

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 958**

51 Int. Cl.:

C07D 401/12 (2006.01)

A61K 31/4709 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2005 E 05803280 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2012 EP 1778672**

54 Título: **Forma cristalina de un compuesto bifenilo**

30 Prioridad:

16.08.2004 US 601805 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.04.2013

73 Titular/es:

**THERAVANCE, INC. (100.0%)
901 GATEWAY BOULEVARD
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**CHAO, ROBERT S.;
RAPTA, MIROSLAV y
COLSON, PIERRE-JEAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 400 958 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

Forma cristalina de un compuesto bifenilo

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

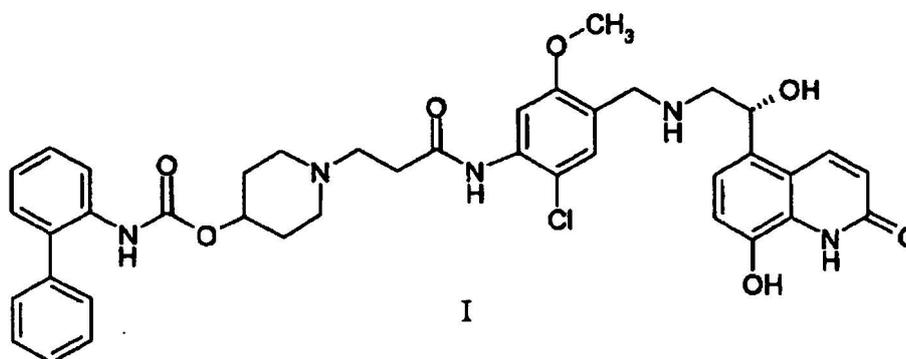
10 La presente invención se refiere a nuevas sales cristalinas de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto bifenilo que se espera resulten útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos pulmonares. La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos cristalinos o preparadas a partir de dichos compuestos cristalinos, a procedimientos y a intermediarios para preparar dichos compuestos cristalinos, y resulta útil en métodos de utilización de dichos compuestos cristalinos para el tratamiento de un trastorno pulmonar.

15 Estado de la técnica

La solicitud de patente WO n° 01/42212 describe derivados impedidos de carbamato que son antagonistas de receptor muscarínico. La solicitud de patente WO n° 2004/074276 describe derivados bifenilo que presentan tanto actividad de agonista de receptor β_2 adrenérgico como de antagonista de receptor muscarínico.

25 La solicitud de patente US de titularidad compartida n° 10/779.157 (patente US n° 2004/0167167), presentada el 13 de febrero de 2004, da a conocer nuevos compuestos bifenilo que resultan útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de trastornos pulmonares tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma. En particular, el compuesto 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico se da a conocer específicamente en dichas solicitudes que presenta actividad tanto de antagonista muscarínico como de agonista de receptor β_2 -adrenérgico. La estructura química del 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico está representada por la fórmula I:

30



35 Los agentes terapéuticos útiles para tratar trastornos pulmonares se administran ventajosamente de manera directa en el tracto respiratorio mediante inhalación. A este respecto, se han desarrollado varios tipos de dispositivos de inhalación farmacéutica para administrar agentes terapéuticos mediante inhalación, incluyendo los inhaladores de polvos secos (IPS), los inhaladores de dosis medida (IDM) y los inhaladores nebulizadores. Durante la preparación de composiciones y formulaciones farmacéuticas para la utilización en dichos dispositivos, resulta altamente deseable disponer de una forma cristalina del agente terapéutico que no sea higroscópica ni deliquescente y que presenta un punto de fusión relativamente alto (es decir, superior a aproximadamente 150°C), permitiendo de esta manera que el material pueda micronizarse sin descomposición significativa o pérdida de cristalinidad.

40 No se ha informado previamente de ninguna forma salina cristalina del compuesto de fórmula I. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, existe una necesidad de una forma salina cristalina no deliquescente estable del compuesto de fórmula I que presente un nivel aceptable de higroscopicidad y un punto de fusión relativamente alto.

45 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona sales cristalinas de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de las mismas:

50

Inesperadamente, dichas sales cristales de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I se ha encontrado que no son deliquescentes, incluso cuando se exponen a la humedad atmosférica. Además, dichas sales cristalinas presentan un nivel aceptable de higroscopicidad y un punto de fusión muy alto, por ejemplo superior a 215°C. En una realización particular, una sal cristalina de la presente invención presenta un punto de fusión superior a 230°C.

Entre otros usos, una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I resulta útil para preparar composiciones farmacéuticas que se espera resulten útiles para tratar trastornos pulmonares. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en otros de sus aspectos de composición, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma.

En una realización particular, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además un agente antiinflamatorio esteroideo, tal como un corticoesteroide, o un inhibidor de fosfodiesterasa-4 ó una combinación de los mismos.

En otra realización, la presente invención proporciona una combinación que comprende:

- (a) una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma, y
- (b) un agente antiinflamatorio esteroideo.

El compuesto de fórmula I presenta actividad tanto de antagonista muscarínico como de agonista de receptor β_2 -adrenérgico. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de la presente invención se espera que resulte útil como agente terapéutico para el tratamiento de trastornos pulmonares tales como asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en uno de sus aspectos metodológicos, la presente invención resulta útil en un método para tratar un trastorno pulmonar, comprendiendo el método la administración en un paciente que necesita tratamiento, de una cantidad terapéuticamente efectiva de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma.

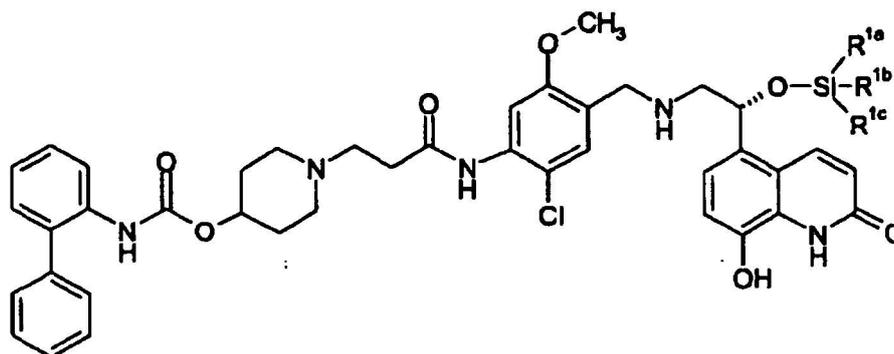
Además, la presente invención resulta útil en un método para producir la broncodilatación en un paciente, comprendiendo el método la administración mediante inhalación en un paciente de una cantidad productora de broncodilatación de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma.

La presente invención resulta útil además en un método para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el asma, comprendiendo el método la administración en un paciente que necesita tratamiento, de una cantidad terapéuticamente efectiva de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma.

La presente invención se refiere además a procedimientos para preparar una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I. Por consiguiente, en otro de sus aspectos metodológicos, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico, comprendiendo el procedimiento poner en contacto el éster 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico con ácido 1,2-etanodisulfónico.

En todavía otro de sus aspectos metodológicos, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto de fórmula I, comprendiendo el procedimiento:

- (a) poner en contacto un compuesto de fórmula II:



II

en la que R^{1a} , R^{1b} y R^{1c} se seleccionan independientemente de entre alquilo C_{1-4} , fenilo, alquil- C_{1-4} -fenilo o uno de entre R^{1a} , R^{1b} y R^{1c} es -O-(alquilo C_{1-4}), con iones flúor, y

- 5 (b) poner en contacto el producto de la etapa (b) on ácido 1,2-etanodisulfónico o un hidrato del mismo, con el fin de formar una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto de fórmula I, en la que las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en el mismo recipiente de reacción sin aislamiento del producto de la etapa (a).

10 En otro de sus aspectos metodológicos, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto de fórmula I que presenta un punto de fusión superior a 230°C , comprendiendo el procedimiento añadir un cristal de nucleación de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto de fórmula I a una solución que comprende una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto de fórmula I disuelto en un diluyente inerte, en el que el cristal de nucleación presenta un punto de fusión superior a 230°C .

15 Este procedimiento también puede utilizarse para recrystalizar una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto de fórmula I con el fin de proporcionar una forma cristalina que presenta un punto de fusión superior a 230°C . De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la invención proporciona además un procedimiento para preparar una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto de fórmula I que presenta un punto de fusión superior a 230°C , comprendiendo el procedimiento:

- 20 (a) disolver una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto de fórmula I en un diluyente inerte a una primera temperatura,
 25 (b) enfriar el producto de la etapa (a) hasta una segunda temperatura, y
 (c) añadir un cristal de nucleación de una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto de fórmula I,

en el que el cristal de nucleación presenta un punto de fusión superior a 230°C ; la primera temperatura es una temperatura suficiente para disolver la sal de ácido 1,2-etanodisulfónico y la segunda temperatura es inferior a una temperatura a la que el cristal de nucleación se disuelve por completo al añadirlo al producto de la etapa (b).

30 Además, la presente invención resulta útil en un procedimiento para purificar 1-[2-(2-cloro-4-[[(R)]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico, comprendiendo el procedimiento formar una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del 1-[2-(2-cloro-4-[[(R)]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico.

35 La presente invención se refiere además a una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[(R)]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato de la misma, para la utilización en terapia o a modo de medicamento.

40 Además, la presente invención se refiere a la utilización de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[(R)]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato de la misma, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno pulmonar.

45 La presente invención se refiere además a la utilización de:

- 50 (a) una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[(R)]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato de la misma, y

(b) un agente antiinflamatorio esteroideo,

en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno pulmonar.

5 La sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato de la misma, puede utilizarse en forma micronizada, y las composiciones farmacéuticas pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable y una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato de la misma, en forma micronizada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Se ilustran diversos aspectos de la presente invención mediante referencia a los dibujos adjuntos.

15 La figura 1 muestra un registro de calorimetría de barrido diferencial (CBD) y un registro de análisis termogravimétrico (ATG) y la figura 2 muestra un registro de CBD de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico de la presente invención.

20 Las figuras 3 y 4 muestran patrones de difracción de rayos X de los polvos (DRXP) de muestras de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico de la presente invención.

25 La figura 5 muestra un espectro de absorción de infrarrojos (IR) para una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico de la presente invención.

30 La figura 6 muestra un registro de sorción dinámica de la humedad (SDH) de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

35 La presente invención proporciona sales cristalinas de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico o un solvato de las mismas. El agente terapéutico activo en estas sales (es decir, el compuesto de fórmula I) contiene un centro quiral que presenta la configuración (R). Sin embargo, el experto en la materia entenderá que pueden encontrarse cantidades menores del estereoisómero (S) en las composiciones de la presente invención, a menos que se indique lo contrario, con la condición de que ninguna utilidad de la composición en su globalidad resulte eliminada por la presencia de dicho isómero.

40 El compuesto de fórmula I se ha denominado utilizando el software AutoNom, disponible comercialmente (MDL, San Leandro, California). Además, las sales de ácido 1,2-etanodisulfónico en ocasiones también se denominan sales de edisilato o sales edisilato.

45 Definiciones

En la descripción de los compuestos, composiciones, métodos y procedimientos de la presente invención, los términos y expresiones siguientes presentan los significados siguientes, a menos que se indique lo contrario.

50 La expresión "punto de fusión" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la temperatura a la que se observa el flujo máximo de calor endotérmico mediante calorimetría de barrido diferencial.

55 La expresión "forma micronizada" se refiere a una forma de partículas en la que por lo menos aproximadamente 90% de las partículas presentan un diámetro inferior a aproximadamente 10 µm.

60 El término "solvato" se refiere a un complejo o agregado formado por una o más moléculas de un soluto, es decir, una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I y una o más moléculas de un solvente. Dichos solvatos típicamente presentan una proporción molar sustancialmente fija de soluto a solvente. Dicho término incluye además clatratos, incluyendo los clatratos con agua. Entre los solventes representativos se incluyen, a título de ejemplo, agua, metanol, etanol, isopropanol, ácido acético y similares. En el caso de que el solvente sea agua, el solvato formado es un hidrato.

La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad suficiente para llevar a cabo el tratamiento cuando se administra en un paciente que necesita tratamiento.

5 El término "tratar" o "tratamiento" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a tratar o al tratamiento de una enfermedad o de una condición médica (tal como EPOC) en un paciente, tal como un mamífero (particularmente un ser humano), incluyendo:

- 10 (a) prevenir que aparezca la enfermedad o condición médica, es decir, el tratamiento profiláctico de un paciente,
 (b) mejorar la enfermedad o la condición médica, es decir, eliminar o provocar la regresión de la enfermedad o de la condición médica en un paciente,
 (c) suprimir la enfermedad o la condición médica, es decir, enlentecer o detener el desarrollo de la enfermedad o de la condición médica en un paciente, o
 (d) aliviar los síntomas de la enfermedad o de la condición médica en un paciente.

15 La expresión "forma de dosificación unitaria" se refiere a una unidad físicamente discreta que resulta adecuada para dosificar en un paciente, es decir, una unidad que contiene una cantidad predeterminada de una sal de la invención que se ha calculado que produce el efecto terapéutico deseado, sola o en combinación con una o más unidades adicionales. Por ejemplo, dichas formas de dosificación unitaria pueden ser cápsulas para inhalador de polvos secos, una dosis medida de un inhalador de dosis medidas, cápsulas, tabletas y píldoras.

20 Sales de ácido 1,2-etanodisulfónico de la invención

25 Puede prepararse una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-{{(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico de la presente invención a partir de 1-[2-(2-cloro-4-{{(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico y ácido 1,2-etanodisulfónico o un hidrato del mismo.

30 Una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de la presente invención típicamente contiene entre 0,90 y 1,10 equivalentes molares de ácido 1,2-etanodisulfónico por equivalente molar de compuesto de fórmula I, incluyendo entre 0,95 y 1,05 equivalentes molares de ácido 1,2-etanodisulfónico por equivalente molar de compuesto de fórmula I. En una realización particular, la sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de la presente invención contiene 1 equivalente molar de ácido 1,2-etanodisulfónico por equivalente molar del compuesto de fórmula I.

35 La proporción molar de ácido 1,2-etanodisulfónico a 1-[2-(2-cloro-4-{{(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico puede determinarse fácilmente mediante diversos métodos disponibles para el experto en la materia. Por ejemplo, dichas proporciones molares pueden determinarse fácilmente mediante RMN-¹H. Alternativamente, puede utilizarse el análisis elemental y métodos de HPLC para determinar la proporción molar.

40 El 1-[2-(2-cloro-4-{{(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico utilizado en la presente invención puede prepararse fácilmente a partir de materias primas y reactivos disponibles comercialmente utilizando los procedimientos descritos en los Ejemplos, posteriormente, o utilizando los procedimientos descritos en la solicitud de patente US de titularidad compartida indicada en la sección de antecedentes de la presente solicitud.

45 El ácido 1,2-etanodisulfónico se encuentra disponible comercialmente de, por ejemplo, Alfa Chemicals Ltd., Berkshire, Reino Unido. En una realización, el ácido 1,2-etanodisulfónico utilizado para preparar las sales de la presente invención es un dihidrato. En una realización particular, el dihidrato de ácido 1,2-etanodisulfónico presenta una pureza superior o igual al 97% (determinada mediante HPLC). Si se desea, el dihidrato de ácido 1,2-disulfónico utilizado en la presente invención puede recristalizarse a partir de, por ejemplo, ácido acético y anhídrido acético previamente a la utilización.

50 Para preparar una sal cristalina de la presente invención, el 1-[2-(2-cloro-4-{{(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico típicamente se pone en contacto con 0,75 a 1,3 equivalentes molares de ácido 1,2-etanodisulfónico o de un hidrato del mismo. Generalmente, dicha reacción se lleva a cabo en un diluyente inerte a una temperatura comprendida entre aproximadamente 0°C y 60°C, incluyendo aproximadamente 20°C a 55°C, tal como 25°C a 50°C. Entre los diluyentes inertes adecuados para dicha reacción se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, metanol, etanol, isopropanol, isobutanol, acetato de etilo, diclorometano y similares, conteniendo opcionalmente agua. En una realización particular, se añade una solución de dihidrato de ácido 1,2-etanodisulfónico en etanol a un volumen cinco veces mayor de 1-[2-(2-cloro-4-{{(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico en una mezcla de isopropanol y

diclorometano (64:1). En otras realizaciones particulares, la solución de dihidrato de ácido 1,2-etanodisulfónico incluye agua o etanol como diluyente y la solución de 1-[2-(2-cloro-4-[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil]etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico incluye isopropanol o etanol como diluyente.

Alternativamente, puede prepararse una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de un compuesto de fórmula I poniendo en contacto un derivado protegido con sililo del compuesto de fórmula I (es decir, un compuesto de fórmula II) con una fuente de iones flúor y después, en el mismo recipiente de reacción, poniendo en contacto el producto con ácido 1,2-etanodisulfónico o un hidrato del mismo. En una realización particular, el grupo protector de sililo es un grupo terc-butildimetilsililo. Entre otros grupos protectores de sililo adecuados se incluyen terc-butildifenilsililo, difenilmetilsililo, di-terc-butilmetilsililo y terc-butoxidifenilsililo. La fuente de iones flúor utilizada en dicho procedimiento puede ser cualquier reactivo que contenga o que comprenda iones flúor o fluoruro de hidrógeno. En una realización particular, la fuente de iones flúor es el trihidrofluoruro de trietilamina. Entre otras fuentes adecuadas de iones flúor se incluyen fluoruro de tetrabutilamonio, fluoruro de potasio con fluoruro de 18-corona-6-hidrógeno e hidrof fluoruro de piridina.

Generalmente, dicho procedimiento se lleva a cabo en un diluyente inerte a una temperatura comprendida entre 0°C y 50°C, incluyendo 20°C a 35°C, tal como 25°C a 30°C. Entre los diluyentes inertes adecuados para dicha reacción se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, diclorometano, metanol y mezclas de los mismos. En una realización particular, una solución de 1-[2-(2-cloro-4-[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil]etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico se pone en contacto con 2,5 a 3,0 equivalentes molares de trihidrofluoruro de trietilamina en diclorometano a temperatura ambiente durante 12 a 24 horas o hasta que se ha completado sustancialmente la eliminación del grupo sililo. A la solución resultante, sin aislamiento del producto de reacción, se añaden 0,9 a 1,1 equivalentes molares de dihidrato de ácido 1,2-etanodisulfónico en metanol y esta mezcla se calienta a una temperatura de entre 25°C y 35°C durante 2 a 6 horas. Tras completarse la reacción, una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil]etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico se aísla de la mezcla de reacción mediante cualquier medio convencional, tal como la precipitación, la concentración o la centrifugación.

Opcionalmente, una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de la presente invención puede purificarse adicionalmente mediante agitación o suspensión de la sal en isopropanol que contiene 15% a 25%, incluyendo 20%, de agua en volumen. En una realización particular, se utilizan 10 ml de la mezcla de isopropanol/agua por cada gramo de la sal de ácido 1,2-etanodisulfónico.

Un procedimiento para preparar una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de la presente invención opcionalmente puede incluir la utilización de un cristal de nucleación para producir predominantemente una sal cristalina particular. Por ejemplo, mediante la utilización de un cristal de nucleación de una sal cristalina de punto de fusión más alto (es decir, superior a 230°C), puede prepararse una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de fórmula I que presenta esencialmente el mismo punto de fusión que el cristal de nucleación. Dichos cristales de nucleación pueden utilizarse al formar inicialmente la sal cristalina o pueden utilizarse para recrystalizar una sal cristalina o parcialmente cristalina.

Típicamente, los cristales de nucleación se preparan a escala pequeña mediante cristalización lenta sin agitación y sin aplicar enfriamiento. A título ilustrativo, para obtener cristales de nucleación, la sal cristalina típicamente se disuelve en un diluyente inerte a una temperatura suficiente para conseguir la disolución. Generalmente, en el procedimiento inicial de obtención de cristales de nucleación, se utiliza una cantidad reducida, típicamente inferior a 10 g, incluyendo inferior a 5 g, tal como inferior a 1 g, de la sal cristalina. En una realización particular, se utiliza metanol que contiene 12% a 20% de agua, incluyendo 13% a 15% de agua, como el diluyente a una temperatura comprendida entre 60°C y 70°C, tal como entre 60°C y 65°C. Se deja enfriar la solución hasta la temperatura ambiente. Tras 1 a 3 días, los cristales resultantes se aíslan mediante filtración u otros medios convencionales. Alternativamente, pueden obtenerse cristales de nucleación a partir de una preparación previa del material cristalino.

En el procedimiento de recrystalización que utiliza cristales de nucleación, se disuelve una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de la presente invención en un diluyente inerte, tal como en el procedimiento de obtención de cristales de nucleación, típicamente metanol que contiene 15% de agua, a una temperatura comprendida entre 60°C y 65°C. Se deja enfriar la solución hasta una temperatura a la que no se disuelven los cristales de nucleación, por ejemplo a una temperatura comprendida entre 30°C y 40°C y después se añaden los cristales de nucleación. Típicamente, la proporción de peso de cristales de nucleación a peso de sal cristalina en la solución es de entre 1:5 y 1:35. La solución se enfría hasta una temperatura a la que se produce la cristalización, por ejemplo hasta 20°C y se agita durante 2 a 24 horas. Los cristales resultantes se aíslan por medios convencionales. Para obtener suficientes cristales de nucleación para preparar grandes lotes de material, el procedimiento de recrystalización puede llevarse a cabo sucesivamente utilizando los cristales obtenidos mediante una primera recrystalización como

los cristales de nucleación para una etapa de recristalización posterior. Se apreciará que las temperaturas específicas a las que se llevan a cabo las etapas del procedimiento de recristalización se seleccionan dependiendo del carácter del diluyente y la concentración de la sal cristalina en el diluyente. Además, el procedimiento de recristalización puede llevarse a cabo utilizando evaporación o un antisolvente para facilitar la cristalización, en lugar del enfriamiento.

Entre otras ventajas, se ha descubierto que la formación de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I resulta útil para purificar el compuesto de fórmula I. Generalmente, una sal cristalina de 1,2-etanodisulfónico de la presente invención presenta una pureza superior a 95%, y típicamente superior a 98%, determinada mediante cromatografía líquida de alto rendimiento.

La sal cristalina de 1,2-etanodisulfónico de la presente invención se caracteriza por un punto de fusión muy alto, tal como ponen de manifiesto los registros de calorimetría de barrido diferencial (CBD), que muestran un pico en el flujo de calor endotérmico en el intervalo de entre 215°C y 240°C. Se ha observado que la temperatura de fusión de la sal cristalina depende del procedimiento por el que se forma la sal cristalina. Los cristales de nucleación formados mediante cristalización lenta sin agitación y sin aplicar enfriamiento mostraron puntos de fusión superiores a 230°C. Las sales cristalinas formadas mediante un procedimiento que incluía la recristalización con dichos cristales de nucleación típicamente mostraban puntos de fusión comprendidos en el intervalo de entre 230°C y 245°C, tal como se muestra en, por ejemplo, la figura 1. Las sales cristalinas formadas sin cristal de nucleación que presentaban un punto de fusión superior a 230°C típicamente mostraron puntos de fusión comprendidos en el intervalo de entre 215°C y 229°C, tal como se muestra en, por ejemplo, la figura 2. Por lo tanto, en realizaciones particulares, la invención proporciona sales cristalinas de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I que presentan un registro de CBD en el intervalo de temperaturas superior a 200°C que concuerda sustancialmente con el registro mostrado en la figura 1 ó con el mostrado en la figura 2.

En otra realización, la sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de la presente invención se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de los polvos (DRXP) que presenta picos de difracción significativos en valores de 2θ de $5,0\pm 0,3$ y $15,0\pm 0,3$. Podían observarse diferencias sutiles entre las posiciones de los picos en el espectro de DRXP de una sal cristalina preparada mediante recristalización a partir de un cristal de nucleación de elevado punto de fusión, tal como se muestra en la figura 3, y las de una sal preparada sin utilizar dicho cristal de nucleación, tal como se muestra en la figura 4. Por consiguiente, en otras realizaciones, la sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de los polvos en el que las posiciones de los picos concuerdan sustancialmente con las mostradas en la figura 3 ó con las mostradas en la figura 4.

En otra realización, la sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I se caracteriza por su espectro de absorción de infrarrojos (IR), que muestra bandas de absorción significativas en 704, 748, 768, 841, 900, 1.055, 1.104, 1.166, 1.218, 1.294, 1.408, 1.522, 1.609, 1.655 y 1.701 cm^{-1} , tal como se ilustra en la figura 5.

Se ha demostrado que una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I presenta un perfil de sorción/desorción reversible con un nivel moderado aceptable de higroscopicidad (es decir, una ganancia inferior al 2,5% en peso en el intervalo de humedad de 40% a 75% de humedad relativa).

Estas propiedades de las sales de la presente invención se ilustran adicionalmente en los Ejemplos, posteriormente.

Composición y formulaciones farmacéuticas

La sal de 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I típicamente se administra en un paciente en forma de una composición o formulación farmacéutica. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse en el paciente mediante cualquier vía aceptable de administración, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, los modos de administración por inhalación, oral, nasal, tópica (incluyendo transdérmica) y parenteral. Sin embargo, el experto en la materia entenderá que, tras formular la sal cristalina de la presente invención, podría ya no encontrarse en forma cristalina, es decir, la sal podría haberse disuelto en un portador adecuado.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en uno de sus aspectos de composición, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolin-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidin-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma. Opcionalmente, dichas composiciones farmacéuticas pueden contener otros agentes terapéuticos y/o de formulación si se desea.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención típicamente contienen una cantidad terapéuticamente efectiva de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-

dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma. Típicamente, dichas composiciones farmacéuticas contienen entre 0,01% y 95% en peso del agente activo, incluyendo entre 0,01% y 30% en peso, tal como entre 0,01% y 10% en peso del agente activo.

5 Puede utilizarse cualquier portador o excipiente convencional en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. La elección de un portador o excipiente particular, o de combinaciones de portadores o excipientes, dependerá del modo de administración que se utilice para tratar un paciente particular o el tipo de condiciones médica o estado de enfermedad. A este respecto, la preparación de una composición farmacéutica adecuada para un modo particular de administración se encuentra perfectamente comprendido dentro de los conocimientos del experto en la técnica farmacéutica. Además, los ingredientes para dichas composiciones se encuentran disponibles comercialmente de, por ejemplo, Sigma, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178. A título ilustrativo adicional, las técnicas de formulación convencionales se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20a edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland, 2000; y en H.C. Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7a edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland, 1999.

15 Entre los ejemplos representativos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, 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 de supositorio, (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 propilenglicol, (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol, (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo, (13) agar, (14) agentes tamponadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio, (15) ácido alginico, (16) agua sin pirógenos, (17) solución salina isotónica, (18) solución de Ringer, (19) alcohol etílico, (20) soluciones tamponadoras de fosfato, (21) gases propelentes comprimidos, tales como clorofluorocarbonos e hidrofurocarbonos, y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas utilizadas en las composiciones farmacéuticas.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención típicamente se preparan mediante la mezcla u homogeneización intensa e íntima de una sal de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable y uno o más ingredientes opcionales. Se resulta necesario o se desea, la mezcla uniformemente homogeneizada resultante seguidamente puede conformarse o cargarse en tabletas, cápsulas, píldoras, inhaladores, cartuchos, dispensadores y similares utilizando procedimientos y equipos convencionales.

35 En una realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención resultan adecuadas para la administración por inhalación. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración inhalada típicamente se encuentran en forma de un aerosol o de unos polvos. Dichas composiciones generalmente se administran utilizando dispositivos de administración bien conocidos, tales como nebulizadores inhaladores, inhaladores de dosis medida (IDM), inhaladores de polvos secos (IPS) o un dispositivo de administración similar.

40 En una realización específica de la presente invención, la composición farmacéutica que comprende el agente activo se administra mediante inhalación utilizando un inhalador nebulizador. Dichos dispositivos nebulizadores típicamente producen un flujo de aire a alta velocidad que provoca que la composición farmacéutica que comprende el agente activo se pulverice en forma de una niebla transportada al interior del tracto respiratorio del paciente. Por consiguiente, al formularse para la utilización en un inhalador nebulizador, el agente activo típicamente se disuelve en un portador adecuado para formar una solución. Los dispositivos nebulizadores adecuados se proporcionan comercialmente, por ejemplo de PARI GmbH (Starnberg, Alemania). Entre otros dispositivos nebulizadores se incluyen Respimat (Boehringer Ingelheim) y los dados a conocer en, por ejemplo, la patente US nº 6.123.068 y en la solicitud de patente WO nº 97/12687.

50 Una composición farmacéutica representativa para la utilización en un inhalador nebulizador comprende una solución acuosa que comprende entre aproximadamente 0,05 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml de una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de compuesto de fórmula I ó un solvato de la misma. En una realización, la formulación acuosa de nebulizador es isotónica. En una realización, la formulación acuosa de nebulizador presente un pH comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6. En una realización particular, la formulación acuosa de nebulizador se tampona con tampón citrato hasta un pH de aproximadamente 5. En otra realización particular, la formulación acuosa de nebulizador contiene entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 1,0 mg/ml de equivalentes de base libre de 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico.

60 En otra realización específica de la presente invención, la composición farmacéutica que comprende el agente activo se administra mediante inhalación utilizando un inhalador de polvos secos. Dichos inhaladores de polvos secos típicamente administran el agente activo en forma de polvos de flujo libre que se dispersan en el flujo de aire de un

paciente durante la inspiración. Con el fin de conseguir unos polvos de flujo libre, el agente activo típicamente se formula con un excipiente adecuado tal como lactosa, almidón, manitol, dextrosa, ácido poliláctico (APL), poliláctido-coglicólido (PLGA) o combinaciones de los mismos. Típicamente, el agente activo se microniza y se combina con un portador adecuado para formar una mezcla de partículas micronizadas de tamaño respirable, en la que las "partículas micronizadas" o "forma micronizada" se refiere a que por lo menos aproximadamente 90% de las partículas presentan un diámetro inferior a aproximadamente 10 mm.

Una composición farmacéutica representativa para la utilización en un inhalador de polvos secos comprende lactosa que presenta un tamaño de partícula de entre aproximadamente 1 mm y aproximadamente 100 mm, y partículas micronizadas de una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de fórmula I ó un solvato de la misma.

Dicha formulación de polvos secos puede prepararse, por ejemplo, mediante combinación de la lactosa con el agente activo y después mezclando en seco los componentes. Alternativamente, si se desea, el agente activo puede formularse sin un excipiente. A continuación, la composición farmacéutica típicamente se carga en un dispensador de polvos secos o en cartuchos o cápsulas de inhalación para la utilización con un dispositivo de administración de polvos secos.

Entre los ejemplos de dispositivos de inhalación de polvos secos se incluyen Diskhaler (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC) (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.035.237), Diskus (GlaxoSmithKline) (ver, por ejemplo, la patente US nº 6.378.519), Turbuhaler (AstraZeneca, Wilmington, DE) (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.524.769), Rotahaler (GlaxoSmithKline) (ver, por ejemplo, la patente US nº 4.353.365) y Handihaler (Boehringer Ingelheim). Se describen ejemplos adicionales de dispositivos de IPS en las patentes US nº 5.415.162, nº 5.239.993 y nº 5.715.810 y referencias citadas en las mismas.

En todavía otra realización específica de la presente invención, la composición farmacéutica que comprende el agente activo se administra mediante inhalación utilizando un inhalador de dosis medidas. Dichos inhaladores de dosis medidas típicamente descargan una cantidad medida del agente activo o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo utilizando gas propelente comprimido. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, las composiciones farmacéuticas administradas utilizando un inhalador de dosis medida típicamente comprenden una solución o suspensión del agente activo en un propelente licuado. Puede utilizarse cualquier propelente licuado adecuado, incluyendo clorofluorocarbonos tales como CCl₃F 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). Debido al temor a los efectos de los clorofluorocarbonos sobre la capa de ozono, resultan generalmente preferentes las formulaciones que contienen HFA. Entre los componentes opcionales adicionales de las formulaciones de HFA se incluyen cosolventes tales como etanol o pentano, y surfactantes tales como trioleato de sorbitán, ácido oleico, lecitina y glicerina. Ver, por ejemplo, la patente US nº 5.225.183, la solicitud de patente EP nº 0717987 A2 y la solicitud de patente WO nº 92/22286.

Una composición farmacéutica representativa para la utilización en un inhalador de dosis medida comprende entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 5% en peso de una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I, o un solvato del mismo, entre aproximadamente 0% y aproximadamente 20% en peso de etanol, y entre aproximadamente 0% y aproximadamente 5% en peso de surfactante, siendo el resto un propelente de HFA.

Dichas composiciones se preparan típicamente mediante la adición de hidrofluoroalcano frío o presurizado a un recipiente adecuado que contiene el agente activo, etanol (en caso de hallarse presente) y el surfactante (en caso de hallarse presente). Para preparar una suspensión, el agente activo se microniza y después se combina con el propelente. A continuación, la formulación se carga en un frasco de aerosol, que forma una parte de un dispositivo inhalador de dosis medida. Se proporcionan ejemplos de dispositivos inhaladores de dosis medidas desarrollados específicamente para la utilización con propelentes de HFA en las patentes US nº 6.006.745 y nº 6.143.277. Alternativamente, puede prepararse una formulación en suspensión mediante secado por pulverización de un recubrimiento de surfactante sobre partículas micronizadas del agente activo. Ver, por ejemplo, las solicitudes de patente WO nº 99/53901 y WO nº 00/61108.

Para ejemplos adicionales de procedimientos para preparar partículas respirables, y formulaciones y dispositivos adecuados para la dosificación mediante inhalación, ver las patentes US nº 6.268.533, 5.983.956, 5.874.063 y 6.221.398, y las solicitudes de patente WO nº 99/55319 y nº 00/30614.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la presente invención resultan adecuadas para la administración oral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración oral pueden encontrarse en forma de cápsulas, tabletas, píldoras, pastillas, sellos, grageas, polvos, gránulos, o en forma de una solución o de una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, o en forma de un elixir o jarabe, y similares, conteniendo cada uno, una cantidad predeterminada de una sal de la presente invención a modo de ingrediente activo.

En el caso de que estén destinada a la administración oral en una forma de dosificación sólida (es decir, como cápsulas, tabletas, píldoras y similares), las composiciones farmacéuticas de la presente invención típicamente comprenderán una sal de la presente invención como el ingrediente activo y uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico. Opcionalmente o alternativamente, dichas formas sólidas de dosificación también pueden comprender: (1) rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico, (2) ligantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia, (3) humectantes, tales como glicerol, (4) agentes desintegrantes, tales como agar agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido alginico, determinados silicatos y/o carbonato sódico, (5) agentes retardantes de solución, tales como parafina, (6) aceleradores de la 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 (1) agentes tamponadores.

También pueden encontrarse presentes en las composiciones farmacéuticas de la presente invención agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes. Entre los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables se incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreto 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, α -tocoferol y similares, y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares. Entre los agentes de recubrimiento para tabletas, cápsulas, píldoras y similares se incluyen aquellos utilizados para los recubrimientos entéricos, tales como ftalato de acetato de celulosa (CAP), ftalato de acetato de polivinilo (PVAP), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de ácido metacrílico-éster de ácido metacrílico, trimelitato de acetato de celulosa (CAT), carboximetilcelulosa (CMC), succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS) y similares.

Si se desea, las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden formularse para proporcionar una liberación lenta o controlada del ingrediente activo utilizando, a título de ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables, u otras matrices poliméricas, tales como ácido poliláctico (PLA) o poliláctido-co-glicólido (PLGA), liposomas y/o microesferas.

Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención opcionalmente pueden contener agentes opacificadores y pueden formularse de manera que liberen únicamente o preferentemente el ingrediente activo en una determinada parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente de manera retardada. Entre los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden utilizarse se incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo también puede encontrarse en forma microencapsulada, en caso apropiado, con uno o más de los ingredientes anteriormente indicados.

Entre las formas líquidas de dosificación adecuadas para la administración oral se incluyen, a título ilustrativo, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Dichas formas líquidas de dosificación típicamente comprenden el ingrediente activo y un diluyente inerte, tal como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizadores y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (especialmente los aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, y mezclas de los mismos. Las suspensiones, además del ingrediente activo, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilén-sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

En caso de que se destinen a la administración oral, las composiciones farmacéuticas de la presente invención preferentemente se empaquetan en una forma de dosificación unitaria. Por ejemplo, dichas formas de dosificación unitaria pueden ser cápsulas, tabletas, píldoras y similares.

Las sales de la presente invención también pueden administrarse transdérmicamente utilizando sistemas y excipientes de administración transdérmica conocidos. Por ejemplo, un compuesto de la presente invención puede mezclarse con intensificadores de la permeación, tales como propilenglicol, monolaurato de polietilenglicol, azacloalcán-2-onas y similares, e incorporarse en un parche o sistema de administración similar. Pueden utilizarse excipientes adicionales, incluyendo agentes gelificantes, emulsionantes y tampones, en dichas composiciones transdérmicas, si se desea.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden contener otros agentes terapéuticos que se coadministran con una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de compuesto de fórmula I ó un solvato de la misma. Por

ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender además uno o más agentes terapéuticos seleccionados de entre agentes antiinflamatorios (por ejemplo agentes antiinflamatorios esteroideos, tales como corticoesteroides y agentes antiinflamatorios no esteroideos (NSA), inhibidores de la fosfodiesterasa IV, agentes antiinfecciosos (por ejemplo antibióticos o antiviricos), antihistamínicos, agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos, antagonistas de receptores muscarínicos (es decir, agentes anticolinérgicos) y similares. Los demás agentes terapéuticos pueden utilizarse en forma de sales o solvatos farmacéuticamente aceptables. Además, en caso apropiado, los otros agentes terapéuticos pueden utilizarse en forma de estereoisómeros ópticamente puros.

Si se desea, las sales de la presente invención también pueden administrarse en combinación con otro agente o agentes terapéuticos, tales como los indicados en la presente memoria. En la presente realización, los componentes no se mezclan físicamente entre sí, sino que se administran simultánea o secuencialmente en forma de composiciones separadas. Por ejemplo, una sal de la presente invención puede administrarse mediante inhalación simultánea o secuencialmente con un agente antiinflamatorio esteroideo, tal como un corticoesteroide, utilizando un dispositivo de administración por inhalación que utilice compartimientos separados (por ejemplo paquetes blíster) para cada agente terapéutico. Alternativamente, la combinación puede administrarse a partir de múltiples dispositivos de administración, es decir, un dispositivo de administración para cada agente terapéutico.

Entre los agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos representativos que pueden utilizarse en combinación con los compuestos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, salmeterol, salbutamol, formoterol, salmefamol, fenoterol, terbutalina, albuterol, isoetarina, metaproterenol, bitolterol, pirbuterol, levalbuterol y similares, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Entre otros agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos que pueden utilizarse en combinación con los compuestos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, 3-(4-[[6-((2R)-2-hidroxi-2-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)fenil]etil)amino)hexil]oxi]butil)bencenosulfonamida y 3-(-3-[[7-((2R)-2-hidroxi-2-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)fenil]etil)amino)heptil]oxi]propil)bencenosulfonamida y compuestos relacionados dados a conocer en la solicitud de patente WO n° 02/066422, publicada el 29 de agosto de 29, 2002; 3-[3-(4-[[6-((2R)-2-hidroxi-2-[4-hidroxi-3-(hidroximetil)fenil]etil)amino)hexil]-oxi]butil)fenil]imidazolidin-2,4-diona y compuestos relacionados dados a conocer en la solicitud de patente WO n° 02/070490, publicada el 12 de septiembre de 2002; 3-(4-[[6-((2R)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxi)etil]amino)hexil]oxi]butil)bencenosulfonamida, 3-(4-[[6-((2S)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxi)etil]amino)hexil]oxi]butil)-bencenosulfonamida, 3-(4-[[6-((2R/S)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxi)etil]amino)hexil]oxi]butil)bencenosulfonamida, *N*-(*terc*-butil)-3-(4-[[6-((2R)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxi)etil]amino)hexil]-oxi]butil)bencenosulfonamida, *N*-(*terc*-butil)-3-(4-[[6-((2S)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxi)etil]amino)hexil]oxi]butil)bencenosulfonamida, *N*-(*terc*-butil)-3-(4-[[6-((2R/S)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxi)etil]amino)hexil]oxi]butil)bencenosulfonamida y compuestos relacionados dados a conocer en la solicitud de patente WO n° 02/076933, publicada el 3 de octubre de 2002; 4-((1R)-2-[(6-{2-[(2,6-dichlorobenzil)oxi]etoxi)hexil]amino]-1-hidroxi)etil]-2-(hidroximetil)fenol y compuestos relacionados dados a conocer en la solicitud de patente WO n° 03/024439, publicada el 27 de marzo de 2003; *N*-{2-[4-((R)-2-hidroxi-2-feniletilamino)fenil]etil}-(R)-2-hidroxi-2-(3-formamido-4-hidroxifenil)etilamina y compuestos relacionados dados a conocer en la patente US n° 6.576.793 B1, publicada el 10 de junio de 2003; *N*-{2-[4-(3-fenil-4-metoxifenil)aminofenil]etil}-(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2(1*H*)-quinolinon-5-il)etilamina y compuestos relacionados dados a conocer en la patente US n° 6.653.323 B2, publicada el 25 de noviembre de 2003, y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En una realización particular, el agonista de β_2 -adrenorreceptor es una sal monohidrocloruro cristalina de *N*-{2-[4-((R)-2-hidroxi-2-feniletilamino)fenil]etil}-(R)-2-hidroxi-2-(3-formamido-4-hidroxifenil)etilamina. Al utilizarlo, el agonista de β_2 -adrenorreceptor se encontrará presente en la composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente efectiva. Típicamente, el agonista de β_2 -adrenorreceptor se encuentra presente en una cantidad suficiente para proporcionar entre aproximadamente 0,05 mg y aproximadamente 500 mg por dosis.

Entre los agentes antiinflamatorios esteroideos representativos que pueden utilizarse en combinación con los compuestos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, metilprednisolona, prednisolona, dexametasona, propionato de fluticasona, S-fluorometil-éster de ácido 6,9-difluoro-17-[(2-furanilcarbonil)oxi]-11-hidroxi-16-metil-3-oxoandrosta-1,4-dien-17-carbotioico, S-(2-oxotetrahidrofuran-3*S*-il)-éster de ácido 6,9-difluoro-11-hidroxi-16-metil-3-oxo-17-propioniloxi-androsta-1,4-dien-17-carbotioico, ésteres de beclometasona (por ejemplo el éster de 17-propionato o el éster de 17,21-dipropionato), budesónido, flunisólido, ésteres de mometasona (por ejemplo el éster de furoato), acetónido de trimacnolona, roflepónido, ciclesónido, propionato de butixocor, RPR-106541, ST-126 y similares, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En una realización particular, el agente antiinflamatorio esteroideo es S-fluorometil-éster de ácido 6 α ,9 α -difluoro-17 α -[(2-furanilcarbonil)oxi]-11 β -hidroxi-16 α -metil-3-oxoandrosta-1,4-dien-17 β -carbotioico o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. Al utilizarlo, el agonista antiinflamatorio esteroideo se encontrará presente en la composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente efectiva. Típicamente, el agente antiinflamatorio esteroideo se encuentra presente en una cantidad suficiente para proporcionar entre aproximadamente 0,05 mg y aproximadamente 500 mg por dosis.

Entre otras combinaciones adecuadas se incluyen, por ejemplo, otros agentes antiinflamatorios, por ejemplo los

NSAID (tales como el cromoglicato sódico, el nedocromil sódico, los inhibidores de la fosfodiesterasa (IFD) (por ejemplo la teofilina, los inhibidores de la IFD4 ó los inhibidores mixtos de IFD3/IFD4), los antagonistas de leucotrieno (por ejemplo montelukast), los inhibidores de la síntesis de leucotrienos, los inhibidores de iNOS, los inhibidores de proteasa, tales como la tripsina, y los inhibidores de elastasa, los antagonistas de la integrina β -2 y los agonistas o antagonistas de receptores de adenosina (por ejemplo los agonistas de adenosina 2a), los antagonistas de citoquinas (por ejemplo antagonistas de quimoquina tales como un anticuerpo contra interleuquina (anticuerpo contra IL), específicamente una terapia de IL-4, una terapia de IL-13 ó una combinación de las mismas), o inhibidores de la síntesis de citoquinas.

Por ejemplo, entre los inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (IFD4) o los inhibidores mixtos de IFD3/IFD4 que pueden utilizarse en combinación con los compuestos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ácido 4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexán-1-carboxílico, 2-carbometoxi-4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxi-fenil)ciclohexán-1-ona, cis-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexán-1-ol], ácido cis-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexán-1-carboxílico o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Entre otros inhibidores de IFD4 ó mixtos de IFD4/IFD3 representativos se incluyen AWD-12-281 (elbion), NCS-613 (INSERM), D-4418 (Chiroscience y Schering-Plough), CI-1018 ó PD-168787 (Pfizer), compuestos benzodioxol dados a conocer en la solicitud de patente WO n° 99/16766 (Kyowa Hakko), K-34 (Kyowa Hakko), V-11294A (Napp), roflumilast (Byk-Gulden), compuestos ftalazinona dados a conocer en la solicitud de patente WO n° 99/47505 (Byk-Gulden), pumafentrina (Byk-Gulden, ahora Altana), arofilina (Almirall-Prodesfarma), VM554/UM565 (Vernalis), T-440 (Tanabe Seiyaku) y T2585 (Tanabe Seiyaku).

Entre los antagonistas muscarínicos representativos (es decir, agentes anticolinérgicos) que pueden utilizarse en combinación, y adicionalmente con, los compuestos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, atropina, sulfato de atropina, óxido de atropina, nitrato de metilatropina, hidrobromuro de homatropina, hidrobromuro de hiosciamina (d, l), hidrobromuro de escopolamina, bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio, bromuro de tiotropio, metantelina, bromuro de propantelina, metilbromuro de anisotropina, bromuro de clidinio, copirrolato (Robinul), yoduro de isopropamida, bromuro de mepenzolato, cloruro de tridihexetilo (Pathilone), metilsulfato de hexociclo, hidrocioruro de ciclopentolato, tropicamida, hidrocioruro de trihexifenidilo, pirenzepina, telenzepina, AF-DX 116 y metoctramina y similares, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o, para aquellos compuestos listados como sal, una sal farmacéuticamente aceptable alternativa de los mismos.

Entre los antihistamínicos representativos (es decir, antagonistas de receptor de H_1) que pueden utilizarse en combinación con los compuestos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, etanolaminas, tales como maleato de carbinoxamina, fumarato de clemastina, hidrocioruro de difenilhidramina y dimenhidrinato; etilendiaminas, tales como amleato de pirilamina, hidrocioruro de tripelenamina y citrato de tripelenamina; alquilaminas, tales como clorfeniramina y acrivastina; piperazinas, tales como hidrocioruro de hidroxizina, pamoato de hidroxizina, hidrocioruro de ciclizina, lactato de ciclizina, hidrocioruro de meclizina e hidrocioruro de cetirizina; piperidinas, tales como astemizol, hidrocioruro de levocabastina, loratadina o su análogo descarboetoxi, terfenadina e hidrocioruro de fexofenadina; hidrocioruro de azelastina, y similares, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos o, para aquellos compuestos listados como una sal, una sal farmacéuticamente aceptable alternativa de los mismos.

Las dosis adecuadas para los demás agentes terapéuticos administrados en combinación con un compuesto de la invención se encuentran comprendidas en el intervalo de entre aproximadamente 0,05 mg/día y aproximadamente 100 mg/día.

Las formulaciones siguientes ilustran composiciones farmacéuticas representativas de la presente invención:

Ejemplo de formulación A

Unos polvos secos para la administración por inhalación se preparan de la manera siguiente:

Ingredientes	Cantidad
Sal de la invención	0,2 mg
Lactosa	25 mg

Procedimiento representativo: El compuesto de la invención se microniza y después se mezcla uniformemente con lactosa. Esta mezcla homogeneizada seguidamente se carga en un cartucho de inhalación con gelatina. El contenido del cartucho se administra utilizando un inhalador de polvos.

Ejemplo de formulación B

Una formulación de polvos secos para la utilización en un dispositivo de inhalación de polvos secos se prepara de la

manera siguiente:

5 Procedimiento representativo: Se prepara una composición farmacéutica que presenta una proporción de la formulación en masa de sal micronizada de la invención a lactosa de 1:200. La composición se empaqueta en un dispositivo de inhalación de polvos secos capaz de administrar entre aproximadamente 10 mg y aproximadamente 100 mg del compuesto de la invención por dosis.

Ejemplo de formulación C

10 Unos polvos secos para la administración por inhalación en un inhalador de dosis medida se preparan de la manera siguiente:

15 Procedimiento representativo: Una suspensión que contiene 5% en peso de una sal de la invención y 0,1% en peso de lecitina se prepara mediante la dispersión de 10 g del compuesto de la invención en forma de partículas micronizadas con un tamaño medio inferior a 10 µm en una solución formada de 0,2 g de lecitina disueltos en 200 ml de agua desmineralizada. La suspensión se seca por pulverización y el material resultante se microniza hasta formar partículas que presentan un diámetro medio inferior a 1,5 µm. Las partículas se cargan en cartuchos con 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado.

20 Ejemplo de formulación D

Una composición farmacéutica para la utilización en un inhalador de dosis medida se prepara de la manera siguiente:

25 Procedimiento representativo: Una suspensión que contiene 5% de una sal de la invención, 0,5% de lecitina y 0,5% de trehalosa se prepara mediante la dispersión de 5 g de ingrediente activo en forma de partículas micronizadas con un tamaño medio inferior a 10 µm en una solución coloidal formada de 0,5 g de trehalosa y 0,5 g de lecitina disueltos en 100 ml de agua desmineralizada. La suspensión se seca por pulverización y el material resultante se microniza hasta formar partículas que presentan un diámetro medio inferior a 1,5 µm. Las partículas se cargan en frascos inhaladores con 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado.

30 Ejemplo de formulación E

Una composición farmacéutica para la utilización en un inhalador nebulizador se prepara de la manera siguiente:

35 Procedimiento representativo: Una formulación acuosa de aerosol para la utilización en un nebulizador se prepara mediante disolución de 0,5 mg de la sal de la invención en 1 ml de una solución de cloruro sódico al 0,9% acidificada con ácido cítrico. La mezcla se agita y se sonica hasta la disolución del ingrediente activo. El pH de la solución se ajusta a un valor de aproximadamente 5 mediante la adición lenta de NaOH.

40 Ejemplo de formulación F

Se preparan cápsulas de gelatina dura para la administración oral de la manera siguiente:

Ingredientes	Cantidad
Sal de la invención	250 mg
Lactosa (secada por pulverización)	200 mg
Estearato de magnesio	10 mg

45 Procedimiento representativo: Los ingredientes se mezclan uniformemente y después se cargan en una cápsula de gelatina dura (460 mg de composición en cada cápsula).

50 Ejemplo de formulación G

Una suspensión para la administración oral se prepara de la manera siguiente:

Ingredientes	Cantidad
Sal de la invención	1,0 g
Ácido fumárico	0,5 g
Cloruro sódico	2,0 g
Metilparabén	0,15 g
Propilparabén	0,05 g
Azúcar granulado	25,5 g

Sorbitol (solución al 70%)	12,85 g
Veegum k (Vanderbilt Co.)	1,0 g
Saborizante	0,035 ml
Colorantes	0,5 mg
Agua destilada	c.s. para 100 ml

Procedimiento representativo: Los ingredientes se mezclan para formar una suspensión que contiene 100 mg de ingrediente activo por cada 10 ml de suspensión.

5 Ejemplo de formulación H

Se prepara una formulación inyectable de la manera siguiente:

Ingredientes	Cantidad
Sal de la invención	0,2 g
Solución tampón de acetato sódico (0,4 M)	2,0 ml
HCl (0,5 N) o NaOH (0,5 N)	c.s. para pH 4
Agua (destilada, estéril)	c.s. para 20 ml

10 Procedimiento representativo: Los ingredientes anteriormente indicados se mezclan uniformemente y el pH se ajusta a $4 \pm 0,5$ utilizando HCl 0,5 N o NaOH 0,5 N.

Utilidad

15 El compuesto de fórmula I presenta actividad tanto de agonista de receptor β_2 -adrenérgico como de antagonista de receptor muscarínico y, por lo tanto, se espera que una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico del compuesto de fórmula I de la presente invención resulte útil como agente terapéutico para el tratamiento de condiciones médicas mediadas por receptores β_2 -adrenérgicos o receptores muscarínicos, es decir, condiciones médicas que mejoran mediante el tratamiento con un agonista de receptor β_2 -adrenérgico o un antagonista de receptor muscarínico. Entre dichas condiciones médicas se incluyen, a título de ejemplo, trastornos o enfermedades pulmonares, incluyendo las asociadas a la obstrucción reversible de las vías respiratorias, tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (por ejemplo la bronquitis crónica y sibilante y el enfisema), el asma, la fibrosis pulmonar, la rinitis alérgica, la rinorrea y similares. Entre otras condiciones que pueden tratarse se incluyen el parto prematuro, la depresión, la insuficiencia cardíaca congestiva, algunas enfermedades de la piel (por ejemplo las enfermedades de la piel inflamatorias, alérgicas, soriáticas y proliferativas; las condiciones en las que resulta deseable bajar la acidez péptica (por ejemplo en la ulceración péptica y gástrica) y la caquexia muscular.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención resulta útil en un método para tratar un trastorno pulmonar, comprendiendo el método la administración en un paciente que necesita tratamiento, de una cantidad terapéuticamente efectiva de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-{{(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma. En el caso de que se utilice para tratar un trastorno pulmonar, la sal de la presente invención típicamente se administra por inhalación en múltiples dosis diarias, en una única dosis diaria o en una única dosis semanal. Generalmente, la dosis para tratar un trastorno pulmonar se encuentra comprendida entre 10 mg/día y 200 mg/día.

Al administrarlos por inhalación, los compuestos de la presente invención típicamente presentan el efecto de producir la broncodilatación. Por consiguiente, la presente invención resulta útil en un método para producir la broncodilatación en un paciente que la requiere, comprendiendo el método la administración en un paciente de una cantidad productora de broncodilatación de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-{{(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma. Generalmente, la dosis para producir la broncodilatación se encuentra comprendida entre 10 mg/día y 200 mg/día.

La presente invención resulta útil además en un método para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el asma, comprendiendo el método la administración en un paciente que necesita tratamiento, de una cantidad terapéuticamente efectiva de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-{{(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma. En el caso de que se utilice para tratar una EPOC o asma, la sal de la presente invención típicamente se administra por inhalación en múltiples dosis diarias, en una única dosis diaria. Generalmente, la dosis para tratar una EPOC o asma se encuentra comprendida entre 10 mg/día y 200 mg/día. Tal como se utiliza en la presente memoria, la EPOC incluye la bronquitis obstructiva crónica y el enfisema (ver, por ejemplo, Barnes, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, N. Engl. J. Med. 343:269-78, 2000).

5 En caso de utilizarse para tratar un trastorno pulmonar, la sal de la presente invención se administra opcionalmente en combinación con otros agentes terapéuticos. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en una realización particular, las composiciones y métodos farmacéuticos de la presente invención comprenden además una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente antiinflamatorio esteroideo. Las propiedades y utilidad de las sales de ácido 1,2-etanodisulfónico de la presente invención pueden demostrarse utilizando diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* bien conocidos por el experto en la materia. Por ejemplo, se describen ensayos representativos en mayor detalle en los Ejemplos siguientes.

10 Ejemplos

Las preparaciones y ejemplos siguientes se proporcionan con el fin de ilustrar realizaciones específicas de la presente invención.

15 Las abreviaturas siguientes presentan los significados siguientes, a menos que se indique lo contrario, y cualesquiera otras abreviaturas utilizadas en la presente memoria y no definidas presentan su significado estándar:

AC	adenililciclase
Ach	acetilcolina
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	albúmina de suero bovino
AMPc	adenosín-monofosfato 3'-5' cíclico
CHO	ovario de hámster chino
cM5	receptor M5 clonado de chimpancé
DCM	diclorometano (es decir, cloruro de metileno)
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
dPBS	solución salina de Dulbecco tamponada con fosfato
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
E _{max}	eficacia máxima
EtOAc	acetato de etilo
EtOH	etanol
FBS	suero de feto bovino
FLIPR	lector de placas de imágenes fluorimétricas
Gly	glicina
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio
HBSS	solución salina tamponada de Hank
HEK	células renales embrionarias humanas
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazínetasulfónico
hM1	receptor M1 humano clonado
hM2	receptor M2 humano clonado
hM3	receptor M3 humano clonado
hM4	receptor M4 humano clonado
hM5	receptor M5 humano clonado
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
IBEX	3-isobutil-1-metilxantina
% de ef.	% de eficacia
PBS	solución salina tamponada con fosfato
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitripirrolidin-fosfonio
rpm	revoluciones por minuto
ATF	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
Tris	tris(hidroximetil)aminometano

20 A menos que se indique lo contrario, los reactivos, las materias primas y los solventes se obtuvieron de proveedores comerciales (tales como Aldrich, Fluka, Sigma y similares) y se utilizaron sin purificación adicional.

En los ejemplos descritos posteriormente, se llevó a cabo el análisis de HPLC utilizando un instrumento Series 1100 de Agilent (Palo Alto, CA) con columnas Zorbax RP-Bonus de 2,1 x 50 mm, proporcionadas por Agilent (una columna C14), con un tamaño de partícula de 3,5 micrómetros. La detección se realizó mediante absorbancia de U.V. a 214 nm. Se obtuvieron los datos de HPLC 10-70 a un caudal de 0,5 ml/minuto de 10% a 70% de B durante 6 minutos. La fase móvil A era 2%-98%-0,1% de ACN-H₂O-AFT, y la fase móvil B era 90%-10%-0,1% ACN-H₂O-AFT. Utilizando las fases móviles A y B indicadas anteriormente, se obtuvieron los datos de HPLC 5-35 y HPLC 10-90 con un gradiente de 5 minutos de duración.

Los datos de cromatografía líquida-espectrometría de masas (CL-EM) se obtuvieron con un instrumento de modelo API-150EX de Applied Biosystems (Foster City, CA). Los datos de CL-EM 10-90 se obtuvieron con 10% a 90% de fase móvil B en un gradiente de 5 minutos de duración.

Se llevó a cabo la purificación a pequeña escala utilizando un sistema API 150EX Prep Workstation de Applied Biosystems. La fase móvil A era: agua + TFA al 0,05% v/v, y B: acetonitrilo + TFA al 0,05% v/v. Para las matrices (típicamente aproximadamente 3 a 50 mg de tamaño de muestra recuperado) se utilizaron las condiciones siguientes: caudal de 20 ml/minuto; gradientes de 15 minutos y una columna Prism RP de 20 mm x 50 mm con partículas de 5 micrómetros (Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA). Para purificaciones a escala mayor (típicamente superior a 100 mg de muestra sin tratar), se utilizaron las condiciones siguientes: caudal de 60 ml/minuto; gradientes de 30 minutos y una columna Microsorb BDS de 41,4 mm x 250 mm con partículas de 10 micrómetros (Varian, Palo Alto, CA).

En el caso de los compuestos quirales la rotación específica (indicada como $[\alpha]^{20}_D$) se midió utilizando un polarímetro Jasco (modelo P-101) con una fuente de luz halógena de tungsteno y un filtro de 589 nm a 20°C. Las muestras de compuestos de ensayo típicamente se midieron con 1 mg/ml de agua.

Preparación 1

4-Amino-5-cloro-2-metoxibenzoato de metilo

A una solución de ácido 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoico (1,008 g, 5,0 mmoles) en una mezcla de tolueno (9 ml) y metanol (1 ml) a 0°C se añadió (trimetilsilil)diazometano (2,0 M en hexano, 3,0 ml, 6,0 mmoles) gota a gota. A continuación, la mezcla de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 16 horas. Se inhibió el exceso de (trimetilsilil)diazometano mediante la adición de ácido acético hasta desaparecer el color amarillo brillante de la mezcla de reacción. A continuación, la mezcla se concentró al vacío, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido blanquecino, que se utilizó sin purificación adicional.

Preparación 2

4-Aciloilamino-5-cloro-2-metoxibenzoato de metilo

Al producto crudo de la Preparación 2 se añadió diclorometano (10 ml, 0,5 M) y trietilamina (2,1 ml, 15 mmoles). Esta mezcla se enfrió a 0°C y se añadió gota a gota cloruro de aciloilo (812 ml, 10 mmoles) bajo agitación. Tras 2 horas, la reacción se detuvo mediante la adición de metanol (aproximadamente 2 ml) a 0°C y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos y después se concentró al vacío. Se añadieron diclorometano (30 ml) y agua (30 ml) al residuo y esta mezcla se mezcló uniformemente. Las capas se separaron y se extrajo la capa acuosa con diclorometano (20 ml). Se agruparon las capas orgánicas, se secaron (Na₂SO₄), se filtraron y se eliminó el solvente al vacío, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido espumoso marrón, que se utilizó sin purificación adicional.

Preparación 3

Piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Se calentaron bifeníl-2-isocianato (97,5 g, 521 mmoles) y 4-hidroxi-1-bencilpiperidina (105 g, 549 mmoles), ambos disponibles comercialmente de Aldrich, Milwaukee, WI, conjuntamente a 70°C durante 12 horas, tiempo durante el cual se realizó un seguimiento mediante CL-EM de la formación del 1-bencilpiperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió a 50°C y se añadió etanol (1 l) y después se añadió lentamente ácido hidrocórico 6 M (191 ml). Seguidamente, la mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadió formato amónico (98,5 g, 1,56 mmoles) y se burbujeó gas nitrógeno por la solución vigorosamente durante 20 minutos. A continuación, se añadió paladio (10% en peso (en seco) sobre carbono activado) (20 g). La mezcla de reacción se calentó a 40°C durante 12 horas y después se filtró a través de un lecho de Celite. A continuación, se eliminó el solvente bajo presión reducida y se añadió ácido hidrocórico 1 M (40 ml) al residuo crudo. Seguidamente se añadió hidróxido sódico (10 N) para ajustar el pH a 12. Se extrajo la capa acuosa

con acetato de etilo (2x150 ml) y se secó (sulfato de magnesio), y después se eliminó el solvente bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del título (155 g, 100%). HPLC (10-70) $R_t=2,52$; EM m/z: $[M + H^+]$ calculado para $C_{18}H_{20}N_2O_2$ 297,15; observado: 297,3.

5 Preparación 4

4-{3-[4-(Bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidín-1-il]propionilamino}-5-cloro-2-metoxibenzoato de metilo

10 Al producto crudo de la Preparación 2 se añadió el producto de la Preparación 3 (1,33 g, 4,5 mmoles) y una mezcla de THF (22,5 ml) y metanol (2,5 ml). Esta mezcla se calentó a 50°C bajo agitación durante 16 horas y después se eliminó el solvente al vacío. El residuo se cromatógrafió (gel de sílice; EtOAc), proporcionando el compuesto del título (0,82 g, $R_t=0,4$, rendimiento de 29% en 3 etapas) en forma de un sólido espumoso blanquecino. EM m/z 566,4 (M+H, esperado: 565,20 para $C_{30}H_{32}ClN_3O_6$).

15 Preparación 5

1-[2-(2-Cloro-4-hidroximetil-5-metoxi-fenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico

20 A una solución del producto de la Preparación 4 (0,82 mg, 1,45 mmoles) en una mezcla de THF (4,5 ml) y metanol (0,5 ml) a 0°C se añadió borohidruro de litio (32 mg, 1,45 mmoles). Se dejó que la mezcla de reacción se calentase hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 41 horas. A continuación, la reacción se detuvo mediante la adición de ácido hidrocórico acuoso 1 N a 0°C hasta que se dejó de observar burbujeo y esta mezcla se agitó durante 10 minutos. Se eliminó el solvente al vacío y el residuo se disolvió en acetonitrilo (aproximadamente 2 ml).
25 Esta solución se purificó mediante RP-HPLC prep. (gradiente: 2 a 50% de acetonitrilo en agua con TFA al 0,05%). Las fracciones apropiadas se recogieron y se agruparon, y se liofilizaron, proporcionando el compuesto del título en forma de una sal trifluoroacetato. Esta sal se trató con acetato de isopropilo (10 ml) e hidróxido sódico acuoso 1 N (10 ml) y se recogió la capa orgánica, se secó (Na_2SO_4), se filtró y se eliminó el solvente al vacío, proporcionando el compuesto del título (161 mg, rendimiento de 21%) en forma de un sólido espumoso blanco. EM m/z 538,4 (M+H, esperado: 537,20 para $C_{19}H_{32}ClN_3O_5$).

30

Preparación 6

1-[2-(2-Cloro-4-formil-5-metoxifenil-carbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico

35 A una solución del producto de la Preparación 5 (161 mg, 0,3 mmoles) en diclorometano (3 ml) se añadió dimetilsulfóxido (213 ml, 3,0 mmoles) y diisopropilamina (261 ml, 1,5 mmoles). Esta mezcla se enfrió a -20°C y se añadió lentamente complejo de trióxido de azufre-piridina (238 mg, 1,5 mmoles). Tras 30 minutos, la mezcla de reacción se desactivó mediante la adición de agua (aproximadamente 3 ml). Se separaron las capas y se secó la capa orgánica (Na_2SO_4), se filtró y se eliminó el solvente al vacío, proporcionando el compuesto del título en forma
40 de un sólido amarillo pálido. EM m/z 536,3 (M+H, esperado: 535,19 para $C_{29}H_{30}ClN_3O_5$).

Preparación 7

8-Benciloxi-5-(2-bromoacetil)-1H-quinolín-2-ona

45

(a) 8-Acetoxi-1H-quinolín-2-ona

50 Se calentaron a 100°C durante 3 horas 8-hidroxiquinolín-N-óxido (160,0 g, 1,0 mol), disponibles comercialmente de Aldrich, Milwaukee, WI, y anhídrido acético (800 ml, 8,4 moles) y después se enfriaron en hielo. El producto se recogió en un embudo Buchner, se lavó con anhídrido acético (2x100 ml) y se secó bajo presión reducida, proporcionando 8-acetoxi-1H-quinolín-2-ona (144 g) en forma de un sólido.

(b) 5-Acetil-8-hidroxi-1H-quinolín-2-ona

55 Una suspensión de cloruro de aluminio (85,7 g, 640 mmoles) en 1,2-dicloroetano (280 ml) se enfrió en hielo y se añadió el producto de la etapa (a) (56,8 g, 280 mmoles). La mezcla se calentó hasta la temperatura ambiente y después se calentó a 85°C. Tras 30 minutos, se añadió cloruro de acetilo (1,5 ml, 21 mmoles) y se calentó la mezcla durante 60 minutos adicionales. A continuación, la mezcla de reacción se enfrió y se añadió a ácido hidrocórico 1 N (3 l) a 0°C bajo agitación vigorosa. Tras agitar durante 2 horas, se recogieron los sólidos en un embudo Buchner, se lavaron con agua (3x250 ml) y se secaron bajo presión reducida. El producto crudo aislado de varios lotes (135 g) se agrupó y se trituró con diclorometano (4 l) durante 6 horas. El sólido resultante se recogió en un embudo Buchner y se secó bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del título (121 g).
60

(c) 5-Acetil-8-benciloxi-1H-quinolín-2-ona

Al producto de la etapa (b) (37,7 g, 186 mmoles) se añadió N,N-dimetilformamida (200 ml) y carbonato potásico (34,5 g, 250 mmoles), seguido de bromuro de bencilo (31,8 g, 186 mmoles). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2,25 horas y después se vertió en cloruro sódico saturado (3,5 l) a 0°C y se agitó durante 1 hora. Se recogió el producto y se secó en un embudo Buchner durante 1 hora, y los sólidos resultantes se disolvieron en diclorometano (2 l) y esta mezcla se secó sobre sulfato sódico. La solución se filtró a través de un lecho de Celite, que seguidamente se lavó con diclorometano (5x200 ml). A continuación, el filtrado agrupado se concentró a sequedad y los sólidos resultantes se trituraron con éter (500 ml) durante 2 horas. Se recogió el producto en un embudo Buchner, se lavó con éter (2x250 ml) y se secó bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del título (44 g) en forma de unos polvos.

(d) 8-Benciloxi-5-(2-bromoacetil)-1H-quinolín-2-ona

El producto de la etapa (c) (20,0 g, 68,2 mmoles) se disolvió en diclorometano (200 ml) y se enfrió a 0°C. Se añadió dietileterato de trifluoruro de boro (10,4 ml, 82,0 mmoles) mediante una jeringa y la mezcla se calentó hasta la temperatura ambiente, proporcionando una suspensión espesa. La suspensión se calentó a 45°C (baño de aceite) y se añadió una solución de bromo (11,5 g, 72,0 mmoles) en diclorometano (100 ml) durante 40 minutos. La mezcla se mantuvo a 45°C durante 15 minutos adicionales y después se enfrió hasta la temperatura ambiente. La mezcla se concentró bajo presión reducida y después se trituró con carbonato sódico acuoso al 10% (200 ml) durante 1 hora. Se recogieron los sólidos en un embudo Buchner, se lavaron con agua (4x100 ml) y se secaron bajo presión reducida. Se agrupó el producto de dos operaciones, para la purificación. El producto crudo (52 g) se trituró con metanol al 50% en cloroformo (500 ml) durante 1 hora. Se recogió el producto en un embudo Buchner y se lavó con metanol al 50% en cloroformo (2x50 ml) y metanol (2x50 ml). Se secó el sólido bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del título (34,1 g) en forma de unos polvos.

Preparación 8

8-Benciloxi-5-[(R)-2-bromo-1-(terc-butildimetilsilanilo)etil]-1H-quinolín-2-ona

(a) 8-Benciloxi-5-[(R)-2-bromo-1-hidroxietil]-1H-quinolín-2-ona

Se agruparon (R)-(+)- α,α -difenílprolinol (30,0 g, 117 mmoles) y trimetilboroxina (11,1 ml, 78 mmoles) en tolueno (300 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. La mezcla se introdujo en un baño de aceite a 150°C y se eliminó el líquido mediante destilación. Se añadió tolueno en alícuotas de 20 ml y se continuó la destilación durante 4 horas. Se añadió un total de 300 ml de tolueno. A continuación, la mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente. Una alícuota de 500 ml se evaporó a sequedad y se pesó (246 mg) para determinar que la concentración del catalizador era de 1,8 M.

Bajo atmósfera de nitrógeno, a 8-benciloxi-5-(2-bromoacetil)-1H-quinolín-2-ona (90,0 g, 243 mmoles) se añadió tetrahidrofurano (900 ml), seguido del catalizador indicado anteriormente (1,8 M en tolueno, 15 ml, 27 mmoles). La suspensión se enfrió a -10+5°C en un baño de hielo/isopropanol. Se añadió borano (1,0 M en THF, 294 ml, 294 mmoles) durante 4 horas. A continuación, la reacción se agitó durante 45 minutos adicionales a -10°C y después se añadió lentamente metanol (250 ml). La mezcla se concentró bajo vacío y el residuo se disolvió en acetonitrilo bajo ebullición (1,3 l), se filtró todavía caliente y después se enfrió hasta la temperatura ambiente. Se filtraron los cristales, se lavaron con acetonitrilo y se secaron bajo vacío, proporcionando el compuesto del título (72,5 g, 196 mmoles, rendimiento de 81%, 95% ee, pureza de 95% según la HPLC).

(b) 8-Benciloxi-5-[(R)-2-bromo-(terc-butildimetilsilanilo)etil]-1H-quinolín-2-ona

Al producto de la etapa (b) (70,2 g, 189 mmoles) se añadió N,N-dimetilformamida (260 ml) y esta mezcla se enfrió en un baño de hielo bajo nitrógeno. Se añadió 2,6-lutidina (40,3 g, 376 mmoles) durante 5 minutos y después se añadió lentamente trifluorometanosulfonato de terc-butildimetilsililo (99,8 g, 378 mmoles), manteniendo simultáneamente una temperatura inferior a 20°C. Se dejó que la mezcla se calentase hasta la temperatura ambiente durante 45 minutos. Se añadió metanol (45 ml) a la mezcla gota a gota durante 10 minutos y se dividió la mezcla entre acetato de etilo/ciclohexano (1:1, 500 ml) y agua/solución hipersalina (1:1, 500 ml). Se lavaron los orgánicos dos veces más con agua/solución hipersalina (1:1, 500 ml cada uno). Los orgánicos agrupados se evaporaron bajo presión reducida, proporcionando un aceite amarillo pálido. Se añadieron dos partes separadas de ciclohexano (400 ml) al aceite y se continuó la destilación hasta formar una suspensión blanca espesa. Se añadió ciclohexano (300 ml) a la suspensión y los cristales blancos resultantes se filtraron, se lavaron con ciclohexano (300 ml) y se secaron bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del título (75,4 g, 151 mmoles, rendimiento de 80%, 98,6% ee).

Preparación 9A

8-Benciloxi-5-[(R)-2-(N-bencilamino)-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-1H-quinolín-2-ona

5 Una solución bajo agitación del producto de la Preparación 8 (1,00 g, 2,05 mmoles) y bencilamina (493 ml, 4,51 mmoles) en DMSO (1,7 ml) se calentó a 105°C durante 4 horas. Se dejó que se enfriase la mezcla de reacción y después se diluyó con EtOAc (10 ml) y se lavó la capa orgánica con solución acuosa saturada de cloruro amónico (5 ml) e hidróxido sódico 1 N (5 ml), se secó (MgSO₄) y se eliminó el solvente bajo presión reducida. El residuo crudo se purificó mediante cromatografía de columna (EtOAc al 50%/hexanosa), proporcionando el compuesto del título (700 mg, 67%). EM m/z: [M + H⁺] calculado para C₃₁H₃₈N₂O₃Si 515,27; observado: 515,5.

10

Preparación 9B

8-Benciloxi-5-[(R)-2-(N-bencilamino)-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-1H-quinolín-2-ona

15 A un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 500 ml se añadió 8-benciloxi-5-[(R)-2-bromo-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-1H-quinolín-2-ona (43 g, 0,124 moles, pureza quiral de aproximadamente 95%), 1-metil-2-pirrolidinona (210 ml) y bencilamina (28,3 g, 0,37 moles). La mezcla resultante se enjuagó con nitrógeno y después se agitó a 90°C durante 6 horas. A continuación, la mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente y se añadieron agua (300 ml) y acetato de etilo (300 ml). Se separaron las capas y se lavó la capa orgánica con agua (200 ml), una
20 mezcla 1:1 de agua y solución acuosa saturada de cloruro sódico (200 ml) y agua (200 ml). A continuación, se secó la capa orgánica sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del título en forma de un aceite naranja.

25 Al aceite naranja se añadió heptano (200 ml) y acetato de etilo (200 ml) y la mezcla resultante se calentó a 65°C, produciendo una solución transparente. Se enfrió esta solución hasta la temperatura ambiente y se dejó en reposo durante la noche (aproximadamente 16 horas), después de lo cual se había formado un precipitado. Se recogió el precipitado mediante filtración, proporcionando el compuesto del título estereoquímicamente impuro (8,85 g, 79,6% ee). El filtrado se concentró bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del título (38,6 g, 99,4% ee). Este material se agrupó con un lote previo de material (19,2 g, 99,5% ee) y se añadieron heptano (250 ml) y acetato de etilo (100 ml). Esta mezcla se calentó a 80°C (solución turbia a transparente) y después se enfrió hasta la
30 temperatura ambiente y se dejó en reposo durante la noche. El precipitado resultante se recogió mediante filtración, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (36,8 g, 98,4% ee, pureza química de 99,9%). Se concentró el filtrado bajo presión reducida y el residuo se disolvió en heptano (100 ml). Se recogieron los sólidos resultantes, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido de color pardo (24 g, pureza quiral de
35 100%, pureza química de 95%).

Preparación 10A

5-[(R)-2-Amino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-8-hidroxi-1H-quinolín-2-ona

40 Una solución bajo agitación del producto de la Preparación 9A (3,16 g, 6,15 mmoles) y paladio (al 10% en peso (seco) sobre carbono activado) (1,58 g) en etanol (62 ml) sometió a una atmósfera de hidrógeno durante 24 horas. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, se lavó con metanol (15 ml) y después se eliminó el solvente bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido (1,52 g, 4,55 mmoles, 74%).

45

Preparación 10B

Sal de ácido acético de 5-[(R)-2-amino-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-8-hidroxi-1H-quinolín-2-ona

50 Se disolvieron 8-benciloxi-5-[(R)-2-(N-bencilamino)-1-(terc-butildimetilsilaniloxi)etil]-1H-quinolín-2-ona (100 g, 194 mmoles) y ácido acético (17,5 ml, 291 mmoles) en metanol (1 l). La solución transparente se purgó con nitrógeno y después se añadió hidróxido de paladio sobre carbono (20 g, Pd al 20% en peso (seco), húmedo (aproximadamente 50% de agua)). Se burbujeó gas hidrógeno por la solución bajo agitación a temperatura ambiente durante 6 horas durante las que se desarrolló una suspensión espesa. A continuación, la mezcla de reacción se purgó con nitrógeno
55 y se añadió metanol (1 l). La mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 30 minutos (para disolver el producto) y después se filtró la mezcla a través de un lecho de Celite. El filtrado se concentró bajo presión reducida hasta un volumen de aproximadamente 500 ml y, a la suspensión resultante, se añadió etanol (500 ml). La mezcla resultante se concentró nuevamente bajo presión reducida hasta un volumen de aproximadamente 500 ml y el precipitado resultante se recogió mediante filtración y se secó, proporcionando el compuesto del título en forma de
60 un sólido amarillo-blanco (65 g, rendimiento de 85%, pureza >98%).

Preparación 11

1-[2-(4-[[R]-2-(terc-Butildimetilsilaniloxi)-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-2-cloro-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Al producto de la Preparación 6 en una mezcla de diclorometano (0,5 ml) y metanol (0,5 ml) se añadió al producto de la Preparación 10A (124,1 mg, 3,1 mmoles) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Se añadió triacetoxiborohidruro sódico (190,7 mg, 0,9 mmoles) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 horas. La reacción se desactivó mediante la adición de agua (aproximadamente 0,2 ml) y la mezcla se concentró al vacío, proporcionando el compuesto del título, que se utilizó sin purificación adicional. EM m/z 854,5 (M+H, esperado: 853,36 para C₄₆H₅₆ClN₅O₇Si).

Preparación 12

1-[2-(2-Cloro-4-[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico

A una suspensión del producto de la Preparación 11 en diclorometano (1,0 ml, 0,3 M) se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (245 ml, 1,5 mmoles). Se agitó dicha mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 45 horas y seguidamente se concentró la mezcla al vacío. Se disolvió el residuo en una mezcla de DMF (0,5 ml), acetonitrilo/agua (1:1, con TFA al 0,1%, 0,6 ml), TFA (0,3 ml) y acetonitrilo (aproximadamente 1 ml) y esta mezcla se purificó mediante RP-HPLC prep. (gradiente: 2 a 50% de acetonitrilo en agua con TFA al 0,05%). Se recogieron las fracciones apropiadas y se agruparon y liofilizaron, proporcionando la sal ditrifluoroacetato del compuesto del título (100 mg, rendimiento de 34%, pureza de 98,7% según la HPLC) en forma de un sólido blanquecino. EM m/z 740,5 (M+H, esperado: 739,28 para C₄₀H₄₂ClN₅O₇).

Ejemplo 1

Sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-Cloro-4-[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Una solución de dihidrato de ácido 1,2-etanodisulfónico (3,8 mg, 0,02 mmoles) en etanol (0,2 ml) se añadió lentamente a una solución del producto de la Preparación 12 (14,3 mg, 0,02 mmoles) en una mezcla 64:1 v/v de isopropanol y diclorometano (1 ml). La solución resultante se calentó a una temperatura de entre 45°C y 50°C durante aproximadamente 30 minutos. A continuación, la mezcla se enfrió lentamente hasta la temperatura ambiente, momento en el que la solución se enturbió ligeramente. Se dejó que la solución reposase a temperatura ambiente bajo un flujo suave de nitrógeno durante la noche. El precipitado resultante se recogió mediante filtración y se secó, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido cristalino blanco (13 mg, rendimiento de 72%).

Ejemplo 2

Sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-Cloro-4-[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Se preparó una solución de 1-[2-(2-cloro-4-[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (26,8 mg, 0,0362 mmoles) en etanol (5,36 ml) y se agitó a temperatura ambiente hasta conseguir la disolución completa (5 minutos). Una solución de dihidrato de ácido 1,2-etanodisulfónico (8,2 mg, 0,0362 mmoles) en etanol (0,2 ml) se añadió lentamente a la primera solución durante aproximadamente un minuto. La suspensión resultante se agitó durante cinco minutos y después se aisló mediante filtración bajo nitrógeno. El precipitado resultante se secó, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (28,5 mg, rendimiento de 85%).

Ejemplo 3

Sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-Cloro-4-[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Se disolvió 1-[2-(2-cloro-4-[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico (5 g, 6,75 mmoles, pureza >99%) en isopropanol (100 ml), seguido de la adición de dihidrato de ácido etanodisulfónico (1,525 mg, 6,75 mmoles) disuelto en agua (20 ml). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y después a ~30°C durante la noche. Se aisló el compuesto del título (6,0 g) en forma de unos polvos blancos. Se calentó el producto en 20% de agua en isopropanol (100 ml) a 30°C durante 48 horas. Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, el precipitado resultante se aisló mediante filtración y se secó al aire durante 2 horas, rindiendo el compuesto del título

(5,4 g).

Preparación 13

5 4-Acridoilamino-5-cloro-2-metoxibenzoato de metilo

10 A un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 1 litro dotado de un agitador de hélice, control de la temperatura y embudo de adición, se añadió 4-amino-5-cloro-2-metoxibenzoato de metilo (44,2 g, 200 mmoles), diclorometano (500 ml) y diisopropiletilamina (104,5 ml, 600 mmoles). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta disolver los ingredientes y después la mezcla se enfrió a 0°C. A continuación, se añadió gota a gota cloruro de acrililo (16,25 ml, 200 mmoles), manteniendo simultáneamente la temperatura interna de la mezcla de reacción por debajo de 10°C. El tiempo total para la adición fue de aproximadamente 30 minutos. A continuación, se calentó lentamente la mezcla de reacción de 0°C hasta la temperatura ambiente durante un periodo de aproximadamente 2 horas. Seguidamente se añadieron solución acuosa saturada de bicarbonato sódico (200 ml) y diclorometano (200 ml) y esta mezcla se agitó durante 5 minutos y después se separaron las capas. La capa de diclorometano se lavó con ácido hidroclicórico 1 M (200 ml) y después se concentró bajo presión reducida hasta aproximadamente un tercio de su volumen original, resultando en una suspensión espesa. Se filtró la suspensión y la torta de filtración se lavó con diclorometano (100 ml) y se secó, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido blanquecino (36 g, rendimiento de 67%, pureza >98% según la HPLC).

20 Preparación 14

4-{3-[4-(Bifenil-2-ilcarbamoilo)piiperidín-1-il]propionilamino}-5-cloro-2-metoxibenzoato de metilo

25 A un matraz de fondo redondo de tres cuellos de 1 litro dotado de un agitador de hélice, control de la temperatura y condensador de reflujo, se añadió piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico (36,3 g, 122 mmoles), diclorometano (500 ml) e isopropanol (100 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta disolver los ingredientes y seguidamente se añadió el producto de la Preparación 10 (30 g, 111,5 mmoles). Se continuó la agitación a temperatura ambiente hasta disolver los ingredientes y seguidamente se calentó la mezcla bajo reflujo (50°C a 55°C) durante 18 horas. A continuación, se enfrió la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se añadió etanol (200 ml). Esta mezcla se concentró bajo presión reducida hasta un volumen de aproximadamente 150 ml, resultando en una suspensión espesa. Se filtró la suspensión y la torta de filtración se lavó con etanol (50 ml) y se secó, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (58 g, rendimiento de 92%, pureza >99,5% según la HPLC).

35 Preparación 15

1-[2-(2-Cloro-4-hidroximetil-5-metoxi-fenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico

40 A un matraz de fondo redondo de 2 litros se añadió el producto de la Preparación 14 (40 g, 70,8 mmoles) y THF (400 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta disolver los ingredientes y seguidamente el matraz de purgó con nitrógeno durante 5 minutos. A continuación, la mezcla se enfrió a 0°C (temperatura interna) y se añadió gota a gota una solución 1 M de hidruro de litio-aluminio en THF (106 ml, 106 mmoles) mediante un embudo adicional, manteniendo simultáneamente la temperatura interna de la mezcla de reacción por debajo de 10°C. El tiempo total de adición fue de aproximadamente 40 minutos. A continuación, la mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0°C y después se añadió hidróxido sódico 1 M (200 ml), manteniendo simultáneamente la temperatura interna de la mezcla de reacción por debajo de 15°C. Seguidamente se separaron las capas y la capa de THF se lavó con solución acuosa saturada de cloruro sódico (100 ml), se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido blanco (38 g, rendimiento de 100%, pureza de 94% según la HPLC).

Preparación 16

1-[2-(2-Cloro-4-formil-5-metoxifenil-carbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico

55 A un matraz de fondo redondo de 1 litro se añadió el producto de la Preparación 15 (28 g, 52 mmoles) y diclorometano (500 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta disolver los ingredientes y seguidamente se añadió óxido de manganeso (IV) activado (45 g, 520 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 12 horas y después se filtró a través de un lecho de Celite. A continuación, la mezcla se concentró bajo presión reducida y el residuo se secó durante la noche bajo vacío, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido amarillo (26 g, rendimiento de 93%, pureza de aproximadamente 93% según la HPLC).

60

Preparación 17

1-[2-(4-[[[R]-2-(terc-Butildimetilsilaniloxi)-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-2-cloro-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico

5 A un matraz de fondo redondo de 500 ml se añadió el producto de la Preparación 16 (6 g, 11,2 mmoles) y diclorometano (50 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta disolver los ingredientes y seguidamente se añadieron el producto de la Preparación 7 (6 g, 15,0 mmoles) y metanol seco (50 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno durante 2 horas (solución amarillo transparente a naranja) y después la
10 mezcla se enfrió hasta una temperatura de entre 0°C y 5°C. Se añadió triacetoxiborohidruro sódico (7,2 g, 34 mmoles) en partes durante un periodo de 10 minutos y después la mezcla de reacción se calentó lentamente de 0°C hasta la temperatura ambiente durante un periodo de aproximadamente 2 horas. A continuación, la mezcla se enfrió a 0°C y se añadieron solución acuosa de hidróxido sódico 1 M (50 ml) y diclorometano (150 ml). La mezcla se agitó
15 intensamente y después se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con solución acuosa saturada de cloruro sódico (50 ml), se filtró, se secó sobre sulfato sódico, se filtró y se concentró bajo presión reducida, proporcionando el compuesto del título en forma de un sólido amarillo (10,1 g, rendimiento de 100%, pureza de 87% según la HPLC).

Ejemplo 4

20 Sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico

25 A un matraz de fondo redondo de 50 ml se añadió el producto de la Preparación 17 (2,0 g, 2,5 mmoles) y diclorometano (10 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta disolver los ingredientes y seguidamente se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (1,2 ml, 7,5 mmoles) y la mezcla resultante se agitó a 25°C durante 20 horas. A continuación, se añadió una solución de dihidrato de ácido 1,2-etanodisulfónico (0,56 g, 2,5 mmoles) en metanol (10 ml) y esta mezcla se agitó a 30°C durante 2 horas, después de lo cual se había formado una suspensión blanca espesa. Se filtró lentamente la suspensión y la torta de filtración se lavó con metanol (10 ml),
30 se secó al aire durante 2 horas y después se secó durante la noche al vacío, proporcionando el compuesto del título en forma de unos polvos blancos finos (1,5 g, pureza >98% según la HPLC).

Ejemplo 5

35 Sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico

40 A sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico, preparada tal como en el Ejemplo 4 (80 g) se añadió una solución de 20% de agua en isopropanol en volumen (800 ml). La suspensión resultante se dejó a temperatura ambiente durante la noche y después se filtró, proporcionando el compuesto del título con cristalinidad y pureza mejoradas (74 g).

Preparación 18

45 Cristales de nucleación de sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico

Etapa (a)

50 La sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico, preparada tal como en el Ejemplo 4 (100 mg) se disolvió en 13% de agua en metanol (20 ml) a ~60°C. La solución transparente resultante se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente en un recipiente cerrado. Tras 48 horas, los cristales de tipo placa
55 resultantes se aislaron mediante filtración.

Etapa (b)

60 La sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[R]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico, preparada tal como en el Ejemplo 4 (1,0 g) se disolvió en 15% de agua en metanol (100 ml) a 60-65°C. La solución transparente bajo agitación se dejó enfriar a 30°C y después se añadió el producto cristalino de la etapa (a) (4,2 mg). La solución se enfrió a 20°C y se agitó durante 2 horas. El precipitado resultante se aisló mediante filtración y se secó al aire

durante 1 hora, proporcionando el compuesto del título (680 mg).

Etapa (c)

- 5 Se repitió el procedimiento de la etapa (b), aunque sustituyendo el producto de la etapa (b) (20 mg) por el producto de la etapa (a), proporcionando el compuesto del título (690 mg).

Etapa (d)

- 10 La sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico, preparada tal como en el Ejemplo 4 (10 g) se disolvió en 15% de agua en metanol (1 l) a 60-65°C. La solución transparente bajo agitación se dejó enfriar a 30°C y después se añadió el producto cristalino de la etapa (c) (4,2 mg). La solución se enfrió a 20°C y se agitó durante 18 horas. El precipitado resultante se aisló mediante filtración y se secó al aire durante 2
15 horas, proporcionando el compuesto del título (5,5 g).

Ejemplo 6

- 20 Recristalización de sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico utilizando cristales de nucleación

- A un matraz de fondo redondo de 12 l se añadió el producto del Ejemplo 5 (60 g, 64,5 mmoles), agua (0,9 l) y metanol (5,1 litros). La mezcla resultante se calentó a una temperatura de entre 25°C y 61-65°C bajo agitación hasta
25 disolver los ingredientes, y se agitó durante 20 minutos adicionales a 60-65°C. La mezcla se dejó enfriar a 30°C y después se añadió el producto de la Preparación 18 (2 g, 2,15 mmoles). Esta mezcla se enfrió lentamente a 20°C y la suspensión resultante se agitó durante 2 horas adicionales a 30°C. El producto se filtró con metanol (500 ml) y se secó al aire durante 2 horas y después al vacío a 25-30°C durante 18 horas, proporcionando el compuesto del título (43 g, rendimiento de 72%, pureza de 99,2%).
30

Ejemplo 7

Análisis térmico

- 35 Se llevó a cabo calorimetría diferencial de barrido (CDB) utilizando un módulo modelo Q-10 de TA Instruments con un controlador de análisis térmico. Se recogieron datos y se analizaron utilizando software Thermal Solutions de TA Instruments. Se pesó con precisión una muestra de aproximadamente 1 mg en un plato de aluminio con tapa. Se evaluó la muestra utilizando un gradiente lineal de calentamiento de 5°C/minuto desde la temperatura ambiente hasta aproximadamente 300°C. Se purgó la celda de CDB con nitrógeno seco durante la utilización. Un registro
40 representativo CDB de una muestra de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico del Ejemplo 6 se muestra en la figura 1 y un registro de CDB representativo de una muestra del Ejemplo 2 se muestra en la figura 2.

- 45 Se llevó a cabo el análisis termogravimétrico (ATG) utilizando un módulo modelo Q-50 de TA Instruments dotado de alta resolución. Se recogieron datos y se analizaron utilizando software Thermal Solutions de TA Instruments. Se colocó una muestra que pesaba aproximadamente 10 mg sobre un plato de platino y se escaneó a alta resolución-tasa de calentamiento de temperatura ambiente a 300°C. La balanza y las cámaras del horno se purgaron con flujo de nitrógeno durante su utilización. En la figura 1 se muestra un registro de ATG representativo de una sal cristalina
50 de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico del Ejemplo 6.

- Los registros de CDB demuestran que una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de la presente invención presenta una
55 estabilidad térmica excelente, con puntos de fusión en aproximadamente 239°C y en aproximadamente 219°C, respectivamente, y sin descomposición térmica por debajo de aproximadamente 200°C.

Ejemplo 8

Difracción de rayos X de polvos

- 60 Se obtuvieron patrones de difracción de rayos X de los polvos con un difractómetro de rayos X modelo X'TRA de Thermo ARL (Thermo ARL SA, Suiza) utilizando radiación K α de Cu a 1,542 Å (45 kV, 40 mA) con un detector de estado sólido de Si(Li). El análisis típicamente se llevó a cabo a una tasa de barrido de 2°/min a intervalos de 0,03°

por punto a lo largo del intervalo de 2 a 30° de ángulo dos-theta. Las muestras, tanto sin tratar como las molidas en polvos finos, se empaquetaron con cuidado en una pieza insertable de volumen pequeño diseñada al efecto para encajar en la taza de muestras de carga superior del instrumento para el análisis. El instrumento se calibró semanalmente respecto a un estándar de metal de silicio, hasta 60,02° de ángulo dos-theta. Se muestran en la figura 3 patrones de PXRD representativos de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4- $\{[(R)-2\text{-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}\}-5\text{-metoxifenilcarbamoil)etil}]\text{piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico del Ejemplo 6 y el patrón de una muestra del Ejemplo 2 se muestra en la figura 4.$

Ejemplo 9

Análisis de infrarrojos

Se determinó el espectro de absorción de infrarrojos (IR) en el intervalo de frecuencias de 4.000 a 675 cm⁻¹ utilizando un espectrómetro de IR Avatar 360 FT dotado de un soporte para muestras de reflexión total atenuada (RTA) Nicolet. Un espectro de absorción de IR representativo para una muestra de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 5-[2-(2-cloro-4- $\{[(R)-2\text{-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}\}-5\text{-metoxifenilcarbamoil)etil}]\text{piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico del Ejemplo 6 presentaban bandas de absorción significativas en 70461, 748+1, 76861, 84161, 90061, 105561, 110461, 116661, 121861, 129461, 140861, 152261, 160961, 165561 y 170161, tal como se ilustra en la figura 5.$

Ejemplo 10

Evaluación de la sorción dinámica de humedad

Se llevó a cabo una evaluación de sorción dinámica de humedad (SDH) (también conocida como perfil de sorción-desorción de la humedad) para una muestra molida manualmente de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4- $\{[(R)-2\text{-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}\}-5\text{-metoxifenilcarbamoil)etil}]\text{piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico de la Preparación 18 utilizando una microbalanza atmosférica de VTI, sistema SGA-100 (VTI Corp., Hialeah, FL 33016). Se utilizó un tamaño de muestra de aproximadamente 10 mg y se fijó la humedad en el valor ambiental al inicio del análisis. Un análisis típico de SDH consiste de tres barridos: humedad relativa ambiente a 2% (HR), HR 2% a HR 90%, HR 90% a HR 5% a una tasa de barrido de HR 5%/paso. Se midió la masa cada dos minutos y se modificó la HR al valor siguiente (HR +/-5%) en caso de observarse que la masa de la muestra era estable a menos de 0,01% durante 5 puntos consecutivos. Se muestra en la figura 6 un registro de SDH representativo.$

El registro de SDH demuestra que una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de la presente invención presenta un perfil de sorción/desorción reversible con una higroscopicidad moderada (<9%). La sal presenta una ganancia de peso inferior a 2,5% en el intervalo de humedades de HR 40% a HR 75%. El perfil de sorción/desorción reversible de humedad demuestra que una sal cristalina de la presente invención presenta una higroscopicidad aceptable y que no es delicuescente.

Ejemplo 11

Análisis elemental y proporción de contraiones

Los porcentajes elementales siguientes de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre de una muestra de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4- $\{[(R)-2\text{-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil}\}-5\text{-metoxifenilcarbamoil)etil}]\text{piperidín-4-il-éster de ácido bifeníl-2-ilcarbámico del Ejemplo 6 se determinaron mediante análisis de combustión utilizando un analizador elemental Flash EA 1112 (CE Elantech, Lakewood, NJ): carbono: 52,95%; hidrógeno: 5,43%; nitrógeno: 6,83%, y azufre: 6,87%. El porcentaje en peso de ácido 1,2-etanodisulfónico en la muestra cristalina, calculado a partir del porcentaje en peso medido de azufre era de 20,4%, que es igual al porcentaje en peso teórico de 20,4%, proporcionando una proporción de contraiones de 1:1.$

Preparación A

Cultivo celular y preparación de membranas a partir de células que expresan receptores β_1 , β_2 o β_3 - adrenérgicos humanos

Se cultivaron líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) que expresaban receptores β_1 , β_2 o β_3 -adrenérgicos humanos clonados, respectivamente, hasta prácticamente la confluencia en medio F-12 de Ham con FBS al 10% en presencia de 500 $\mu\text{g/ml}$ de geneticina. La monocapa celular se levantó con EDTA 2 mM en PBS. Se peletizaron las células mediante centrifugación a 1.000 rpm y los pellets celulares se almacenaron congelados a -80°C o se prepararon membranas inmediatamente para su utilización. Para la preparación de membranas que expresaban

receptores β_1 , β_2 o β_3 , los pellets celulares se resuspendieron en tampón de lisis (HEPES 10 mM/HCl, EDTA 10 mM, pH 7,4 a 4°C) y se homogeneizaron utilizando un homogeneizador de vidrio de tipo Dounce de ajuste estrecho (30 ciclos) sobre hielo. Para las membranas que expresaban receptores β_3 más sensibles a la proteasa, los pellets celulares se homogeneizaron en tampón de lisis (Tris 10 mM/HCl, pH 7,4) suplementado con una tableta de "Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets with 2 mM EDTA" [cóctel inhibidor de proteasa completo con EDTA 2 mM] por cada 50 ml de tampón (catálogo de Roche n° 1697498, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). El homogenizado se centrifugó a 20.000xg y el pellet resultante se lavó una vez con tampón de lisis mediante resuspensión y centrifugación tal como se ha indicado anteriormente. A continuación, el pellet final se resuspendió en tampón de ensayo de unión helado (Tris/HCl 75 mM, pH 7,4, MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 1 mM). Se determinó la concentración de proteínas de la suspensión de membranas mediante los métodos descritos en Lowry *et al.*, Journal of Biological Chemistry 193:265, 1951, y en Bradford, Analytical Biochemistry 72:248-54, 1976. Todas las membranas se almacenaron congeladas en alícuotas a -80°C o se utilizaron inmediatamente.

Preparación B

Cultivo celular y preparación de membranas a partir de células que expresan receptores muscarínicos M₁, M₂, M₃ y M₄ humanos

Se cultivaron líneas celulares CHO que expresaban subtipos hM₁, hM₂, hM₃ y hM₄ de receptor muscarínico humano clonado, respectivamente, hasta prácticamente la confluencia en medio F-12 de Ham suplementado con FBS al 10% y 250 µg/ml de geneticina. Las células se cultivaron en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C y se levantaron con EDTA 2 mM en dPBS. Las células se recogieron mediante centrifugación durante 5 minutos a 650xg y los pellets celulares se almacenaron congelados a -80°C o se prepararon membranas inmediatamente para su utilización. Para la preparación de membranas, se resuspendieron los pellets celulares en tampón de lisis y se homogeneizaron con un triturador de tejidos (Kinematica AG, 20 segundos x 2 pulsos). Las membranas crudas se centrifugaron a 40.000xg durante 15 minutos a 4°C. A continuación, el pellet de membranas se resuspendió con tampón de resuspensión y se homogeneizó nuevamente con el triturador de tejidos Polytron. Se determinó la concentración de proteínas de la suspensión de membranas mediante el método descrito en Lowry *et al.*, Journal of Biochemistry 193:265, 1951. Todas las membranas se almacenaron congeladas en alícuotas a -80°C o se utilizaron inmediatamente. Se obtuvieron directamente de Perkin Elmer alícuotas de las membranas de receptor hM₅ preparadas y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Procedimiento de ensayo A

Ensayo de unión de ligando radioactivo para los receptores β_1 , β_2 y β_3 adrenérgicos humanos

Se llevaron a cabo ensayos de unión en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de ensayo de 100 µl con 10-15 mg de proteína membranal que contenía los receptores β_1 , β_2 y β_3 adrenérgicos humanos en tampón de ensayo (Tris/HCl 75 mM, pH 7,4 a 25°C, MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,2%). Se llevaron a cabo estudios de saturación de la unión para determinar los valores de K_d del ligando radioactivo utilizando [³H]-dihidroalprenolol (NET-720, 100 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) para los receptores β_1 y β_2 y [¹²⁵I]-(-)-yodocianopindolol (NEX-189, 220 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) a 10 ó 11 concentraciones diferentes comprendidas entre 0,01 nM y 20 nM. Se llevaron a cabo ensayos de desplazamiento para determinar los valores de K_i de los compuestos de ensayo con [³H]-dihidroalprenolol a una concentración de 1 nM y [¹²⁵I]-(-)-yodocianopindolol a una concentración de 0,5 nM para 10 ó 11 concentraciones de compuesto de ensayo comprendidas entre 10 pM y 10 µM. Se determinó la unión no específica en presencia de propanolol 10 µM. Se incubaron los ensayos durante 1 hora a 37°C y seguidamente se terminaron las reacciones de unión mediante filtración rápida por GF/B para los receptores β_1 y β_2 o placas de filtro de fibra de vidrio GF/C para los receptores β_3 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) presurgidos en polietilénimina al 0,3%. Las placas de filtración se lavaron tres veces con tampón de filtración (Tris/HCl) 75 mM, pH 7,4, a 4°C, MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 1 mM) para eliminar la radioactividad no unida. A continuación, las placas se secaron y se añadieron 50 µl de líquido de centelleo líquido Microscint-20 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) y se realizó un recuento de las placas en un contador de centelleo líquido Packard Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT). Se analizaron los datos de unión mediante análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando el modelo de 3 parámetros para la competición de un sitio. Se fijó el mínimo de la curva en el valor de unión no específica, según se determinó en presencia de propanolol 10 mM. Se calcularon los valores de K_i para los compuestos de ensayo a partir de los valores de IC₅₀ observados y el valor de K_d del ligando radioactivo utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y. y Prusoff W.H., Biochemical Pharmacology 22, 23:3099-108, 1973).

En dicho ensayo, un valor de K_i inferior indica que un compuesto de ensayo presenta una afinidad de unión más elevada para el receptor sometido a ensayo. Sometido a ensayo en dicho ensayo, se encontró que el compuesto de fórmula I presentaba un valor de K_i inferior a 10 nM para el receptor β_2 adrenérgico humano.

Procedimiento de ensayo B

Ensayo de unión de ligando radioactivo para los receptores muscarínicos

5 Se llevaron a cabo ensayos de unión de ligando radioactivo para los receptores muscarínicos humanos clonados, en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de ensayo de 100 µl. Se diluyeron en tampón de ensayo membranas de células CHO que expresaban el subtipo muscarínico hM₁, hM₂, hM₃, hM₄ o hM₅, hasta las concentraciones de proteína diana específicas siguientes (mg/pocillo): 10 mg para hM₁, 10-15 mg para hM₂, 10-20 mg para hM₃, 10-20 mg para hM₄ y 10-12 mg para hM₅ para obtener señales similares (cpm). Las membranas se homogeneizaron brevemente utilizando un disruptor de tejidos Polytron (10 segundos) previamente a la adición a la placa de ensayo. Se llevaron a cabo estudios de saturación de unión para determinar los valores de K_D del ligando radioactivo, utilizando metilcloruro de L-[N-metil-³H]escopolamina ([³H]-NMS) (TRK666, 84,0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Reino Unido) a concentraciones comprendidas entre 0,001 nM y 20 nM. Se llevaron a cabo ensayos de desplazamiento para determinar los valores de K_i de los compuestos de ensayo con [³H]-NMS a una concentración de 1 nM y once concentraciones diferentes de compuesto de ensayo. Los compuestos de ensayo se disolvieron inicialmente a una concentración de 400 mM en tampón de dilución y después se diluyeron en serie 5x con tampón de dilución hasta concentraciones finales comprendidas entre 10 pM a 100 µM. El orden y volúmenes de adición a las placas de ensayo fueron los siguientes: 25 µl de ligando radioactivo, 25 µl de compuesto de ensayo diluido y 50 µl de membranas. Las placas de ensayo se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Las reacciones de unión se terminaron mediante filtración rápida por placas de filtros de fibra de vidrio GF/B (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) pretratadas en BSA al 1%. Las placas de filtración se enjuagaron tres veces con tampón de lavado (HEPES 10 mM) para eliminar la radioactividad no unida. A continuación, las placas se secaron al aire y se añadieron 50 µl de líquido de centelleo líquido Microscint-20 (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) a cada pocillo. A continuación, se realizó un recuento de las placas en un contador de centelleo líquido PerkinElmer Topcount (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA). Se analizaron los datos de unión mediante análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando el modelo de competición de un sitio. Se calcularon los valores de K_i para los compuestos de ensayo a partir de los valores de IC₅₀ observados y el valor de K_D del ligando radioactivo utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y., Prusoff W.H., Biochemical Pharmacology 22(23):3099-108, 1973). Se convirtieron los valores de K_i a valores de pK_i para determinar la media geométrica y los intervalos de confianza al 95%. A continuación, se convirtieron estas estadísticas de resumen nuevamente en valores de K_i para la presentación de los datos.

35 En dicho ensayo, un valor de K_i inferior indica que un compuesto de ensayo presenta una afinidad de unión más elevada para el receptor sometido a ensayo. Sometido a ensayo en dicho ensayo, se encontró que el compuesto de fórmula I presentaba un valor de K_i inferior a 10 nM para los receptores muscarínicos M₂ y M₃ humanos.

Procedimiento de ensayo C

40 Ensayo de placa de flash de AMPc de células completas en líneas de células CHO que expresan heterológamente receptores β₁, β₂ o β₃ adrenérgicos humanos

45 Se llevaron a cabo ensayos de AMPc en un formato de radioinmunoensayo utilizando el sistema de ensayo de placa de flash de activación de adenilciclasa con [¹²⁵I]-AMPc (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la determinación de la potencia agonista de los receptores β (EC₅₀), se cultivaron líneas celulares CHO-K1 que expresaban establemente receptores β₁, β₂ o β₃-adrenérgicos humanos clonados, hasta prácticamente la confluencia en medio F-12 de Ham con FBS al 10% y 500 µg/ml de geneticina. Las células se enjuagaron con PBS y se desengancharon en dPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, sin CaCl₂ ni MgCl₂) que contenía EDTA 2 mM o solución de tripsina-EDTA (tripsina al 0,05%/EDTA 0,53 mM). Tras el recuento de las células en un contador celular Coulter, las células se pelletizaron mediante centrifugación a 1.000 rpm y se resuspendieron en tampón de estimulación que contenía IBMX (kit de PerkinElmer) precalentado a temperatura ambiente a una concentración de entre 1,6x10⁶ y 2,8x10⁶ células/ml. En este ensayo se utilizaron aproximadamente 60.000 a 80.000 células por cada pocillo. Se diluyeron los compuestos de ensayo (10 mM en DMSO) en PBS que contenía BSA al 0,1% en Beckman Biomek-2000 y se sometieron a ensayo a 11 concentraciones diferentes comprendidas entre 100 µM y 1 pM. Las reacciones se incubaron durante 10 minutos a 37°C y se detuvieron mediante la adición de 100 µl de tampón de detección frío que contenía [¹²⁵I]-AMPc (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). Se calculó la cantidad de AMPc producido (pmoles/pocillo) basándose en los recuentos observados para las muestras y los estándares de AMPc, tal como se indica en el manual de usuario del fabricante. Se analizaron los datos de unión mediante análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) con la ecuación sigmoideal. Se utilizó la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y. y Prusoff W.H., Biochemical Pharmacology 22(23):3099-108, 1973) para calcular los valores de EC₅₀.

En dicho ensayo, un valor de EC_{50} inferior indica que un compuesto de ensayo presenta una actividad funcional más elevada para el receptor sometido a ensayo. Sometido a ensayo en dicho ensayo, se encontró que el compuesto de fórmula I presentaba un valor de EC_{50} inferior a 10 nM para el receptor β_2 adrenérgico humano.

5 Procedimiento de ensayo D

Ensayos funcionales de antagonismo para los subtipos de receptor muscarínico

10 A. Bloqueo de la unión de [35 S]GTP γ S mediada por agonista

Se determinó la potencia funcional de un compuesto de ensayo mediante la medición de la capacidad del compuesto de bloquear la unión de [35 S]GTP γ S estimulada por oxotremorina en células CHO-K1 que expresaban el receptor hM $_2$.

15 En el momento de la utilización, se descongelaron membranas congeladas y después se diluyeron en tampón de ensayo con una concentración diana final de tejido de entre 5 y 10 mg de proteína en cada pocillo. Las membranas se homogeneizaron brevemente utilizando un disruptor de tejidos Polytron PT-2100 y después se añadieron a las placas de ensayo.

20 Se determinó en cada experimento el valor de EC_{90} (concentración efectiva para alcanzar el 90% de la respuesta máxima) para la estimulación de la unión de [35 S]GTP γ S por parte del agonista oxotremorina.

25 Para determinar la capacidad de un compuesto de ensayo de inhibir la unión de [35 S]GTP γ S estimulada por oxotremorina, se añadió lo siguiente a cada pocillo de placas de 96 pocillos: 25 ml de tampón de ensayo con [35 S]GTP γ S (0,4 nM), 25 ml de oxotremorina (EC_{90}) y GDP (3 μ M), 25 ml de compuesto de ensayo diluido y 25 ml de membranas de células CHO que expresan el receptor hM $_2$. A continuación, las placas de ensayo se incubaron a 37°C durante 60 minutos. Las placas de ensayo se filtraron por filtros GF/B pretratados con BSA al 1% utilizando un recolector de 96 pocillos PerkinElmer. Las placas se enjuagaron con tampón de lavado helado durante 3 x 3 segundos y después se secaron al aire o al vacío. Se añadió líquido de centelleo Microscint-20 (50 ml) a cada pocillo y se selló cada placa y se midió la radioactividad en un Topcounter (PerkinElmer). Se analizaron los datos de unión mediante análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando la ecuación de regresión no lineal de competición por un sitio. Se utilizó la ecuación de Cheng-Prusoff para calcular la K_i , utilizando los valores de IC_{50} de la curva de concentración-respuesta para el compuesto de ensayo y la concentración de oxotremorina en el ensayo como la K_D , y [L], la concentración de ligando, respectivamente.

35 En dicho ensayo, un valor de K_i inferior indica que un compuesto de ensayo presenta una actividad funcional más elevada para el receptor sometido a ensayo. Sometido a ensayo en dicho ensayo, se encontró que el compuesto de fórmula I presentaba un valor de K_i inferior a 10 nM para el bloqueo de la unión de [35 S]GTP γ S estimulado por oxotremorina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM $_2$.

40 B. Bloqueo de la liberación de calcio mediada por agonista mediante ensayos FLIPR

45 Los subtipos de receptor muscarínico (receptores M $_1$, M $_3$ y M $_5$), que se acoplan a proteínas Gq, activan la ruta de la fosfolipasa C (PLC) con la unión de agonista al receptor. Como resultado, la PLC activada hidroliza el fosfatidilinositol difosfato (PIP $_2$) a diacilglicerol (DAG) y fosfatidil-1,4,5-trifosfato (IP $_3$), que a su vez genera la liberación de calcio de las reservas intracelulares, es decir, los retículos endoplasmático y sarcoplásmico. El ensayo FLIPR (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) aprovecha dicho incremento del calcio intracelular mediante la utilización de un pigmento sensible al calcio (Fluo-4AM, Molecular Probes, Eugene, OR) que emite fluorescencia al unirse el calcio libre. Este suceso de fluorescencia se mide en tiempo real mediante el FLIPR, que detecta el cambio de fluorescencia de una monocapa de células clonada con receptores M $_1$ y M $_3$ humanos y M $_5$ de chimpancé. La potencia antagonista puede determinarse a partir de la capacidad de los antagonistas de inhibir los incrementos mediados por agonista del calcio intracelular.

55 Para los ensayos de estimulación con calcio de FLIPR, las células CHO que expresan establemente los receptores hM $_1$, hM $_3$ y cM $_5$ se sembraron en placas FLIPR de 96 pocillos la noche antes de llevar a cabo el ensayo. Las células sembradas se lavaron dos veces con Cellwash (MTX LabSystems, Inc.) con tampón de FLIPR (HEPES 10 mM, pH 7,4, cloruro de calcio 2 mM, probenecid 2,5 mM en solución salina tamponada de Hank (HBSS) sin calcio ni magnesio) para eliminar el medio de crecimiento y dejando 50 ml/pocillo de tampón de FLIPR. A continuación, las células se incubaron con 50 ml/pocillo de FLUO-4AM 4 mM (se preparó una solución 2X) durante 40 minutos a 37°C, 5% de dióxido de carbono. Tras el periodo de incubación con pigmento, las células se lavaron dos veces con tampón de FLIPR, dejando un volumen final de 50 ml/pocillo.

Para determinar la potencia antagonista, la estimulación dependiente de dosis de la liberación del Ca^{2+} intracelular por parte de la oxotremorina se determinó en primer lugar de manera que la potencia antagonista puede medirse posteriormente frente a la estimulación con oxotremorina a una concentración de EC_{90} . Las células en primer lugar se incubaron con tampón de dilución de compuesto durante 20 minutos, seguido de la adición de agonista, que fue llevada a cabo mediante el FLIPR. Se generó un valor de EC_{90} para la oxotremorina siguiendo el método detallado en la sección de medición de FLIPR y de reducción de datos, posteriormente, conjuntamente con la fórmula $\text{EC}_F = ((F/100-F)^{1/H}) * \text{EC}_{50}$. Se preparó una concentración de oxotremorina de 3 x ECF en placas de estimulación, de manera que se añadiese una concentración EC_{90} de oxotremorina a cada pocillo en las placas de ensayo de inhibición antagonista.

Los parámetros utilizados para el FLIPR fueron: duración de la 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 la línea base mediante medición de fluorescencia durante 10 segundos previamente a la adición de agonista. Tras la estimulación con agonista, el FLIPR midió continuamente el cambio de fluorescencia cada 0,5 a 1 segundo durante 1,5 minutos para capturar el cambio máximo de fluorescencia.

El cambio de fluorescencia se expresó como fluorescencia máxima menos fluorescencia de línea base para cada pocillo. Los datos crudos se analizaron frente al logaritmo de la concentración de fármaco mediante regresión no lineal con GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando el modelo integrado de respuesta a dosis sigmoidal. Se determinaron los valores de K_i de antagonista con Prims utilizando el valor de EC_{50} de la oxotremorina como la KD y la EC_{90} de la oxotremorina para la concentración de ligando según la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng y Prusoff, 1973).

En dicho ensayo, un valor de K_i inferior indica que un compuesto de ensayo presenta una actividad funcional más elevada para el receptor sometido a ensayo. Sometido a ensayo en dicho ensayo, se encontró que el compuesto de fórmula I presentaba un valor de K_i inferior a 10 nM para el bloqueo de la liberación de calcio mediada por agonista en células CHO que expresan los receptores hM_2 , hM_3 y cM_5 .

30 Procedimiento de ensayo E

Ensayo de placa de flash de AMPc de células completas con una línea celular epitelial pulmonar que expresaba endógenamente receptores β_2 -adrenérgicos humanos

Para la determinación de las potencias y eficacias (actividades intrínsecas) de agonistas en una línea celular que expresaba niveles endógenos del receptor β_2 -adrenérgico, se utilizó una línea celular epitelial pulmonar (BEAS-2B) (ATCC n° CRL-9609, American Type Culture Collection, Manassas, VA) (January B. *et al.*, British Journal of Pharmacology 123(4):701-11, 1998). Las células se cultivaron hasta el 75-90% de la confluencia en medio completo sin suero (medio LHC-9 que contenía epinefrina y ácido reinoico, n° de cat. 181-500, Biosource International, Camarillo, CA). El día antes del ensayo, se cambió el medio a LHC8 (sin epinefrina ni ácido retinoico, n° de cat. 141-500, Biosource International, Camarillo, CA).

Se llevaron a cabo ensayos de AMPc en un formato de radioinmunoensayo utilizando el sistema de ensayo de placa de flash de activación de adenilciclasa con [^{125}I]-AMPc (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

El día del ensayo, las células se enjuagaron con PBS, se levantaron mediante raspado con EDTA 5 mM en PBS, y se contaron. Las células se peletizaron mediante centrifugación a 1.000 rpm y se resuspendieron en tampón de estimulación precalentado a 37°C a una concentración final de 600.000 células/ml. Las células se utilizaron a una concentración final de 100.000 a 120.000 células/pocillo en dicho ensayo. Los compuestos de ensayo se diluyeron en serie en tampón de ensayo (Tris/HCl 75 mM, pH 7,4, a 25°C, MgCl_2 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA al 0,2%) en Beckman Biomek-2000. Los compuestos de ensayo se siguieron en el ensayo a 11 concentraciones diferentes, comprendidas entre 10 μM y 10 pM. Las reacciones se incubaron durante 10 minutos a 37°C y se detuvieron mediante la adición de 100 ml de tampón de detección helado. Se sellaron las placas, se incubaron durante la noche a 4°C y se contaron la mañana siguiente en un contador de centelleo Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT). Se calculó la cantidad de AMPc producido por ml de reacción basándose en los recuentos observados para las muestras y los estándares de AMPc, tal como se indica en el manual de usuario del fabricante. Se analizaron los datos de unión mediante análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) utilizando el modelo de 4 parámetros para la respuesta a dosis sigmoidal.

En dicho ensayo, un valor de EC_{50} inferior indica que un compuesto de ensayo presenta una actividad funcional más elevada para el receptor sometido a ensayo. Sometido a ensayo en dicho ensayo, se encontró que el compuesto de fórmula I presentaba un valor de EC_{50} inferior a 10 nM para el receptor β_2 adrenérgico humano.

Procedimiento de ensayo F

5 Duración de la broncoprotección en modelos de cobaya de broncoconstricción inducida por acetilcolina o por histamina

10 Dichos ensayos *in vivo* se utilizaron para evaluar los efectos broncoprotectores de los compuestos de ensayo que mostraban actividad tanto de antagonista de receptor muscarínico como de agonista de receptor β_2 -adrenérgico. Para aislar la actividad de antagonista muscarínico en el modelo de broncoconstricción inducida por acetilcolina, los animales recibieron la administración de propanolol, un compuesto que bloquea la actividad de receptor β , previamente a la administración de acetilcolina. La duración de la broncoprotección en el modelo de broncoconstricción inducida por histamina refleja la actividad de agonista de receptor β_2 -adrenérgico.

15 Se identificaron individualmente mediante tarjetas grupos de 6 cobayas macho (Duncan-Hartley (HsdPoc:DH) Harlan, Madison, WI), los cuales pesaban entre 250 y 350 g. Durante todo el estudio, se permitió que los animales tuvieran acceso *ad libitum* a alimentos y agua.

20 Los compuestos de ensayo fueron administrados por inhalación durante 10 minutos en una cámara de dosificación de exposición de cuerpo completo (R&S Molds, San Carlos, CA). Las cámaras de dosificación se dispusieron de manera que se administrase simultáneamente un aerosol a las 6 cámaras individuales desde un distribuidor central. Los cobayas se expusieron a un aerosol de un compuesto de ensayo o de vehículo (WFI). Estos aerosoles se generaron a partir de soluciones acuosas utilizando un juego de nebulizador LC Star (modelo 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc., Midlothian, VA) controlado por una mezcla de gases ($\text{CO}_2=5\%$, $\text{O}_2=21\%$ y $\text{N}_2=74\%$) a una presión de 22 psi. El flujo de gas por el nebulizador a esta presión operativa era de aproximadamente 3 litros/minuto. Los aerosoles generados resultaron enviados al interior de las cámaras por presión positiva. No se utilizó aire de dilución durante la administración de las soluciones aerosolizadas. Durante la nebulización de 10 minutos, se nebulizaron aproximadamente 1,8 ml de solución. Este valor se midió gravimétricamente mediante comparación de los pesos antes y después de la nebulización del nebulizador relleno.

30 Se evaluaron los efectos broncoprotectores de los compuestos de ensayo administrados por inhalación, utilizando la pletismografía de cuerpo completo 1,5, 24, 48 y 72 horas después de la dosificación.

35 Cuarenta y cinco minutos antes del inicio de la evaluación pulmonar, se anestesió cada cobaya con una inyección intramuscular de quetamina (43,75 mg/kg), xilazina (3,50 mg/kg) y acepromazina (1,05 mg/kg). Tras afeitar el sitio quirúrgico y limpiarlo con alcohol al 70%, se realizó una incisión en la línea media de 2 a 3 cm del aspecto ventral del cuello. A continuación, se aisló la vena yugular y se canuló con un catéter de polietileno lleno de solución salina (PE-50, Becton Dickinson, Sparks, MD) para permitir las infusiones intravenosas de acetilcolina (Ach) o histamina en la solución salina. A continuación, se diseccionó la tráquea y se canuló con un tubo de teflón 14G (n° NE-014, Small Parts, Miami Lakes, FL). En caso necesario, se mantuvo la anestesia mediante inyecciones intramusculares adicionales de la mezcla anestésica anteriormente indicada. Se realizó un seguimiento de la profundidad de la anestesia y se ajustó en caso de que el animal respondiese al pinchado de una pata o si su tasa de respiración era superior a 100 respiraciones/minuto.

45 Tras completar las canulaciones, el animal se introdujo en un pletismógrafo (n° PLY3114, Buxco Electronics, Inc., Sharon, CT) y se insertó una cánula de presión esofágica (PE-160, Becton Dickinson, Sparks, MD) para medir la presión de impulsión pulmonar (*presión*). Se enganchó el tubo traqueal de teflón a la abertura del pletismógrafo para permitir que el cobaya respirase el aire de la sala en el exterior de la cámara. A continuación, se selló la cámara. Se utilizó una lámpara calefactora para mantener la temperatura corporal y se inflaron los pulmones de los cobayas 3 veces con 4 ml de aire utilizando una jeringa de calibración de 10 ml (serie n° 5520, Hans Rudolph, Kansas City, MO) para garantizar que las vías respiratorias inferiores no se colapsasen y que el animal no sufriese hiperventilación.

50 Tras determinar que los valores de línea base se encontraban dentro del intervalo de 0,3 a 0,9 ml/cm de H_2O para la distensibilidad y dentro del intervalo de 0,1 a 0,199 cm de $\text{H}_2\text{O}/\text{ml}$ por segundo para la resistencia, se inició la evaluación pulmonar. Un programa informático de medición pulmonar de Buxco permitió la recolección y derivación de valores pulmonares.

60 La activación de este programa inició el protocolo experimental y la recolección de datos. Los cambios de volumen con el tiempo que se producen dentro del pletismógrafo con cada respiración se midieron con un transductor de presión de Buxco. Mediante la integración de dicha señal en el tiempo, se estimó una medida de *flujo* para cada respiración. Esta señal, conjuntamente con los cambios de *presión* impulsora pulmonar, que se recogieron utilizando un transductor de presión Sensym (n° TRD4100), se conectó mediante un preamplificador Buxco (MAX 2270) a una interfaz de recolección de datos (n° SFT3400 y n° SFT3813). Todos los demás parámetros pulmonares se derivaron

de dichos dos inputs.

Se recogieron los valores de línea base durante 5 minutos, después de lo cual se retaron los cobayas con Ach o con histamina. Al evaluar los efectos antagonistas muscarínicos, se administró propanolol (5 mg/kg, i.v.) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 15 minutos antes del reto con Ach. Se infundió por vía intravenosa Ach (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (0,1 mg/ml) durante 1 minuto desde una bomba de jeringa (sp210iw, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) a las dosis y tiempos de prescripción siguientes desde el inicio del experimento: 1,9 mg/minuto a los 5 minutos, 3,8 mg/minuto a los 10 minutos, 7,5 mg/minuto a los 15 minutos, 15,0 mg/minuto a los 20 minutos, 30 mg/minuto a los 25 minutos y 60 mg/minuto a los 30 minutos. Alternativamente, se evaluó la broncoprotección de los compuestos de ensayo en el modelo de reto con acetilcolina sin pretratamiento con un compuesto beta-bloqueante.

Al evaluar los efectos de los agonistas de receptor β_2 -adrenérgico de los compuestos de ensayo, se infundió por vía intravenosa histamina (25 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 1 minuto desde una bomba de jeringa a las dosis y tiempos de prescripción siguientes desde el inicio del experimento: 0,5 mg/minuto a los 5 minutos, 0,9 mg/minuto a los 10 minutos, 1,9 mg/minuto a los 15 minutos, 3,8 mg/minuto a los 20 minutos, 7,5 mg/minuto a los 25 minutos y 15 mg/minuto a los 30 minutos. Si la resistencia o la distensibilidad no había vuelto a los valores de línea base en los 3 minutos siguientes a cada dosis de Ach o histamina, se inflaban los pulmones del cobaya 3 veces con 4 ml de aire desde una jeringa de calibración de 10 ml. Entre los parámetros pulmonares registrados se incluyen la frecuencia de respiración (respiraciones/minuto), la distensibilidad (ml/cm de H₂O) y la resistencia pulmonar (cm de H₂O/ml por segundo). Tras completar las mediciones de la función pulmonar en el minuto 35 de dicho protocolo, se retiró el cobaya del pletismógrafo y se sacrificó mediante asfixia con dióxido de carbono.

Se evaluaron los datos de dos maneras:

(a) Resistencia pulmonar (R_L, cm de H₂O/ml por segundo): se calculó a partir de la proporción de "cambio de presión" a "cambio de flujo". Se registró la respuesta de R_L a Ach (60 mg/min, IH) para los grupos de vehículo y de compuesto de ensayo. Se calculó la respuesta media de Ach en los animales tratados con vehículo, en cada tiempo de pretratamiento, y se utilizó para calcular el % de inhibición de la respuesta con Ach, en el tiempo de pretratamiento correspondiente, a cada dosis de compuesto de ensayo. Se ajustaron las curvas de respuesta a dosis de inhibición para 'R_L' con una ecuación logística de cuatro parámetros utilizando GraphPad Prism, versión 3.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego, California) para estimar la ID₅₀ broncoprotectora (dosis requerida para inhibir la respuesta broncoconstrictora a Ach (60 mg/min) en el 50%). La ecuación utilizada fue la siguiente:

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

en la que X es el logaritmo de la dosis, Y es la respuesta (% de inhibición del incremento inducido por Ach de R_L). Y se inicia en Min y se aproxima asintóticamente a Max con una forma sigmoideal.

(b) La cantidad PD₂, definida como la cantidad de Ach o histamina necesaria para provocar el doblado de la resistencia pulmonar de línea base, se calculó utilizando los valores de resistencia pulmonar derivados del flujo y de la presión en un abanico de retos con Ach o histamina, utilizando la ecuación siguiente (derivada de la ecuación utilizada para calcular los valores de PC₂₀ en la clínica (ver Am. Thoracic Soc., 2000):

$$\text{PD}_2 = \text{antilog} \left[\log C_1 + \frac{(\log C_2 - \log C_1)(2R_0 - R_1)}{R_2 - R_1} \right]$$

en la que:

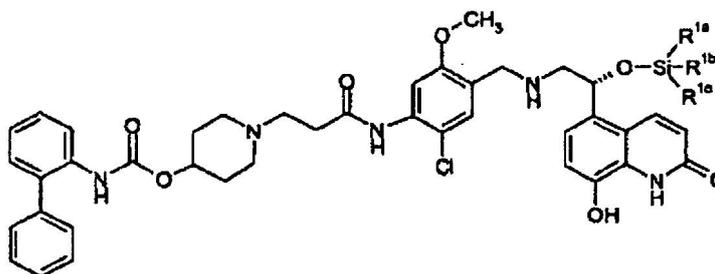
- C₁ = concentración de Ach o histamina antes de C₂
- C₂ = concentración de Ach o histamina que resulta en un incremento de por lo menos 2 veces de la resistencia pulmonar (R_L)
- R₀ = valor de R_L de línea base
- R₁ = valor de R_L después de C₁
- R₂ = valor de R_L después de C₂

Se llevó a cabo un análisis estadístico de los datos utilizando una prueba t de Student de dos colas. Se consideró que un valor de P < 0,05 era significativo.

En el análisis de este ensayo, el compuesto de fórmula I produjo un efecto broncoprotector dependiente de la dosis contra la broncoconstricción inducida por Mch y la broncoconstricción inducida por His. Además, el compuesto de fórmula I presentaba una duración (PD T_{1/2}) de actividad broncoprotectora de por lo menos aproximadamente 24 horas en este ensayo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[*(R)*]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma.
- 10 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto se caracteriza por un registro de calorimetría diferencial de barrido que muestra un flujo máximo de calor endotérmico comprendido en el intervalo de entre 215°C y 229°C.
3. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto se caracteriza por un registro de calorimetría diferencial de barrido que muestra un flujo máximo de calor endotérmico comprendido en el intervalo de entre 230°C y 240°C.
- 15 4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en forma micronizada.
5. Composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 20 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que la composición comprende además un agente antiinflamatorio esteroideo.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que el agente antiinflamatorio esteroideo es S-fluorometil-éster de ácido 6 α ,9 α -difluoro-17 α -[(2-furanilcarbamoil)oxi]-11 β -hidroxi-16 α -metil-3-oxoandrosta-1,4-dien-17 β -carbotoico o una sal o un solvato del mismo.
- 25 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que la composición comprende además un inhibidor de fosfodiesterasa-4.
- 30 9. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en la que la composición se formula para la administración por inhalación.
10. Procedimiento para preparar un compuesto según la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento poner en contacto
- 35 1-[2-(2-cloro-4-[[*(R)*]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico con ácido 1,2-etanodisulfónico o un hidrato del mismo.
11. Sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-Cloro-4-[[*(R)*]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico.
- 40 12. Procedimiento para preparar un compuesto según la reivindicación 1, comprendiendo el procedimiento:
- (a) poner en contacto un compuesto de fórmula II:



- 45 en la que R^{1a}, R^{1b} y R^{1c} se seleccionan independientemente de entre alquilo C₁₋₄, fenilo, alquil-C₁₋₄-fenilo o uno de entre R^{1a}, R^{1b} y R^{1c} es -O-alquilo C₁₋₄ con iones fluoruro, y
- (b) poner en contacto el producto de la etapa (a) on ácido 1,2-etanodisulfónico o un hidrato del mismo, con el fin de formar una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[[*(R)*]-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil]-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico, o un solvato de la misma, en la que las etapas (a) y (b) se llevan a cabo en el mismo recipiente de reacción sin aislamiento del producto de la etapa (a).
- 50

13. Procedimiento para preparar un compuesto según la reivindicación 1, que presenta un punto de fusión superior a

- 230°C, comprendiendo el procedimiento añadir un cristal de nucleación de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma, a una solución que comprende una sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma, disuelto en un diluyente inerte, en el que el cristal de nucleación presenta un punto de fusión superior a 230°C.
14. Procedimiento para preparar un compuesto según la reivindicación 1, que presenta un punto de fusión superior a 230°C, comprendiendo el procedimiento:
- disolver una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico en un diluyente inerte, a una primera temperatura,
 - enfriar el producto de la etapa (a) hasta una segunda temperatura, y
 - añadir un cristal de nucleación de sal de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico,
- en el que el cristal de nucleación presenta un punto de fusión superior a 230°C; la primera temperatura es una temperatura suficiente para disolver la sal de ácido 1,2-etanodisulfónico y la segunda temperatura es inferior a una temperatura a la que el cristal de nucleación se disuelve por completo al añadirlo al producto de la etapa (b).
15. Sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma, para la utilización en terapia o a modo de medicamento.
16. Utilización de una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o de un solvato de la misma, para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno pulmonar.
17. Utilización según la reivindicación 16, en la que el trastorno pulmonar es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el asma.
18. Utilización de:
- una sal cristalina de ácido 1,2-etanodisulfónico de 1-[2-(2-cloro-4-[(R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-oxo-1,2-dihidroquinolín-5-il)etilamino]metil)-5-metoxifenilcarbamoil)etil]piperidín-4-il-éster de ácido bifenil-2-ilcarbámico o un solvato de la misma, y
 - un agente antiinflamatorio esteroideo,
- en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de un trastorno pulmonar.
19. Utilización según la reivindicación 18, en la que el agente antiinflamatorio esteroideo es S-fluorometil-éster de ácido 6 α ,9 α -difluoro-17 α -[(2-furanilcarbonyl)oxi]-11 β -hidroxi-16 α -metil-3-oxoandrosta-1,4-dien-17 β -carbotoico o un solvato del mismo.

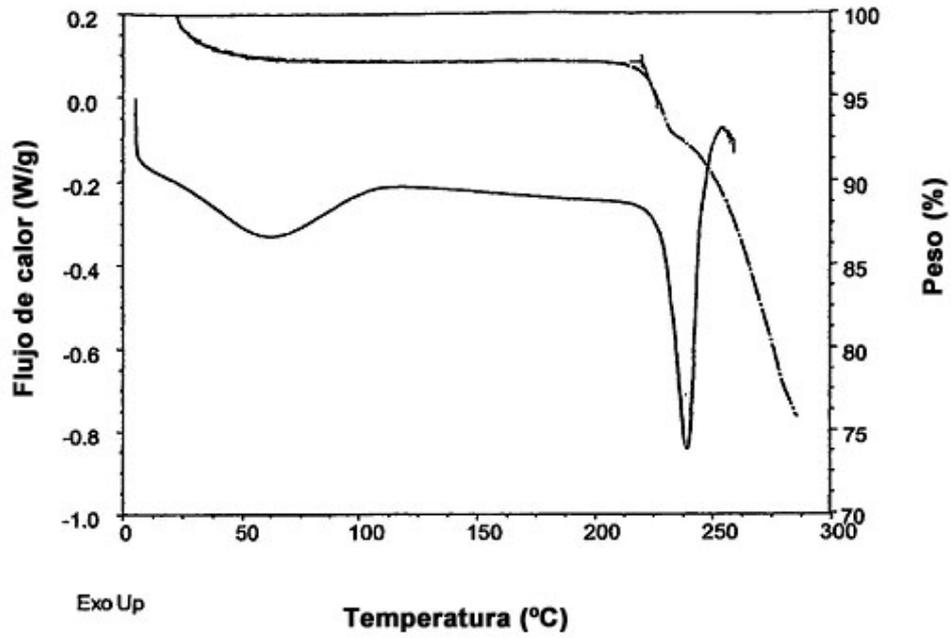


Figura 1

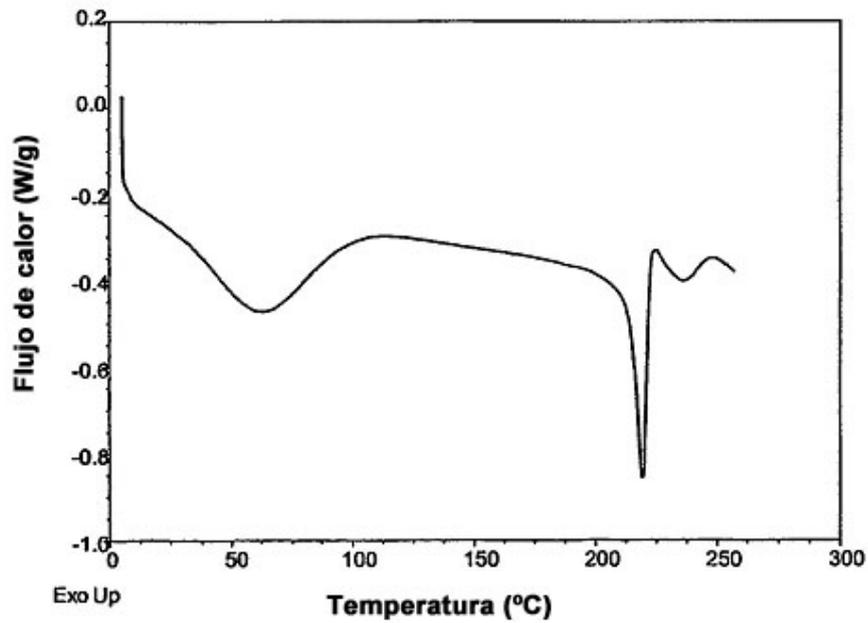


Figura 2

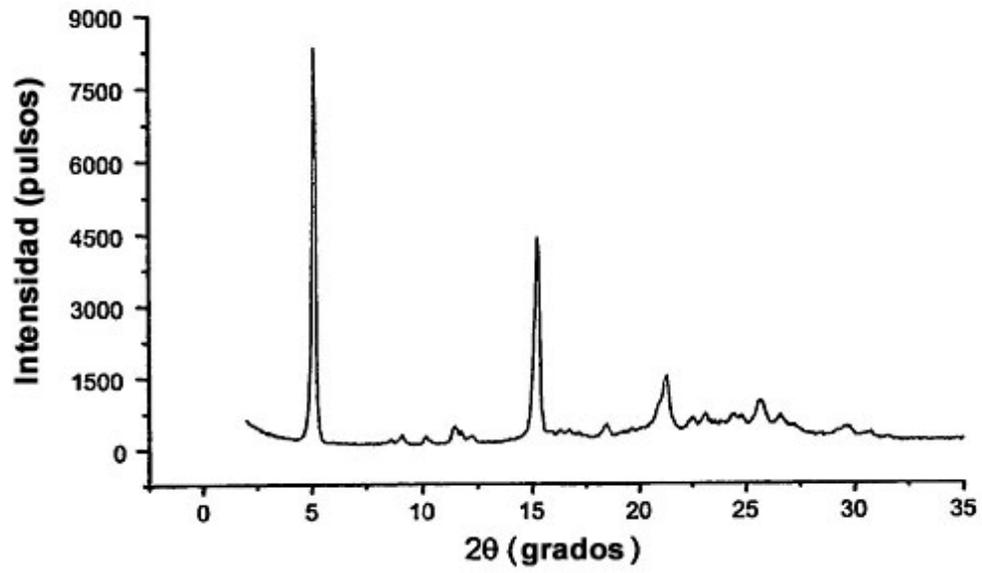


Figura 3

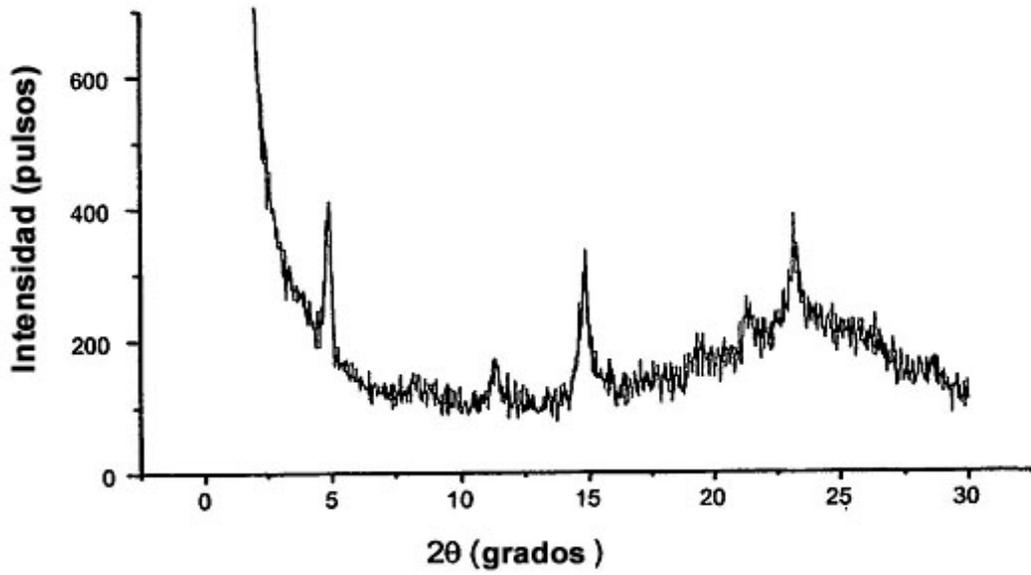


Figura 4

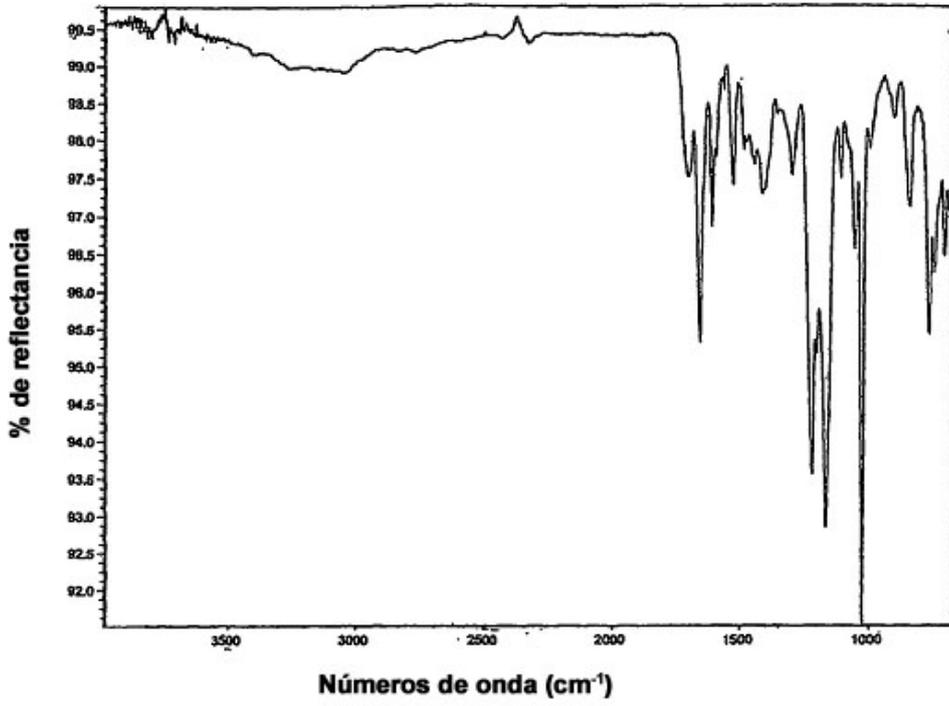


Figura 5

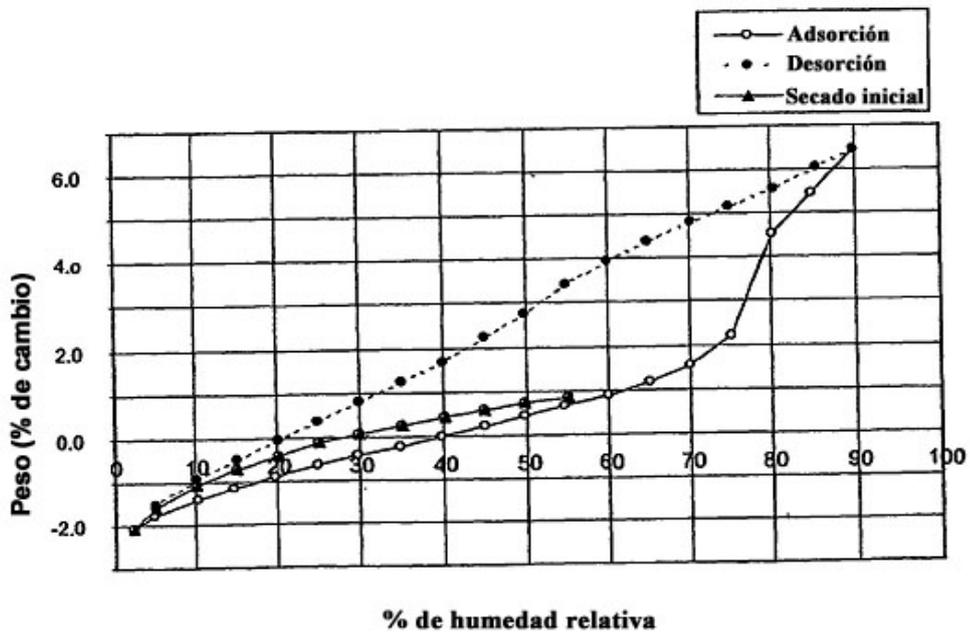


Figura 6