con tiosulfato de sodio acuoso al 5% (500 ml) y salmuera (500 ml). La capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró al vacío para dar 4-yodo-2,5-dimetilfenilamina (39,6 g, 98% de rendimiento). El producto se usó sin más purificación.

50 Paso B

N-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida

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

65

ES 2 371 425 T3

Paso C

Éster 1-[2-(4-yodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)-etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

5 A una solución de *N*-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida (32,2 g, 107 mmol) en una mezcla al 6:1 v/v de *N,N*-
dimetilformamida e isopropanol (700 ml) se le añadió éster piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (36,3 g,
123 mmol). Se calentó la mezcla resultante a 50°C durante 24 horas y luego a 80°C durante 24 horas. Entonces se
enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en diclorometano
10 (1 l) y esta solución se lavó con 1N de ácido clorhídrico acuoso (500 ml), agua (500 ml), salmuera (500 ml) y bi-
carbonato sódico acuoso saturado (500 ml). Entonces la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y
se filtró. Se añadió etanol (400 ml) y la mezcla resultante se concentró al vacío a un volumen de aproximadamente
400 ml, momento en el que se formó un precipitado. El precipitado se filtró y secó para proporcionar éster 1-[2-(4-
yodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (59,6 g, 84% de pureza, 79% de
15 rendimiento), m/z: [M+H]⁺ calculado para C₂₉H₃₂IN₃O₃: 598,49; hallado: 598,5.

Paso D

Metiléster de ácido 4-(3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]etil]propionilamino)-2,5-dimetilbenzóico

20 A una solución de éster de 1-[2-(4-yodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbá-
mico (56 g, 94 mmol) en una mezcla al 5:1 v/v de *N,N*-dimetilformamida y metanol (600 ml) se le añadió diisopro-
piletilamina (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
25 mmol). La mezcla resultante se purgó con monóxido de carbono y entonces se agitó durante la noche a entre 70°C y
80°C bajo una atmósfera de monóxido de carbono (presión de balón). La mezcla de reacción se concentró al vacío,
y el residuo se disolvió en diclorometano (500 ml). Esta mezcla se lavó con 1N de ácido clorhídrico (500 ml), agua
(500 ml) y salmuera (500 ml). Entonces la capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se concentró al
vacío. El residuo se mezcló con etanol (aproximadamente 5:1 v/p de etanol y residuo) y la mezcla se calentó hasta que
todo el material sólido se disolvió. Esta solución se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente y el precipitado
30 resultante se aisló por filtración para proporcionar metiléster de ácido 4-{3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-
il]propionilamino}2,5- dimetilbenzóico (47,3 g, 97% de pureza, 92% de rendimiento), m/z: [M+H]⁺ calculado para
C₃₁H₃₅N₃O₅: 530,63; hallado: 530,4.

Paso E

Éster 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico

40 Se enfrió una solución de metiléster de ácido 4-{3-[4-(bifeníl-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-
2,5-dimetilbenzóico (49,8 g, 93,9 mmol) en tetrahidrofurano (200 ml) a 0°C y se le añadió hidruro de aluminio de litio
(10,7 g, 281,7 mmol) en porciones (10 x 1,07 g). La mezcla resultante se agitó durante 3 horas y luego se le añadió agua
(10,7 ml) seguido de 1N de hidróxido de sodio acuoso (10,7 ml) y más agua (32,1 ml). Esta mezcla se agitó durante la
noche y se filtró. La capa orgánica se concentró al vacío y el residuo se mezcló con acetato de etilo (aproximadamente
45 5:1 v/p de acetato de etilo y residuo). Esta mezcla se calentó hasta que todo el material sólido se disolvió y se dejó
enfriar la solución a temperatura ambiente. El precipitado resultante se filtró y secó para proporcionar éster 1-[2-(4-
hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (24,6 g, 95% de pureza,
47,5% de rendimiento). Este material se usó sin más purificación, m/z: [M+H]⁺ calculado para C₃₀H₃₅N₃O₄: 502,62;
hallado: 502,5.

Paso F

Éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

55 A una solución de éster 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-
ilcarbámico (5,0 g, 10 mmol) en diclorometano (200 ml) se le añadió diisopropiletilamina (8,7 ml, 50 mmol) y dime-
tilsulfóxido (5,6 ml, 100 mmol). La mezcla resultante se enfrió a 0°C y se añadió el complejo de piridina y trióxido
de sulfuro (8,0 g, 50 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0°C y entonces se añadió agua (300 ml).
60 La capa orgánica se eliminó y se lavó con 1N de ácido clorhídrico acuoso (300 ml) y salmuera (300 ml). Entonces la
capa orgánica se secó sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. La solución resultante conteniendo éster 1-[2-(4-
formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico se utilizó sin más purificación,
(m/z): [M+H]⁺ calculado para C₃₀H₃₃N₃O₄: 500,60; hallado: 500,4.

65

ES 2 371 425 T3

Ejemplo 8

Preparación de la Forma I del éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

5 Se preparó una pasta de éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (55 mg) en acetonitrilo (2 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El solvente se eliminó por filtración, y los sólidos se secaron a temperatura ambiente para proporcionar la Forma I (50 mg). Los espectros de PXR, DSC y TGA para esta forma de base libre cristalina se muestran en las Figuras 1, 4 y 7, respectivamente.

Ejemplo 9

15 *Preparación de la Forma II del éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico*

20 Se preparó una pasta de éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (46 mg) en isopropanol (2 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El solvente se eliminó por filtración, y los sólidos se secaron a temperatura ambiente para proporcionar la Forma II (43 mg). Los espectros de PXR, DSC y TGA para esta forma de base libre cristalina se muestran en las Figuras 2, 5 y 8, respectivamente.

Ejemplo 10

Preparación de la Forma III del éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

30 Se preparó una pasta de éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (54 mg) en etanol (2 ml) y se agitó a temperatura ambiente durante 2 días. El solvente se eliminó por filtración, y los sólidos se secaron a temperatura ambiente para proporcionar la Forma III (48 mg). Los espectros de PXR, DSC y TGA para esta forma de base libre cristalina se muestran en las Figuras 3, 6 y 9, respectivamente.

35

Ejemplo 11

40 *Preparación de cristales semilla de la Forma II del éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico*

45 Se disolvió éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico semicristalino (500 mg) en metanol (50 ml) y se añadió agua hasta que se alcanzó el punto de enturbiamiento. La mezcla resultante se agitó a 25°C durante 3 horas y el material cristalino resultante se aisló por filtración para proporcionar la Forma II del éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (420 mg).

Ejemplo 12

Cristalización de la Forma II del éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

55 A un frasco de fondo redondo de 3 cuellos equipado con un agitador superior, control de temperatura y embudo de adición se le añadió éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico semicristalino (14 g) y metanol (1,4 l). Se añadió agua (500 ml) en una porción y entonces se añadió más agua (200 ml) lentamente hasta que se alcanzó el punto de enturbiamiento. Se añadieron cristales semillas de éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (50 mg) y la mezcla resultante se agitó a 25°C durante 3 horas, momento en el que se desarrolló una pasta fluida. Se añadió agua (300 ml) durante un período de 15 minutos y la mezcla resultante se agitó a 25°C durante la noche. La mezcla se filtró y la torta de filtración se lavó con agua (100 ml), se secó al aire durante aproximadamente 2 horas y luego se secó al vacío a temperatura ambiente para proporcionar la Forma II del éster 1-[2-(4-[[(R)]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico cristalino (12,5 g, 99,6% de pureza).

65

ES 2 371 425 T3

Ejemplo 13

Difracción de rayos X en polvo

5 Se obtuvieron los patrones de difracción de rayos x en polvo con un Difractómetro de rayos X Termo ARL, modelo X'TRA (Termo ARL SA, Suiza) utilizando radiación de Cu Ka a 1,542 Å (45 kV, 40 mA) con un detector del estado sólido Peltier. El análisis se realizó normalmente a una velocidad de escaneado de 2°/min con un tamaño de paso de 0,03° por punto en un rango de 2 a 40° en un ángulo de dos zeta. Antes de la medición, se realizó una molienda ligera a mano durante 30 segundos de la Forma II para reducir el tamaño de las partículas. No se efectuó ninguna reducción mecánica del tamaño de las partículas en las Formas I y III. Las muestras se cargaron cuidadosamente en una olla para muestras de cuarzo hecha a la medida y diseñada para encajar en la copa de muestras de carga superior del equipo para el análisis. El equipo fue calibrado semanalmente con un estándar de metal de silicio, dentro del ángulo dos zeta de 0,02°. Los patrones de PXRD representativos brutos sin procesar para la Forma I, Forma II y Forma III del éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico cristalino se muestran en las Figuras 1, 2 y 3, respectivamente.

Adicionalmente, se obtuvieron las siguientes posiciones de los picos de dos zeta utilizando una función para el ajuste del perfil que incluía una sustracción de fondo y rutina de atenuación:

20 Forma I: 8,3±0,3; 10,7±0,3; 12,2±0,3; 13,5±0,3; 14,5±0,3; 15,2±0,3; 17,7±0,3; 18,2±0,3; 19,6±0,3; 20,7±0,3; 21,7±0,3 y 23,2±0,3.

Forma II: 8,4±0,3; 10,4±0,3; 10,7±0,3; 11,9±0,3; 12,3±0,3; 12,6±0,3; 13,4±0,3; 13,6±0,3; 14,3±0,3; 14,7±0,3; 15,31±0,3; 16,8±0,3; 17,10±0,3; 17,80±0,3; 18,20±0,3; 18,70±0,3; 19,20±0,3; 19,80±0,3; 20,70±0,3; 21,60±0,3; 22,30±0,3; 22,50±0,3 y 23,20±0,3.

Forma III: 8,5±0,3; 10,5±0,3; 11,3±0,3; 12,1±0,3; 12,8±0,3; 13,6±0,3; 14,2±0,3; 15,5±0,3; 16,6±0,3; 17,1 ±0,3; 18,1±0,3; 19,2±0,3; 21,0±0,3; 21,8±0,3; 22,6±0,3; 23,3±0,3 y 24,5±0,3.

Ejemplo 14

Calorimetría diferencial de barrido

35 La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se realizó utilizando un módulo de TA Instruments modelo Q-100 con un controlador Thermal Analyst. Los datos se recogieron y analizaron utilizando el software Thermal Solutions de TA Instruments. Se pesó exactamente una muestra de aproximadamente 1 mg en una olla de aluminio con tapa. La muestra se evaluó utilizando una rampa de calentamiento lineal de 5°C/min desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente 300°C. La célula de DSC se purgó con nitrógeno seco durante el uso. Las trazas de DSC representativas para las muestras de la Forma I, Forma II y Forma III del éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico cristalino se muestran en las Figuras 4, 5 y 6, respectivamente. La Figura 5 demuestra que la Forma II del éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico cristalino tiene una excelente estabilidad térmica con un punto de fusión a aproximadamente 143°C.

Ejemplo 15

Análisis termogravimétrico

50 El análisis termogravimétrico (TGA) se realizó utilizando un módulo de TA Instruments modelo Q-500 equipado con capacidad alta de resolución. Los datos se recogieron y analizaron utilizando el software Thermal Solutions de TA Instruments. Se colocó una muestra que pesaba aproximadamente 10 mg en una olla de platino y se escaneó con una velocidad de calentamiento y alta resolución desde la temperatura ambiente hasta 300°C. Las cámaras de equilibrio y horno se purgaron con flujos de nitrógeno durante el uso. Las trazas de TGA representativas para las muestras de la Forma I, Forma II y Forma III del éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico cristalino se muestran en las Figuras 7, 8 y 9, respectivamente.

Ejemplo 16

Evaluación de la absorción dinámica de humedad

65 Se realizó una evaluación de la absorción dinámica de humedad (DMS) (también conocida como perfil de absorción-desorción de humedad) para las muestras molidas a mano de la Forma I, Forma II y Forma III del éster 1-[2-(4-[[*R*]-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico cristalino utilizando una microbalanza atmosférica VTI, sistema SGA-100 (VTI Corp.,

ES 2 371 425 T3

Hialeah, FL 33016). Se utilizó un tamaño de la muestra de aproximadamente 10 mg y se ajustó la humedad al valor ambiente al comienzo del análisis. Un análisis típico de DMS consistió en tres escáneres: ambiente a 2% de humedad relativa (RH), 2% de RH a 90% de RH, 90% de RH a 5% de RH a una velocidad de escaneado de 5% RH/paso. La masa se midió cada dos minutos y la RH se cambió al próximo valor ($\pm 5\%$ RH) cuando la masa de la muestra se encontraba de estable a dentro de 0,01% para 5 puntos consecutivos. Las trazas representativas de la DMS para la Forma I, Forma II y Forma III se muestran en las Figuras 10, 11 y 12, respectivamente.

La traza de la DMS de la Figura 11 demuestra que la Forma II tenía un perfil reversible de absorción/desorción con una higroscopicidad moderada ($< 5\%$). La Forma II tuvo un aumento de peso insignificante de aproximadamente 0,3% en peso en el rango de humedad de 40% RH a 75% RH. El perfil reversible de absorción/desorción de humedad demuestra que la Forma II posee una higroscopicidad aceptable y no es deliquescente.

Ejemplo 17

Cultivo celular y preparación de la membrana a partir de células que expresan un receptor muscarínico M_1 , M_2 , M_3 y M_4 humano

Se cultivaron líneas celulares CHO que expresaban de forma estable los subtipos clonados del receptor muscarínico humano hM₁, hM₂, hM₃ y hM₄, respectivamente, hasta casi la confluencia en un medio Ham F-12 complementado con FBS al 10% y 250 $\mu\text{g/ml}$ de Geneticina. Se cultivaron las células en una incubadora con CO₂ al 5%, 37°C y se sustentaron con 2 mM de EDTA en dPBS. Se recogieron las células con una centrifugación de 5 minutos a 650 x g y los sedimentos celulares o bien se almacenaron congelados a -80°C o se prepararon membranas inmediatamente para usarlas. Para preparar la membrana se resuspendieron los sedimentos celulares en un tampón de lisis y se homogeneizaron con un disgregador de tejidos Polytron PT2100 (Kinematica AG; 20 segundos x 2 ráfagas). Se centrifugaron las membranas crudas a 40,000 x g durante 15 minutos a 4°C. Luego se resuspendió el sedimento de la membrana con un tampón de resuspensión y se volvió a homogeneizar con el disgregador de tejidos Polytron. Se determinó la concentración de proteínas de la suspensión de la membrana por el método descrito en Lowry, *et al.*, 1951, Journal of Biochemistry 193, 265. Se almacenaron todas las membranas congeladas en partes alícuotas a -80°C o se utilizaron inmediatamente. Se compraron alícuotas de membranas preparadas del receptor hM5 directamente de PerkinElmer, Inc. (Wellesley, MA) y se conservaron a -80°C hasta su uso.

Ejemplo 18

Ensayo de unión de radioligandos para receptores muscarínicos

Se realizaron ensayos de unión de radioligandos para los receptores muscarínicos clonados en placas de 96 pocillos en un volumen de ensayo total de 100 μL . Se diluyeron las membranas de las células CHO que expresaban de forma estable los subtipos muscarínicos hM₁, hM₂, hM₃, hM₄ o hM₅ en un tampón de ensayo con las siguientes concentraciones de la proteína diana específica ($\mu\text{g/pocillo}$): 10 μg para hM₁, 10-15 μg para hM₂, 10-20 μg para hM₃, 10-20 μg para hM₄ y 10-12 μg para hM₅ para conseguir señales similares (cpm). Se homogeneizaron las membranas brevemente utilizando un disgregador de tejidos Polytron (10 segundos) antes de añadir las a las placas de ensayo. Se realizaron los estudios de fijación por saturación para determinar los valores K_D de los radioligandos utilizando cloruro de metilo de L-[N-metil-³H]escopolamina ([³H]-NMS) (TRK666, 84,0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) a concentraciones que variaban entre 0,001 nM y 20 nM. Se realizaron ensayos de desplazamiento para determinar los valores de K_i de los compuestos de ensayo con [³H]-NMS a 1 nM y once concentraciones diferentes de los compuestos de ensayo. Se disolvieron los compuestos de ensayo inicialmente a una concentración de 400 μM en un tampón de dilución y se diluyeron en serie 5x con tampón de dilución hasta alcanzar concentraciones finales que variaban entre 10 pM y 100 μM . El orden y los volúmenes de adición a las placas de ensayo fueron los siguientes: 25 μL de radioligando, 25 μL de compuesto de ensayo diluido y 50 μL de membranas. Se incubaron las placas de ensayo durante 60 minutos a 37°C. Las reacciones de fijación terminaron con una filtración rápida sobre placas de filtro de fibra de vidrio GF/B (PerkinElmer Inc.) previamente tratadas en BSA al 1%. Las placas de filtro se lavaron tres veces con tampón de lavado (HEPES 10 mM) para eliminar la radioactividad no fijada. Se secaron las placas al aire y se añadieron 50 μL de fluido de centelleo líquido Microscint-20 (PerkinElmer Inc.) a cada pocillo. Se contaron las placas en un contador de centelleo líquido PerkinElmer Topcount (PerkinElmer Inc.). Se analizaron los datos de unión por análisis de regresión no lineal con el paquete GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando el modelo de competencia de un sitio. Se calcularon los valores de K_i para los compuestos de ensayo de los valores observados de IC₅₀ y el valor de K_D del radioligando utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y; Prusoff W. H. (1973) Biochemical Pharmacology, 22(23):3099-108). Se convirtieron los valores de K_i a valores de pK_i para determinar la media geométrica y los intervalos de confianza del 95%. Luego se volvieron a convertir estas estadísticas a valores de K_i para la presentación de datos.

En este ensayo, un valor de K_i más bajo indica que el compuesto de ensayo tiene una mayor afinidad de unión para el receptor ensayado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino}metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (compuesto de la fórmula I) tiene un valor de K_i de menos de 10 nM para los subtipos del receptor muscarínico M₁, M₂, M₃, M₄ y M₅.

ES 2 371 425 T3

Ejemplo 19

Cultivo celular y preparación de la membrana a partir de células que expresan los receptores adrenérgicos β_1 , β_2 o β_3 humanos

5 [Se cultivaron líneas celulares de riñón embrionario humano (HEK-293) que expresaban de manera estable los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 o líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) que expresaban de manera estable los receptores adrenérgicos β_3 humanos clonados hasta casi la confluencia en un medio DMEM o Ham F-12 con FBS al 10% en presencia de 5,00 $\mu\text{g/ml}$ de Geneticina. La monocapa celular se levantó con 2 mM de EDTA en PBS. Las
10 células se sedimentaron por centrifugación a 1.000 rpm, y los sedimentos de células fueron o bien conservados congelados a -80°C o bien se prepararon las membranas inmediatamente para su uso. Para la preparación de las membranas que expresaban los receptores β_1 y β_2 , los sedimentos de células se resuspendieron en tampón de tisis (10 mM de HEPES/HCl, 10 mM de EDTA, pH 7,4 a 4°C) y se homogeneizaron utilizando un homogeneizador de cristal her-
15 mético Dounce (30 emboladas) en hielo. Para las membranas que expresaban el receptor β_3 más sensible a la proteasa, los sedimentos de células se homogeneizaron en tampón de lisis (10 mM de Tris/HCl, pH 7,4) complementado con un comprimido de "Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets" con 2 mM de EDTA por 50 ml de tampón (Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN). El homogeneizado se centrifugó a $20.000 \times g$ y el sedimento resultante se lavó una vez con tampón de lisis por resuspensión y centrifugación como se indicó arriba. Entonces se resuspendió el sedimento final en tampón de ensayo de unión enfriado en hielo (75 mM de Tris/HCl pH 7,4, 12,5 mM de MgCl_2 ,
20 1 mM de EDTA). Se determinó la concentración de proteínas de la suspensión de la membrana por el método descrito en Lowry, *et al.*, Journal of Biochemistry 193, 265; y Bradford, Analytical Biochemistry, 1976; 72, 248-54. Se almacenaron todas las membranas congeladas en partes alícuotas a -80°C o se utilizaron inmediatamente.

25 Ejemplo 20

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

Los ensayos de unión se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de ensayo
30 de 100 μl con 10-15 μg de proteína de membrana conteniendo los receptores adrenérgicos humanos β_1 , β_2 o β_3 en el tampón de ensayo (75 mM de Tris/HCl pH 7,4 a 25°C , 12,5 mM de MgCl_2 , 1 mM de EDTA, 0,2% de BSA). Se realizaron los estudios de unión de saturación para determinar los valores de K_d del radioligando utilizando [^3H]-di-
hidroalprenolol (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) en 10 u 11 con-
35 centraciones diferentes que oscilaban entre 0,01 nM y 20 nM. Se realizaron ensayos de desplazamiento para la determinación de los valores K_i de los compuestos de prueba con [^3H]-dihidroalprenolol a 1 nM y [^{125}I]-(-)-yodocianopindolol a 0,5 nM para 11 concentraciones diferentes del compuesto de prueba que oscilaban de 10 pM a 10 μM . La unión no específica se determinó en presencia de 10 μM de propranolol. Los ensayos se incubaron durante 1 hora a 37°C y luego se finalizaron las reacciones de unión por filtración rápida en placas de fibra de vidrio GF/B para los receptores
40 β_3 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) previamente mojadas en polietilénmina al 0,3%. Las placas de filtración se lavaron tres veces con tampón de filtración (75 mM de Tris/HCl, pH 7,4 a 4°C , 12,5 mM de MgCl_2 , 1 mM de EDTA) para eliminar la radioactividad no unida. Las placas se secaron y se añadieron 50 μl de líquido de centelleo Microscint-
20 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) a cada pocillo y se contaron las placas en un contador de centelleo líquido Packard Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT). Se analizaron los datos de unión por análisis de regresión
45 no lineal con el paquete GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando el modelo de competencia de un sitio de 3 parámetros. El mínimo de la curva se fijó en el valor de la unión no específica, como se determinó en presencia de 10 μM de propranolol. Se calcularon los valores de K_i para los compuestos de prueba a partir de los valores observados de IC_{50} y el valor de K_d del radioligando utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y; Prusoff W. H. Biochemical Pharmacology 1973, 22, 23, 3099-108).
50

En este ensayo, un valor de K_i más bajo indica que el compuesto de ensayo tiene una mayor afinidad de unión para el receptor ensayado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-((R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino)metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]piperidin-4-ílico de ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto de la fórmula I) tiene un valor de K_i de menos de 10 nM para el receptor adrenérgico β_2 y valores de K_i superiores a 1000 nM para los
55 receptores adrenérgicos β_1 y β_3 .

Ejemplo 21

60 *Ensayos funcionales de antagonismo para los subtipos del receptor muscarínico*

Ensayo A

Bloqueo de la inhibición mediada por el agonista de la acumulación de AMPc

65 En este ensayo se determinó la potencia funcional de un compuesto de prueba como antagonista para el receptor hM_2 midiendo la capacidad del compuesto de prueba de bloquear la inhibición con oxotremorina de la acumulación de AMPc mediada por la forskolina en células CHO-K1 que expresaban el receptor hM_2 . Los ensayos AMPc se rea-

ES 2 371 425 T3

lizaron con un formato de radioinmunoensayo utilizando el sistema de ensayo de activación de la ciclasa Flashplate con ^{125}I -AMPc (NEN SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), según las instrucciones del fabricante. Se enjuagaron las células una vez con dPBS y se sustentaron con una solución de tripsina y EDTA (tripsina al 0,05%/EDTA 0,53 mM) como se describe en la sección de la Preparación de la membrana y Cultivo de células arriba.

5 Se lavaron las células sueltas dos veces por centrifugación a 650 x g durante cinco minutos en 50 ml de dPBS. Luego se resuspendió el sedimento celular en 10 ml de dPBS y se contaron las células con un contador de partículas doble Coulter Z1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Se centrifugaron de nuevo las células a 650 x g durante cinco minutos y se resuspendieron en un tampón de estimulación hasta obtener una concentración de ensayo de $1,6 \times 10^6$ - $2,8 \times 10^6$ células/ml.

10 Se disolvió el compuesto de ensayo inicialmente a una concentración de 400 μM en un tampón de dilución (dPBS complementado con 1 mg/ml de BSA (0.1%)) y se diluyó en serie 5x con tampón de dilución hasta alcanzar una concentración molar final que variaba entre 100 μM y 0,1 nM. Se diluyó oxotremorina de forma similar.

15 Para medir la inhibición con oxotremorina de la actividad de la adenilil ciclasa se añadieron 25 μL de forskolina (concentración final de 25 μM diluida en dPBS), 25 μL de oxotremorina diluida y 50 μL de células a los pocillos de ensayo del agonista. Para medir la capacidad de un compuesto de ensayo de bloquear la actividad de la adenilil ciclasa inhibida por oxotremorina se añadieron 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 al resto de pocillos de ensayo.

20 Se incubaron las reacciones durante 10 minutos a 37°C y se paró añadiendo 100 μL de tampón de detención enfriado en hielo. Se sellaron las placas, se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y se contaron a la mañana siguiente en un contador de centelleo líquido PerkinElmer Topcount (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA).

25 Se calculó la cantidad de AMPc producida (pmol/pocillo) en base a los recuentos observados para las muestras y estándares de AMPc, como se describe en el manual de usuario del fabricante. Se analizaron los datos por análisis de regresión no lineal con el paquete GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando la ecuación de competencia de un sitio de regresión no lineal. Se utilizó la ecuación Cheng-Prusoff para calcular el valor de K_{obs} , utilizando el EC_{50} de la curva de concentración de oxotremorina-respuesta y la concentración de ensayo de oxotremorina como el valor de K_D y $[\text{L}]$, respectivamente.

30 En este ensayo, un valor de K_{obs} más bajo indica que el compuesto de ensayo tiene una mayor actividad funcional en el receptor ensayado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-[[*R*-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino] metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto de la fórmula I) tiene un valor de K_{obs} de menos de 10 nM para el bloqueo de la inhibición con oxotremorina de la acumulación de AMPc mediada por forskolina en células CHO-K1 que expresaban el receptor hM_2 .

Ensayo B

Bloqueo de la unión de [^{35}S]GTP γS mediada por el agonista

40 En este ensayo funcional, se determinó la potencia funcional de un compuesto de prueba como un antagonista del receptor hM_2 midiendo la capacidad del compuesto de prueba para bloquear la unión de [^{35}S]GTP γS estimulada con oxotremorina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2 .

50 En el momento de usarlas, se descongelaron las membranas congeladas y entonces se diluyeron en el tampón de ensayo con una concentración final del tejido diana de 5 a 10 μg de proteína por pocillo. Se homogeneizaron las membranas brevemente utilizando un disgregador de tejidos Polytron y luego se añadieron a las placas de ensayo.

Se determinó el valor EC_{90} (concentración efectiva para una respuesta máxima del 90%) para la estimulación de la fijación de [^{35}S]GTP γS por la oxotremorina del agonista en cada experimento.

55 Para determinar la capacidad de un compuesto de ensayo de inhibir la unión de [^{35}S]GTP γS estimulada por oxotremorina, se añadió lo siguiente a cada pocillo de las placas de 96 pocillos: 25 μL de tampón de ensayo con [^{35}S]GTP γS (0,4 nM), 25 μL de oxotremorina (EC_{90}) y GDP (3 μM), 25 μL de compuesto de ensayo diluido y 25 μL de membranas de células CHO que expresan el receptor hM_2 . Entonces se incubaron las placas a 37°C durante 60 minutos. Se filtraron las placas de ensayo sobre filtros GF/B previamente tratados con BSA al 1% utilizando una cosechadora PerkinElmer de 96 pocillos. Se enjuagaron las placas con tampón de lavado enfriado en hielo durante 3x3 segundos y luego se secaron al aire o al vacío. Se añadió líquido de centelleo Microscint-20 (50 μL) a cada pocillo, se selló cada placa y se contó la radioactividad en un Topcounter (PerkinElmer). Se analizaron los datos por análisis de regresión no lineal con el paquete GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando la ecuación de competencia de un sitio de regresión no lineal. Se utilizó la ecuación Cheng-Prusoff para calcular el valor de K_{obs} , utilizando los valores IC_{50} de la curva de concentración-respuesta para el compuesto de ensayo y la concentración de oxotremorina en el ensayo como el valor de K_D y la concentración del ligando $[\text{L}]$, respectivamente.

65 En este ensayo, un valor de K_{obs} más bajo indica que el compuesto de ensayo tiene una mayor actividad funcional en el receptor ensayado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-[[*R*-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]

ES 2 371 425 T3

metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto de la fórmula I) tiene un valor de K_{obs} de menos de 10 nM para el bloqueo de la unión de [35 S]GTP γ S estimulada con oxotremorina en células CHO-K1 que expresaban el receptor hM₂.

5 Ensayo C

Bloqueo de la liberación de calcio mediada por el agonista a través de ensayos FLIPR

10 En este ensayo funcional, se determinó la potencia funcional de un compuesto de prueba como un antagonista de los receptores hM₁, hM₃ y cM₅ midiendo la capacidad del compuesto de prueba de inhibir los incrementos de calcio intracelular mediados por el agonista.

15 Se sembraron las células CHO que expresan de forma estable los receptores en placas de FLIPR de 96 pocillos la noche antes de hacer el ensayo. Las células sembradas fueron lavadas dos veces con tampón FLIPR (10 mM de HEPES, pH 7,4, 2 mM de cloruro de calcio, 2,5 mM de probenecida en solución salina de Hank tamponada (HBSS) sin calcio ni magnesio) utilizando Cellwash (MTX LabSystems, Inc.) para eliminar el medio de crecimiento. Después del lavado, cada pocillo contenía 50 μ L de tampón FLIPR. Entonces se incubaron las células con 50 μ L/pocillo de 4 μ M de FLUO-4AM (se hizo una solución 2X) durante 40 minutos a 37°C, dióxido de carbono al 5%. Tras el periodo de incubación de la tintura, se lavan las células dos veces con tampón de FLIPR dejando un volumen final de 50 μ L en cada pocillo.

20 Se determinó la estimulación dependiente de la dosis de la liberación de Ca²⁺ intracelular para la oxotremorina de manera que se pudiera medir el compuesto de prueba con respecto a la estimulación con oxotremorina en una concentración EC₉₀. Primero se incubaron las células con tampón de dilución del compuesto durante 20 minutos seguido de oxotremorina. Se generó un valor de EC₉₀ para la oxotremorina según el método detallado en la sección de reducción de datos y mediciones de FLIPR abajo junto con la fórmula $EC_F = ((F/100-F)^{1/H}) * EC_{50}$. Se preparó una concentración de oxotremorina de 3 x EC_F en placas de estimulación de modo que se añadió una concentración EC₉₀ de oxotremorina a cada pocillo en las placas de ensayo de prueba.

30 Los parámetros utilizados para la FLIPR fueron: tiempo de exposición de 0,4 segundos, potencia del láser de 0,5 vatios, longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 550 nm. Se determinó el valor de referencia midiendo el cambio de fluorescencia durante 10 segundos antes de la adición de la oxotremorina. Tras la estimulación con oxotremorina, la FLIPR midió continuamente el cambio de fluorescencia cada 0,5 a 1 segundo durante 1,5 minutos para capturar el máximo cambio de fluorescencia.

35 El cambio de fluorescencia se expresó como la máxima fluorescencia menos la fluorescencia de referencia para cada pocillo. Se analizaron los datos iniciales con respecto al logaritmo de la concentración del compuesto de prueba por regresión no lineal con GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando el modelo incluido para la curva sigmoidea dosis-respuesta. Se determinaron los valores de K_{obs} del antagonista con Prism utilizando el valor EC₅₀ de la oxotremorina como el valor K_D y el valor EC₉₀ de la oxotremorina para la concentración de ligandos según la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng & Prusoff, 1973).

45 En este ensayo, un valor de K_{obs} más bajo indica que el compuesto de ensayo tiene una mayor actividad funcional en el receptor ensayado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino] metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto de la fórmula I) tiene un valor de K_{obs} de menos de 10 nM para el bloqueo de la liberación de calcio mediada por el agonista en células CHO que expresaban de forma estable los receptores hM₁, hM₃ y cM₅.

50 Ejemplo 22

Ensayo de AMPc Flashplate en líneas celulares HEK-293 y CHO que expresan de manera heterogénea los receptores adrenérgicos humanos β_1 , β_2 o β_3

55 Se realizaron los ensayos con AMPc en un formato de radioinmunoensayo utilizando el sistema de ensayo de activación de la adenilil ciclasa en placas Flashplate con ¹²⁵I-AMPc (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), según las instrucciones del fabricante. Para la determinación de la potencia agonista (EC₅₀) de los receptores β_1 y β_2 se cultivaron líneas celulares de CHO-K1 HEK que expresaban de forma estable los receptores β_1 y β_2 humanos clonados hasta casi su confluencia en DMEM complementado con FBS al 10% y Geneticina (500 μ g/ml). Para la determinación de la potencia agonista del receptor β_3 , se cultivó la línea celular CHO-K1 que expresaba de forma estable los receptores adrenérgicos β_3 o humanos clonados hasta casi su confluencia en un medio Ham F-12 complementado con FBS al 10% y Geneticina (250 μ g/ml). Las células se enjuagaron con PBS y se separaron en dPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, sin CaCl₂ ni MgCl₂) conteniendo 2 mM de EDTA o solución de Tripsina-EDTA (0,05% de tripsina /0,53 mM de EDTA). Después de contar las células en el contador de células Counter, se sedimentaron las células por centrifugación a 1.000 rpm y se resuspendieron en un tampón de estimulación conteniendo IBMX (Kit de PerkinElmer) previamente calentado a temperatura ambiente para una concentración de 1,6 x 10⁶-2,8 x 10⁶ células/ml. Se utilizaron aproximadamente 40.000 a 80.000 células por pocillo en este ensayo.

ES 2 371 425 T3

Los compuestos de prueba (10 mM en DMSO) se diluyeron en PBS conteniendo BSA al 0,1% en Beckman Biomek-2000 y se probaron en 11 concentraciones diferentes que oscilaban entre 100 μ M y 1 μ M. Las reacciones se incubaron durante 10 min a 37°C y se pararon añadiendo 100 μ l de tampón de detección frío conteniendo [¹²⁵I]-AMPc (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). Se calculó la cantidad de AMPc producida (μ mol/pocillo) en base a los recuentos observados para las muestras y estándares de cAMP, como se describe en el manual de usuario del fabricante. Se analizaron los datos por análisis de regresión no lineal con el paquete GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) con la ecuación sigmoidal. Se utilizó la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y, y Prusoff WH., Biochemical Pharmacology, 1973, 22, 23, 3099-108) para calcular los valores de EC₅₀.

En este ensayo, un valor de EC₅₀ más bajo indica que el compuesto de ensayo tiene una mayor actividad funcional en el receptor ensayado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-[[*(R)*-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (compuesto de la fórmula I) tiene un valor de EC₅₀ de menos de 10 nM para el receptor adrenérgico β_2 , un valor de EC₅₀ de aproximadamente 30 nM para el receptor adrenérgico β_1 y un valor de EC₅₀ mayor de 700 nM para el receptor adrenérgico β_3 .

Ejemplo 23

Ensayo de AMPc Flashplate de células enteras con una línea celular epitelial de pulmón que expresa endógenamente el receptor adrenérgico humano β_2

En este ensayo se determinaron la potencia y la actividad intrínseca como agonista de un compuesto de prueba utilizando una línea celular que expresaba niveles endógenos del receptor adrenérgico β_2 . Se cultivaron células de una línea celular epitelial pulmonar 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) hasta una confluencia del 75-90% en un medio sin suero (medio LHC-9 conteniendo epinefrina y ácido retinóico, Biosource International, Camarillo, CA). El día antes del ensayo el medio se cambió por LHC-8 (sin epinefrina ni ácido retinóico, Biosource International, Camarillo, CA). Se realizaron los ensayos con AMPc en un formato de radioinmunoensayo utilizando el sistema de ensayo de activación de la adenilil ciclasa en placas Flashplate con ¹²⁵I-AMPc (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), según las instrucciones del fabricante.

En el día del ensayo, las células se enjuagaron una vez con PBS, se levantaron rascándolas con 5 mM de EDTA en PBS y se contaron. Las células se sedimentaron por centrifugado a 1.000 rpm, y se resuspendieron en tampón de estimulación precalentando a 37°C en una concentración final de 600.000 células/ml. Se utilizaron las células con una concentración final de 100.000 a 120.000 células/pocillo en este ensayo. Los compuestos de prueba se diluyeron en serie en tampón de ensayo (75 mM de Tris/HCl, pH 7,4 a 25°C, 12,5 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 0,2% de BSA) en Beckman Biomek-2000. Los compuestos de prueba se probaron en el ensayo con 11 concentraciones diferentes, que iban de 10 μ M a 10 pM. Se incubaron las reacciones durante 10 minutos a 37°C y se pararon añadiendo 100 μ l de tampón de detención enfriado en hielo. Las placas se sellaron, se incubaron durante la noche a 4°C y se contaron a la mañana siguiente en un contador de centelleo TopCount (Packard BioScience Co., Meriden, CT). Se calculó la cantidad de AMPc producida por ml de reacción en base a los recuentos observados para las muestras y los estándares de AMPc, como se describe en el manual de usuario del fabricante. Se analizaron los datos por análisis de regresión no lineal con el paquete GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando el modelo de 4 parámetros para la curva de dosis-respuesta sigmoidal.

En este ensayo, un valor de EC₅₀ más bajo indica que el compuesto de ensayo tiene una mayor actividad funcional en el receptor ensayado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-[[*(R)*-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil]-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (compuesto de la fórmula I) tiene un valor de EC₅₀ de menos de 10 nM con un valor de actividad intrínseca superior a 0,3 en comparación con un isoproterenol agonista de β_2 completo (1,0).

Ejemplo 24

Ensayo de Eindhoven para determinar la eficacia y duración broncoprotectora

En este ensayo se determinaron la eficacia y duración broncoprotectora de los compuestos de prueba utilizando cobayas. Este ensayo se inspira en los procedimientos descritos en Eindhoven (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 medida sustitua de la resistencia en las vías respiratorias. Tras el pretratamiento con un compuesto de prueba, se determinó la potencia antagonista muscarínica utilizando curvas de dosis-respuesta a la metacolina broncoconstrictora intravenosa en presencia de propranolol. Asimismo, se determinó la potencia broncoprotectora del agonista β_2 utilizando histamina. Se determinó la potencia broncoprotectora combinada utilizando metacolina en ausencia de propranolol.

El ensayo se realizó utilizando cobayas machos Duncan-Hartley (Harían, Indianápolis, IN), pesando entre 250 y 400 g. Se dosificó un compuesto de prueba o vehículo (es decir, agua estéril) por inhalación (IH) durante un período de tiempo de 10 minutos en una cámara de dosificación con exposición de todo el cuerpo (R+S Molds, San Carlos, CA)

ES 2 371 425 T3

utilizando 5 ml de solución de dosificación. Los animales se expusieron a un aerosol generado por un nebulizador LC Star (modelo 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA) conducido por una mezcla de gases Bioblend (una mezcla de CO₂ al 2%, O₂ al 21% y N₂ al 74%) a una presión de 22 psi. Se evaluó la función pulmonar en varios puntos de tiempo después de la dosificación por inhalación.

5 Setenta y cinco minutos antes del comienzo del ensayo, los cobayas se anestesiaron con una inyección intramuscular (IM) de una mezcla de quetamina (43,7 mg/kg/xilacina (3,5 mg/kg)/acepromacina (1,05 mg/kg). Se administró una dosis complementaria de esta mezcla (50% de la dosis inicial) según necesidad. La vena yugular y la arteria carótida se aislaron y entubaron con catéteres de polietileno llenos de solución salina (micro-renatano y PE-50, respectivamente, Beckton Dickinson, Sparks, MD). La arteria carótida se conectó a un transductor de presión para permitir la medición de la presión sanguínea y se utilizó la cánula de la vena yugular para la inyección IV de metacolina o histamina. Luego se diseccionó la tráquea y se intubó con una aguja 14G (#NE-014, Small Parts, Miami Lakes, FL). Una vez completadas las intubaciones, las cobayas se ventilaron utilizando un respirador (modelo 683, Harvard Apparatus, Inc., MA) ajustado con un volumen por embolada de 1 ml/100 g de peso corporal pero sin exceder el volumen de 2,5 ml y a una velocidad de 100 emboladas por minuto. La presión de ventilación (VP) se midió en la cánula traqueal utilizando un transductor Biopac conectado a un preamplificador Biopac (TSD 137C). La temperatura corporal se mantuvo a 37°C utilizando una manta eléctrica. Antes de iniciar la recogida de datos, se administró pentobarbital (25 mg/kg) intraperitonealmente (IP) para suprimir la respiración espontánea y obtener una referencia estable. Los cambios en VP se registraron en una interfaz de recogida de datos Biopac Windows. Se recogieron los valores de referencia durante al menos 5 minutos, después de lo cual se administraron a las cobayas por vía IV de forma no acumulativa unas dosis dobles del broncoconstrictor (metacolina o histamina). Cuando se utilizó metacolina como agente broncoconstrictor, los animales se trataron previamente con propranolol (5 mg/kg, IV) para aislar los efectos antimuscarínicos del compuesto de prueba. El propranolol fue administrado 30 minutos antes de construir la curva de dosis-respuesta a la metacolina o a la histamina. Los cambios en VP se registraron utilizando el Acknowledge Data Collection Software (Santa Barbara, CA). Se practicó la eutanasia a los animales una vez completado el estudio.

El Cambio en VP se midió en cm de agua. Cambio en VP (cm H₂O) = presión pico (después de la administración del broncoconstrictor) - la presión de referencia pico. Se ajustó la curva de dosis-respuesta a la metacolina o la histamina a una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando GraphPad Prism, versión 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California). Se utilizó la ecuación siguiente:

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

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

40 Se calculó el porcentaje de inhibición de la respuesta broncoconstrictora a una dosis submáxima de metacolina o histamina en cada dosis del compuesto de prueba utilizando la ecuación siguiente: % Inhibición de respuesta = 100 - ((presión pico (después del tratamiento con un broncoconstrictor) - presión de referencia pico (tratado)) / (presión pico (después de administrar un broncoconstrictor, agua) - presión de referencia pico (agua) x 100). Las curvas de inhibición se ajustaron utilizando la ecuación logística de cuatro parámetros del software de GraphPad. También se estimaron la ID₅₀ (dosis necesaria para producir el 50% de inhibición de la respuesta al broncoconstrictor) y la E_{max} (inhibición máxima) cuando se consideró apropiado.

50 La magnitud de broncoprotección en diferentes puntos de tiempo tras la inhalación del compuesto de prueba se utilizó para estimar la vida media farmacodinámica (PD T_{1/2}). Se determinó la PD T_{1/2} utilizando un ajuste de regresión no lineal usando una ecuación de degradación exponencial de una fase (GraphPad Prism, versión 4.00): Y = Intervalo * exp (-K * X) + Estabilización; Comienza en Intervalo + Estabilización y se degrada en Estabilización con una constante de velocidad K. PD T_{1/2} = 0,69/K. La estabilización se limitó a 0.

55 A las 1,5 horas posteriores a la dosis, se descubrió que el éster 1-[2-(4-[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil)-2,5-dimetilfenilcarbamoil]etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto de la fórmula I) tiene una ID₅₀ de menos de aproximadamente 50 µg/ml para tanto la broncoconstricción inducida por la metacolina como para la broncoconstricción inducida por la histamina.

60 Adicionalmente, este compuesto produjo una broncoprotección significativa de hasta aproximadamente 72 horas cuando se administró como una dosis submáxima única (100 µg/ml) En este ensayo, el salmeterol (3 µg/ml, IH) (un agonista del receptor adrenérgico β₂) exhibió una broncoprotección significativa durante 6 a 14 horas; y el tiotropio (10 µg/ml) (un antagonista del receptor muscarínico) exhibió una broncoprotección significativa durante más de 72 horas.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se ha elaborado únicamente como ayuda para el lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha prestado mucha atención en la compilación de las mismas no se puede evitar incurrir en errores u omisiones, declinando la OEP toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2004074246 A [0002]
- US 2007009925 W [0003]
- US 79470206 P [0003]
- US 6750210 B2 [0076]
- US 6759398 B2 [0076]
- US 6537983 B [0076]
- US 20020019378 A1 [0076]

Literatura no patente citada en la descripción

- Remington: The Science and Practice of Pharmacy. Lippincott Williams & White, 2000 [0050]
- H.C. Ansel *et al.* Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. Lippincott Williams & White, 1999 [0050]
- Eglén *et al.* Muscarinic Receptor Subtypes: Pharmacology and Therapeutic Potential. DN&P, 1997, vol. 10 (8), 462-469 [0088]
- Emilien *et al.* Current Therapeutic Uses and Potential of beta-Adrenoceptor Agonists and Antagonists. *European J. Clinical Pharm.*, 1998, vol. 53 (6), 389-404 [0088]
- Barnes. Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *N. Engl. J. Med.*, 2000, vol. 343, 269-78 [0090]
- Lowry *et al.* *Journal of Biochemistry*, 1951, vol. 193, 265 [0152]
- Cheng Y; Prusoff WH. *Biochemical Pharmacology*, 1973, vol. 22 (23), 3099-108 [0153] [0156] [0174]
- Lowry *et al.* *Journal of Biological Chemistry*, 1951, vol. 193, 265 [0155]
- Bradford. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 72, 248-54 [0155]
- January B *et al.* *British Journal of Pharmacology*, 1998, vol. 123 (4), 701-11 [0176]
- Einthoven. *Pfugers Arch.*, vol. 51, 367-445 [0179]
- Mohammed *et al.* *Pulm Pharmacol Ther.*, 2000, vol. 13 (6), 287-92 [0179]

ES 2 371 425 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2- ilcarbámico.
- 10 2. Forma de base libre cristalina de la reivindicación 1 que tiene la Forma I, que está **caracterizada** por un patrón de difracción de rayos x en polvo que tiene picos de difracción en valores 2θ de $17,7\pm 0,3$, $18,2\pm 0,3$, $21,7\pm 0,3$ y $23,2\pm 0,3$.
- 15 3. Forma de base libre cristalina de la reivindicación 1 que tiene la Forma II, que está **caracterizada** por un patrón de difracción de rayos x en polvo que tiene picos de difracción en valores 2θ de $20,70\pm 0,3$, $21,60\pm 0,3$, $22,50\pm 0,3$ y $23,2\pm 0,3$.
- 20 4. Forma de base libre cristalina de la reivindicación 1 que tiene la Forma III, que está **caracterizada** por un patrón de difracción de rayos x en polvo que tiene picos de difracción en valores 2θ de $15,50\pm 0,3$, $18,10\pm 0,3$, $19,20\pm 0,3$ y $21,80\pm 0,3$.
- 25 5. Forma de base libre cristalina de la reivindicación 1 en forma micronizada.
- 30 6. Composición farmacéutica que comprende un soporte farmacéuticamente aceptable y una forma de base libre cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 35 7. Composición farmacéutica que comprende:
- (a) la forma de base libre cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5;
 - (b) un agente antiinflamatorio esteroideo; y
 - (c) un soporte farmacéuticamente aceptable.
- 40 8. Solución salina isotónica preparada disolviendo la forma de base libre cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en solución salina acuosa isotónica; en donde la solución tiene un pH en el rango de 4 a 6.
- 45 9. Combinación de agentes terapéuticos que comprende:
- (a) la forma de base libre cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y
 - (b) un agente antiinflamatorio esteroideo.
- 50 10. Proceso para preparar la forma de base libre cristalina de la reivindicación 1, el proceso comprendiendo:
- (a) proporcionar una solución de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifenil-2-ilcarbámico en un diluyente;
 - (b) añadir un solvente antagónico a la solución del paso (a) para producir un punto de enturbiamiento.
- 55 11. Proceso para preparar la forma de base libre cristalina de la reivindicación 1, el proceso comprendiendo:
- (a) proporcionar una solución de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico de ácido bifenil-2-ilcarbámico en un diluyente;
 - (b) añadir un solvente antagónico a la solución del paso (a) para producir un punto de enturbiamiento; y entonces
 - (c) añadir un cristal semilla de una forma de base libre cristalina de éster 1-[2-(4-{{(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxiethylamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]-piperidin-4-ílico de ácido bifenil-2-ilcarbámico.
- 60 12. Forma de base libre cristalina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en terapia.
- 65 13. Uso de una forma de base libre cristalina de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad pulmonar.

FIG. 1

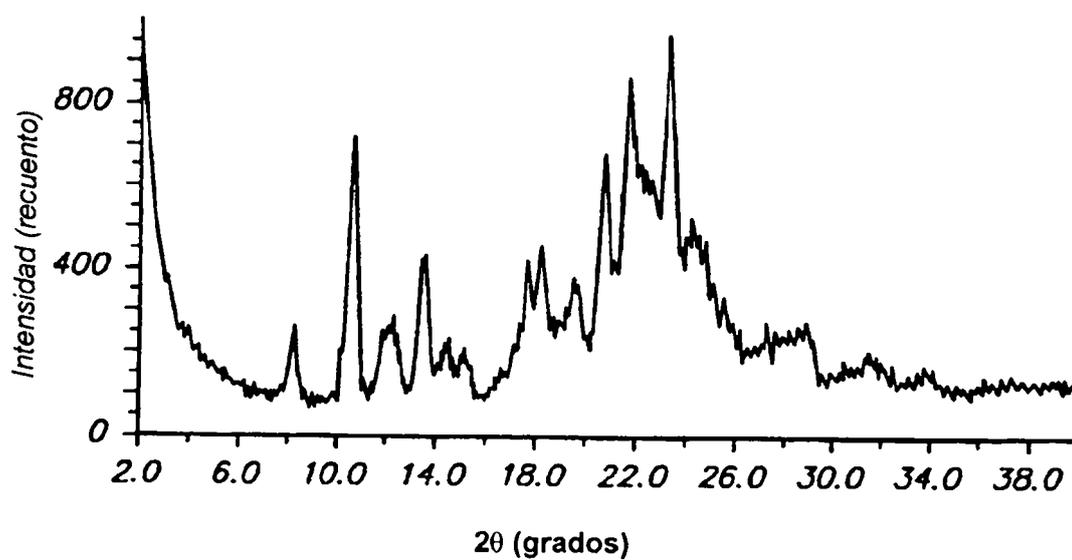


FIG. 2

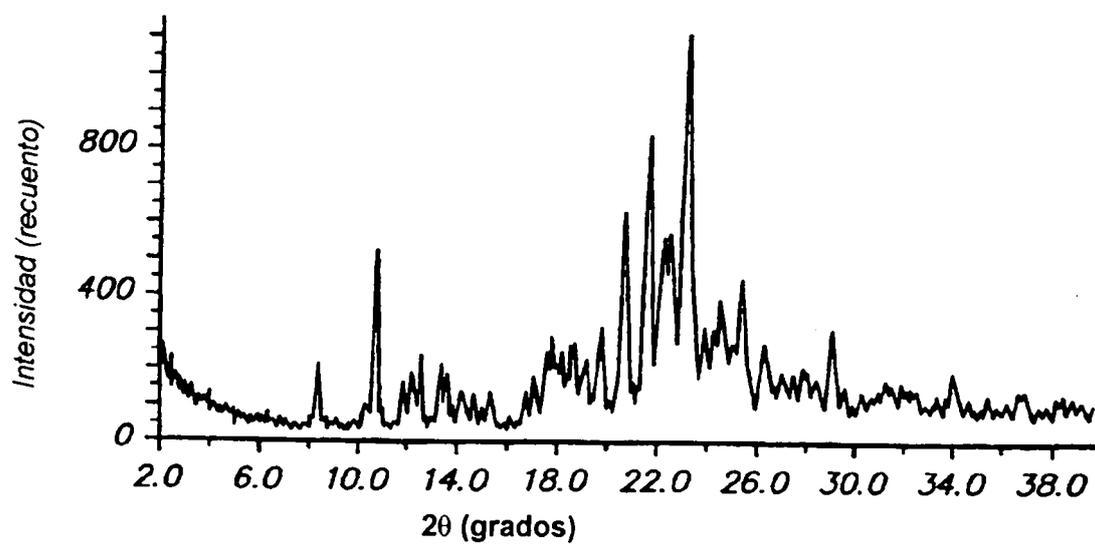


FIG. 3

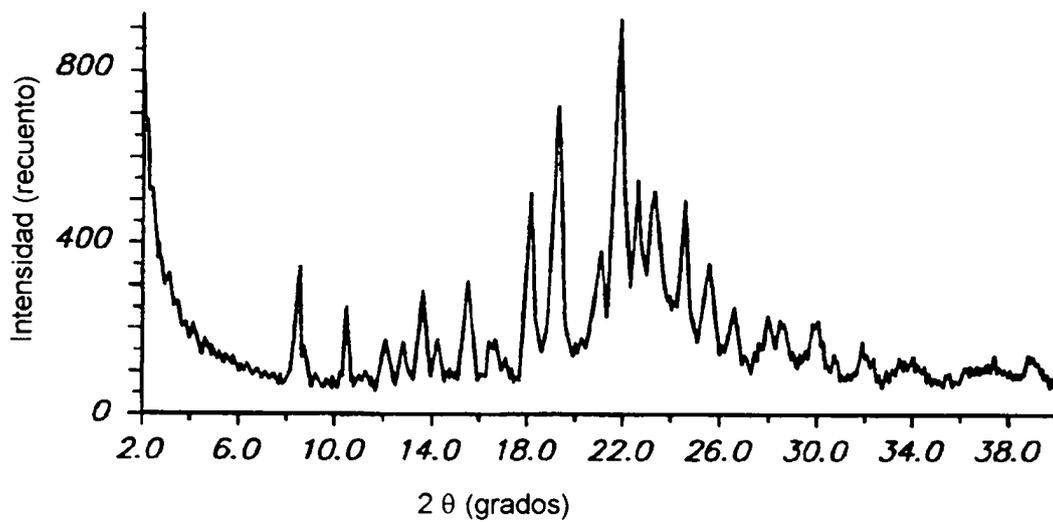


FIG. 4

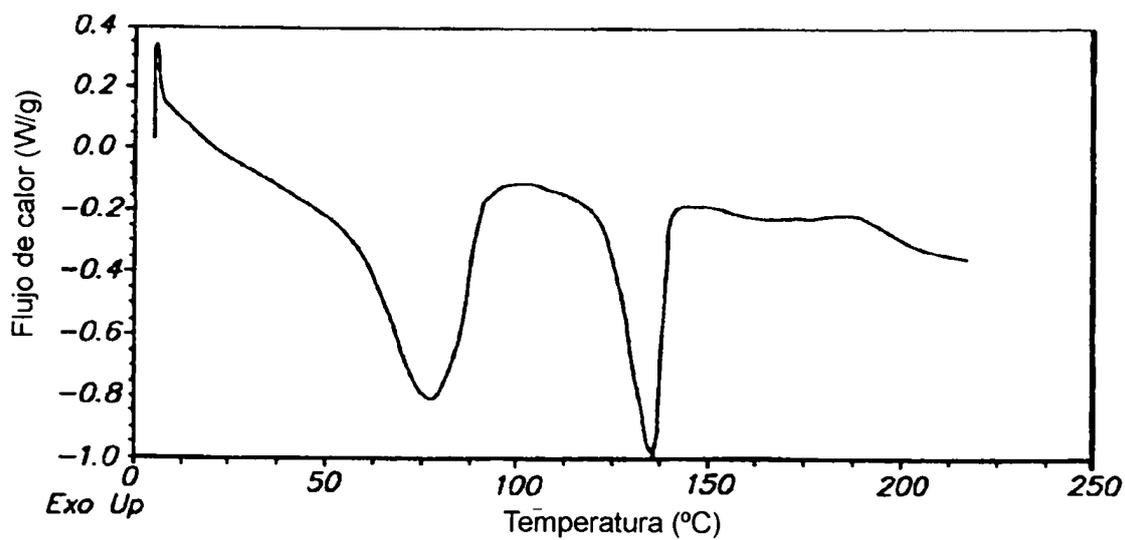


FIG. 5

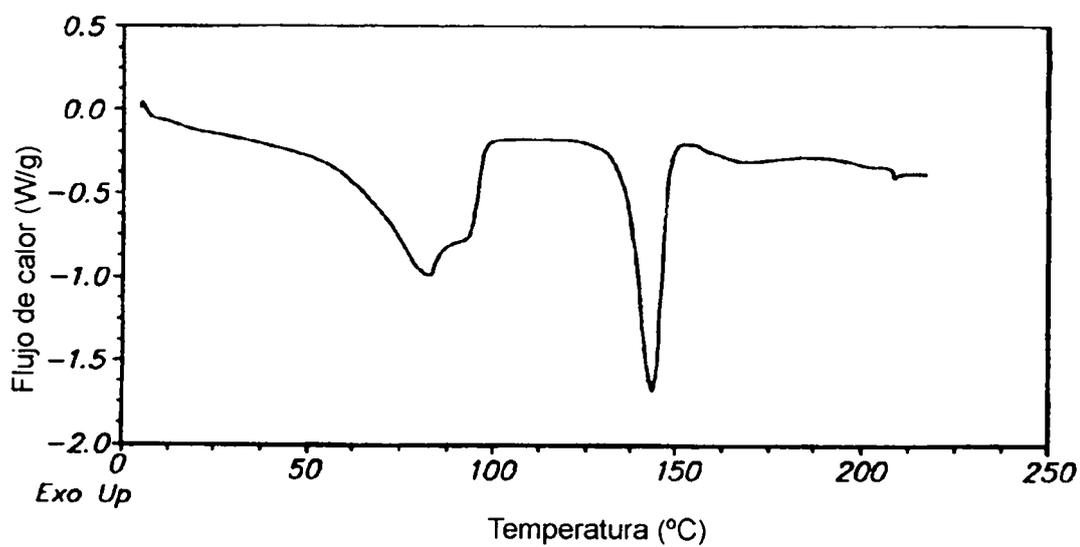


FIG. 6

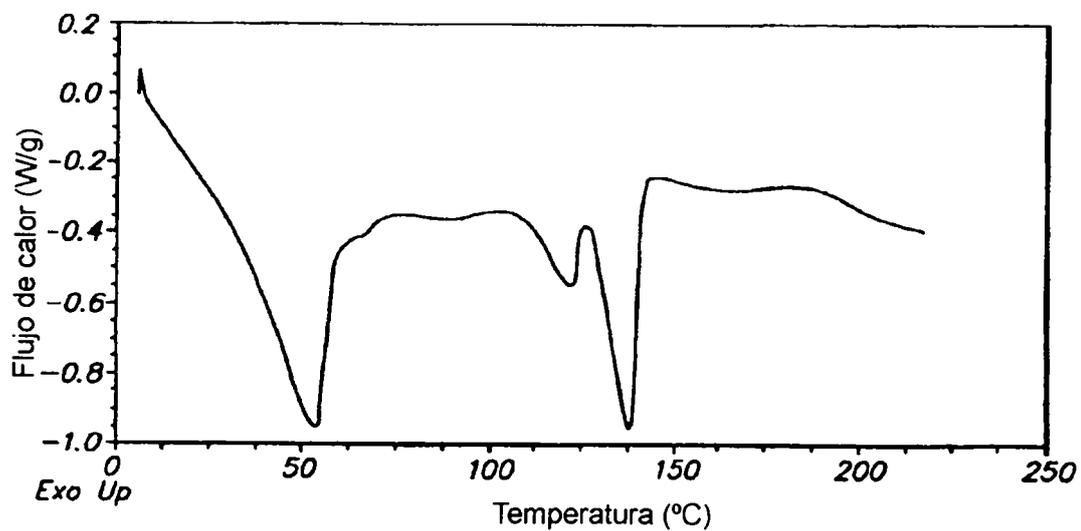


FIG. 7

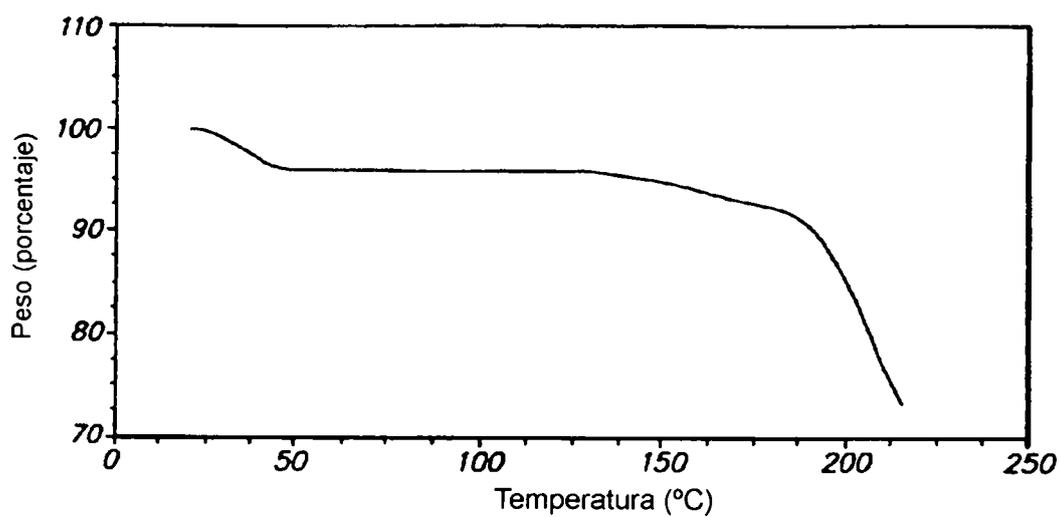


FIG. 8

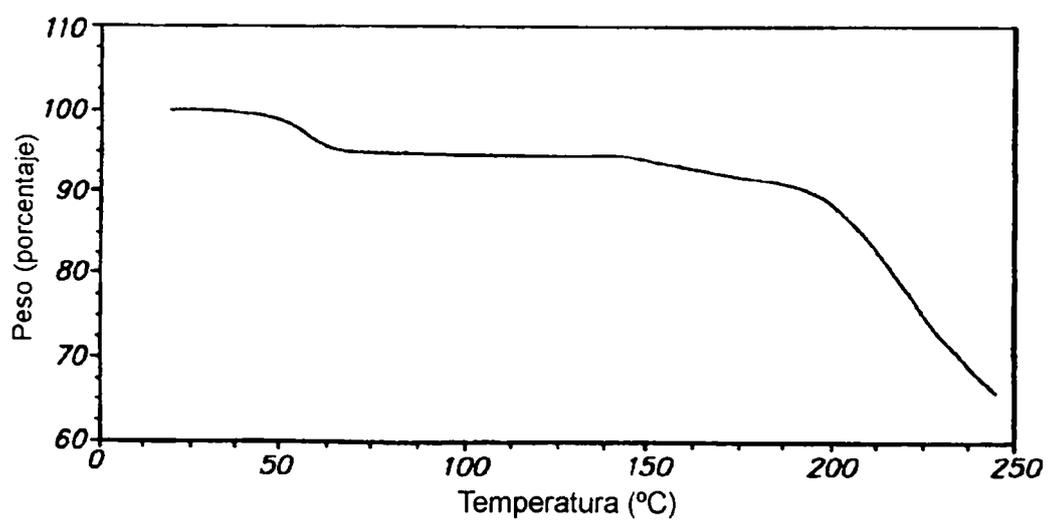


FIG. 9

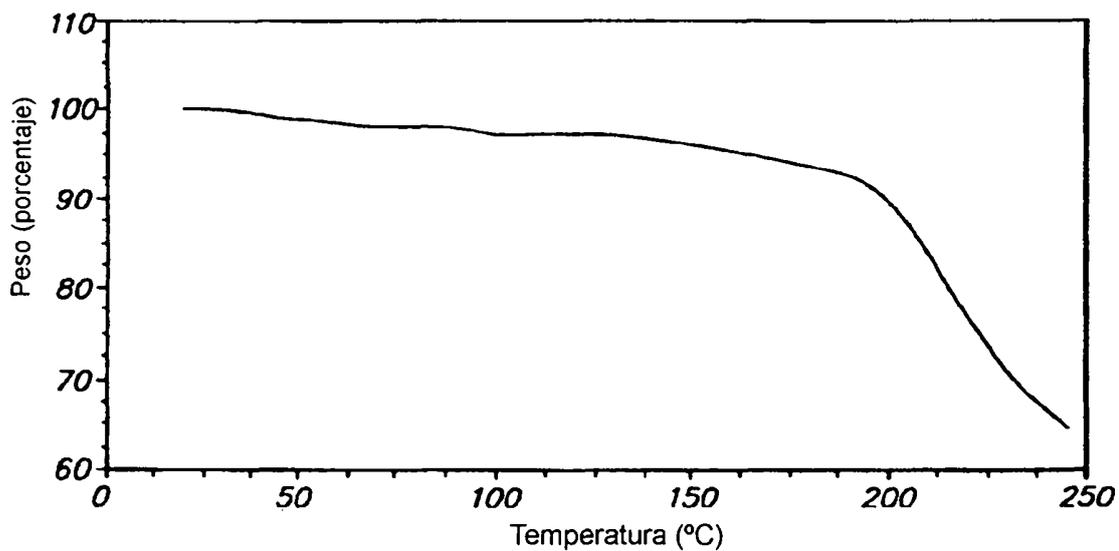


FIG. 10

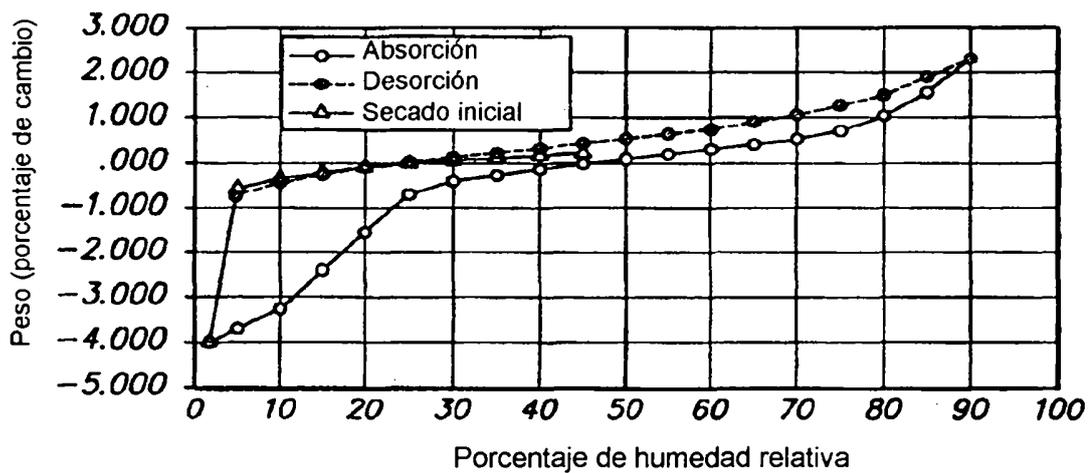


FIG. 11

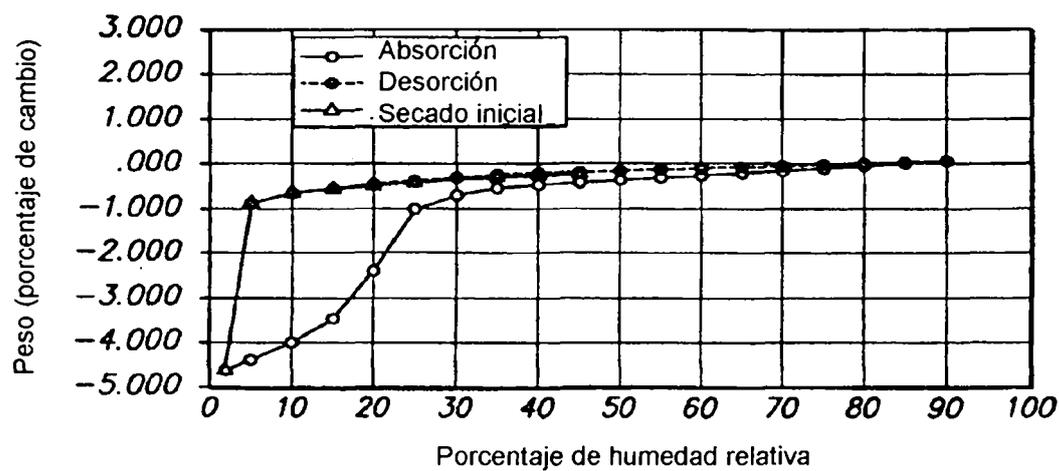


FIG. 12

