

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 948**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/22 (2006.01)

C07C 235/60 (2006.01)

C07D 231/12 (2006.01)

C07D 233/56 (2006.01)

C07D 249/08 (2006.01)

C07D 295/13 (2006.01)

C07D 233/64 (2006.01)

C07C 235/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2002 E 02713747 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1372615**

54 Título: **Compuestos y composiciones para suministrar agentes activos**

30 Prioridad:

01.03.2001 US 272726 P

24.08.2001 US 314783 P

17.09.2001 US 323139 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.09.2013

73 Titular/es:

EMISPHERE TECHNOLOGIES, INC. (100.0%)

240 CEDAR KNOLLS ROAD

CEDAR KNOLLS, NEW JERSEY 07927, US

72 Inventor/es:

LIAO, JUN;

GSCHNEIDNER, DAVID;

WEIDNER, JOHN J. y

WANG, NAI FANG

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 421 948 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

Compuestos y composiciones para suministrar agentes activos

La presente invención se refiere a compuestos para suministrar agentes activos, tales como agentes biológica o químicamente activos, a una diana. Estos compuestos son muy adecuados para formar mezclas no covalentes con
 5 agentes activos para la administración por vía oral, intracolónica, pulmonar y por otras vías de administración a animales. También se dan a conocer métodos para la preparación y la administración de tales composiciones.

Con frecuencia los medios convencionales para suministrar agentes activos están muy limitados por barreras biológicas, químicas y físicas. Normalmente, estas barreras están impuestas por el entorno a través del cual se produce el suministro, el entorno de la diana para el suministro y/o la propia diana. Los agentes biológica y
 10 químicamente activos son particularmente vulnerables a tales barreras.

En el suministro a animales de agentes farmacológicos y terapéuticos biológicamente activos y químicamente activos, el organismo impone barreras. Ejemplos de barreras físicas son la piel, bicapas lipídicas y membranas de diversos órganos que son relativamente impermeables a determinados agentes activos pero que deben atravesarse antes de alcanzar una diana, tal como el sistema circulatorio. Las barreras químicas incluyen, pero no se limitan a,
 15 variaciones de pH en el tracto gastrointestinal (GI) y enzimas degradantes.

Estas barreras son de particular importancia en el diseño de sistemas de suministro orales. El suministro oral de muchos agentes biológica o químicamente activos sería la vía de elección para la administración a animales si no fuera por las barreras biológicas, químicas y físicas. Entre los numerosos agentes que normalmente no son susceptibles de administración oral están los péptidos biológica o químicamente activos, tales como calcitonina e
 20 insulina; polisacáridos y, en particular, mucopolisacáridos incluyendo, pero sin limitarse a, heparina; heparinoides; antibióticos; y otras sustancias orgánicas. Estos agentes pueden volverse rápidamente ineficaces o destruirse en el tracto gastrointestinal mediante hidrólisis ácida, enzimas y similares. Además, el tamaño y la estructura de los fármacos macromoleculares pueden impedir la absorción.

Métodos iniciales para administrar por vía oral agentes farmacológicos vulnerables se han basado en la coadministración de adyuvantes (por ejemplo, resorcinoles y tensioactivos no iónicos tales como oleil éter de polioxietileno y éter de n-hexadecilpolietileno) para aumentar artificialmente la permeabilidad de las paredes del intestino, así como la coadministración de inhibidores enzimáticos (por ejemplo, inhibidores de la tripsina pancreática, fluorofosfato de diisopropilo (DFF) y Trasylol) para inhibir la degradación enzimática. También se han descrito liposomas como sistemas de suministro de fármacos para la insulina y la heparina. Sin embargo, se excluye
 25 el uso de espectro amplio de tales sistemas de suministro de fármacos debido a que: (1) los sistemas requieren cantidades tóxicas de adyuvantes o inhibidores; (2) no están disponibles cargas de bajo peso molecular adecuadas, es decir agentes activos; (3) los sistemas muestran mala estabilidad y vida útil de almacenamiento inadecuada; (4) los sistemas son difíciles de fabricar; (5) los sistemas no logran proteger el agente activo (carga); (6) los sistemas alteran de manera adversa el agente activo; o (7) los sistemas no logran permitir o fomentar la absorción del agente activo.
 30 35

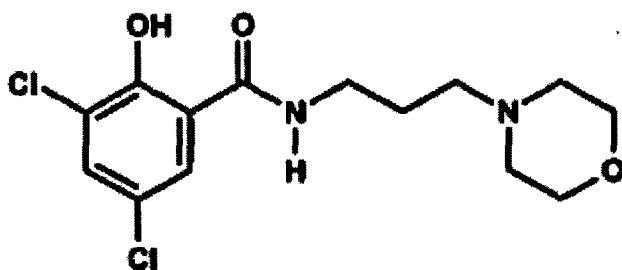
Se han usado microesferas proteínoides para suministrar agentes farmacéuticos. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5.401.516; 5.443.841 y Re. 35.862. Además, se han usado determinados aminoácidos modificados para suministrar agentes farmacéuticos. Véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.º 5.629.020; 5.643.957; 5.766.633; 5.776.888 y 5.866.536.

Más recientemente, se ha conjugado un polímero a un aminoácido modificado o un derivado del mismo mediante un grupo de unión para proporcionar agentes de suministro poliméricos. El polímero modificado puede ser cualquier polímero, pero los polímeros preferidos incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG) y derivados del mismo. Véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO 00/40203.

El documento WO 00/50386 da a conocer compuestos y composiciones para suministrar agentes activos.

45 El problema subyacente a la presente invención es proporcionar sistemas de suministro sencillos, económicos, que se preparen fácilmente y que puedan suministrar una amplia gama de agentes activos mediante diversas vías.

El problema se soluciona mediante un compuesto de la siguiente fórmula:



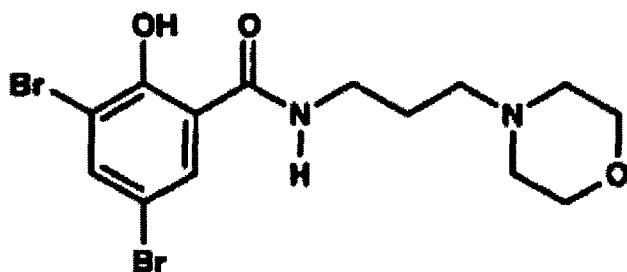
Compuesto 16

y sales del mismo.

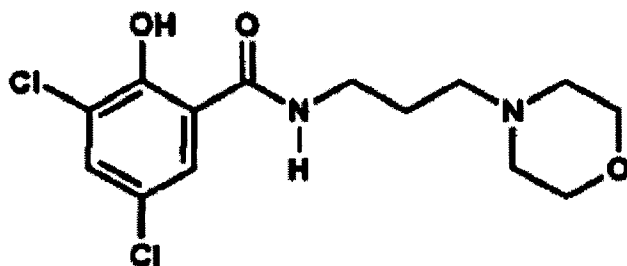
En otra realización la invención se refiere a una composición que comprende:

- (A) un agente biológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en: BIBN-4096BS, hormonas del crecimiento, hormonas del crecimiento humanas, hormonas del crecimiento humanas recombinantes (GHr), hormonas del crecimiento bovinas, hormonas del crecimiento porcinas, hormonas liberadoras de la hormona del crecimiento, factor liberador de la hormona del crecimiento, interferones, interferón α , interferón β , interferón γ , interleucina-1, interleucina-2, insulina, insulina porcina, insulina bovina, insulina humana, insulina recombinante humana, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), IGF-1, heparina, heparina no fraccionada, heparinoides, dermatanos, condroitinas, heparina de bajo peso molecular, heparina de muy bajo peso molecular, heparina de ultrabajo peso molecular, calcitonina, calcitonina de salmón, calcitonina de anguila, calcitonina humana; eritropoyetina (EPO), factor natriurético auricular, antígenos, anticuerpos monoclonales, somatostatina, inhibidores de proteasa, adrenocorticotropina, hormona liberadora de gonadotropina, oxitocina, hormona liberadora de la hormona leutinizante, hormona estimuladora del folículo, glucocerebrosidasa, trombopoyetina, filgrastim, prostaglandinas, ciclosporina, vasopresina, cromolín sódico, cromoglicato sódico, cromoglicato disódico, vancomicina, desferrioxamina (DFO), hormona paratiroidea (PTH), fragmentos de PTH, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, vitaminas; análogos, fragmentos, miméticos y derivados modificados con polietilenglicol (PEG) de estos compuestos; y cualquier combinación de los mismos un agente activo; y

(B) al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en los compuestos 15 y 16:



Compuesto 15



Compuesto 16

y sales de los mismos.

Otras realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes.

Los compuestos y las composiciones de la presente invención facilitan el suministro de agentes activos.

- 25 También pueden usarse mezclas de estos compuestos de agente de suministro para facilitar el suministro de agentes activos.

La invención también proporciona una composición que comprende al menos uno de los compuestos de agente de suministro de las fórmulas anteriores, y al menos un agente activo. Estas composiciones suministran agentes activos a sistemas biológicos seleccionados con una biodisponibilidad aumentada o mejorada del agente activo en

comparación con la administración del agente activo sin el compuesto de agente de suministro.

También se proporcionan formas unitarias de dosificación que comprenden las composiciones. La unidad de dosificación puede estar en forma de un líquido o de un sólido, tal como un comprimido, cápsula o partícula, incluyendo un polvo o sobre.

- 5 Otra realización es un uso médico para administrar un agente activo a un animal que necesita el agente activo, administrando una composición que comprende al menos uno de los compuestos de agente de suministro de la fórmula anterior y el agente activo a un animal. Las vías de administración preferidas incluyen las vías oral, intracolónica y pulmonar.

- 10 Aún otra realización es un uso médico para tratar una enfermedad o para lograr un efecto fisiológico deseado en un animal administrando la composición de la presente invención.

Aún otra realización es un método de preparación de una composición de la presente invención mezclando al menos un compuesto de agente de suministro de la fórmula anterior, y al menos un agente activo.

Descripción detallada de la invención

Compuestos de agente de suministro

- 15 Los términos "alquilo" y "alquenilo" tal como se usan en el presente documento incluyen sustituyentes alquilo y alquenilo lineales y ramificados, respectivamente.

- 20 Los compuestos de agente de suministro pueden estar en forma de base libres o sales de los mismos. Las sales adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales orgánicas e inorgánicas, por ejemplo, sales de clorhidrato, amonio, acetato, citrato, haluro, hidróxido, sulfato, nitrato, fosfato, alcoilo, perclorato, tetrafluoroborato, carboxilato, mesilato, fumarato, malonato, succinato, tartrato, acetato, gluconato y maleato. Las sales también pueden ser solvatos, incluyendo solvatos de etanol, e hidratos. La sal de mesilato puede formarse haciendo reaccionar la base libre del compuesto de agente de suministro con ácido metanosulfónico.

- 25 Pueden prepararse sales de los compuestos de agente de suministro de la presente invención mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse sales de citrato en etanol, tolueno y ácido cítrico. Las sales también pueden ser solvatos, incluyendo solvatos de etanol, e hidratos.

- 30 El compuesto de agente de suministro puede purificarse mediante recristalización o mediante fraccionamiento en uno o más soportes cromatográficos sólidos, solos o acoplados en tándem. Los sistemas de disolvente de recristalización adecuados incluyen, pero no se limitan a, etanol, agua, heptano, acetato de etilo, acetonitrilo, metanol y tetrahidrofurano (THF) y mezclas de los mismos. El fraccionamiento puede realizarse en un soporte cromatográfico adecuado tal como alúmina, usando mezclas de metanol/n-propanol como fase móvil; cromatografía de fase inversa usando mezclas de ácido trifluoroacético/acetonitrilo como fase móvil; y cromatografía de intercambio iónico usando agua o un tampón apropiado como fase móvil. Cuando se realiza cromatografía de intercambio aniónico, se emplea preferiblemente un gradiente de cloruro de sodio 0-500 mM.

Agentes activos

- 35 Los agentes activos adecuados para su uso en la presente invención incluyen agentes biológicamente activos y agentes químicamente activos, incluyendo, pero sin limitarse a, pesticidas, agentes farmacológicos y agentes terapéuticos. Los agentes activos adecuados incluyen aquellos que se vuelven menos eficaces, ineficaces o se destruyen en el tracto gastrointestinal mediante hidrólisis ácida, enzimas y similares. También se incluyen como agentes activos adecuados los agentes macromoleculares cuyas características fisicoquímicas, tales como tamaño, estructura o carga, prohíben o impiden la absorción cuando se administran dosis por vía oral.

- 40 Por ejemplo, los agentes biológica o químicamente activos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, proteínas; polipéptidos; péptidos; hormonas; polisacáridos y particularmente mezclas de mucopolisacáridos; hidratos de carbono; lípidos; moléculas orgánicas polares pequeñas (es decir moléculas orgánicas polares que tienen un peso molecular de 500 dalton o menos); otros compuestos orgánicos; y particularmente compuestos que por sí mismos no pasan (o de los que sólo pasa una fracción de la dosis administrada) a través de la mucosa gastrointestinal y/o son susceptibles de experimentar escisión química mediante ácidos y enzimas en el tracto gastrointestinal; o cualquier combinación de los mismos.

- 50 Los ejemplos adicionales incluyen, pero no se limitan a, los siguientes, incluyendo fuentes sintéticas, naturales o recombinantes de los mismos: hormonas del crecimiento, incluyendo hormonas del crecimiento humanas (GHH), hormonas del crecimiento humanas recombinantes (GHr), hormonas del crecimiento bovinas y hormonas del crecimiento porcinas; hormonas liberadoras de la hormona del crecimiento; factor liberador de la hormona del crecimiento, interferones, incluyendo α , β y γ ; interleucina-1; interleucina-2; insulina, incluyendo porcina, bovina, humana y recombinante humana, opcionalmente que tiene contraiones incluyendo zinc, sodio, calcio y amonio; factor de crecimiento similar a la insulina, incluyendo IGF-1; heparina, incluyendo heparina no fraccionada,

- heparinoides, dermatanos, condroitinas, heparina de bajo peso molecular, heparina de muy bajo peso molecular y heparina de ultrabajo peso molecular; calcitonina, incluyendo de salmón, de anguila, porcina y humana; eritropoyetina; factor natriurético auricular; antígenos; anticuerpos monoclonales; somatostatina; inhibidores de proteasa; adrenocorticotropina, hormona liberadora de gonadotropina; oxitocina; hormona liberadora de la hormona leutinizante; hormona estimuladora del folículo; glucocerebrosidasa; trombopoyetina; filgrastim; prostaglandinas; ciclosporina; vasopresina; cromolín sódico (cromoglicato sódico o disódico); vancomicina; desferrioxamina (DFO); bisfosfonatos, incluyendo alendronato, tiludronato, etidronato, clodronato, pamidronato, olpadronato e incadronato; hormona paratiroidea (PTH), incluyendo sus fragmentos; agentes antimigrañosos tales como BIBN-4096BS y otros antagonistas de proteínas relacionadas con el gen de calcitonina; agentes antimicrobianos, incluyendo antibióticos, agentes antibacterianos y antifúngicos; vitaminas; análogos, fragmentos, miméticos o derivados modificados con polietilenglicol (PEG) de estos compuestos; o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos no limitativos de antibióticos incluyen antibióticos de acción gram-positiva, bactericidas, lipopeptídicos y peptídicos cíclicos, tales como daptomicina y análogos de la misma.

Sistemas de suministro

- 15 La composición de la presente invención comprende uno o más compuestos de agente de suministro de la presente invención y uno o más agentes activos. En una realización, uno o más de los compuestos de agente de suministro, o sales de estos compuestos, o poliaminoácidos o péptidos de los cuales estos compuestos o sales forman una o más de las unidades de los mismos, pueden usarse como agente de suministro mezclándose con el agente activo antes de la administración para formar una composición de administración.
- 20 Las composiciones de administración pueden estar en forma de un líquido. El medio de disolución puede ser agua (por ejemplo, para calcitonina de salmón, hormona paratiroidea y eritropoyetina), propilenglicol acuoso al 25% (por ejemplo, para heparina) y tampón fosfato (por ejemplo, para GHr). Otros vehículos de dosificación incluyen polietilenglicol. Pueden prepararse disoluciones de dosificación mezclando una disolución del compuesto de agente de suministro con una disolución del agente activo, justo antes de la administración. Alternativamente, puede mezclarse una disolución del compuesto de agente de suministro (o agente activo) con la forma sólida del agente activo (o compuesto de agente de suministro). El compuesto de agente de suministro y el agente activo también pueden mezclarse como polvos secos. El compuesto de agente de suministro y el agente activo también pueden mezclarse durante el procedimiento de fabricación.
- 25 Las disoluciones de dosificación pueden contener opcionalmente aditivos tales como sales de tampón fosfato, ácido cítrico, glicoles u otros agentes dispersantes. Pueden incorporarse aditivos estabilizantes en la disolución, preferiblemente a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,1 y el 20% (p/v).

En una realización, la disolución de dosificación que contiene BIBN-4096BS tiene un pH de menos de 8. Según otra realización, las disoluciones de dosificación que contienen BIBN-4096BS tienen un pH de menos de 7.

- 35 Las composiciones de administración pueden estar alternativamente en forma de un sólido, tal como un comprimido, cápsula o partícula, tal como un polvo o sobre. Pueden prepararse formas farmacéuticas sólidas mezclando la forma sólida del compuesto con la forma sólida del agente activo. Alternativamente, puede obtenerse un sólido a partir de una disolución de compuesto y agente activo mediante métodos conocidos en la técnica, tales como secado por congelación (liofilización), precipitación, cristalización y dispersión sólida.
- 40 Las composiciones de administración de la presente invención también pueden incluir uno o más inhibidores enzimáticos. Tales inhibidores enzimáticos incluyen, pero no se limitan a, compuestos tales como actinonina o epiactinonina y derivados de las mismas. Otros inhibidores enzimáticos incluyen, pero no se limitan a, aprotinina (Trasylol) e inhibidor de Bowman-Birk.

- 45 La cantidad de agente activo usada en una composición de administración de la presente invención es una cantidad eficaz para lograr el propósito del agente activo particular para la indicación objetivo. La cantidad de agente activo en las composiciones es normalmente una cantidad farmacológica, biológica, terapéutica o químicamente eficaz. Sin embargo, la cantidad puede ser inferior a esa cantidad cuando se usa la composición en una forma unitaria de dosificación porque la forma unitaria de dosificación puede contener una pluralidad de composiciones de compuesto de agente de suministro/agente activo o puede contener una cantidad farmacológica, biológica, terapéutica o químicamente eficaz dividida. Entonces puede administrarse la cantidad eficaz total en unidades acumulativas que
- 50 contienen, en total, una cantidad eficaz del agente activo.

- La cantidad total de agente activo que va a usarse puede determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Sin embargo, dado que las composiciones de la invención pueden suministrar agentes activos de manera más eficaz que composiciones que contienen el agente activo solo, pueden administrarse al sujeto cantidades de agentes biológica o químicamente activos inferiores a las usadas en formas unitarias de dosificación o sistemas de suministro anteriores, mientras todavía se logran los mismos niveles en sangre y/o efectos terapéuticos.
- 55

Los compuestos de agente de suministro dados a conocer en el presente documento facilitan el suministro de agentes biológica y químicamente activos, particularmente en sistemas orales, intranasales, sublinguales,

intraduodenales, subcutáneos, bucales, intracolónicos, rectales, vaginales, mucosos, pulmonares, transdérmicos, intradérmicos, parenterales, intravenosos, intramusculares y oculares, así como que atraviesan la barrera hematoencefálica.

- 5 Las formas unitarias de dosificación también pueden incluir uno cualquiera o una combinación de excipientes, diluyentes, disgregantes, lubricantes, plastificantes, colorantes, aromatizantes, agentes enmascaradores del sabor, azúcares, edulcorantes, sales y vehículos de dosificación, incluyendo, pero sin limitarse a, agua, 1,2-propanodiol, etanol, aceite de oliva o cualquier combinación de los mismos.

- 10 Los compuestos y las composiciones de la presente invención son útiles para administrar agentes biológica o químicamente activos a cualquier animal, incluyendo, pero sin limitarse a, aves tales como pollos; mamíferos, tales como roedores, vacas, cerdos, perros, gatos, primates y particularmente seres humanos; e insectos.

- 15 El sistema es particularmente ventajoso para suministrar agentes química o biológicamente activos que de lo contrario se destruirían o se volverían menos eficaces por las condiciones encontradas antes de que el agente activo alcance su zona diana (es decir el área en la que debe liberarse el agente activo de la composición de suministro) y dentro del organismo del animal al que se le administran. Particularmente, los compuestos y las composiciones de la presente invención son útiles en la administración oral de agentes activos, especialmente aquellos que normalmente no pueden suministrarse por vía oral, o aquellos para los que se desea un suministro mejorado.

- 20 Las composiciones que comprenden los compuestos y agentes activos tienen utilidad en el suministro de agentes activos a sistemas biológicos seleccionados y en un aumento o mejora de la biodisponibilidad del agente activo en comparación con la administración del agente activo sin el agente de suministro. El suministro puede mejorarse suministrando más agente activo a lo largo de un periodo de tiempo o suministrando agente activo en un periodo de tiempo particular (tal como para realizar un suministro más rápido o retrasado) o suministrando el agente activo en un momento específico o a lo largo de un periodo de tiempo (tal como suministro sostenido).

- 25 Otra realización de la presente invención es un uso médico para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o para lograr un efecto fisiológico deseado, tal como los indicados en la siguiente tabla, en un animal administrando la composición de la presente invención. Pueden encontrarse indicaciones específicas para agentes activos en el Physicians' Desk Reference (54^a ed., 2000, Medical Economics Company, Inc., Montvale, NJ). Los agentes activos en la siguiente tabla incluyen sus análogos, fragmentos, miméticos y derivados modificados con polietilenglicol.

Agente activo	Enfermedad y efecto fisiológico
Hormonas del crecimiento	Trastornos del crecimiento
Interferones, incluyendo α , β y γ	Infección viral, incluyendo cáncer crónico y esclerosis múltiple
Interleucina-1; interleucina-2	Infección viral; cáncer
Insulina; factor de crecimiento similar a la insulina IGF-1	Diabetes
Heparina	Trombosis; prevención de coagulación de la sangre
Calcitonina	Osteoporosis; enfermedades de los huesos
Eritropoyetina	Anemia
Factor natriurético auricular	Vasodilatación
Antígenos	Infección
Anticuerpos monoclonales	Para prevenir rechazo de injerto; cáncer
Somatostatina	Úlcera sangrante; gastritis erosiva
Inhibidores de proteasa	SIDA
Adrenocorticotropina	Colesterol alto (para reducir el colesterol)
Hormona liberadora de gonadotropina	Disfunción ovulatoria (para estimular la ovulación)
Oxitocina	Disfunción en el parto (para estimular las contracciones)
Hormona liberadora de la hormona leutinizante; hormona estimuladora del folículo	Regular la función reproductiva
Glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher (para metabolizar lipoproteínas)
Trombopoyetina	Trombocitopenia
Filgrastim	Reducir la infección en pacientes con quimioterapia
Prostaglandinas	Hipertensión
Ciclosporina	Rechazo de trasplante
Vasopresina	Enuresis; antidiurético
Cromolín sódico; vancomicina	Asma; alergias
Desferrioxamina (DFO)	Sobrecarga de hierro
Hormona paratiroidea (PTH), incluyendo sus fragmentos	Osteoporosis; enfermedades de los huesos
Agentes antimicrobianos	Infección incluyendo infección por bacterias gram-positivas
Vitaminas	Deficiencias de vitaminas

Bisfosfonatos	Osteoporosis; enfermedad de Paget; inhibe los osteoclastos
BIBN4096BS - ((R-(R*,S*)))-N-[2-[[5-amino-1-[[4-(4-piridinil)-1-piperazinil]carbonil]pentil]amino]-1-[(3,5-dibromo-4-hidroxifenil)metil]-2-oxoetil]-4(1,4-dihidro-2-oxo-3(2H0-quinazolinil)-1-piperidincarboxamida)	Antimigrañoso; antagonista de péptido relacionado con el gen de calcitonina

Por ejemplo, una realización de la presente invención es un uso médico para tratar a un paciente que padece o es susceptible a la diabetes administrando insulina y al menos uno de los compuestos de agente de suministro de la presente invención.

- 5 Tras la administración, el agente activo presente en la composición o forma unitaria de dosificación se capta en la circulación. La biodisponibilidad del agente se evalúa fácilmente midiendo una actividad farmacológica conocida en la sangre, por ejemplo un aumento en el tiempo de coagulación de la sangre provocado por heparina, o una disminución en los niveles de calcio circulante provocada por calcitonina. Alternativamente, pueden medirse directamente los niveles circulantes del propio agente activo.

Descripción de las realizaciones preferidas

- 10 Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitación. Todas las partes se facilitan en peso a menos que se indique lo contrario.

Se realizaron análisis por resonancia magnética nuclear del protón (¹H-RMN) para los compuestos indicados a continuación en un espectrómetro Bruker de 300 MHz usando dimetilsulfóxido (DMSO-d₆) como disolvente a menos que se indique lo contrario.

- 15 Se realizaron análisis de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas (CL-EM) con un instrumento LC/MSD 1100 (cuadrupolo individual) de Agilent Technologies que tenía los siguientes parámetros:

Fase móvil A: acetonitrilo:agua:ácido acético 50:950:5 (v/v/v)

Fase móvil B: acetonitrilo:agua:ácido acético 950:50:5 (v/v/v)

Elución en gradiente: gradiente lineal de 4 minutos del 0-100% de B; el tiempo total por inyección es de 11 minutos

- 20 Volumen de inyección: 5 µl

Columna: cartucho de resolución rápida ZORBAX, SB-C18, 2,1 x 30 mm, 3,5 µm

Tamaño de partícula, n.º de catálogo 873700-902

Temp. de columna: 40°C

Detección UV a 244 nm

- 25 Parámetros de DEM:

Fuente: API-ES, polaridad positiva Parámetros de barrido:

Intervalo de masas: 125,00-600,00

Fragmentador: 60 V

Ganancia: 1,0 EMV

- 30 Umbral: 150

Cámara de pulverización:

Temp. de gas: 350 grados D

Gas de secado: 12,0 l/min.

Presión de neb.: 40 psig

- 35 VCap: 4000 V positivo/negativo

Ejemplo 1: Preparación de compuestos

1a: Preparación del compuesto 2 (referencia)

Se trató una disolución del 40% de dimetilamina/agua (30 ml, 26,9 g, 239 mmol) y etanol (50 ml) con una disolución de 8-bromo-1-octanol (15,13 g, 72,3 mmol) y etanol (20 ml), añadida gota a gota a lo largo de 10 minutos. Se agitó la mezcla de reacción durante 75 horas, se diluyó con acetato de etilo (80 ml) y se lavó con disolución saturada de bicarbonato de sodio. Se extrajo la fase acuosa con acetato de etilo. Se lavaron las fases orgánicas combinadas con disolución saturada de bicarbonato de sodio (50 ml) y salmuera (2 x 40 ml), se secaron sobre sulfato de sodio y se concentraron. Se usaron tal cual los 11,4 g de 8-dimetilamino-1-octanol, aislado como un aceite de color amarillo.

Se trató una suspensión espesa de carsalame (10,80 g, 66,2 mmol), 8-dimetilamino-1-octanol (11,4 g, 65,8 mmol), trifenilfosfina (17,53 g, 66,8 mmol) y tetrahidrofurano (40 ml) con una disolución de azodicarboxilato de diisopropilo (13,0 ml, 13,35 g, 66,0 mmol) y tetrahidrofurano (20 ml), añadida gota a gota a lo largo de 25 minutos provocando que aumentara la temperatura hasta 50°C. Se dejó enfriar la mezcla de reacción de nuevo hasta 25°C y se agitó durante 40 horas. Se trató la disolución con NaOH 2 N acuoso (70 ml, 140 mmol) y se calentó hasta 60°C durante 180 minutos. Se lavó la mezcla de reacción enfriada con acetato de etilo (2 x 50 ml). Se acidificó la fase acuosa con HCl al 4% acuoso hasta un pH ligeramente inferior a 0 y se lavó con acetato de etilo (2 x 40 ml). Se aumentó el pH de la fase acuosa hasta 9,5 tras el tratamiento con bicarbonato de sodio sólido. Se extrajo la fase acuosa con cloruro de metileno (10 x 40 ml). Se secaron los extractos de cloruro de metileno combinados sobre sulfato de sodio y se concentraron para dar 0,6 g de producto. Se encontró el resto del producto en los extractos de acetato de etilo anteriores. Se extrajeron estas fases de acetato de etilo con NaOH 1 N acuoso (4 x 30 ml). Se combinaron estas 4 fases acuosas, se acidificaron hasta pH 0,7 con HCl al 4% acuoso y se lavaron con acetato de etilo (2 x 30 ml). Se ajustó el pH de la disolución acuosa a 5 con NaOH 2 N acuoso. Se trató la disolución con bicarbonato de sodio sólido hasta que no se produjo más burbujeo y se extrajo con acetato de etilo (6 x 50 ml). Se secaron las fases de acetato de etilo combinadas sobre sulfato de sodio y se concentraron para dar un sólido. Se llevó el sólido a un tetrahidrofurano y se trató con gas de HCl. Se añadió agua provocando que un sólido precipitara de la disolución. Se aisló un total de 4,73 g de clorhidrato de N-(8-dimetilamino-octil)salicilamida mediante filtración.

p.f. 78-80°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆), δ (ppm): 10,5 (sa, 1H), 8,9 (t, 1H), 7,9 (dd, 1H), 7,4 (td, 1H), 6,9 (m, 2H), 3,3 (q, 2H), 3,0 (m, 2H), 2,7 (s, 6H), 1,6 (t, 4H), 1,3 (m, 8H). Valor de KF = 5,19% de agua. Análisis elemental: %C: 58,86 (calculado), 58,87 (hallado); %H: 9,01 (calculado), 8,98 (hallado); %N: 8,08 (calculado), 7,98 (hallado).

1b: Preparación del compuesto 4 (referencia)

Se cargó un matraz de fondo redondo de una boca, de 250 ml, con diclorhidrato de 4-(dimetilamino)bencilamina (8,0 g, 0,0358 mol) y 50 ml de cloruro de metileno. Se enfrió la disolución con agitación en un baño de hielo. Se añadieron trietilamina (20,0 ml, 0,1432 mol) y una cantidad catalítica de 4-(dimetilamino)piridina (DMAP) a la mezcla de reacción. Se añadió una disolución de cloruro de acetilsalicilato (7,12 g, 0,1432 mol) en cloruro de metileno (30 ml) al matraz de reacción enfriado. Tras completarse la adición, se calentó la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se dejó agitar durante la noche.

Se diluyó la mezcla de reacción con HCl 2 N y se separaron las fases. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a vacío. Se agitó el aceite resultante en NaOH 2 N durante 4 horas y se lavó con acetato de etilo. Se concentró la fase acuosa a vacío para eliminar cualquier acetato de etilo residual. Se ajustó el pH de la fase acuosa a 7 y se recogieron los sólidos resultantes mediante filtración a vacío. El peso de los sólidos en bruto fue de 1,76 g. Se repitió la reacción para dar 0,88 g adicionales de producto bruto. Se recrystalizaron los sólidos combinados en etanol/agua para dar 2,64 g de N-(4-dimetilaminobencil)salicilamida como un sólido de color blanco.

p.f. 129-132°C; ¹H-RMN (d₆-DMSO), δ (ppm): 9,3 (s, 1H), 7,87 (dd, 1H), 7,39 (dt, 1H), 7,16 (d, 2H), 6,87 (t, 2H), 6,69 (d, 2H), 4,38 (d, 2H), 2,86 (s, 6H). Análisis elemental: %C: 71,09 (calc.), 70,84 (hallado); %H: 6,71 (calc.), 6,50 (hallado); %N: 10,36 (calc.), 10,14 (hallado).

1c: Preparación del compuesto 5 (referencia)

Se agitó una suspensión de morfolina (3,30 ml, 3,30 g, 37,8 mmol), 6-bromo-1-hexanol (6,72 g, 72,3 mmol), etanol (20 ml) y carbonato de potasio (6,23 g, 45,1 mmol) durante 36 horas a 25°C, tras una ligera exoterma al principio. Se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (30 ml), se filtró y se concentró. Se llevó el residuo a acetato de etilo, se filtró y se concentró. Se aislaron los 7,0 g de 4-(6-hidroxihexil)morfolina como un aceite de color amarillo y se usaron tal cual.

Se trató una suspensión espesa de carsalame (6,13 g, 37,6 mmol), 4-(6-hidroxihexil)morfolina (7,0 g, 37,4 mmol), trifenilfosfina (9,97 g, 35,0 mmol) y tetrahidrofurano (40 ml) con una disolución de azodicarboxilato de diisopropilo (7,40 ml, 7,60 g, 37,6 mmol) y tetrahidrofurano (10 ml), añadida gota a gota a lo largo de 15 minutos. Se agitó la mezcla de reacción a 25°C durante 60 horas. Se trató la disolución con NaOH 2 N acuoso (50 ml, 100 mmol) y se calentó hasta 60°C durante 180 minutos. Se concentró la mezcla de reacción enfriada para eliminar el tetrahidrofurano. Se lavó el residuo acuoso con acetato de etilo (2 x 40 ml) y se acidificó con HCl al 4% acuoso hasta un pH de 0,84 (haciendo que se desprendiera gas de dióxido de carbono). Se aumentó el pH de la fase acuosa hasta 7,8 con NaOH 2 N acuoso. Se añadió bicarbonato de sodio sólido. La extracción con acetato de etilo (8 x 40 ml), secado sobre sulfato de sodio y concentración dieron un aceite que solidificó tras reposar. Se aisló un total de

4,26 g de 4-(6-morfolin-4-ilhexil)-salicilamida.

p.f. 70-73°C; ^1H -RMN (d_6 -DMSO), δ (ppm): 8,8 (t, 1H), 7,8 (dd, 1H), 7,4 (td, 1H), 6,9 (m, 2H), 3,5 (t, 4H), 3,3 (q, 2H), 2,3 (t, 4H), 2,2 (t, 2H), 1,5 (t, 2H), 1,3-1,4 (m, 6H). Valor de KF = 5,39% de agua. Análisis elemental: %C: 63,05 (calculado), 63,06 (hallado); %H: 8,70 (calculado), 8,53 (hallado); %N: 8,65 (calculado), 8,73 (hallado).

5 1d: Preparación de las sales de citrato de los compuestos 1, 7 (referencia)

Síntesis de O-acetil-5-clorosalicilato de N-hidroxi-succinimida

10 Se añadieron ácido 5-clorosalicílico (17,3 g, 100 mmol) y tres gotas de ácido sulfúrico concentrado (98%) a una disolución de anhídrido acético (14 g, 137 mmol) y ácido acético glacial (16,4 g, 274 mmol) con agitación. Se calentó la mezcla de reacción lentamente hasta 70°C y se agitó durante 2 horas. Se enfrió la mezcla de reacción hasta temperatura ambiente y se añadió gradualmente a agua con hielo (500 ml) para precipitar el producto acetilado. Se recogieron estos sólidos y se lavaron con agua. Se combinaron los dos lotes de producto y se recrystalizaron en acetato de etilo. Se recogieron los cristales puros mediante filtración a vacío para dar 16,3 g de ácido O-acetil-5-clorosalicílico (76 mmol, rendimiento del 76%).

Análisis elemental calculado para $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_4\text{Cl}$: C 50,37%, H 3,29%, N 0,0%; hallado: C 50,36%, H 3,20%, N <0,02%.

15 Se disolvió N-hidroxi-succinimida (8,6 g, 82 mmol) en dimetilformamida (DMF) (8 ml). Se mezcló esta disolución con ácido O-acetil-5-clorosalicílico (16 g, 74,6 mmol) en diclorometano (DCM) (150 ml) a temperatura ambiente. Se agitó esta mezcla en un baño de agua. Se disolvió 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) (17 g, 82 mmol) en diclorometano (55 ml) y se añadió gradualmente a la mezcla. Se equilibró la reacción hasta temperatura ambiente y se agitó durante 24 horas. Se enfrió la mezcla hasta -10°C y se filtró para eliminar cualquier sólido. Se diluyó el filtrado con diclorometano (100 ml). Se lavó la disolución con HCl 1 N (2 x 200 ml), salmuera (2 x 200 ml), bicarbonato de sodio al 5% (2 x 200 ml) y salmuera (2 x 200 ml). Se secó la fase de diclorometano sobre sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el disolvente a vacío. Se recogió el producto para dar 22,5 g (72 mmol, 97%).

Compuesto 7: Mono-citrato de 2-(5-cloro-2-hidroxibenzoil)amino-5-(N',N'-dietilamino)pentano (referencia)

Nombre IUPAC: Mono-citrato de N-[5-(dietilamino)-1-metilpentil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida

25 Se disolvió O-acetil-5-clorosalicilato de N-hidroxi-succinimida obtenido anteriormente (3,1 g, 10 mmol) en diclorometano (15 ml). Se añadió lentamente esta disolución a 2-amino-5-dietilaminopentano (3,2 g, 20 mmol) en diclorometano (35 ml) con agitación. Se agitó la mezcla de reacción durante la noche a temperatura ambiente. HPLC indicó que la reacción era completa. Se lavó la mezcla de reacción con bicarbonato de sodio al 5% (3 x 100 ml). Se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el diclorometano a vacío para dar el producto de amina terciaria libre (2,3 g, 7,4 mmol, 74%).

35 Se disolvieron el 2-(5-cloro-2-hidroxibenzoilamino)-5-(N,N-dietilamino)pentano obtenido anteriormente (2,3 g, 7,4 mmol) y ácido cítrico (1,4 g, 7,4 mmol) en alcohol etílico anhidro (8 ml). Se añadió dietil éter (~30 ml) a esta disolución hasta que la disolución se volvió turbia. Se refrigeró la disolución turbia durante la noche para precipitar la sal de ácido cítrico. Se recogió el producto final, mono-citrato de 2-(5-cloro-2-hidroxibenzoilamino)-5-(N,N-dietilamino)pentano, mediante filtración a vacío y se secó bajo flujo de nitrógeno para dar 2,0 g (4,0 mmol, 54%).

p.f. 57-59°C; ^1H -RMN (DMSO-d_6) δ (ppm): 1,18 (m, 9H), 1,60 (m, 4H), 2,57 (q_{ab} , 4H), 3,08 (m, 6H), 4,04 (q, 1H), 4,11 (s, 1H), 6,98 (d, 1H), 7,47 (dd, 1H), 8,01 (d, 1H), 8,70 (s, 1H). Valor de KF = 0,59%. Análisis elemental calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{N}_2\text{O}_9\text{Cl}$: C 52,33, H 6,54, N 5,55. Hallado: C 52,21, H 6,79, N 5,20.

Compuesto 1: Mono-citrato de N-(5-cloro-2-hidroxibenzoil)-N',N'-dietilendiamina (referencia)

40 Nombre IUPAC: Mono-citrato de N-[2-(dietilamino)etil]-5-cloro-2-hidroxibenzamida

Se preparó el compuesto 1 mediante el mismo procedimiento que para el compuesto 7 con los materiales de partida apropiados.

45 p.f. 107-109°C; ^1H -RMN (DMSO-d_6) δ (ppm): 1,16 (t, 6H), 2,61 (q_{ab} , 4H), 3,09 (m, 6H), 3,59 (s, 2H), 6,98 (d, 1H), 7,44 (dd, 1H), 7,88 (d, 1H), 9,09 (s, 1H), 9,95-11,20 (s, 3H). Análisis elemental calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_9\text{Cl}$: C 49,30, H 5,84, N 6,05; hallado: C 49,30, H 5,78, N 5,94.

1e: Preparación del compuesto 11, 18 (referencia)

Síntesis de O-acetil-4-metoxisalicilato de N-hidroxi-succinimida

Se preparó O-acetil-4-metoxisalicilato de N-hidroxi-succinimida mediante el mismo procedimiento que para N-hidroxi-O-acetil-5-clorosalicilato con los materiales de partida apropiados.

50 Compuesto 11: Clorhidrato de 8-(2-hidroxi-4-metoxibenzoilamido)octilamina (referencia)

Nombre IUPAC: Clorhidrato de N-(8-amino-octil)-2-hidroxi-4-metoxibenzamida

5 Se disolvió O-acetil-4-metoxisalicilato de N-hidroxi-succinimida tal como se obtuvo anteriormente (13 g, 42,3 mmol) en diclorometano (70 ml) y se añadió gota a gota a una disolución de 1,8-diamino-octano (13 g, 90 mmol) en diclorometano (230 ml) en un baño de agua con agitación. Se agitó la reacción durante la noche. Se precipitó el producto de la disolución y se recogió mediante filtración a vacío. Se lavaron los precipitados con diclorometano y se secaron al aire para dar 9,0 g de producto bruto. Se lavaron los precipitados con agua (50 ml) y se extrajeron con disolución acuosa de HCl 0,1 N (50 ml) durante 0,5 horas con agitación. Se filtró la disolución acuosa ácida para eliminar material insoluble. Se lavó el filtrado con etil éter (150 ml) y se ajustó a pH 10. Se produjo precipitación inmediatamente. Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante la noche. Se recogió el precipitado mediante filtración y se secó al aire para proporcionar 2,6 g (8,8 mmol, 21%).

15 Se suspendió la amina primaria libre obtenida anteriormente (1,7 g, 5,8 mmol) en 20 ml de alcohol etílico anhidro. Se burbujeó gas de HCl en esta mezcla durante 10 minutos para obtener una disolución transparente. Se burbujeó gas nitrógeno a través de esta disolución para purgar el exceso de HCl y para evaporar el alcohol etílico hasta que el volumen de la disolución fue de 10 ml. Se refrigeró esta disolución durante 2 horas para precipitar el producto. Se recogió el producto mediante filtración a vacío, se lavó con etil éter y se secó a vacío para dar 1,7 g de la sal de clorhidrato (5,1 mmol, 89%).

p.f. 162-164°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆), δ (ppm): 1,36 (s, 8H, 1,53 (m, 4H), 2,71 (sex, 2H), 3,22 (q, 2H), 3,76 (s, 3H), 6,42 (m, 2H), 7,83 (d, 1H), 7,93-8,11 (s, 3H), 8,77 (t, 1H), 13,12 (sa, 1H). Análisis elemental calculado para C₁₆H₂₇N₂O₃Cl: C 58,08, H 8,23, N 8,47; hallado: C 57,46, H 8,24, N 8,63.

20 Compuesto 18: N-(2-Hidroxi-4-metoxibenzoil)-1,8-diamino-octano (referencia)

Nombre IUPAC: N-[2-(Dietilamino)etil]-2-hidroxi-4-metoxibenzamida

Se preparó el compuesto 18 mediante el mismo procedimiento que para el compuesto 11 con los materiales de partida apropiados.

25 p.f. 151-153°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆), δ (ppm): 1,16-1,40 (m, 8H), 1,46 (m, 4H), 2,64 (t, 2H), 3,23 (s, 2H), 3,69 (s, 3H), 6,13 (d, 1H), 6,17 (s, 1H), 7,67 (d, 1H), 10,05 (s, 1H). Valor de KF = 0,93%. Análisis elemental calculado para C₁₆H₂₆N₂O₃·0,16H₂O: C 64,67, H 8,86, N 9,43; hallado: C 64,26, H 8,84, N 9,65.

1f: Preparación de sales de citrato de los compuestos 3, 6, 8 y los compuestos 9, 10, 17 (referencia)

Síntesis de O-acetilsalicilato de N-hidroxi-succinimida

30 Se disolvió N-hidroxi-succinimida (12 g, 104 mmol) en DMF (15 ml). Se mezcló esta disolución con cloruro de O-acetilsalicílico (20 g, 101 mmol) en diclorometano (150 ml) a temperatura ambiente. Se añadió trietilamina (11 g, 109 mmol) gota a gota a esta mezcla con agitación. Se agitó la mezcla de reacción durante 2 horas. Se filtró la mezcla para eliminar cualquier material insoluble. Se recogió el filtrado y se evaporaron los disolventes a vacío. Se disolvió el aceite resultante en 200 ml de acetato de etilo. Se eliminó cualquier sólido restante mediante filtración. Se lavó el filtrado con HCl 1 N (3 x 150 ml), salmuera (1 x 150 ml), bicarbonato de sodio al 4% (3 x 150 ml) y salmuera (1 x 150 ml). Se secó la fase de acetato de etilo sobre sulfato de sodio anhidro. Se eliminó el acetato de etilo mediante evaporación a vacío, seguido por una purga de nitrógeno. Se produjeron 20 g (72 mmol, 72%) de O-acetilsalicilato de N-hidroxi-succinimida.

Compuesto 3: Mono-citrato de N-(2-hidroxibenzoil)-N',N'-dietilendiamina (referencia)

Nombre IUPAC: Mono-citrato de N-[2-(dietilamino)etil]-2-hidroxibenzamida

40 Se preparó el compuesto 3 mediante el mismo procedimiento que para el compuesto 7 con los materiales de partida apropiados.

p.f. 111-113°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆), δ (ppm): 1,17 (t, 6H), 2,59 (q_{ab}, 4H), 3,09 (m, 6H), 3,61 (q, 2H), 6,95 (m, 2H), 7,44 (t, 1H), 7,85 (d, 1H), 9,07 (s, 1H), 10,25 (sa, 2H). Valor de KF = 0,30%. Análisis elemental calculado para C₁₉H₂₈N₂O₉: C 53,27, H 6,54, N 6,54; hallado: C 52,96, H 6,28, N 6,37.

45 Mono-citrato de 2-(2-hidroxibenzoil)amino-5-(N,N-dietilamino)pentano

Nombre IUPAC: Mono-citrato de N-[5-(dietilamino)-1-metilpentil]-2-hidroxibenzamida

Se preparó mono-citrato de 2-(2-hidroxibenzoil)amino-5-(N,N-dietilamino)pentano mediante el mismo procedimiento que para el compuesto 7 con los materiales de partida apropiados.

50 p.f. 62-64°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆), δ (ppm): 1,18 (m, 9H), 1,61 (m, 4H), 2,57 (q_{ab}, 4H), 3,02 (m, 6H), 4,03 (q, 1H), 4,11 (s, 1H), 6,91 (m, 2H), 7,41 (t, 1H), 7,89 (d, 1H), 8,58 (s, 1H), 10,6-11,8 (s, 2H). Análisis elemental calculado para C₂₂H₃₄N₂O₉: C 56,17, H 7,23, N 5,96; hallado: C 55,77, H 7,35, N 5,71.

Compuesto 8: Mono-citrato de N-(2-hidroxibenzoil)-N',N'-di(n-butil)-1,3-diaminonopropano (referencia)

Nombre IUPAC: Mono-citrato de N-{3-[dibutilamino]propil}-5-cloro-2-hidroxibenzamida

Los procedimientos fueron los mismos que los descritos para el compuesto 7 excepto por los materiales de partida.

- 5 p.f. 87-89°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆), δ (ppm): 0,89 (t, 6H), 1,30 (sex, 4H), 1,53 (m, 4H), 1,77 (quin, 2H), 2,59 (q_{ab}, 4H), 2,84-3,04 (m, 6H), 3,36 (t, 2H), 6,96 (d, 1H), 7,44 (dd, 1H), 7,90 (d, 1H), 8,97 (s, 1H). Análisis elemental calculado para C₁₉H₂₇N₂O₉Cl: C 54,08, H 6,95, N 5,26; hallado: C 54,13, H 7,00, N 5,10.

Compuesto 9: Clorhidrato de N-(2-hidroxibenzoil)-1,12-diaminododecano (referencia)

Nombre IUPAC: Clorhidrato de N-(12-aminododecanil)-2-hidroxibenzamida

- 10 Se preparó el compuesto 9 mediante el mismo procedimiento que para el compuesto 7 con los materiales de partida apropiados.

p.f. 140-142°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆), δ (ppm): 1,21 (s, 16H), 1,53 (m, 4H), 2,72 (sex, 2H), 3,27 (q, 2H), 6,89 (m, 2H), 7,37 (t, 1H), 7,791 (d, 1H), 7,96-8,20 (s, 3H), 8,93 (s, 1H), 12,87 (s, 1H). Análisis elemental calculado para C₁₉H₃₃N₂O₂Cl: C 63,94, H 9,32, N 7,85, Cl 9,93; hallado: C 63,33, H 9,45, N 7,28, Cl 10,87.

Compuesto 10: Clorhidrato de 10-(2-hidroxibenzoilamido)decalamina (referencia)

- 15 Nombre IUPAC: Clorhidrato de N-(10-aminodecil)-2-hidroxibenzamida

Se preparó el compuesto 10 mediante el mismo procedimiento que para el compuesto 11 con los materiales de partida apropiados.

- 20 p.f. 136-138°C; ¹H-RMN (DMSO-d₆), δ (ppm): 1,24 (s, 12H), 1,51 (m, 4H), 2,71 (t, 2H), 3,26 (q, 2H), 6,87 (m, 2H), 7,37 (t, 1H), 7,88 (d, 1H), 7,89-8,13 (s, 3H), 8,91 (t, 1H), 12,76 (s, 1H). Análisis elemental calculado para C₁₇H₂₉N₂O₂Cl: C 62,09, H 8,89, N 8,52; hallado: C 60,66, H 9,11, N 8,73.

Compuesto 17: N-(2-Hidroxibenzoil)-1,9-diaminononano (referencia)

Nombre IUPAC: N-(8-Aminononil)-2-hidroxibenzamida

Se preparó el compuesto 17 mediante el mismo procedimiento que para preparar la amina libre del compuesto 11 con los materiales de partida apropiados.

- 25 ¹H-RMN (DMSO-d₆), δ (ppm): 1,21-1,42 (m, 12H), 1,51 (m, 2H), 2,60 (t, 2H), 3,27 (t, 2H), 6,63 (t, 1H), 6,70 (d, 1H), 7,22 (t, 1H), 7,78 (d, 1H), 9,80 (s, 1H). Valor de KF= 0,91%. Análisis elemental calculado para C₁₆H₂₆N₂O₂ (0,91% H₂O): C 68,61, H 9,33, N 9,97; Hallado: C 68,54, H 9,41, N 10,31.

1g: Preparación del compuesto 12 (referencia)

- 30 Se cargó un vial de centelleo de 20 ml con ácido 3,5-dibromosalicílico (1,299 g, 4,39 mmol), 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida*HCl (0,99 g, 5,2 mmol) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,79 g, 5,8 mmol). Se añadió 1-(3-aminopropil)imidazol (476 µl, 3,99 mmol) mediante autopipeta. Se añadió THF (10 ml), se tapó el vial y se colocó en un agitador orbital durante la noche a 60°C. Se apagó el calentamiento y se dejó enfriar el vial de nuevo hasta temperatura ambiente. Se añadió resina de trisamina (200 mg, 0,85 mmol) y se colocó el vial de nuevo en el agitador orbital durante 4 horas. Se añadieron resinas de intercambio iónico Amberlyst-15 (2 g, 9,4 mmol) y Amberlyst-21 (2 g, 9,4 mmol) al vial junto con DCM (5 ml) para suspender las resinas. Se colocó el vial de nuevo en el agitador orbital durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción y se aclararon las resinas con DCM (2 x 5 ml). Se colocaron los filtrados combinados bajo una corriente de nitrógeno durante la noche. Se recuperaron 2,3985 g de material.

CL-EM: tr = 2,39 min., 89%, M + H = 404

- 40 1h: Preparación del compuesto 13 (referencia)

- 45 Se cargó un vial de centelleo de 20 ml con ácido 3,5-diclorosalicílico (0,9082 g, 4,39 mmol), 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida*HCl (0,99 g, 5,2 mmol) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,79 g, 5,8 mmol). Se añadió 1-(3-aminopropil)imidazol (476 µl, 3,99 mmol) mediante autopipeta. Se añadió THF (10 ml), se tapó el vial y se colocó en un agitador orbital durante la noche a 60°C. Se apagó el calentamiento y se dejó enfriar el vial de nuevo hasta temperatura ambiente. Se añadió resina de trisamina (200 mg, 0,85 mmol) y se colocó el vial de nuevo en el agitador orbital durante 4 horas. Se añadieron resinas de intercambio iónico Amberlyst-15 (2 g, 9,4 mmol) y Amberlyst-21 (2 g, 9,4 mmol) al vial junto con DCM (5 ml) para suspender las resinas. Se colocó el vial de nuevo en el agitador orbital durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción y se aclararon las resinas con DCM (2 x 5 ml). Se colocaron los filtrados combinados bajo una corriente de nitrógeno durante la noche. Se recuperaron 2,0343 g de

material.

CL-EM: tr = 2,24 min, 79%, M + H = 315

1i: Preparación del compuesto 14 (referencia)

- 5 Se cargó un vial de centelleo de 20 ml con ácido 3,5-diiodosalicílico (1,700 g, 4,39 mmol), 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida*HCl (0,99 g, 5,2 mmol) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,79 g, 5,8 mmol). Se añadió 1-(3-aminopropil)imidazol (476 µl, 3,99 mmol) mediante autopipeta. Se añadió THF (10 ml), se tapó el vial y se colocó en un agitador orbital durante la noche a 60°C. Se apagó el calentamiento y se dejó enfriar el vial de nuevo hasta temperatura ambiente. Se añadió resina de trisamina (200 mg, 0,85 mmol) y se colocó el vial de nuevo en el agitador orbital durante 4 horas. Se añadieron resinas de intercambio iónico Amberlyst-15 (2 g, 9,4 mmol) y Amberlyst-21 (2 g, 9,4 mmol) al vial junto con DCM (5 ml) para suspender las resinas. Se colocó el vial de nuevo en el agitador orbital durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción y se aclararon las resinas con DCM (2 x 5 ml). Se colocaron los filtrados combinados bajo una corriente de nitrógeno durante la noche. Se recuperaron 2,7305 g de material.

CL-EM: tr = 2,62 min, 84 %, M + H = 498

1j: Preparación del compuesto 15

- 15 Se cargó un vial de centelleo de 20 ml con ácido 3,5-dibromosalicílico (1,299 g, 3,8 mmol), 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida*HCl (0,84 g, 4,39 mmol) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,59 g, 4,38 mmol). Se añadió 4-(3-aminopropil)morfolina (506 µl, 3,47 mmol) mediante autopipeta. Se añadió THF (10 ml), se tapó el vial y se colocó en un agitador orbital durante la noche a 60°C. Se apagó el calentamiento y se dejó enfriar el vial de nuevo hasta temperatura ambiente. Se añadió resina de trisamina (200 mg, 0,85 mmol) y se colocó el vial de nuevo en el agitador orbital durante 4 horas. Se añadieron resinas de intercambio iónico Amberlyst-15 (2 g, 9,4 mmol) y Amberlyst-21 (2 g, 9,4 mmol) al vial junto con DCM (5 ml) para suspender las resinas. Se colocó el vial de nuevo en el agitador orbital durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción y se aclararon las resinas con DCM (2 x 5 ml). Se colocaron los filtrados combinados bajo una corriente de nitrógeno durante la noche. Se recuperaron 2,103 g de material.

CL-EM: tr = 2,36 min, 74%, M + H = 423

25 1k: Preparación del compuesto 16

- 30 Se cargó un vial de centelleo de 20 ml con ácido 3,5-diclorosalicílico (0,786 g, 3,8 mmol), 1-[3-(dimetilamino)propil]-3-etilcarbodiimida*HCl (0,84 g, 4,39 mmol) e hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (0,59 g, 4,38 mmol). Se añadió 4-(3-aminopropil)morfolina (506 µl, 3,47 mmol) mediante autopipeta. Se añadió THF (10 ml), se tapó el vial y se colocó en un agitador orbital durante la noche a 60°C. Se apagó el calentamiento y se dejó enfriar el vial de nuevo hasta temperatura ambiente. Se añadió resina de trisamina (200 mg, 0,85 mmol) y se colocó el vial de nuevo en el agitador orbital durante 4 horas. Se añadieron resinas de intercambio iónico Amberlyst-15 (2 g, 9,4 mmol) y Amberlyst-21 (2 g, 9,4 mmol) al vial junto con DCM (5 ml) para suspender las resinas. Se colocó el vial de nuevo en el agitador orbital durante la noche. Se filtró la mezcla de reacción y se aclararon las resinas con DCM (2 x 5 ml). Se colocaron los filtrados combinados bajo una corriente de nitrógeno durante la noche. Se recuperaron 1,648 g de material.

- 35 CL-EM: tr = 2,23 min, 75%, M + H = 334

1k: Preparaciones alternativas de los compuestos 15, 16

Los compuestos 15 y 16 se sintetizan mediante el mismo procedimiento que el descrito para preparar el compuesto de referencia 7 usando los materiales de partida apropiados.

Ejemplo 2

40 2A: Insulina – suministro oral

- 45 Se prepararon composiciones de dosificación oral (v.o.) de compuesto de agente de suministro e insulina-zinc humana (mínimo de 26 UI/mg disponible de Calbiochem - Novabiochem Corp, La Jolla, CA) en agua desionizada. Normalmente, se añadieron 500 mg de compuesto de agente de suministro a 1,5 ml de agua. Se agitó la disolución con vórtice, después se calentó (aproximadamente 37°C) y se sonicó. Se ajustó el pH a aproximadamente de 7 a 8,5 con NaOH o HCl. Se añadió NaOH adicional, si era necesario, para lograr una solubilidad uniforme, y volvió a ajustarse el pH a aproximadamente de 7 a 8,5. Entonces se añadió agua para llevar el volumen total a aproximadamente 2,4 ml y se agitó con vórtice. Se añadieron aproximadamente 1,25 mg de insulina de una disolución madre de insulina (15 mg/ml preparada a partir de 0,5409 g de insulina y 18 ml de agua desionizada, ajustando con HCl y NaOH a pH 8,15 y para obtener una disolución transparente usando 40 ml de HCl concentrado, 25 ml de NaOH 10 N y 50 ml de NaOH 1 N) a la disolución y se mezcló con inversión. Puede usarse la disolución inmediatamente en el protocolo de dosificación o, alternativamente, puede colocarse la disolución en un baño de agua a 37°C durante una hora antes de la dosificación. La dosis final de compuesto de agente de suministro, la dosis de insulina y las cantidades de volumen de dosis se indican a continuación en la tabla 1.

Los protocolos de dosificación y muestreo típicos fueron los siguientes. Se sometieron ratas Sprague-Dawley macho que pesaban entre aproximadamente 200-250 g a ayunas durante 24 horas y se les administraron ketamina (44 mg/kg) y clorpromazina (1,5 mg/kg) 15 minutos antes de la dosificación y de nuevo según fue necesario para mantener la anestesia. A un grupo de dosificación de cinco animales se les administró una de las disoluciones de dosificación. Para la dosificación oral, se adaptó un catéter de calibre francés 8, de 11 cm de Rusch a una jeringa de 1 ml con una punta de pipeta. Se llenó la jeringa con disolución de dosificación extrayendo la disolución a través del catéter, que entonces se secó con paño. Se introdujo el catéter por el esófago dejando 1 cm de tubo más allá de los incisivos. Se administró la disolución de dosificación presionando el émbolo de jeringa.

Se extrajeron muestras de sangre en serie de la arteria de la cola, normalmente a los tiempos = 15, 30, 60, 120 y 180 minutos. Se determinaron los niveles de insulina en suero con un kit de prueba ELISA para insulina (n.º de kit DSL-10-1600 de Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX), modificando el protocolo convencional con el fin de optimizar la sensibilidad y el intervalo lineal de la curva patrón para los volúmenes y las concentraciones de las muestras usadas en el presente protocolo. Se midieron concentraciones de insulina humana en suero ($\mu\text{U/ml}$) para cada punto de tiempo para cada uno de los cinco animales en cada grupo de dosificación. Se calculó el promedio de los cinco valores para cada punto de tiempo y se trazaron los resultados como concentración de insulina en suero frente al tiempo (experimentos anteriores no revelaron niveles medibles de insulina humana tras la dosificación oral con insulina humana sola). A continuación en la tabla 1 se notifican el máximo (pico) y el área bajo la curva (AUC).

Tabla 1. Insulina – suministro oral

Compuesto de agente de suministro	Dosis de compuesto de agente de suministro (mg/kg)	Dosis de insulina (mg/kg)	Dosis en volumen (ml/kg)	Suero pico medio [INS] $\pm$ DE
15	200	0,25	1	60,42 $\pm$ 117,16
16	200	0,25	1	61,27 $\pm$ 116,59

2B: Suministro oral de ribonucleasa A biotinilada (ARNasab A)

Se prepararon disoluciones de dosificación mediante alimentación por sonda oral (v.o.) de compuesto de agente de suministro y ARNasab A (Sigma (Milwaukee, WI): ribonucleasa A tipo XII-A de páncreas bovino) en agua desionizada mediante mezclado. Se preparó la disolución de compuesto de agente de suministro en tampón fosfato y se agitó. Si era necesario, se ajustó el pH de la mezcla mediante aumento mediante la adición de alícuotas de NaOH de una normalidad apropiada hasta que el compuesto de agente de suministro se disolvió completamente. El pH final del compuesto de agente de suministro disuelto fue de entre 7,5 y 9,5. Se prepararon las disoluciones de dosificación finales mezclando 9 volúmenes de la disolución de compuesto de agente de suministro con 1 volumen de una disolución madre de ARNasab A (20 mg de ARNasab A en solución salina tamponada con fosfato (PBS)). Las concentraciones finales fueron de 150 mg/ml de compuesto de agente de suministro y 2 mg/ml de ARNasab A.

Los protocolos de dosificación y de muestreo fueron los siguientes. Se sometieron ratas Sprague-Dawley macho que pesaban 200-250 g a ayunas durante 24 horas y se les administraron ketamina (44 mg/kg) y clorpromazina (1,5 mg/kg) 15 minutos antes de la dosificación y de nuevo según se necesitó para mantener la anestesia. A un grupo de dosificación de cinco animales se les administró una de las disoluciones de dosificación de la siguiente manera. Se adaptó un catéter de calibre francés 8, de 11 cm de Rusch a una jeringa de 1 ml con una punta de pipeta. Se llenó la jeringa con disolución de dosificación extrayendo la disolución a través del catéter, que entonces se secó con un paño. Se introdujo el catéter por el esófago dejando 1 cm de tubo más allá de los incisivos. Se administró la disolución de dosificación presionando el émbolo de la jeringa. Se extrajeron muestras de sangre en serie de la arteria de la cola a los 15, 30, 45, 60 y 90 minutos. Se cuantificaron las concentraciones de ARNasab A en suero mediante un inmunoensayo modificado tal como se describe a continuación.

Biotinilación de ribonucleasa A

Para marcar cada una de las moléculas de ARNasa A con una molécula de biotina, se mantuvo la razón de la biotina activada a 3 moles de biotina/1 mol de ARNasa A. En una reacción de biotinilación representativa, se disolvieron 500 mg de ARNasa A en 20 ml de NaHCO_3 50 mM, pH 7,6. Se añadieron 57,08 mg de EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC Biotin (Pierce Chemical Company, Rockford, IL) a la disolución, se disolvieron y se dejaron reposar sobre hielo durante 2 horas. Entonces se dializó la mezcla de reacción (membrana de diálisis con un punto de corte de 10.000 de PM (Pierce, Rockford, Illinois)) frente a 4 litros de PBS a 4°C durante la noche. Se colocó la mezcla de reacción en 4 litros de PBS reciente y se dializó durante 4 horas adicionales. Se retiró la ARNasab A dializada de la membrana de diálisis, se diluyó hasta un volumen final de 25 ml con PBS (concentración final de ARNasab A = 20 mg/ml) y se almacenó a 4°C.

Ensayo de los niveles en suero de ARNasab A administrada por vía oral

En general se colocaron alícuotas de 100 μl de los sueros de rata recogidos a los diversos puntos de tiempo en pocillos apropiados de una placa de poliestireno recubierta con estreptavidina de 96 pocillos Reacti-Bind (Pierce). Tras un período de incubación de 2 horas, se lavaron las placas y después se incubaron con un anticuerpo policlonal de conejo anti-ARNasa A (Chemicon, Pittsburgh, PA). Tras lavar, se incubaron las placas durante 2 horas con un

- 5 anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de conejo (Chemicon, Pittsburgh, PA) conjugado con fosfatasa alcalina. Se lavaron las placas tras la incubación y se detectó la cantidad de ARNasab A inicialmente capturada mediante la adición de fosfato de para-nitrofenilo (un sustrato para fosfatasa alcalina) (Pierce, Rockford, Illinois). Se cuantificó la cantidad de ARNasab A circulante en los sueros de rata originales mediante comparación con una curva patrón de ARNasab A que se extiende desde 1000 - 0,1 ng/ml en quince diluciones de dos veces. En la tabla 2 a continuación se facilita el máximo $\pm$ desviación estándar.

Tabla 2 – Suministro oral de ARNasa

Compuesto de agente de suministro (referencia)	Dosis de compuesto de agente de suministro (mg/kg)	Dosis de ARNasab (mg/kg)	Dosis en volumen (ml/kg)	Suero pico medio ng/ml
1	150	1	1	2,38 $\pm$ 2,2
3	150	1	1	2,98 $\pm$ 1,66

2c: Suministro oral de BIBN4096BS

- 10 Se prepararon disoluciones de dosificación mediante alimentación por sonda oral (v.o.) de compuesto de agente de suministro y el antagonista de péptido relacionado con el gen de calcitonina, [R-(R*,S*)]-N-[2-[5-amino-1-[[4-(4-piridinil)-1-piperazinil]carbonil]pentil]amino]-1-[(3,5-dibromo-4-hidroxifenil)metil]-2-oxoetil]-4-(1,4-dihidro-2-oxo-3(2H)-quinazolinil)-1-piperidincarboxamida (BIBN4096BS) en agua. Normalmente, se preparó una disolución del compuesto de agente de suministro en agua y se agitó. Se prepararon las disoluciones de dosificación finales mezclando el compuesto de agente de suministro con una disolución madre de BIBN4096BS y diluyendo hasta el volumen deseado (habitualmente 1,0 ml). Si era necesario, se ajustó el pH de la mezcla mediante la adición de alícuotas de disolución acuosa de ácido clorhídrico de una normalidad apropiada hasta que el pH final de la disolución de dosificación estaba por debajo de 7,0. Las cantidades de compuesto finales por dosis fueron de 25 mg/kg de BIBN4096BS, 200 mg/kg de compuesto de agente de suministro, en un volumen total de 1 ml/kg.

- 20 Los protocolos de dosificación y muestreo típicos fueron los siguientes. Se sometieron ratas Sprague-Dawley macho que pesaban entre 200-250 g a ayunas durante 24 horas y se les administraron ketamina (44 mg/kg) y clorpromazina (1,5 mg/kg) 15 minutos antes de la dosificación. A un grupo de dosificación de cinco ratas se les administró una de las disoluciones de dosificación. Para la dosificación mediante alimentación por sonda oral (v.o.), se adaptó un catéter de calibre francés 8, de 11 cm de Rusch a una jeringa de 1 ml con una punta de pipeta. Se llenó la jeringa con disolución de dosificación extrayendo la disolución a través del catéter, que entonces se secó con un paño. Se introdujo el catéter por el esófago dejando 1 cm de tubo más allá de los incisivos. Se administró la disolución presionando el émbolo de la jeringa. Se extrajeron muestras de sangre en serie de la arteria de la cola, normalmente a los tiempos = 0, 15, 30, 45 y 60 minutos. Se cuantificaron las concentraciones de BIBN4096BS en plasma usando un método de ensayo de cromatografía de líquidos/espectrometría de masas/espectrometría de masas usando detección por UV. El intervalo convencional para el ensayo fue de 5-2.000 ng/ml. Estudios previos indicaron valores de nivel inicial de aproximadamente 10 ng/ml. El máximo se notifica a continuación en la tabla 3.

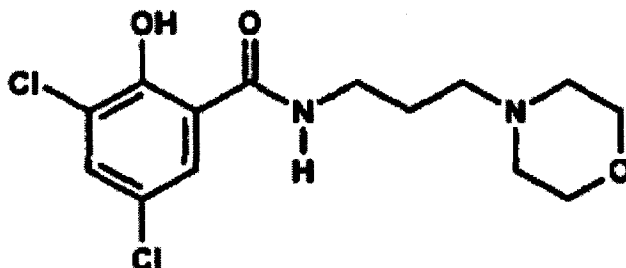
Tabla 3. Suministro de BIBN4096BS oral

Compuesto de agente de suministro	Dosis de compuesto de agente de suministro (mg/kg)	Dosis de BIBN4096BS (mg/kg)	Dosis en volumen (ml/kg)	Suero pico medio ng/ml
15	200	25	1	0
16	200	25	1	15 $\pm$ 8,1

* algunas disoluciones de dosificación estuvieron a un pH $\geq$ 8,0.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de la siguiente fórmula:



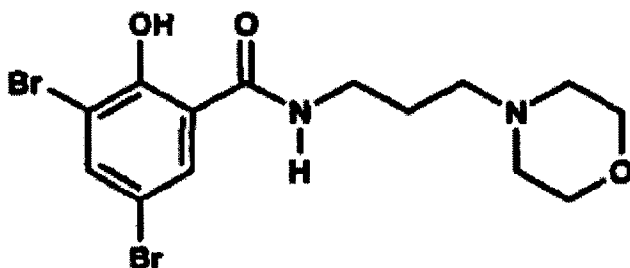
Compuesto 16

y sales del mismo.

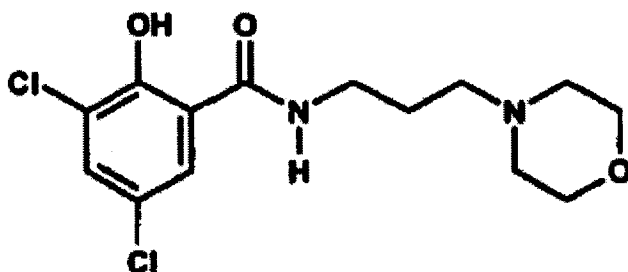
2. Composición que comprende:

(A) un agente biológicamente activo seleccionado del grupo que consiste en: BIBN-4096BS, hormonas del crecimiento, hormonas del crecimiento humanas, hormonas del crecimiento humanas recombinantes (GHr), hormonas del crecimiento bovinas, hormonas del crecimiento porcinas, hormonas liberadoras de la hormona del crecimiento, factor liberador de la hormona del crecimiento, interferones, interferón α , interferón β , interferón γ , interleucina-1, interleucina-2, insulina, insulina porcina, insulina bovina, insulina humana, insulina recombinante humana, factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), IGF-1, heparina, heparina no fraccionada, heparinoides, dermatanos, condroitinas, heparina de bajo peso molecular, heparina de muy bajo peso molecular, heparina de ultrabajo peso molecular, calcitonina, calcitonina de salmón, calcitonina de anguila, calcitonina humana; eritropoyetina (EPO), factor natriurético auricular, antígenos, anticuerpos monoclonales, somatostatina, inhibidores de proteasa, adrenocorticotropina, hormona liberadora de gonadotropina, oxitocina, hormona liberadora de la hormona leutinizante, hormona estimuladora del folículo, glucocerebrosidasa, trombopoyetina, filgrastim, prostaglandinas, ciclosporina, vasopresina, cromolín sódico, cromoglicato sódico, cromoglicato disódico, vancomicina, desferrioxamina (DFO), hormona paratiroidea (PTH), fragmentos de PTH, agentes antimicrobianos, agentes antifúngicos, vitaminas; análogos, fragmentos, miméticos y derivados modificados con polietilenglicol (PEG) de estos compuestos; y cualquier combinación de los mismos un agente activo; y

(B) al menos un compuesto seleccionado del grupo que consiste en los compuestos 15 y 16:



Compuesto 15



Compuesto 16

y sales de los mismos.

3. Composición según la reivindicación 2, en la que el agente biológicamente activo comprende insulina, BIBN-4096BS, calcitonina, hormona paratiroidea, eritropoyetina, hormonas del crecimiento o combinaciones de los mismos.

4. Composición según la reivindicación 2, en la que el agente biológicamente activo comprende BIBN-4096BS.
5. Composición según la reivindicación 2, en la que el agente biológicamente activo comprende insulina.
6. Forma unitaria de dosificación que comprende:
 - 5 (A) la composición según la reivindicación 2; y
 - (B) (a) un excipiente,
(b) un diluyente,
(c) un disgregante,
(d) un lubricante,
10 (e) un plastificante,
(f) un colorante,
(g) un vehículo de dosificación, o
(h) cualquier combinación de los mismos.
7. Forma unitaria de dosificación según la reivindicación 6, en la que el agente biológicamente activo comprende insulina, BIBN-4096BS, calcitonina, hormona paratiroidea, eritropoyetina, hormonas del crecimiento humanas o combinaciones de los mismos.
- 15 8. Forma unitaria de dosificación según la reivindicación 6, en la que el agente activo comprende BIBN-4096BS recombinante.
9. Forma unitaria de dosificación según la reivindicación 6, en la que el agente activo comprende insulina.
- 20 10. Forma unitaria de dosificación según la reivindicación 6, en la que la forma unitaria de dosificación comprende un vehículo de dosificación que comprende un comprimido, una cápsula, un polvo o un líquido.
11. Forma unitaria de dosificación según la reivindicación 6, en la que el vehículo de dosificación es líquido seleccionado del grupo que consiste en agua, 1,2-propanodiol, etanol y cualquier combinación.
- 25 12. Composición según la reivindicación 2, para su uso en la administración por vía oral de un agente biológicamente activo a un animal que necesita el agente.
13. Método para preparar una composición que comprende mezclar:
 - (A) al menos un agente activo;
 - (B) el compuesto según la reivindicación 1; y
 - (C) opcionalmente, un vehículo de dosificación.