

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 553**

51 Int. Cl.:

A61K 31/445 (2006.01)

C07D 401/12 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2010** **E 10732616 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.11.2015** **EP 2453894**

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

30 Prioridad:

15.07.2009 US 225803 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2016

73 Titular/es:

THERAVANCE BIOPHARMA R&D IP, LLC
(100.0%)
901 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

WOOLLAM, GRAHAME

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 557 553 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 de base libre cristalina de un compuesto de bifenilo

5 Antecedentes de la invención

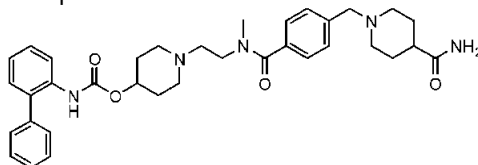
Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a una novedosa forma cristalina de un compuesto de bifenilo, que se espera que sea útil para tratar trastornos pulmonares. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto cristalino o preparadas a partir de tal compuesto, procesos y productos intermedios para preparar tal compuesto cristalino, y encuentra utilidad en métodos de uso de tal compuesto para tratar un trastorno pulmonar.

15 Estado de la técnica

La publicación de patente de EE.UU. Nº 2005/0203133 a Mammen et al. desvelan novedosos compuestos de bifenilo que se espera que sean útiles para tratar trastornos pulmonares tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y asma. En particular, el compuesto éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico se describe específicamente en la presente solicitud como que posee actividad antagonista o anticolinérgica de receptores muscarínicos.

20 La estructura química del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico se representa por la fórmula I:



25 El compuesto de fórmula I se ha nombrado usando el software comercialmente disponible AutoNom (MDL, San Leandro, California).

30 Agentes terapéuticos útiles para tratar trastornos pulmonares o respiratorios se administran ventajosamente directamente en las vías respiratorias por inhalación. A este respecto, se han desarrollado varios tipos de dispositivos de inhalación farmacéuticos para administrar agentes terapéuticos por inhalación que incluyen inhaladores de polvo seco (DPI), inhaladores de dosis medida (MDI) e inhaladores nebulizadores. Cuando se preparan composiciones farmacéuticas y formulaciones para su uso en tales dispositivos, es altamente deseable tener una forma cristalina del agente terapéutico que no sea ni higroscópica ni deliquescente y que tenga un punto de fusión relativamente alto que permita así que el material se micronice sin descomposición significativa. Aunque se ha informado de formas de base libre cristalina del compuesto de fórmula I en la publicación de patente de EE.UU. Nº 2007/0112027 a Axt et al. como la forma I y la forma II, la forma de base libre cristalina de la presente invención tiene propiedades diferentes y particularmente útiles, que incluyen un mayor punto de fusión.

40 Resumen de la invención

La invención se refiere a una base libre cristalina del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico, designada la forma III, que se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a 28 valores de 2θ de $6,6\pm 0,1$, $13,1\pm 0,1$, $18,6\pm 0,1$, $19,7\pm 0,1$ y $20,2\pm 0,1$; y adicionalmente caracterizada por tener cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados de $8,8\pm 0,1$, $10,1\pm 0,1$, $11,4\pm 0,1$, $11,6\pm 0,1$, $14,8\pm 0,1$, $15,2\pm 0,1$, $16,1\pm 0,1$, $16,4\pm 0,1$, $16,9\pm 0,1$, $17,5\pm 0,1$, $18,2\pm 0,1$, $19,3\pm 0,1$, $19,9\pm 0,1$, $20,8\pm 0,1$, $21,1\pm 0,1$, $21,7\pm 0,1$ y $22,3\pm 0,1$.

50 También se describe, pero no se reivindica en el presente documento, una base libre cristalina de éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico, designada la forma IV, que se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ de $6,6\pm 0,1$, $13,1\pm 0,1$, $18,6\pm 0,1$, $19,7\pm 0,1$ y $20,2\pm 0,1$; y adicionalmente caracterizada por tener cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados de $10,6\pm 0,1$, $15,0\pm 0,1$, $16,0\pm 0,1$, $17,3\pm 0,1$, $17,7\pm 0,1$, $20,9\pm 0,1$, $21,4\pm 0,1$, $22,6\pm 0,1$, $24,6\pm 0,1$ y $27,8\pm 0,1$.

Otro aspecto de la invención se refiere a la composición farmacéutica que comprende la base libre cristalina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Todavía otro aspecto de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la base libre cristalina de la invención en combinación con uno o

varios de otros agentes terapéuticos. Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (a) un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de la base libre cristalina de la invención; y (b) una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente seleccionado de un agente antiinflamatorio esteroideo tal como un corticosteroide; un agonista de receptores β_2 -adrenérgicos; un inhibidor de la fosfodiesterasa-4; o una combinación de los mismos; en el que la base libre cristalina y el agente se formulan juntos o por separado. Cuando el agente se formula por separado, puede incluirse un vehículo farmacéuticamente aceptable. Normalmente, la base libre cristalina de la invención y el agente estarán presentes en cantidades terapéuticamente eficaces.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una solución salina isotónica acuosa que comprende la base libre cristalina de la invención, en la que la disolución tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a 6. En una realización particular, una formulación de nebulizador acuosa se tampona con tampón citrato a un pH de aproximadamente 5.

En una realización, la presente invención se refiere a un dispositivo de administración de fármaco que comprende un inhalador de polvo seco que contiene una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y la base libre cristalina de la invención.

El compuesto de fórmula I tiene actividad de antagonista de receptores muscarínicos. Por consiguiente, se espera que una base libre cristalina del compuesto de fórmula I tenga la misma actividad, y así encuentre utilidad en el tratamiento de trastornos pulmonares tales como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Así, otro aspecto de la invención encuentra utilidad en un compuesto I para su uso en un método de tratamiento de un trastorno pulmonar que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la base libre cristalina de la invención. Todavía otro aspecto de la invención encuentra utilidad en un compuesto I para su uso en un método de producción de broncodilatación en un paciente que comprende administrar al paciente una cantidad productora de broncodilatación de la base libre cristalina de la invención. En una realización, el compuesto se administra por inhalación. La invención también encuentra utilidad en un compuesto I para su uso en un método de tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la base libre cristalina de la invención. Otro aspecto de la invención encuentra utilidad en un compuesto I para su uso en un método de antagonización de un receptor muscarínico en un mamífero que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la base libre cristalina de la invención.

La invención también se refiere a procesos de preparación de la forma de base libre cristalina III del compuesto de fórmula I. La invención también proporciona un proceso de purificación del compuesto de fórmula I que comprende formar la forma de base libre cristalina III del éster 1-(2-([4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ilico del ácido bifenil-2-ilcarbámico. La invención se refiere además a productos preparados por el proceso descrito en el presente documento.

La invención también se refiere a la base libre cristalina del compuesto de fórmula I en la forma III en una forma micronizada; y a composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable y una base libre cristalina micronizada de la invención.

La invención también se refiere a la forma de base libre cristalina III del compuesto de fórmula I para su uso en terapia o como un medicamento. Adicionalmente, la invención se refiere al uso de la base libre cristalina de la invención para la fabricación de un medicamento; especialmente para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno pulmonar o para antagonizar un receptor muscarínico en un mamífero.

Breve descripción de los dibujos

Diversos aspectos de la presente invención se ilustran por referencia a los dibujos adjuntos.

La FIG. 1 muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo (PXRD) de la forma III de la base libre cristalina del éster 1-(2-([4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ilico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (el compuesto de fórmula I). Otras características de la forma III se presentan en la FIG. 4, que muestra un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC) y la FIG. 6, que muestra un trazo de análisis termogravimétrico (TGA).

La FIG. 2 muestra un patrón de PXRD de la forma IV de la base libre cristalina del compuesto de fórmula I. La FIG. 3 muestra una transparencia de los patrones de PXRD de la forma III y la forma IV. Otras características de la forma IV se presentan en la FIG. 5, que muestra un termograma de DSC, y la FIG. 7, que muestra un trazo de TGA.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado que la forma de base libre cristalina III de la invención no es delicuescente, incluso cuando se expone a humedad atmosférica. Adicionalmente, la forma de base libre cristalina de la invención tiene niveles aceptables de higroscopicidad y punto de fusión aceptable. Por ejemplo, la forma de base libre

crystalina III tiene un punto de fusión de aproximadamente 125 °C. La forma IV de la base libre cristalina tiene un punto de fusión de aproximadamente 119 °C.

Entre otros usos, la forma de base libre cristalina de la invención es útil para preparar composiciones farmacéuticas que se espera que tengan utilidad en el tratamiento de trastornos pulmonares. Por consiguiente, un aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de la base libre cristalina de la invención.

Definiciones

Cuando se describen los compuestos, composiciones, métodos y procesos de la invención, los siguientes términos tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario. Adicionalmente, como se usa en el presente documento, las formas en singular “un”, “una”, “el” y “la” incluyen las formas en plural correspondientes, a menos que el contexto de uso dicte claramente de otro modo. Los términos “que comprende”, “que incluye” y “que tiene” pretenden ser inclusivos y significa que puede haber elementos adicionales distintos de los elementos enumerados. Todos los números que expresan cantidades de ingredientes, propiedades tales como peso molecular, condiciones de reacción, etc., usados en el presente documento deben entenderse que están modificados en todos los casos por el término “aproximadamente”, a menos que se indique lo contrario. Por consiguiente, los números expuestos en el presente documento son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener por la presente invención. Al menos, y no como un intento por limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada número debe interpretarse al menos en vista de los dígitos significativos informados y aplicando técnicas de redondeo comunes.

Tanto la forma III como la forma IV son polimorfos cristalinos de base libre. Si se hace referencia a “una base libre cristalina de la invención”, se entiende que el término incluye solo la forma III.

Como se usa en el presente documento, la expresión “que tiene la fórmula” o “que tiene la estructura” no pretende ser limitante y se usa de la misma forma que comúnmente se usa el término “que comprende”.

El término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material que no es biológicamente o de otro modo inaceptable cuando se usa en la invención. Por ejemplo, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un material que puede incorporarse en una composición y administrarse a un paciente sin causar efectos biológicos inaceptables o interaccionar inaceptablemente con otros componentes de la composición. Tales materiales farmacéuticamente aceptables normalmente han cumplido los patrones requeridos de pruebas toxicológicas y de fabricación, e incluyen aquellos materiales identificados como principios inactivos adecuados por la Agencia Estadounidense del Medicamento.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un paciente en necesidad del mismo, es decir, la cantidad de fármaco necesaria para obtener el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar un trastorno pulmonar es una cantidad de compuesto necesaria para, por ejemplo, reducir, suprimir, eliminar o prevenir los síntomas del asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (“EPOC”), o para tratar la causa subyacente del asma o la EPOC. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz es que cantidad necesaria para producir broncodilatación. Por otra parte, el término “cantidad eficaz” significa una cantidad suficiente para obtener un resultado deseado, que puede no ser necesariamente un resultado terapéutico. Por ejemplo, cuando se estudia un sistema que comprende un receptor muscarínico, una “cantidad eficaz” puede ser la cantidad necesaria para antagonizar el receptor.

El término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en el presente documento, significa el tratar o tratamiento de una enfermedad o afección médica (tal como EPOC) en un paciente tal como un mamífero (particularmente un ser humano) que incluye: (a) prevenir que se produzca la enfermedad o afección médica, es decir, tratamiento profiláctico de un paciente; (b) mejorar la enfermedad o afección médica tal como eliminando o causando la regresión de la enfermedad o afección médica en un paciente; (c) suprimir la enfermedad o afección médica tal como ralentizar o detener el desarrollo de la enfermedad o afección médica en un paciente; o (d) aliviar los síntomas de la enfermedad o afección médica en un paciente. Por ejemplo, el término “tratar EPOC” incluiría prevenir que se produzca EPOC, mejorar EPOC, suprimir EPOC y aliviar los síntomas de EPOC. El término “paciente” pretende incluir aquellos mamíferos, tales como seres humanos, que están en necesidad de tratamiento o prevención de enfermedad o que actualmente están siendo tratados para la prevención de la enfermedad o tratamiento de una enfermedad específica o afección médica. El término “paciente” también incluye sujetos de prueba en los que los compuestos de la invención están siendo evaluados o sujetos de prueba que se usan en un ensayo, por ejemplo, un modelo animal.

Síntesis

La forma de base libre cristalina de la invención puede sintetizarse a partir de materiales de partida fácilmente disponibles como se describe más adelante y en los ejemplos. Aunque puede haber varios métodos que pueden usarse para producir cada forma de base libre cristalina, se observa, sin embargo, que el contenido cristalino,

además del hábito de los cristales (tamaño y forma), puede variar, basándose parcialmente en el método de preparación, además de en la composición del disolvente.

Se apreciará que aunque se facilitan condiciones de proceso específicas (es decir, temperaturas de cristalización, tiempos, relaciones molares de reactivos, disolventes, presiones, etc.), también pueden usarse otras condiciones de proceso, a menos que se establezca de otro modo. En algunos casos se realizaron reacciones o cristalizaciones a temperatura ambiente y no se tomó medición de temperatura real. Se entiende que la temperatura ambiente puede tomarse para significar una temperatura dentro del intervalo comúnmente asociado a la temperatura ambiente en un entorno de laboratorio, y normalmente estará en el intervalo de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 50 °C. En otros casos se realizaron reacciones o cristalizaciones a temperatura ambiente, y la temperatura se midió y registró en realidad. Todos los pesos, volúmenes y equivalentes son con respecto al material de partida éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (o forma de sal).

Generalmente, las cristalizaciones se realizan en un diluyente inerte o sistema de disolventes adecuado, ejemplos de los cuales incluyen, pero no se limitan a, metanol, etanol, isopropanol, isobutanol, acetato de etilo, acetonitrilo, diclorometano, metil *t*-butil éter, y similares, y mezclas de los mismos. Tras completarse cualquiera de las anteriores cristalizaciones, los compuestos cristalinos pueden aislarse de la mezcla de reacción por cualquier medio convencional tal como precipitación, concentración, centrifugación y similares.

El éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico, además de sus sales tales como la sal de difosfato, empleado en la invención puede prepararse fácilmente a partir de materiales de partida y reactivos comercialmente disponibles usando los procedimientos descritos en los ejemplos, o usando los procedimientos descritos en la publicación de patente de EE.UU. N° 2005/0203133 a Mammen et al. y la publicación de patente de EE.UU. N° 2007/0112027 a Axt et al.

Las relaciones molares descritas en los métodos de la invención pueden determinarse fácilmente por diversos métodos disponibles para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, tales relaciones molares pueden determinarse fácilmente por RMN ¹H. Alternativamente, pueden usarse análisis elemental y métodos de HPLC para determinar la relación molar.

Forma III

La base libre cristalina de la forma III del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico puede prepararse a partir del éster o la sal de difosfato del éster.

En una realización, la base libre cristalina de forma III se prepara poniendo en contacto el éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico con acetonitrilo. Normalmente, la relación de miligramos del éster con respecto a los mililitros totales de acetonitrilo es aproximadamente 100:1, añadiéndose el acetonitrilo en dos etapas. Generalmente, esta reacción se realiza mientras que se cicla repetidamente a través de un intervalo de temperatura de 0-40 °C. Los sólidos se aíslan entonces por filtración a vacío y se secan.

En otra realización, la base libre cristalina de la forma III se prepara usando un cristal semilla de la base libre cristalina de la forma III y la sal de difosfato del éster. Este método implica: a) formar un cristal semilla de la forma III de la base libre cristalina; b) disolver la sal de difosfato del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico en acetato de isopropilo y agua para formar una disolución; c) y añadir el cristal semilla a la disolución. Más específicamente, la sal de difosfato del éster (1 peso) se suspende en acetato de isopropilo (17,5 vol) y agua (10 vol) a 20 ± 3 °C bajo nitrógeno. La suspensión se calienta a 53 ± 3 °C y se añade NaOH 10 M (0,5 vol). La mezcla se agita a esa temperatura durante un tiempo corto, entonces las fases se separan y se elimina la fase acuosa básica. Se añade agua (5 vol) a la fase orgánica, y se agita. Las fases se separan y la fase acuosa se elimina. Se añade acetato de isopropilo (17,5 vol) y se recogen aproximadamente 10 volúmenes de destilado por destilación atmosférica. Esta etapa se repite con acetato de isopropilo adicional (10 vol). Después de la segunda destilación, la temperatura de la disolución transparente se reduce a 53 ± 3 °C, luego se siembra con una suspensión de la forma III de la base libre cristalina (0,005 peso; 0,5 % en peso) en acetato de isopropilo (0,08 vol). La suspensión resultante se agita a 53 ± 3 °C durante al menos 2 horas, luego se enfría a 10 ± 3 °C a una tasa de enfriamiento aproximada de 0,19 °C/min. La suspensión se agita a 10 ± 3 °C durante al menos 2 horas y luego se recoge por filtración. La torta de filtración resultante se lava con acetato de isopropilo (2 x 3 volúmenes) y entonces el producto se seca dando la base libre cristalina de la forma III.

Forma IV

La base libre cristalina de la forma IV puede prepararse usando un cristal semilla de la base libre cristalina de la forma III. Este método implica: a) formar un cristal semilla de la forma de base libre cristalina III; b) disolver la forma III de la base libre cristalina en acetonitrilo para formar una disolución; c) y añadir el cristal semilla a la disolución.

Normalmente, la relación de peso de semilla con respecto a éster está en el intervalo de aproximadamente 2:250. Normalmente, la relación de gramos de la forma III de la base libre cristalina con respecto a mililitros totales de acetonitrilo está dentro del intervalo de aproximadamente 2:10 a 3:30, siendo 2,5:16 un intervalo. El acetonitrilo se añade normalmente en varias alícuotas. Generalmente, esta reacción se realiza mientras que se cicla repetidamente a través de un intervalo de temperatura de 0-40 °C. Entonces se aíslan los sólidos por filtración a vacío y se secan.

Propiedades cristalinas

Como es muy conocido en el campo de la difracción de rayos X de polvo, las alturas de pico relativas de los espectros de difracción de rayos X de polvo (PXRD) dependen de varios factores referentes a la preparación de muestras y geometría del instrumento, mientras que las posiciones de picos son relativamente insensibles a los detalles experimentales. Se obtuvieron patrones de PXRD para la forma III y la forma IV de la base libre cristalina como se expone en el Ejemplo 5. Así, en una realización, el compuesto cristalino de la invención se caracteriza por un patrón de PXRD que tiene ciertas posiciones de picos.

Cada forma de base libre cristalina presenta un patrón de PXRD diferentes, pero con ciertos picos comunes. Ambas formas de base libre cristalina del éster 1-(2-([4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ilico del ácido bifenil-2-ilcarbámico se caracterizan por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ seleccionados de $6,6 \pm 0,1$, $13,1 \pm 0,1$, $18,6 \pm 0,1$, $19,7 \pm 0,1$ y $20,2 \pm 0,1$.

La forma III de la base libre cristalina se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ de $6,6 \pm 0,1$, $13,1 \pm 0,1$, $18,6 \pm 0,1$, $19,7 \pm 0,1$ y $20,2 \pm 0,1$; y adicionalmente caracterizada por tener cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados de $8,8 \pm 0,1$, $10,1 \pm 0,1$, $11,4 \pm 0,1$, $11,6 \pm 0,1$, $14,8 \pm 0,1$, $15,2 \pm 0,1$, $16,1 \pm 0,1$, $16,4 \pm 0,1$, $16,9 \pm 0,1$, $17,5 \pm 0,1$, $18,2 \pm 0,1$, $19,3 \pm 0,1$, $19,9 \pm 0,1$, $20,8 \pm 0,1$, $21,1 \pm 0,1$, $21,7 \pm 0,1$ y $22,3 \pm 0,1$. En otra realización, la forma III de la base libre cristalina se caracteriza por una difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ seleccionados de $6,6 \pm 0,1$, $11,4 \pm 0,1$, $13,1 \pm 0,1$, $16,1 \pm 0,1$, $17,5 \pm 0,1$, $18,2 \pm 0,1$, $18,6 \pm 0,1$, $19,3 \pm 0,1$, $19,7 \pm 0,1$, $19,9 \pm 0,1$, $20,2 \pm 0,1$, $20,8 \pm 0,1$, $21,1 \pm 0,1$, $21,7 \pm 0,1$ y $22,3 \pm 0,1$. En otra realización más, la forma III de la base libre cristalina se caracteriza por un patrón de PXRD en el que las posiciones de picos son sustancialmente según aquellas mostradas en la FIG. 1.

La forma IV de la base libre cristalina se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ de $6,6 \pm 0,1$, $13,1 \pm 0,1$, $18,6 \pm 0,1$, $19,7 \pm 0,1$ y $20,2 \pm 0,1$; y adicionalmente caracterizada por tener cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados de $10,6 \pm 0,1$, $15,0 \pm 0,1$, $16,0 \pm 0,1$, $17,3 \pm 0,1$, $17,7 \pm 0,1$, $20,9 \pm 0,1$, $21,4 \pm 0,1$, $22,6 \pm 0,1$, $24,6 \pm 0,1$ y $27,8 \pm 0,1$. En otra realización, la forma IV de la base libre cristalina se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ seleccionados de $6,6 \pm 0,1$, $13,1 \pm 0,1$, $15,0 \pm 0,1$, $17,3 \pm 0,1$, $17,7 \pm 0,1$, $18,6 \pm 0,1$, $19,7 \pm 0,1$, $20,2 \pm 0,1$, $20,9 \pm 0,1$, $21,4 \pm 0,1$ y $22,6 \pm 0,1$. En otra realización más, la forma IV de la base libre cristalina se caracteriza por un patrón de PXRD en el que las posiciones de picos son sustancialmente según aquellas mostradas en la FIG. 2.

En otra realización más, la base libre cristalina de la invención se caracteriza por un termograma de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los termogramas de DSC se obtuvieron como se expone en el Ejemplo 6. Los puntos de fusión informados en el presente documento se estiman basándose en la aparición del fundido registrada durante el análisis de DSC. Así, en una realización, el compuesto cristalino de la invención se caracteriza por su termógrafo de DSC. En una realización, la forma III de la base libre cristalina se caracteriza por un termógrafo de DSC que muestra una aparición del flujo de calor endotérmico a aproximadamente 123 °C y un punto de fusión de aproximadamente 125 °C, como se observa en la FIG. 4. La forma IV de la base libre cristalina se caracteriza por un termógrafo de DSC que muestra una aparición de flujo de calor endotérmico a aproximadamente 66 °C, una segunda aparición de flujo de calor endotérmico a aproximadamente 119 °C y un punto de fusión de aproximadamente 119 °C, como se observa en la FIG. 5.

Se realizó análisis termogravimétrico (TGA) en la forma de base libre cristalina de la invención como se describe en el Ejemplo 6. Así, en una realización, la base libre cristalina se caracteriza por su trazo de TGA. En una realización, la forma III de la base libre cristalina se caracteriza por el trazo de TGA representado en la FIG. 6. La forma IV de la base libre cristalina se caracteriza por el trazo de TGA representado en la FIG. 7.

Se realizó una evaluación de sorción gravimétrica de vapor (GVS) en la forma de base libre cristalina de la invención como se describe en el Ejemplo 7. Se ha demostrado que la forma de base libre cristalina de la invención tiene un perfil de sorción/desorción reversible con niveles aceptables de higrscopicidad. Por ejemplo, la forma III de la base libre cristalina mostró una captación de agua reversible de <2 % peso/peso entre el 0 y el 90 % de humedad relativa a 25 °C. Adicionalmente, se ha encontrado que la forma III de la base libre cristalina es estable tras la exposición a temperatura y humedad elevada.

Estas propiedades de la forma de base libre cristalina de la invención se ilustran adicionalmente en los ejemplos más adelante.

Utilidad

El compuesto de fórmula I posee actividad de antagonista de receptores muscarínicos y, por tanto, se espera que una forma de base libre cristalina del compuesto de fórmula I sea útil para tratar afecciones médicas mediadas por receptores muscarínicos, es decir, afecciones médicas que mejoran mediante el tratamiento con un antagonista de receptores muscarínicos. Tales afecciones médicas incluyen, a modo de ejemplo, trastornos pulmonares o enfermedades que incluyen aquellas asociadas a obstrucción reversible de las vías respiratorias tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (por ejemplo, bronquitis crónica y sibilante y enfisema), asma, fibrosis pulmonar, rinitis alérgica, rinorrea, y similares. Otras afecciones médicas que pueden tratarse con los antagonistas de receptores muscarínicos son trastornos de las vías genitourinarias tales como vejiga hiperactiva o hiperactividad del detrusor y sus síntomas; trastornos del tubo gastrointestinal tales como síndrome del intestino irritable, enfermedad diverticular, acalasia, trastornos de hipermotilidad gastrointestinal y diarrea; arritmias cardíacas tales como bradicardia sinusal; enfermedad de Parkinson; trastornos cognitivos tales como enfermedad de Alzheimer; dismenorrea; y similares.

Por consiguiente, en una realización, la invención encuentra utilidad en un compuesto I para su uso en un método de tratamiento de un trastorno pulmonar, comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma III de la base libre cristalina del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico. Cuando se usa para tratar un trastorno pulmonar, la base libre cristalina de la invención normalmente se administrará por inhalación en múltiples dosis por día, en una única dosis diaria o una única dosis semanal. Generalmente, la dosis para tratar un trastorno pulmonar oscilará de aproximadamente 10 µg/día a 200 µg/día.

Cuando se administra por inhalación, la base libre cristalina de la invención normalmente tendrá el efecto de producir broncodilatación. Por consiguiente, en otra realización, la invención encuentra utilidad en un compuesto I para su uso en un método de producir broncodilatación en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad productora de broncodilatación de la forma III de la base libre cristalina del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico. Generalmente, la dosis terapéuticamente eficaz para producir broncodilatación oscilará de aproximadamente 10 µg/día a 200 µg/día.

En una realización, la invención encuentra utilidad en un compuesto I para su uso en un método de tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma, comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma III de la base libre cristalina del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico. Cuando se usa para tratar EPOC o asma, la base libre cristalina de la invención normalmente se administrará por inhalación en múltiples dosis por día o en una única dosis diaria. Generalmente, la dosis para tratar EPOC o asma oscilará de aproximadamente 10 µg/día a 200 µg/día. Como se usa en el presente documento, EPOC incluye bronquitis obstructiva crónica y enfisema (véase, por ejemplo, Barnes, Chronic Obstructive Pulmonary Disease, New England Journal of Medicine 343:269-78 (2000)).

Cuando se usa para tratar un trastorno pulmonar, la base libre cristalina de la invención se administra opcionalmente en combinación con otros agentes terapéuticos. Por consiguiente, en una realización particular, las composiciones farmacéuticas y métodos de la invención comprenden además una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de β_2 -adrenoreceptor, un corticosteroide, un agente antiinflamatorio no esteroideo, o combinación de los mismos.

En otra realización, la base libre cristalina de la invención se usa para antagonizar un receptor muscarínico en un sistema biológico, y un mamífero en particular tal como ratones, ratas, cobayas, conejos, perros, cerdos, seres humano, etc. En esta realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de la base libre cristalina de la invención se administra al mamífero. Si se desea, los efectos de antagonizar el receptor muscarínico pueden entonces determinarse usando procedimientos y equipo convencionales.

Las propiedades y utilidad de la base libre cristalina de la invención, tales como la actividad antagonizante de receptores muscarínicos, pueden demostrarse usando diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, ensayos representativos se describen en más detalle en los siguientes ejemplos e incluyen, a modo de ilustración y no limitación, ensayos que miden la unión al receptor muscarínico hM₁, hM₂, hM₃, hM₄ y hM₅ (por ejemplo, como se describe en el Ensayo 1). Ensayos funcionales útiles para determinar la actividad antagonizante de receptores muscarínicos de una base libre cristalina de la invención incluyen, a modo de ilustración y no limitación, ensayos que miden los cambios mediados por ligando en adenosin monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, cambios mediados por ligando en la actividad de la enzima adenilil ciclasa (que sintetiza AMPC), cambios mediados por ligando en la incorporación de guanosin 5'-O-(γ -tio)trifosfato ([³⁵S]GTP γ S) en membranas aisladas mediante el intercambio catalizado por receptor de [³⁵S]GTP γ S por GDP, cambios mediados por ligando en iones calcio intracelulares libres (medidos, por ejemplo, con un lector de placas de obtención de imágenes asociado a fluorescencia o FLIPR[®] de Molecular Devices, Inc.), y similares. Ensayos a modo de ejemplo se describen en el Ensayo 2. Se espera que la base libre cristalina antagonice o disminuya la activación de receptores muscarínicos en cualquiera de los ensayos enumerados anteriormente, o ensayos de una naturaleza similar, y normalmente se usarán en estos estudios a una concentración que oscila de aproximadamente 0,1-100

nanomolar. Así, los ensayos anteriormente mencionados son útiles en determinar la utilidad terapéutica, por ejemplo, la actividad broncodilatadora, de una base libre cristalina de la invención.

Otras propiedades y utilidades de una base libre cristalina de la invención pueden demostrarse usando diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, la potencia *in vivo* de una base libre cristalina puede medirse en un modelo animal tal como el modelo de Einthoven. Brevemente, la actividad broncodilatadora de una base libre cristalina se evalúa en un animal anestesiado (el modelo de Einthoven), que usa presión de ventilación como medida sustituta de la resistencia de las vías respiratorias. Véanse, por ejemplo, Einthoven (1892) *Pfugers Arch.* 51:367-445; y Mohammed et al. (2000) *Pulm Pharmacol Ther.* 13(6):287-92, además del Ensayo 3 que describe un modelo de rata de Einthoven. Otro ensayo *in vivo* útil es el ensayo de rata antisialogogo (por ejemplo, como se describe en el Ensayo 4).

Composiciones farmacéuticas y formulaciones

Una base libre cristalina de la invención normalmente se administra a un paciente en forma de una composición farmacéutica o formulación. Tales composiciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente por cualquier vía de administración aceptable que incluye, pero no se limita a, modos inhalado, oral, nasal, tópico (incluyendo transdérmico) y parenteral de administración. Sin embargo, se entenderá por aquellos expertos en la materia que, una vez se ha formulado una base libre cristalina de la invención, ya no puede estar en forma cristalina, es decir, la base libre cristalina puede disolverse en un vehículo adecuado.

Por consiguiente, en una realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y la forma III de la base libre cristalina del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico. La composición farmacéutica puede contener otros agentes terapéuticos y/o de formulación, si se desea.

Las composiciones farmacéuticas de la invención normalmente contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de la base libre cristalina del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico, como agente activo. Normalmente, tales composiciones farmacéuticas contendrán de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 95 % en peso del agente activo; que incluye de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 30 % en peso; tal como de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 10 % en peso del agente activo.

Puede usarse cualquier vehículo o excipiente convencional en las composiciones farmacéuticas de la invención. La elección de un vehículo o excipiente particular, o combinación de vehículos o excipientes, dependerá del modo de administración que se usa para tratar un paciente particular o tipo de afección médica o estado de enfermedad. A este respecto, la preparación de una composición farmacéutica adecuada para un modo de administración particular está bien dentro del alcance de aquellos expertos en las técnicas farmacéuticas. Adicionalmente, los ingredientes para tales composiciones están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Sigma, P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178. A modo de ilustración adicional, técnicas de formulación convencionales se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); y H.C. Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ª Edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Ejemplos representativos de materiales que pueden servir de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de tampón fosfato; gases propulsores comprimidos tales como clorofluorocarbonos e hidrofluorocarbonos; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas de la invención normalmente se preparan mezclando o combinando minuciosamente la base libre cristalina con un vehículo farmacéuticamente aceptable y uno o más ingredientes opcionales. Si fuera necesario o se desea, la mezcla combinada uniformemente resultante puede entonces formarse o cargarse en comprimidos, cápsulas, píldoras, latas, cartuchos, dispensadores y similares usando procedimientos y equipo convencionales.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para administración inhalada. Composiciones farmacéuticas adecuadas para administración inhalada normalmente estarán en forma de un aerosol o un polvo. Tales composiciones se administran generalmente usando dispositivos de administración muy conocidos

tales como un inhalador nebulizador, un inhalador de dosis medida (MDI), un inhalador de polvo seco (DPI) o un dispositivo de administración similar.

En una realización específica de la invención, una composición farmacéutica que comprende el agente activo se administra por inhalación usando un inhalador nebulizador. Tales dispositivos nebulizadores normalmente producen una corriente de aire de alta velocidad que hace que la composición farmacéutica comprenda el agente activo a pulverizar como una niebla que es llevada a las vías respiratorias del paciente. Por consiguiente, cuando se formula para su uso en un inhalador nebulizador, el agente activo de base libre cristalina normalmente se disuelve en un vehículo adecuado para formar una disolución. Dispositivos nebulizadores adecuados incluyen el inhalador RespiMat® Soft Mist™ (Boehringer Ingelheim), el sistema de administración pulmonar AERx® (Aradigm Corp.), y el nebulizador reutilizable PARI LC Plus (Pari GmbH).

Una composición farmacéutica representativa para su uso en un inhalador nebulizador comprende una disolución acuosa isotónica que comprende de aproximadamente 0,05 µg/ml a aproximadamente 10 mg/ml de una base libre cristalina de la invención. En una realización, la formulación acuosa de nebulizador es isotónica. En una realización, una disolución tal tiene un pH de aproximadamente 4-6. En una realización particular, la formulación acuosa de nebulizador se tampona con tampón citrato a un pH de aproximadamente 5. En otra realización particular, la formulación acuosa contiene de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml de equivalentes de base libre de éster 1-(2-[[4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoyl]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico.

En otra realización específica de la invención, la composición farmacéutica que comprende el agente activo se administra por inhalación usando un DPI. Tales DPI normalmente administran el agente activo como un polvo fluido que se dispersa en una corriente de aire del paciente durante la inspiración. Con el fin de lograr un polvo fluido, el agente activo de base libre cristalina normalmente se formula con un excipiente adecuado tal como lactosa, almidón, manitol, dextrosa, ácido poliláctico, polilactida-co-glicolida, y combinaciones de los mismos. La micronización es un método común de reducción del tamaño de cristal de manera que sea adecuado para administración pulmonar. Normalmente, un agente activo de base libre cristalina se microniza y se combina con un vehículo adecuado para formar una suspensión de partículas micronizadas de tamaño respirable, en la que "partículas micronizadas" o "forma micronizada" significa que al menos aproximadamente el 90 % de las partículas tienen un diámetro inferior a aproximadamente 10 µm. También pueden usarse otros métodos de reducción del tamaño de partícula tales como molienda fina, picado, machacado, trituración, molienda, tamizado, trituración, pulverización, etc., en tanto que pueda obtenerse el tamaño de partícula deseado.

Una composición farmacéutica representativa para su uso en un DPI comprende lactosa seca que tiene un tamaño de partícula entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 100 µm y partículas micronizadas de una base libre cristalina de la invención. Una formulación en polvo seca tal puede prepararse, por ejemplo, combinando la lactosa con el agente activo de base libre cristalina y luego mezclando en seco los componentes. Alternativamente, si se desea, el agente activo de base libre cristalina puede formularse sin un excipiente. La composición farmacéutica se carga entonces normalmente en un dispensador de polvo seco, o en cartuchos de inhalación o cápsulas para su uso con un dispositivo de administración de polvo seco.

Ejemplos de dispositivos de administración de DPI incluyen Diskhaler (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.035.237 a Newell et al.); Diskus (GlaxoSmithKline; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 6.378.519 a Davies et al.); Turbuhaler (AstraZeneca, Wilmington, DE; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.524.769 a Wetterlin); Rotahaler (GlaxoSmithKline; véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 4.353.365 a Hallworth et al.) y Handihaler (Boehringer Ingelheim). Otros ejemplos de dispositivos DPI adecuados se describen en las patentes de EE.UU. Nº 5.415.162 a Casper et al., 5.239.993 a Evans, y 5.715.810 a Armstrong et al., y referencias citadas en su interior. Las divulgaciones de las patentes anteriormente mencionadas se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

En otra realización específica más de la invención, una composición farmacéutica que comprende un agente activo de base libre cristalina se administra por inhalación usando un MDI, que normalmente descarga una cantidad medida del agente activo usando gas propulsor comprimido. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas administradas usando un MDI normalmente comprenden una disolución o suspensión del agente activo de base libre cristalina en un propulsor licuado. Puede emplearse cualquier propulsor licuado adecuado que incluye 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 a cuestiones sobre clorofluorocarbonos que afectan la capa de ozono, generalmente se prefieren las formulaciones que contienen HFA. Componentes de HFA opcionales adicionales incluyen co-disolventes tales como etanol o pentano, y tensioactivos tales como trioleato de sorbitano, ácido oleico, lecitina y glicerina. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Nº 5.225.183 a Purewal et al., documento EP 0717987 A2 (Minnesota Mining and Manufacturing Company) y el documento WO 92/22286 (Minnesota Mining and Manufacturing Company, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Una composición farmacéutica representativa para su uso en un inhalador de dosis medida comprende de aproximadamente el 0,01 al 5 % en peso de un compuesto cristalino de base libre de la invención; de aproximadamente el 0 al 20 % en peso de etanol; y de aproximadamente el 0 al 5 % en peso de tensioactivo; siendo el resto un propulsor de HFA.

Tales composiciones normalmente se preparan añadiendo hidrofluoroalcano enfriado o presurizado a un recipiente adecuado que contiene el agente activo de base libre cristalina, etanol (si está presente) y el tensioactivo (si está presente). Para preparar una suspensión, el agente activo de base libre cristalina se microniza y a continuación se combina con el propulsor. La formulación se carga entonces en un bote de aerosol, que forma una porción de un dispositivo inhalador de dosis medida. Ejemplos de dispositivos inhaladores de dosis medida desarrollados específicamente para su uso con propulsores de HFA se describen en las patentes de EE.UU. N° 6.006.745 a Marecki y 6.143.277 a Ashurst et al. Alternativamente, puede prepararse una formulación en suspensión secando por pulverización un recubrimiento de tensioactivo sobre partículas micronizadas del agente activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 99/53901 (Glaxo Group Ltd.) y el documento WO 00/61108 (Glaxo Group Ltd.). Las divulgaciones de las patentes y publicaciones anteriormente mencionadas se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Para ejemplos adicionales de procesos de preparación de partículas respirables, y formulaciones y dispositivos adecuados para la dosificación por inhalación, véanse las patentes de EE.UU. N° 6.268.533 a Gao et al., 5.983.956 a Trofast; 5.874.063 a Briggner et al.; y 6.221.398 a Jakupovic et al.; y documento WO 99/55319 (Glaxo Group Ltd.) y el documento WO 00/30614 (AstraZeneca AB); cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para administración por vía oral. Composiciones farmacéuticas adecuadas para administración por vía oral pueden estar en forma de cápsulas, comprimidos, píldoras, pastillas para chupar, sellos, comprimidos recubiertos de azúcar, polvos, gránulos; o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite; o como un elixir o jarabe; y similares; conteniendo cada una una cantidad predeterminada de una base libre cristalina de la invención como principio activo. La composición farmacéutica puede envasarse en una forma de dosificación unitaria.

Cuando está prevista para administración por vía oral en una forma de dosificación sólida (es decir, como cápsulas, comprimidos, píldoras y similares), una composición farmacéutica de la invención normalmente comprenderá una base libre cristalina de la invención como principio activo y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio. Opcionalmente o alternativamente, tales formas de dosificación sólidas también pueden comprender: cargas o sustancias de relleno tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; humectantes tales como glicerol; agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y/o carbonato sódico; agentes retardantes de la disolución tales como parafina; aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes tales como alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerol; absorbentes tales como caolín y/o arcilla de bentonita; lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y/o mezclas de los mismos; agentes colorantes; y agentes de tamponamiento.

Agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes también pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares. Agentes de recubrimiento para comprimidos, cápsulas, píldoras, y similares, incluyen aquellos usados para recubrimientos entéricos tales como acetato-ftalato de celulosa (CAP), poli(acetato-ftalato de vinilo) (PVAP), ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, copolímeros de ácido metacrílico-éster del ácido metacrílico, acetato-trimelitato de celulosa (CAT), carboximetilcelulosa (CMEC), acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), y similares.

Si se desea, las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden formularse para proporcionar liberación lenta o controlada del principio activo usando, a modo de ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables; u otras matrices de polímero, liposomas y/o microesferas.

Además, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener opcionalmente opacificantes y pueden formularse de manera que liberen el principio activo solo, o preferencialmente, en una cierta porción del tubo gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Ejemplos de incorporación de composiciones que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo de base libre cristalina también puede estar en forma micro-encapsulada, si es apropiada, con uno o más de los excipientes anteriormente descritos.

Formas de dosificación líquidas adecuadas para administración por vía oral incluyen, a modo de ilustración, emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Tales formas de dosificación líquidas normalmente comprenden el principio activo y un diluyente inerte tal como, por ejemplo, agua u otros disolventes, solubilizantes 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 aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos. Las suspensiones, además del principio activo, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Una base libre cristalina de la invención también puede administrarse transdérmicamente usando sistemas de administración transdérmica y excipientes conocidos. Por ejemplo, la base libre cristalina puede mezclarse con potenciadores de la permeación tales como propilenglicol, monolaurato de polietilenglicol, azacicloalcan-2-onas y similares, e incorporarse en un parche o sistema de administración similar. Excipientes adicionales que incluyen gelificantes, emulsionantes y tampones pueden usarse en tales composiciones transdérmicas, si se desea.

Una base libre cristalina de la invención también puede co-administrarse con otros agentes terapéuticos. Esta terapia de combinación implica usar la base libre cristalina combinada con uno o más de estos agentes secundarios, tanto formulados juntos (por ejemplo, envasados juntos en una única formulación) como formulados por separado (por ejemplo, envasados como formas de dosificación unitaria separadas). Métodos de formulación de múltiples agentes juntos en la misma formulación o en formas de dosificación unitaria separadas son muy conocidos en la técnica. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada para la dosificación a un paciente, es decir, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de un compuesto de la invención calculada para producir el efecto terapéutico deseado tanto solo como en combinación con una o más unidades adicionales. Por ejemplo, tales formas de dosificación unitaria pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras y similares.

El (Los) agente(s) terapéutico(s) adicional(es) puede(n) seleccionarse de otros broncodilatadores (por ejemplo, inhibidores de PDE₃, moduladores de adenosina 2b y agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, agentes antiinflamatorios esteroideos tales como corticosteroides; agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) e inhibidores de PDE₄); otros antagonistas de receptores muscarínicos (es decir, agentes anticolinérgicos); agentes antiinfecciosos (por ejemplo, antibióticos Gram-positivos y Gram-negativos o antivirales); antihistamínicos; inhibidores de la proteasa; y bloqueantes de aferentes (por ejemplo, agonistas de D₂ y moduladores de neuroquinina).

Una realización particular de la invención se refiere a una composición que comprende (a) un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de una base libre cristalina de la invención; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente seleccionado de un agente antiinflamatorio esteroideo tal como un corticosteroide; un agonista de receptores β_2 -adrenérgicos; un inhibidor de la fosfodiesterasa-4; o una combinación de los mismos; en la que la base libre cristalina y el agente se formulan juntos o por separado. En otra realización, (b) es un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de receptores β_2 -adrenérgicos y un agente antiinflamatorio esteroideo. Los agentes secundarios pueden usarse en forma de sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, y si es apropiado, como estereoisómeros ópticamente puros.

Agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos representativos que pueden usarse en combinación con una base libre cristalina de la invención incluyen, pero no se limitan a, salmeterol, salbutamol, formoterol, salmefamol, fenoterol, terbutalina, albuterol, isoetarina, metaproterenol, bitolterol, pirbuterol, levalbuterol y similares, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Otros agonistas de receptores β_2 -adrenérgicos que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, 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 descritos en el documento WO 02/066422 (Glaxo Group Ltd.); 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 descritos en el documento WO 02/070490 (Glaxo Group Ltd.); 3-(4-[[6-((2R)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxietil)amino)hexil]oxi]butil)-bencenosulfonamida, 3-(4-[[6-((2S)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxietil)amino)hexil]oxi]butil)-bencenosulfonamida, 3-(4-[[6-((2R/S)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxietil)amino)hexil]oxi]butil)-bencenosulfonamida, *N*-(*t*-butil)-3-(4-[[6-((2R)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxietil)amino)hexil]-oxi]butil) bencenosulfonamida, *N*-(*terc*-butil)-3-(4-[[6-((2S)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxietil)amino)-hexil]oxi]butil)-bencenosulfonamida, *N*-(*terc*-butil)-3-(4-[[6-((2R/S)-2-[3-(formilamino)-4-hidroxifenil]-2-hidroxietil)amino)hexil]-oxi]butil)bencenosulfonamida y compuestos relacionados descritos en el documento WO 02/076933 (Glaxo Group Ltd.); 4-((1R)-2-[[6-2-[(2,6-diclorobencil)oxi]etoxi]hexil)amino]-1-hidroxietil)-2-(hidroximetil)fenol y compuestos relacionados descritos en el documento WO 03/024439 (Glaxo Group Ltd.); *N*-(2-[4-((R)-2-hidroxi-2-feniletilamino)fenil]etil)-((R)-2-hidroxi-2-(3-formamido-4-hidroxifenil)etilamina y compuestos relacionados descritos en la patente de EE.UU. N° 6.576.793 a Moran et al.; *N*-(2-[4-(3-fenil-4-metoxifenil)aminofenil]etil)-((R)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2-(1H)-quinolinon-5-il)etilamina y

compuestos relacionados descritos en la patente de EE.UU. N° 6.653.323 a Moran et al.; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En una realización particular, el agonista de β_2 -adrenoreceptores es una sal de monoclóhidrato cristalina de *N*-[2-[4-((*R*)-2-hidroxi-2-feniletilamino)fenil]etil]-(*R*)-2-hidroxi-2-(3-formamido-4-hidroxifenil)etilamina. Cuando se emplea, el agonista de β_2 -adrenoreceptores estará presente en la composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz. Normalmente, el agonista de β_2 -adrenoreceptores estará presente en una cantidad suficiente para proporcionar de aproximadamente 0,05 μ g a 500 μ g por dosis. Las divulgaciones de las patentes y publicaciones anteriormente mencionadas se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Agentes antiinflamatorios esteroideos representativos que pueden usarse en combinación con una base libre cristalina de la invención incluyen, pero no se limitan a, metilprednisolona, prednisolona, dexametasona, propionato de fluticasona, éster *S*-fluorometílico del ácido 6 α ,9 α -difluoro-17 α -[(2-furanilcarbonyl)oxi]-11 β -hidroxi-16 α -metil-3-oxoandrost-1,4-dieno-17 β -carbotoico, éster (2-oxo-tetrahidrofuran-3*S*-ílico) del ácido 6 α ,9 α -difluoro-11 β -hidroxi-16 α -metil-3-oxo-17 α -propionilo-1,4-dieno-17 β -carbotoico, ésteres de beclometasona (por ejemplo, el éster de 17-propionato o el éster de 17,21-dipropionato), budesonida, flunisolida, ésteres de mometasona (por ejemplo, el éster de furoato), acetónido de triamcinolona, rofleponida, ciclesonida, propionato de butixocort, RPR-106541, ST-126 y similares, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Cuando se emplean, el agente antiinflamatorio esteroideo estará presente en la composición en una cantidad terapéuticamente eficaz. Normalmente, el agente antiinflamatorio esteroideo estará presente en una cantidad suficiente para proporcionar de aproximadamente 0,05 μ g a 500 μ g por dosis.

Una combinación a modo de ejemplo es una base libre cristalina de la invención, co-administrada con salmeterol como el agonista de receptores β_2 -adrenérgicos, y propionato de fluticasona como el agente antiinflamatorio esteroideo. Otra combinación a modo de ejemplo es una base libre cristalina de la invención, co-administrada con una sal de monoclóhidrato cristalina de *N*-[2-[4-((*R*)-2-hidroxi-2-feniletilamino)fenil]etil]-(*R*)-2-hidroxi-2-(3-formamido-4-hidroxifenil)etilamina como el agonista de β_2 -adrenoreceptores, y éster *S*-fluorometílico del ácido 6 α ,9 α -difluoro-17 α -[(2-furanilcarbonyl)oxi]-11 β -hidroxi-16 α -metil-3-oxoandrost-1,4-dieno-17 β -carbotoico como el agente antiinflamatorio esteroideo. Como se observa anteriormente, estos agentes pueden formularse juntos o por separado.

Otras combinaciones adecuadas incluyen, por ejemplo, otros agentes antiinflamatorios, por ejemplo, AINE (por ejemplo, cromoglicato de sodio, nedocromil sódico e inhibidores de fosfodiesterasas (PDE) tales como teofilina, inhibidores de PDE4 e inhibidores mixtos de PDE3/PDE4); antagonistas de leucotrieno (por ejemplo, monteleucast); inhibidores de la síntesis del leucotrieno; inhibidores de iNOS; inhibidores de la proteasa tales como inhibidores de tripsina y de elastasa; antagonistas de integrina beta-2 y agonistas o antagonistas de receptores de adenosina (por ejemplo, agonistas de adenosina 2a); antagonistas de citocinas (por ejemplo, antagonistas de quimiocinas tales como un anticuerpo para interleucinas (anticuerpo α IL), específicamente, una terapia con α IL-4, una terapia con α IL-13, o una combinación de los mismos); o inhibidores de la síntesis de citocinas.

Inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (PDE4) o inhibidores mixtos de PDE3/PDE4 representativos que pueden usarse en combinación con una base libre cristalina de la invención incluyen, pero no se limitan a, ácido *cis*-4-ciano-4-(3-ciclopentilo-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico, 2-carbometoxi-4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexano-1-ona; *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexano-1-ol]; ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentilo-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico y similares, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Otros inhibidores de PDE4 o mixtos de PDE4/PDE3 representativos incluyen AWD-12-281 (elbion); NCS-613 (INSERM); D-4418 (Chiroscience y Schering-Plough); CI-1018 o PD-168787 (Pfizer); compuestos de benzodioxol descritos en el documento WO99/16766 (Kyowa Hakko); K-34 (Kyowa Hakko); V-11294A (Napp); roflumilast (Byk-Gulden); compuestos de ftalazinona descritos en el documento WO99/47505 (Byk-Gulden); pumafentrina (Byk-Gulden, ahora Altana); arofilina (Almirall-Prodesfarma); VM554/UM565 (Vernalis); T-440 (Tanabe Seiyaku); y T2585 (Tanabe Seiyaku).

Antagonistas muscarínicos representativos (es decir, agentes anticolinérgicos) que pueden usarse en combinación con una base libre cristalina de la invención incluyen, pero no se limitan a, atropina, sulfato de atropina, óxido de atropina, nitrato de metilatropina, bromhidrato de homatropina, bromhidrato de hiosciamina (*d, l*), bromhidrato de escopolamina, bromuro de ipratropio, bromuro de oxitropio, bromuro de tiotropio, metantelina, bromuro de propantelina, metilbromuro de anisotropina, bromuro de clidinio, copirilato (Robinul), yoduro de isopropamida, bromuro de mepenzolato, cloruro de tridihexetilo (Pathilone), metilsulfato de hexociclo, clorhidrato de ciclopentolato, tropicamida, clorhidrato de trihexifenidilo, pirenzepina, telenzepina, AF-DX 116 y metocitramina y similares, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; o, para aquellos compuestos enumerados como una sal, sal farmacéuticamente aceptable alternativa de los mismos.

Antihistamínicos representativos (es decir, antagonistas de receptores H_1) que pueden usarse en combinación con una base libre cristalina de la invención incluyen, pero no se limitan a, etanolaminas tales como maleato de carbinoxamina, fumarato de clemastina, clorhidrato y dimenhidrinato de difenilhidramina; etilendiaminas tales como maleato de pirilamina, clorhidrato de tripelenamina y citrato de tripelenamina; alquilaminas tales como clorfeniramina y acrivastina; piperazinas tales como clorhidrato de hidroxizina, pamoato de hidroxizina, clorhidrato de ciclizina, lactato de ciclizina, clorhidrato de meclizina y clorhidrato de cetirizina; piperidinas tales como astemizol, clorhidrato

de levocabastina, loratadina o su análogo de descarboetoxi, clorhidrato de terfenadina y de fexofenadina; clorhidrato de azelastina; y similares, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; o, para aquellos compuestos enumerados como una sal, sal farmacéuticamente aceptable alternativa de los mismos.

- 5 A menos que se indique lo contrario, dosis adecuadas a modo de ejemplo para los otros agentes terapéuticos administrados en combinación con una base libre cristalina de la invención están en el intervalo de aproximadamente 0,05 µg/día a 100 mg/día.

- 10 Las siguientes formulaciones ilustran composiciones farmacéuticas representativas de la invención, además de métodos de preparación a modo de ejemplo. Uno o más agentes secundarios pueden opcionalmente formularse con una base libre cristalina de la invención (agente activo primario). Alternativamente, el (los) agente(s) secundario(s) puede(n) formularse por separado y co-administrarse con el agente activo primario, tanto simultáneamente como secuencialmente. Por ejemplo, en una realización, una formulación en polvo seca unitaria puede fabricarse para incluir tanto la base libre cristalina de la invención como uno o más agentes secundarios. En otra realización, una
15 formulación se fabrica para contener la base libre cristalina de la invención y se fabrican formulación (formulaciones) separada(s) que contiene(n) el (los) agente(s) secundario(s). Tales formulaciones en polvo seco pueden entonces envasarse en envases alveolados separados y administrarse con un dispositivo DPI individual.

20 *Formulación en polvo seco a modo de ejemplo para administración por inhalación*

Se micronizan 0,2 mg de una base libre cristalina de la invención y luego se combinan con 25 mg de lactosa. La mezcla combinada se carga entonces en un cartucho de inhalación de gelatina. El contenido del cartucho se administra usando un inhalador de polvo.

25 *Formulación en polvo seco a modo de ejemplo para administración por un inhalador de polvo seco*

Se prepara un polvo seco que tiene una relación de formulación a granel de base libre cristalina micronizada de la invención (agente activo) con respecto a lactosa de 1:200. El polvo se envasa en un dispositivo de inhalación de polvo seco capaz de administrar entre aproximadamente 10 µg y 100 µg de agente activo por dosis.

30 *Formulaciones a modo de ejemplo para administración por un inhalador de dosis medida*

Se prepara una suspensión que contiene 5 % en peso de una base libre cristalina de la invención (agente activo) y 0,1 % en peso de lecitina dispersando 10 g de la base libre cristalina como partículas micronizadas con un tamaño medio inferior a 10 µm en una disolución formada a partir 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 dando partículas que tienen un diámetro medio inferior a 1,5 µm. Las partículas se cargan en cartuchos con 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado.

- 40 Alternativamente, se prepara una suspensión que contiene 5 % en peso de una base libre cristalina de la invención, 0,5 % en peso de lecitina y 0,5 % en peso de trehalosa dispersando 5 g de la base libre cristalina como partículas micronizadas con un tamaño medio inferior a 10 µm en una disolución coloidal formada a partir 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 dando partículas que tienen un diámetro medio inferior a 1,5 µm. Las partículas se
45 cargan en botes con 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado.

Formulación en aerosol acuosa a modo de ejemplo para administración por nebulizador

- 50 Se prepara una composición farmacéutica disolviendo 0,5 mg de una base libre cristalina de la invención (agente activo) en 1 ml de una disolución al 0,9 % de cloruro sódico acidificado con ácido cítrico. La mezcla se agita y se sónica hasta que el agente activo se disuelve. El pH de la disolución se ajusta a un valor en el intervalo de 3 a 8 (normalmente aproximadamente 5) por la lenta adición de NaOH.

55 *Formulación de cápsula de gelatina dura a modo de ejemplo para administración por vía oral*

Los siguientes ingredientes se combinan minuciosamente y luego se cargan en una cápsula de gelatina dura: 250 mg de una base libre cristalina de la invención, 200 mg de lactosa (secada por pulverización) y 10 mg de estearato de magnesio, durante un total de 460 mg de composición por cápsula.

60 *Formulación en suspensión a modo de ejemplo para administración por vía oral*

Se mezclan los siguientes ingredientes para formar una suspensión que contiene 100 mg de principio activo por 10 ml de suspensión.

65

Ingredientes	Cantidad
una base libre cristalina de la invención	1,0 g
ácido fumárico	0,5 g
cloruro sódico	2,0 g
metilparabeno	0,15 g
propilparabeno	0,05 g
azúcar granulada	25,5 g
sorbitol (disolución al 70 %)	12,85 g
Veegum k (Vanderbilt Co.)	1,0 g
aromatizante	0,035 ml
colorantes	0,5 mg
agua destilada	c.s.p. hasta 100 ml

Formulación inyectable a modo de ejemplo

- 5 Se combinan los siguientes ingredientes y el pH se ajusta a $4 \pm 0,5$ usando HCl 0,5 N o NaOH 0,5 N.

Ingredientes	Cantidad
una base libre cristalina de la invención	0,2 g
disolución de tampón acetato sódico (0,4 M)	2,0 ml
HCl (0,5 N) o NaOH (0,5 N)	c.s.p. hasta pH 4
agua (destilada, estéril)	c.s.p. hasta 20 ml

EJEMPLOS

- 10 Las siguientes preparaciones y ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones específicas de la invención. Estas realizaciones específicas, sin embargo, no pretenden limitar el alcance de la invención de ningún modo, a menos que se indique específicamente. Las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario, y cualquier otra abreviatura usada en el presente documento y no definida tiene su significado estándar:

15	AC	adenilil ciclasa
	BSA	albúmina de suero bovino
	AMP _c	3'-5' adenosin monofosfato cíclico
	CHO	ovario de hámster chino
20	cM ₅	receptor M5 de chimpancé clonado
	DCM	diclorometano
	dPBS	solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
	EDTA	ácido etilendiaminetetraacético
	EtOAc	acetato de etilo
25	FBS	suero bovino fetal
	FLIPR	lector de placas de obtención de imágenes fluorométrica
	HBSS	disolución salina tamponada con Hank
	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
	hM ₁	receptor M1 humano clonado
30	hM ₂	receptor M2 humano clonado
	hM ₃	receptor M3 humano clonado
	hM ₄	receptor M4 humano clonado
	hM ₅	receptor M5 humano clonado
	HOBT	N-hidroxibenzotriazol
35	HPLC	cromatografía de líquidos de alta resolución
	MCh	metilcolina
	MeCN	acetonitrilo

- 40 Cualquier otra abreviatura usada en el presente documento, pero no definida, tiene su significado estándar generalmente aceptado. A menos que se indique de otro modo, los reactivos, materiales de partida y disolventes se compraron de proveedores comerciales (tales como Sigma-Aldrich, Fluka, y similares) y se usaron sin más purificación.

Preparación 1

- 45 Éster 1-(2-([4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ilico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico

Se disolvió la sal de difosfato del éster 1-(2-([4-(4-carbamoylpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ilico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (16 g) en una mezcla bifásica de agua (100 ml) y EtOAc (200 ml). Se añadió NaOH (2

N, 75 ml) durante un periodo de 5 minutos. La mezcla se agitó entonces durante 30 minutos. Las fases se separaron y la fase acuosa se extrajo con EtOAc (200 ml). Las fases orgánicas combinadas se concentraron. Se añadió DCM (100 ml), y la mezcla se evaporó a sequedad. Los sólidos se secaron en un horno durante aproximadamente 48 horas dando el compuesto del título (9,6 g).

EJEMPLO 1

Base libre cristalina del éster 1-(2-([4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (forma III)

Se disolvió éster 1-(2-([4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (102,4 mg) en MeCN (500 µl). La disolución se agitó a temperatura ambiente durante 80 minutos y se formó un precipitado sólido blanco. La mezcla se dispuso en un bloque agitador para someterse a ciclos térmicos (0-40 °C en bloques de una hora) durante 48 horas. Se observó un sólido inmóvil denso blanco. Se añadió MeCN (500 µl) para movilizar la suspensión. La mezcla se dispuso de nuevo en el bloque agitador durante 2 horas. Los sólidos se aislaron por filtración a vacío usando un embudo de sinterización, luego se dispusieron en la secadora de pistón a 40 °C bajo vacío completo durante 15,5 horas, dando 76,85 mg del compuesto cristalino del título.

EJEMPLO 2

Base libre cristalina del éster 1-(2-([4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (forma III)

Se suspendió la sal de difosfato del éster 1-(2-([4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico ($C_{35}H_{43}N_5O_4 \cdot 2H_3PO_4$; MW 793,75; 632,9 g) en acetato de isopropilo (11,08 l) y agua (6,33 l) a temperatura ambiente bajo nitrógeno. La suspensión se calentó hasta 53 ± 3 °C y se añadió NaOH 10 M (317 ml) a la mezcla con agitación, mientras que se mantenía la temperatura de la mezcla por encima de 50 °C. La mezcla se agitó durante aproximadamente 5 minutos a 53 ± 3 °C antes de permitir que las fases sedimentaran. A continuación, las fases se separaron y la fase acuosa se eliminó. Se añadió agua (3,16 l) a la fase orgánica mientras que se mantenía la temperatura de la mezcla por encima de 50 °C. La mezcla se agitó durante 5 minutos a 53 ± 3 °C antes de permitir que las fases sedimentaran. Las fases se separaron y la fase acuosa se eliminó. Se añadió acetato de isopropilo (6,33 l) y entonces se recogieron aproximadamente 10 volúmenes de destilado por destilación atmosférica. Esta etapa se repitió con acetato de isopropilo adicional (3,2 l). Después de la segunda destilación, la temperatura de la disolución transparente se redujo a 53 ± 3 °C, luego se sembró con una suspensión de la base libre cristalina del éster 1-(2-([4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (forma III; 3,2 g) en acetato de isopropilo (51 ml). La suspensión resultante se agitó a 53 ± 3 °C durante 2 horas, a continuación se enfrió a 10 ± 3 °C durante 4 horas. La suspensión se agitó a 10 ± 3 °C durante al menos 2 horas y a continuación los sólidos se recogieron por filtración. La torta de filtración resultante se lavó con acetato de isopropilo (2 x 1,9 l) y el producto se secó a vacío a 50 °C dando el compuesto cristalino del título ($C_{35}H_{43}N_5O_4$; MW 597,76; 382,5 g, rendimiento del 80,3 %).

EJEMPLO 3

Recristalización de la base libre cristalina del éster 1-(2-([4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (forma III)

Se suspendió base libre cristalina del éster 1-(2-([4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (forma III; $C_{35}H_{43}N_5O_4$; MW 597,76; 372,5 g) en tolueno (5,6 l) a 20 ± 3 °C bajo nitrógeno. La suspensión se calentó hasta 82 ± 3 °C, y se mantuvo a esta temperatura hasta que se observó disolución completa. La disolución se clarificó entonces en el recipiente cristalizador, seguido de aclarado con tolueno (373 µl). Los sólidos se observaron en el recipiente cristalizador, y el recipiente se volvió a calentar a 82 ± 3 °C para efectuar la disolución, luego se enfrió a 58 ± 3 °C y se sembró con una base libre cristalina previamente sonicada (aproximadamente 1 minuto) (forma III; 1,9 g) en tolueno (8 µl). La suspensión resultante se dejó reposar a 58 ± 3 °C durante al menos 4 horas, luego se enfrió a 20 ± 3 °C durante 2 horas (tasa de enfriamiento aproximada de 0,33 °C/min). La suspensión se agitó a 20 ± 3 °C durante al menos 1 hora, a continuación los sólidos se recogieron por filtración. La torta de filtración resultante se lavó con tolueno (2 x 1,2 l) y el producto se secó a vacío a 52 ± 3 °C dando el compuesto cristalino del título (345,3 g, rendimiento del 92,7 %).

EJEMPLO 4 (no parte de la invención)

Base libre cristalina del éster 1-(2-([4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (forma IV)

Se disolvió el éster 1-(2-([4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino)etil)piperidin-4-ílico del ácido bifeníl-2-ilcarbámico (preparado como se describe en la Preparación 1; 2,5 g) en MeCN (10 ml) dando un material amarillo pálido aceitoso viscoso. Se añadió MeCN adicional (5 ml) para diluir el material. La disolución se sembró con base libre cristalina (20 mg; forma III preparada como se describe en el Ejemplo 1) y se agitó a temperatura ambiente

durante 90 minutos. Se observó una gran cantidad de precipitado blanco (cristales pequeños). La suspensión se analizó bajo un microscopio óptico polarizado y se encontró que era birrefringente.

Se añadió MeCN adicional (3 ml) y la suspensión se dispuso en un bloque Metz Syn10 para someter a ciclos térmicos (0-40 °C en bloques de una hora) a 800 rpm durante la noche. Metz Syn10 es una estación de reacción paralela de 10 posiciones que es estática. La agitación de la disolución/suspensión fue por una barra de agitador magnético en cruz. El bloque agitador fue una pieza separada del equipo que se calentó y se enfrió por un baño Julabo externo. El material se sacó a 0 °C. Se observó que la suspensión había sedimentado, dejando una disolución amarilla pálida encima del precipitado blanco. La suspensión se agitó y se dispuso de nuevo en el bloque agitador para someterla a ciclos térmicos. El material se sacó a 40 °C, y se agitó a una alta tasa de agitación a temperatura ambiente durante 80 minutos. La suspensión se analizó de nuevo y se encontró que era birrefringente. La torta de filtración se aisló por filtración a vacío usando un embudo de sinterización. Se usó MeCN (3 ml) para humedecer el papel de filtro y la torta de filtración se lavó con MeCN antes de la filtración. La torta se deshidrató a vacío durante 40 minutos dando 2,3 g de un polvo blanco a reflujo. El material se dispuso en una secadora de pistón a 40 °C durante 65 horas, dando 2,2 g del compuesto cristalino del título como un polvo blanco (pureza del 99,6 %).

La mayoría de los espectros de Raman del producto estuvieron de acuerdo con el del material de partida de la forma III. Sin embargo, se observaron tres desplazamientos:

Forma III	Producto
878 cm ⁻¹	881 cm ⁻¹
775 cm ⁻¹	772 cm ⁻¹
485 cm ⁻¹	488 cm ⁻¹

El producto se analizó entonces por difracción de rayos X de polvo, calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico. Se determinó que el producto era una base libre cristalina diferente del material de partida de la forma III, y se designó la forma IV.

EJEMPLO 5

Difracción de rayos X de polvo

Se adquirieron patrones de difracción de rayos X de polvo (PXRD) de las formas III de la base libre cristalina (del Ejemplo 1) y IV (del Ejemplo 4) en un difractómetro de polvo PANalytical X'Pert Pro, equipado con un detector X'Celerator. Las condiciones de adquisición fueron radiación: K α de Cu; tensión del generador: 40 kV; corriente del generador: 45 mA; ángulo inicial 2,0° 2 θ ; ángulo final 40,0° 2 θ ; tamaño de etapa: 0,0167° 2 θ . El tiempo por etapa fue 31,750 segundos. La muestra se preparó montando algunos miligramos de muestra sobre una placa de oblea de sílice (ruido de fondo cero), produciendo una delgada capa de polvo.

Las posiciones de picos características y separaciones d calculadas se resumen a continuación, informando solo aquellos picos con más del 14 % de intensidad relativa. Éstos se calcularon a partir de los datos sin procesar usando el software Highscore. El error experimental en las posiciones de picos es aproximadamente $\pm 0,1^\circ$ 2 θ . Las intensidades de picos relativas variarán debido a la orientación preferida.

Forma III			Forma IV		
Pos. [° 2 Th]	Separación d [Å]	Int. rel. [%]	Pos. [° 2 Th]	Separación d [Å]	Int. rel. [%]
6,6	13,5	53,8	6,6	13,4	27,1
8,8	10,1	14,8	10,6	8,4	13,7
10,1	8,8	14,1	13,1	6,8	42,0
11,4	7,8	21,7	15,0	5,9	58,4
11,6	7,6	14,7	16,0	5,5	15,0
13,1	6,8	29,3	17,3	5,1	41,2
14,8	6,0	15,2	17,7	5,0	45,6
15,2	5,8	15,8	18,6	4,8	100,0
16,1	5,5	30,1	19,7	4,5	81,2

(continuación)

Forma III			Forma IV		
Pos. [° 2 Th]	Separación d [Å]	Int. rel. [%]	Pos. [° 2 Th]	Separación d [Å]	Int. rel. [%]
16,4	5,4	13,9	20,2	4,4	29,7
16,9	5,2	13,8	20,9	4,2	34,8
17,5	5,1	25,5	21,4	4,1	74,8
18,2	4,9	38,4	22,6	3,9	34,3
18,6	4,8	23,6	24,6	3,6	18,1

19,3	4,6	23,1	27,8	3,2	16,1
19,7	4,5	100,0			
19,9	4,5	73,5			
20,2	4,4	22,8			
20,8	4,3	72,7			
21,1	4,2	51,5			
21,7	4,1	21,7			
22,3	4,0	31,0			

Un patrón de PXRD representativo para la forma III de la base libre cristalina se muestra en la FIG. 1. Un patrón de PXRD representativo para la forma IV de la base libre cristalina se muestra en la FIG. 2.

5 EJEMPLO 6

Análisis térmico

Se obtuvieron termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de las formas III de la base libre cristalina (del Ejemplo 1) y IV (del Ejemplo 4) usando un calorímetro de TA Instruments. Las muestras se pesaron en un platillo de aluminio, se colocó una tapa de platillo encima y se plegó ligeramente sin sellar el platillo. Los experimentos se realizaron usando una tasa de calentamiento de 10 °C/min.

Un termógrafo de DSC representativo para la forma III de la base libre cristalina se muestra en la FIG. 4. El termógrafo de DSC demuestra que la forma III se caracteriza por un termógrafo de DSC que muestra una aparición de flujo de calor endotérmico a 123,1 °C (entalpía 67,7 J/g).

Un termógrafo de DSC representativo para la forma IV de la base libre cristalina se muestra en la FIG. 5. El termógrafo de DSC demuestra que la forma IV se caracteriza por un termógrafo de DSC que muestra una pequeña endoterma y una endoterma principal, es decir, una pequeña primera aparición de flujo de calor endotérmico que se produce a 65,6 °C (entalpía 0,8 J/g) y una segunda aparición principal de flujo de calor endotérmico que se produce a 118,8 °C (entalpía 66,8 J/g).

Se obtuvieron datos de análisis termogravimétrico (TGA) usando un instrumento Q500 de TA Instruments. Las muestras se calentaron en un platillo de aluminio abierto a una tasa de calentamiento de 10 °C/min a 200 °C.

Un trazo de TGA representativo para la forma III de la base libre cristalina se muestra en la FIG. 6, e indica que se observó pérdida de peso despreciable antes de la degradación de la muestra. Un trazo de TGA representativo para la forma IV de la base libre cristalina se muestra en la FIG. 7, e indica que se observó aproximadamente el 0,3 % de pérdida de peso antes del fundido de la muestra, que está de acuerdo con la pérdida de disolvente residual.

EJEMPLO 7

Evaluación de la sorción gravimétrica de vapor

Se realizaron estudios de sorción gravimétrica de vapor (GVS) usando un instrumento DVS-1 de Surface Measurements System para la generación de isoterma de absorción completa usando perfusión de vapor de agua a 25 °C. Se dispuso un tamaño de muestra de aproximadamente 7 mg en un platillo de malla de muestra tarado limpio y seco y se pesó usando la balanza interna. Los intervalos de humedad relativa (HR) objetivo fueron del 30 % al 90 %, luego del 90 % al 0 % y del 0 % al 30 % con etapas del 10 %. El punto de equilibrio se determinó automáticamente usando un establecimiento de asíntota de 0,02 dm/dt.

Los estudios de GVS en una muestra de la forma III de la base libre cristalina realizados a 25 °C demostraron que el material tuvo una baja propensión a captar humedad durante el intervalo del 0 % de HR al 90 % de HR. La muestra mostró una captación de agua reversible de <2 % en peso/peso entre el 0 y el 90 % de HR a 25 °C. Este trazo de GVS demuestra que la forma III tiene un aumento de peso aceptable cuando se expone a un amplio intervalo de humedad.

EJEMPLO 8

Micronización

Las muestras de la forma III de la base libre cristalina se micronizaron usando tanto un micronizador APTM 4" como el tamaño de partícula determinado por difracción de luz láser.

Cantidad de material cristalino		Tamaño de partícula del material micronizado (µm)		
entrada (g)	rendimiento (g)	X ₁₀	X ₅₀	X ₉₀
60,11	50,73	1,27	2,69	5,25

Por referencia, el tamaño de partícula de la forma III de la base libre cristalina de entrada fue X₁₀=5,58 µm, X₅₀=18,2 µm y X₉₀=49,7 µm. La micronización dio partículas en el intervalo de tamaño respirable. La micronización produjo una reducción en la cristalinidad, pero retuvo las características esenciales del material previamente micronizado. No se observaron cambios en el PXRD después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C/20 % de humedad relativa, a 40 °C/75 % de humedad relativa (sin tapar) y a 50 °C/humedad ambiente.

El termógrafo de DSC para la forma III de la base libre cristalina mostró una fusión brusca a 125 °C, antes y después de la micronización. Hubo un pequeño acontecimiento térmico adicional en el material micronizado a 87 °C, probablemente debido a la cristalización. Después del almacenamiento durante 3 meses a 40 °C/20 % de HR, 40 °C/75 % de HR desnudo y 50 °C/ humedad ambiente, el material micronizado mostró una fusión brusca a 125 °C sin evidencia de contenido amorfo.

EJEMPLO 9

Compatibilidad de lactosa

Se evaluaron dos formulaciones de la forma III de la base libre cristalina en cuanto a la estabilidad durante 3 meses a 40 °C/20 % de humedad relativa (HR), a 40 °C/75 % de HR (sin tapar) y a 50 °C/humedad ambiente. Se prepararon formulaciones de 0,08 % en peso/peso (dosis de DPI de 10 µg) y 2 % en peso/peso (dosis de DPI de 250 µg) como una mezcla con lactosa sola, o con lactosa y 1 % en peso/peso de estearato de magnesio. Se encontró que la estabilidad de todas las formulaciones era aceptable.

EJEMPLO 10

Solubilidad y estabilidad a pH

La forma III de la base libre cristalina muestra solubilidad (superior a aproximadamente 2 mg/ml) en medio de hasta pH 7. La solubilidad en agua es 0,66 mg/ml con un pH natural de 8,9. La solubilidad en líquido de pulmón simulado es 0,46 mg/ml sin cambio observado entre las mediciones de solubilidad de 4 horas y de 24 horas.

Las disoluciones de la forma III de la base libre cristalina son estables en tampones a pH 4 y pH 6 durante hasta 7 días a 50 °C o expuestas a la luz. Las disoluciones son estables en agua y solución salina durante 7 días a temperatura ambiente, protegidas de la luz.

ENSAYO 1

Ensayo de unión a radioligando

Preparación de membranas a partir de células que expresan los subtipos de receptor muscarínico hM₁, hM₂, hM₃ y hM₄

Se cultivaron líneas celulares CHO que expresan establemente los subtipos de receptores muscarínicos hM₁, hM₂, hM₃ y hM₄ humanos clonados, respectivamente, a casi confluencia en medio que consistía en HAM's F-12 complementado con 10 % de FBS y 250 µg/ml de geneticina. Las células se cultivaron en una estufa de incubación de 5 % de CO₂, 37 °C, y se elevaron con EDTA 2 mM en dPBS. Las células se recogieron por centrifugación de 5 minutos a 650 x g, y los sedimentos de células tanto se almacenaron congelados a -80 °C como se prepararon membranas inmediatamente. Para la preparación de membranas, se resuspendieron sedimentos de células en tampón de lisis y se homogeneizaron con un disruptor de tejido Polytron PT-2100 (Kinematica AG; 20 segundos x 2 ráfagas). Las membranas en bruto se centrifugaron a 40.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. El sedimento de membranas se resuspendió entonces con tampón de resuspensión y se homogeneizó de nuevo con el disruptor de tejido Polytron. La concentración de proteína de la suspensión de membrana se determinó por el método descrito en Lowry, O. et al., Journal of Biochemistry 193:265 (1951). Todas las membranas se almacenaron congeladas en alícuotas a -80 °C o se usaron inmediatamente. Las alícuotas de membranas de receptor hM₅ preparadas se compraron directamente de Perkin Elmer y se guardaron a -80 °C hasta uso.

Ensayo de unión a radioligando sobre los subtipos de receptor muscarínico hM₁, hM₂, hM₃, hM₄ y hM₅

Se realizaron ensayos de unión a radioligando en placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen de ensayo total de 1000 µl. Se diluyeron membranas de células CHO que expresan establemente tanto el subtipo muscarínico hM₁, hM₂, hM₃, hM₄ como hM₅ en tampón de ensayo a las siguientes concentraciones objetivo específicas de

proteína ($\mu\text{g/pocillo}$): 10 μg para hM_1 , 10-15 μg para hM_2 , 10-20 μg para hM_3 , 10-20 μg para hM_4 , y 10-12 μg para hM_5 . Las membranas se homogeneizaron brevemente usando un disruptor de tejido Polytron (10 segundos) antes de ensayar la adición a placa. Se realizaron estudios de unión de saturación para determinar los valores de K_D del radioligando usando cloruro de metilo de L-[N-metil- ^3H]escopolamina ($[\text{}^3\text{H}]\text{-NMS}$) (TRK666, 84,0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra) a concentraciones que oscilaban de 0,001 nM a 20 nM. Los ensayos de desplazamiento para la determinación de valores de K_i de compuestos de prueba se realizaron con $[\text{}^3\text{H}]\text{-NMS}$ a 1 nM y once concentraciones de compuestos de prueba diferentes. Los compuestos de prueba se disolvieron inicialmente a una concentración de 40 μM en tampón de dilución y a continuación se diluyeron en serie 5x con tampón de dilución a concentraciones finales que oscilaron de 400 fM a 4 μM . El orden de adición y volúmenes a las placas de ensayo fueron los siguientes: 825 μl de tampón de ensayo con 0,1 % de BSA, 25 μl de radioligando, 100 μl de compuesto de prueba diluido y 50 μl de membranas. Las placas de ensayo se incubaron durante 6 horas a 37 °C. Las reacciones de unión se terminaron por filtración rápida sobre placas de filtro de fibra de vidrio GF/B (Perkin Elmer Inc., Wellesley, MA) previamente tratadas en 0,3 % de polietilenimina (PEI). Las placas de filtro se aclararon tres veces con tampón de lavado (HEPES 10 mM) para eliminar la radiactividad no unida. Entonces, las placas se secaron al aire y se añadieron 50 μl de líquido de centelleo Microscint-20 (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) a cada pocillo. A continuación, las placas se contaron en un contador de centelleo líquido PerkinElmer Topcount (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA). Los datos de unión se analizaron por análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) usando el modelo de competición de un sitio. Los valores de K_i para los compuestos de prueba se calcularon a partir de valores de CI_{50} observados y el valor de K_D del radioligando usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y; Prusoff W.H. *Biochemical Pharmacology* 22(23):3099-108 (1973)). Los valores de K_i se convirtieron en valores de pK_i para determinar la media geométrica y los intervalos de confianza del 95 %. Esta estadística resumen se convirtió entonces de nuevo en valores de K_i para informar los datos.

En este ensayo, un valor de K_i más bajo indica que el compuesto de prueba tiene una mayor afinidad de unión por el receptor probado. Se encontró que el compuesto de fórmula I tenía un valor de K_i inferior a aproximadamente 5 nM para el subtipo de receptor muscarínico M_3 cuando se probó en este o un ensayo similar.

ENSAYO 2

Ensayos de potencia funcional de receptores muscarínicos

Bloqueo de la inhibición mediada por agonistas de la acumulación de AMPc

En este ensayo, la potencia funcional de un compuesto de prueba se determina midiendo la capacidad del compuesto de prueba para bloquear la inhibición por oxotremorina de la acumulación de AMPc mediada por forskolina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2 .

Los ensayos de AMPc se realizan en un formato de radioinmunoensayo usando el sistema de ensayo de activación de adenilil ciclasa Flashplate con $^{125}\text{I}\text{-AMPc}$ (NEN SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), según las instrucciones del fabricante.

Las células se aclaran una vez con dPBS y se elevan con disolución de tripsina-EDTA (0,05 % de tripsina/ EDTA 0,53 mM) como se describe en el Ensayo 1. Las células desprendidas se lavan dos veces por centrifugación a 650 x g durante cinco minutos en 50 ml de dPBS. El sedimento de células se resuspende entonces en 10 ml de dPBS, y las células se cuentan con un contador de partículas dual Coulter Z1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Las células se centrifugan de nuevo a 650 x g durante cinco minutos y se resuspenden en tampón de estimulación a una concentración de ensayo de $1,6 \times 10^5$ - $2,8 \times 10^6$ células/ml.

El compuesto de prueba se disuelve inicialmente a una concentración de 400 μM en tampón de dilución (dPBS complementado con 1 mg/ml de BSA (0,1 %)), y a continuación se diluye en serie con tampón de dilución a concentraciones molares finales que oscilan de 100 μM a 0,1 nM. La oxotremorina se diluye de una manera similar.

Para medir la inhibición por oxotremorina de la actividad de AC, se añaden 25 μl de forskolina (concentración final 25 μM diluida en dPBS), 25 μl de oxotremorina diluida y 50 μl de células a pocillos de ensayo de agonista. Para medir la capacidad de un compuesto de prueba para bloquear la actividad de AC inhibida por oxotremorina, se añaden 25 μl de forskolina y oxotremorina (concentraciones finales 25 μM y 5 μM , respectivamente, diluidas en dPBS), 25 μl de compuesto de prueba diluido y 50 μl de células a los restantes pocillos de ensayo.

Las reacciones se incuban durante 10 minutos a 37 °C y se detienen mediante la adición de 100 μl de tampón de detección frío en hielo. Las placas se tapan, se incuban durante la noche a temperatura ambiente y se cuentan a la mañana siguiente en un contador de centelleo líquido TopCount de PerkinElmer (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA). La cantidad de AMPc producida (pmol/pocillo) se calcula basándose en los recuentos observados para las muestras y los patrones de AMPc, como se describe en el manual de usuario del fabricante. Los datos se analizan por análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) usando la ecuación de competición de un sitio de regresión no lineal. La ecuación de Cheng-Prusoff se usa para calcular K_i , usando la CE_{50} de la curva de concentración-respuesta de oxotremorina y la concentración de ensayo de

oxotremorina como K_D y $[L]$, respectivamente. Los valores de K_i se convierten en valores de pK_i para determinar la media geométrica y los intervalos de confianza del 95 %. Esta estadística resumen se convierte de nuevo en valores de K_i para informar datos.

- 5 En este ensayo, un menor valor de K_i indica que el compuesto de prueba tiene una mayor actividad funcional en el receptor probado. Se encontró que el compuesto de fórmula I tenía un valor de K inferior a aproximadamente 5 nM para el bloqueo de la inhibición por oxotremorina de la acumulación de AMPc mediada por forskolina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2 , cuando se prueba en este ensayo o un ensayo similar.

10 *Bloqueo de la unión de [35 S]GTPyS mediada por agonista*

En un segundo ensayo funcional, la potencia funcional de compuestos de prueba puede determinarse midiendo la capacidad de los compuestos para bloquear la unión de [35 S]GTPyS estimulada por oxotremorina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2 .

- 15 En el momento de uso, membranas congeladas se descongelan y a continuación se diluyen en tampón de ensayo con una concentración de tejido objetivo final de 5-10 μ g de proteína por pocillo. Las membranas se homogeneizan brevemente usando un disruptor de tejidos Polytron PT-2100 y a continuación se añaden a las placas de ensayo.

- 20 El valor de CE_{90} (concentración eficaz para el 90 % de respuesta máxima) para la estimulación de la unión de [35 S]GTPyS por el agonista oxotremorina se determina en cada experimento.

- Para determinar la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la unión de [35 S]GTPyS estimulada por oxotremorina, lo siguiente se añade a cada pocillo de placas de 96 pocillos: 25 μ l de tampón de ensayo con [35 S]GTPyS (0,4 nM), 25 μ l de oxotremorina (CE_{90}) y GDP (3 μ M), 25 μ l de compuesto de prueba diluido y 25 μ l de membranas de células CHO que expresan el receptor hM_2 . Las placas de ensayo se incuban entonces a 37 °C durante 60 minutos. Las placas de ensayo se filtran sobre 1 % de filtros GF/B pretratados con BSA usando un recolector de 96 pocillos de PerkinElmer. Las placas se aclaran con tampón de lavado frío en hielo durante 3 x 3 segundos y a continuación se secan al aire o a vacío. Se añade líquido de centelleo Microscint-20 (50 μ l) a cada pocillo, y cada placa se sella y se cuenta la radiactividad en un Topcounter (PerkinElmer). Los datos se analizan por análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) usando la ecuación de competición de un sitio de regresión no lineal. La ecuación de Cheng-Prusoff se usa para calcular K_i , usando los valores de CI_{50} de la curva de concentración-respuesta para el compuesto de prueba y la concentración de oxotremorina en el ensayo como K_D y $[L]$, concentración ligando, respectivamente.

- 35 En este ensayo, un menor valor de K_i indica que el compuesto de prueba tiene una mayor actividad funcional en el receptor probado. Se encontró que el compuesto de fórmula I tenía un valor de K_i inferior a aproximadamente 5 nM para el bloqueo de la unión de [35 S]GTPyS estimulada por oxotremorina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2 , cuando se prueba en este ensayo o un ensayo similar.

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

- Los subtipos de receptor muscarínico (receptores M_1 , M_3 y M_5), que se acoplan a proteínas Gq, activan la vía de la fosfolipasa C (PLC) tras la unión del agonista al receptor. Como resultado, PLC activada hidroliza el difosfato de fosfatil inositol (PIP_2) a diacilglicerol (DAG) y fosfatidil-1,4,5-trifosfato (IP_3), que a su vez genera la liberación de calcio de reservas intracelulares, es decir, el retículo endoplásmico y sarcoplásmico. El ensayo de FLIPR (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) saca el máximo rendimiento de este aumento en el calcio intracelular usando un colorante sensible al calcio (Fluo-4AM, Molecular Probes, Eugene, OR) que fluoresce cuando se une a calcio libre. Este acontecimiento de fluorescencia se mide en tiempo real por el FLIPR, que detecta el cambio en fluorescencia de una monocapa de células clonada con receptores M_1 y M_3 humano, y M_5 de chimpancé. La potencia del antagonista puede determinarse por la capacidad de los antagonistas para inhibir aumentos mediados por agonistas en calcio intracelular.

- Para los ensayos de estimulación de calcio de FLIPR, células CHO que expresan establemente los receptores hM_1 , hM_3 y cM_5 se siembran en placas de FLIPR de 96 pocillos la noche antes de hacer el ensayo. Las células sembradas se lavan dos veces por Cellwash (MTX Labsystems, Inc.) con tampón FLIPR (HEPES 10 mM, pH 7,4, cloruro de calcio 2 mM, probenecid 2,5 mM en HBSS sin calcio y magnesio) para eliminar medios de crecimiento y dejando 50 μ l/pocillo de tampón FLIPR. Las células se incuban entonces con 50 μ l/pocillo de FLUO-4AM 4 μ M (se preparó una disolución 2X) durante 40 minutos a 37 °C, 5 % de dióxido de carbono. Tras el periodo de incubación con colorante, las células se lavan dos veces con tampón FLIPR, dejando un volumen final de 50 μ l/pocillo. Para determinar la potencia antagonista, la estimulación dependiente de la dosis de la liberación de Ca^{2+} intracelular para oxotremorina se determina primero de manera que la potencia del antagonista pueda medirse después contra la estimulación de oxotremorina a una concentración CE_{90} . Las células se incuban primero con tampón de dilución de compuesto durante 20 minutos, seguido de la adición de agonista, que se realiza por el FLIPR. Se genera un valor de CE_{90} para oxotremorina según el método detallado en la medición de FLIPR y la sección de reducción de datos de más adelante, conjuntamente con la fórmula $CE_F = ((F/100-F)^{1/H}) * CE_{50}$. Se prepara una concentración

de oxotremorina de $3 \times EC_F$ en placas de estimulación de forma que se añada una concentración de CE_{90} de oxotremorina a cada pocillo en las placas de ensayo de inhibición de antagonista.

Los parámetros usados para FLIPR son: longitud de exposición de 0,4 segundos, intensidad del láser de 0,5 vatios, longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 550 nm. El nivel inicial se determina midiendo el cambio en la fluorescencia durante 10 segundos antes de la adición de agonista. Tras la estimulación del agonista, el FLIPR mide continuamente el cambio de fluorescencia cada 0,5 a 1 segundos durante 1,5 minutos para capturar el máximo cambio de fluorescencia.

El cambio de fluorescencia se expresa como la máxima fluorescencia menos la fluorescencia inicial para cada pocillo. Los datos sin procesar se analizan contra el logaritmo de la concentración de fármaco por regresión no lineal con GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) usando el modelo de construcción para dosis-respuesta sigmoide. Los valores de K_i de antagonista se determinan por Prism usando el valor de CE_{50} de oxotremorina como K_D y CE_{90} de oxotremorina para la concentración de ligando según la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng & Prusoff, 1973).

En este ensayo, un menor valor de K_i indica que el compuesto de prueba tiene una mayor actividad funcional en el receptor probado. Se encontró que el compuesto de fórmula I tenía un valor de K_i inferior a aproximadamente 5 nM para el bloqueo de la liberación de calcio mediada por agonista en células CHO que expresan establemente el receptor hM_3 , cuando se prueba en este ensayo o un ensayo similar.

Ensayo 3

Ensayo de rata de Einthoven

Este ensayo *in vivo* se usa para evaluar los efectos broncoprotectores de compuestos de prueba que presentan actividad de antagonista de receptores muscarínicos. Todos los compuestos de prueba se diluyen en agua estéril y se dosifican por vía por inhalación (IH). Las ratas (Sprague-Dawley, macho, 250-350 g) se exponen al aerosol generado a partir de un LC Star Nebulizer Set y se conduce por una mezcla de gases (5 % de CO_2 /95 % de aire atmosférico). Cada disolución de compuesto de prueba se nebuliza durante un periodo de tiempo de 10 minutos en una cámara de dosificación con forma de tarta capaz de contener seis ratas. En momentos de tiempo predeterminados después de la inhalación de compuesto, se realiza el ensayo de Einthoven.

Treinta minutos antes del inicio de la evaluación pulmonar, los animales se anestesian con inactina (tiobutabarbital, 120 mg/kg IP). La vena yugular se cateteriza con catéteres de polietileno llenos de solución salina (PE-50) y se usa para infundir MCh. Entonces se direcciona la tráquea y se canula con una aguja de 14G y se usa para la ventilación de la rata durante la evaluación pulmonar. Una vez se ha completado la cirugía, las ratas se ventilan usando un equipo de respirador de pistón a un volumen de embolada de 1 ml/100 g de peso corporal pero sin superar 2,5 ml de volumen, y a una tasa de 90 emboladas por minuto.

Se miden los cambios en la presión que se producen con cada respiración. Los valores iniciales se recogen durante al menos 2,5 minutos, entonces las ratas se exponen no acumulativamente a aumentos incrementales de 2 veces del MCh broncoconstrictor (5, 10, 20, 40 y 80 μ g/ml). El MCh se infunde durante 2,5 minutos desde una bomba de jeringa a una tasa de 2 ml/kg/min. Los animales se sacrifican tras completarse los estudios.

Los cambios en la presión de ventilación (cm de H_2O) en animales tratados se expresan como el % de inhibición de respuesta de MCh con respecto a los animales de control. En este ensayo, un mayor valor de % de inhibición indica que el compuesto de prueba tiene un efecto broncoprotector. Se espera que el compuesto de fórmula I, cuando se prueba en este ensayo a una dosis de 100 μ g/ml, presente más del 35 % de inhibición, posiblemente más del 70 % de inhibición, e incluso más posiblemente más del 90 % de inhibición.

Determinación de ID_{50} a las 1,5 h

Se evaluaron antagonistas muscarínicos estándar en el ensayo de rata de Einthoven 1,5 h después de la dosis. Se determinó que el orden de potencia (ID_{50}) para los cinco patrones probados era: ipratropio (4,4 μ g/ml) > tiotropio (6 μ g/ml) > des-metil-tiotropio (12 μ g/ml) > glicopirrolato (15 μ g/ml) > LAS-34237 (24 μ g/ml). La potencia del compuesto de prueba se determina similarmente 1,5 h después de la dosis.

Determinación de ID_{50} a las 6 y 24 h

Los patrones tiotropio e ipratropio también se evaluaron 24 h y/o 6 h después de la dosis en el ensayo de rata de Einthoven. El ipratropio (10 y 30 μ g/ml) fue aproximadamente 3 veces menos potente 6 h después de la dosis en comparación con su potencia a las 1,5 h. La pérdida de actividad observada en este momento de tiempo (6 h) está de acuerdo con su duración de acción relativamente corta en la clínica. El tiotropio mostró una lenta aparición del efecto lográndose la broncoprotección pico 6 h después de la dosis. Sus valores de potencia a las 6 h y 24 h no fueron significativamente diferentes entre sí y fueron aproximadamente 2 veces más potentes en comparación con

su potencia a las 1,5 h. La aparición de acción del compuesto de prueba, además de los valores de potencia a las 6 y 24 h, se determina similarmente.

ENSAYO 4

Ensayo de rata antisialogogo

Se dosifican ratas (Sprague-Dawley, macho, 250-350 g), se anestesian y se canulan como se ha descrito para el Ensayo 3. En momentos de tiempo predeterminados y después de la cirugía, los animales se colocan sobre su lado dorsal a una inclinación de 20° con su cabeza en pendiente hacia abajo. Una almohadilla de gasa previamente pesada se inserta en la boca del animal y se administra el agonista muscarínico pilocarpina (PILO) (3 mg/kg, iv.). La saliva producida durante 10 minutos después de PILO se mide gravimétricamente determinando el peso de la almohadilla de gasa antes y después de PILO. Los efectos antisialogogo se expresan como el % de inhibición de la salivación con respecto a animales de control.

Determinación de DI_{50} a las 1, 6 y 24 h

Se desarrolló el ensayo de rata antisialogogo para evaluar la exposición sistémica y calcular el índice de selectividad del pulmón (LSI) de compuestos de prueba. El patrón, tiotropio, se evaluó en este modelo 1, 6 y 24 h después de la dosis. Se encontró que el tiotropio era más potente en inhibir la salivación inducida por pilocarpina 6 h después de la dosis. Este hallazgo está de acuerdo con los efectos pico observados en el ensayo de Einthoven.

Este modelo es una versión modificada del procedimiento descrito en Rechter, "Estimation of anticholinergic drug effects in mice by antagonism against pilocarpine-induced salivation" *Ata Pharmacol Toxicol* 24:243-254 (1996). El peso medio de saliva en animales tratados con vehículo, en cada momento pre-tratamiento, se calcula y se usa para calcular el % de inhibición de la salivación, en el momento de pre-tratamiento correspondiente, a cada dosis.

Se espera que los compuestos a modo de ejemplo de la invención que se prueban en este ensayo presenten valores de DI_{50} inferiores a 100 µg/ml (medidos a las 24 horas), esperándose que algunos compuestos presenten un valor de DI_{50} inferior a 30 µg/ml, algunos inferior a 20 µg/ml y algunos inferior a 15 µg/ml.

La relación de la DI_{50} de antisialogogo con respecto DI_{50} de broncoprotector se usa para calcular el índice de selectividad de pulmón aparente del compuesto de prueba. Generalmente se prefieren los compuestos que tienen un índice de selectividad de pulmón aparente superior a aproximadamente 5.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una base libre cristalina del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico caracterizada por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ de $6,6 \pm 0,1$, $13,1 \pm 0,1$, $18,6 \pm 0,1$, $19,7 \pm 0,1$ y $20,2 \pm 0,1$ y que tiene cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados de $8,8 \pm 0,1$, $10,1 \pm 0,1$, $11,4 \pm 0,1$, $11,6 \pm 0,1$, $14,8 \pm 0,1$, $15,2 \pm 0,1$, $16,1 \pm 0,1$, $16,4 \pm 0,1$, $16,9 \pm 0,1$, $17,5 \pm 0,1$, $18,2 \pm 0,1$, $19,3 \pm 0,1$, $19,9 \pm 0,1$, $20,8 \pm 0,1$, $21,1 \pm 0,1$, $21,7 \pm 0,1$ y $22,3 \pm 0,1$.
- 10 2.- El compuesto cristalino de la reivindicación 1, caracterizado por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ seleccionados de $6,6 \pm 0,1$, $11,4 \pm 0,1$, $13,1 \pm 0,1$, $16,1 \pm 0,1$, $17,5 \pm 0,1$, $18,2 \pm 0,1$, $18,6 \pm 0,1$, $19,3 \pm 0,1$, $19,7 \pm 0,1$, $19,9 \pm 0,1$, $20,2 \pm 0,1$, $20,8 \pm 0,1$, $21,1 \pm 0,1$, $21,7 \pm 0,1$ y $22,3 \pm 0,1$.
- 15 3.- El compuesto cristalino de la reivindicación 1, caracterizado por un patrón de difracción de rayos X de polvo según el patrón mostrado en la FIG. 1.
- 20 4.- El compuesto de la reivindicación 1, caracterizado adicionalmente por un termograma de calorimetría diferencial de barrido según el mostrado en la FIG. 4.
- 25 5.- Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 6.- La composición de la reivindicación 5, que comprende además un agente seleccionado de agonistas de receptores $\beta 2$ -adrenérgicos, agentes antiinflamatorios esteroideos, inhibidores de la fosfodiesterasa-4 y combinaciones de los mismos; en la que la forma cristalina y el agente se formulan juntos o por separado.
- 7.- La composición de la reivindicación 6, que comprende un agonista de receptores $\beta 2$ -adrenérgicos y un agente antiinflamatorio esteroideo.
- 30 8.- El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en forma micronizada.
- 9.- Un proceso de preparación de la base libre cristalina de la reivindicación 1, que comprende poner en contacto el éster 1-(2-[[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]-metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico con un disolvente que consiste en acetonitrilo, siendo la relación de miligramos del éster con respecto a los mililitros totales de acetonitrilo 100:1, y añadiéndose el acetonitrilo en dos etapas.
- 35 10.- Un proceso de preparación de la base libre cristalina de la reivindicación 1, que comprende a) formar un cristal semilla de la base libre cristalina de la reivindicación 1; b) disolver la sal de difosfato del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]-metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico en acetato de isopropilo y agua para formar una disolución; y c) añadir el cristal semilla a la disolución.
- 40 11.- Un proceso de purificación del éster 1-(2-[[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino]etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico, que comprende formar el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 45 12.- Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para su uso en terapia.
- 50 13.- Un compuesto según la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma, o para producir broncodilatación.
- 14.- El uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma, o para producir broncodilatación.

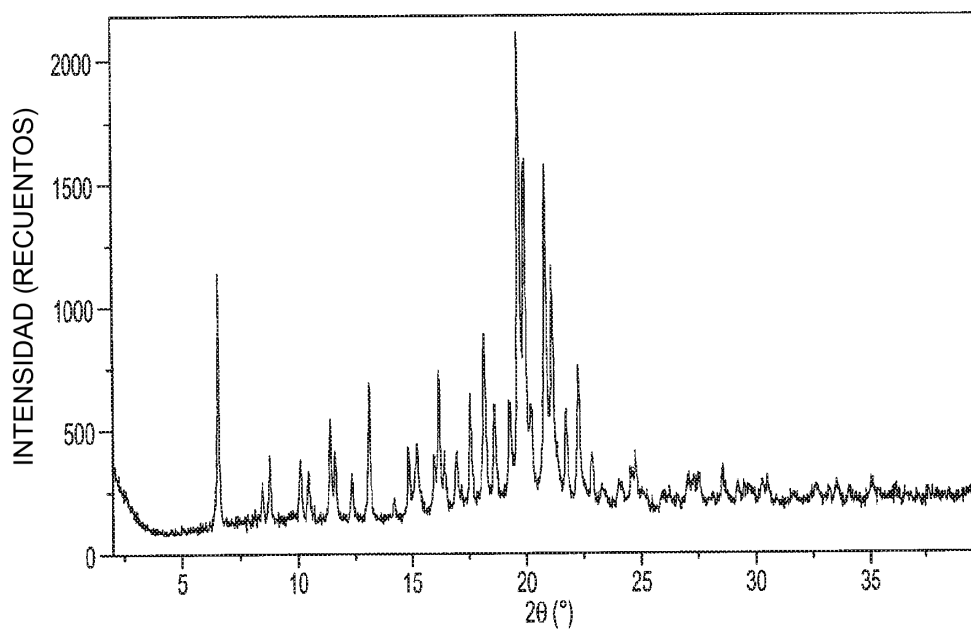


FIG. 1

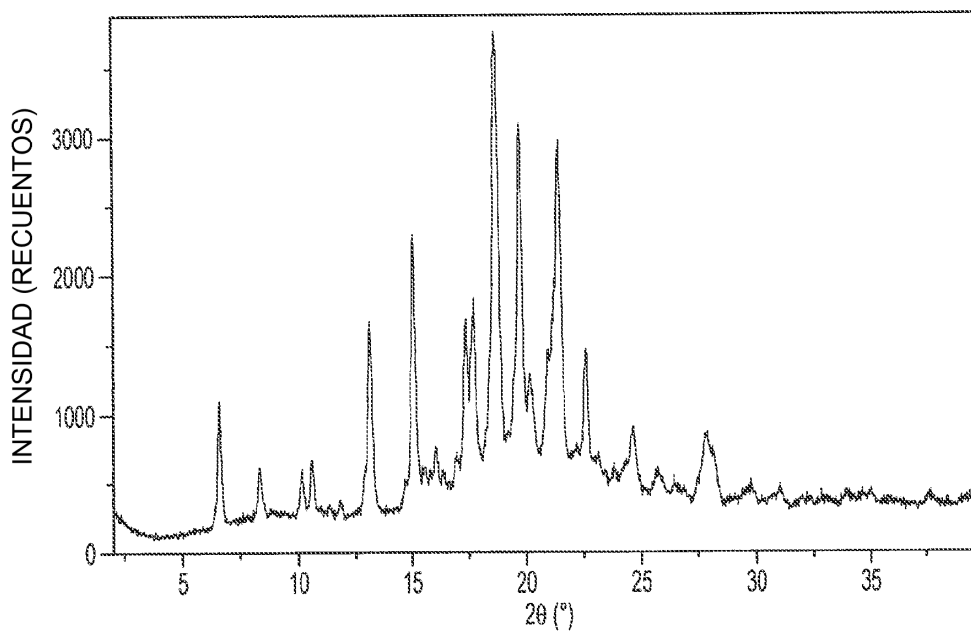


FIG. 2

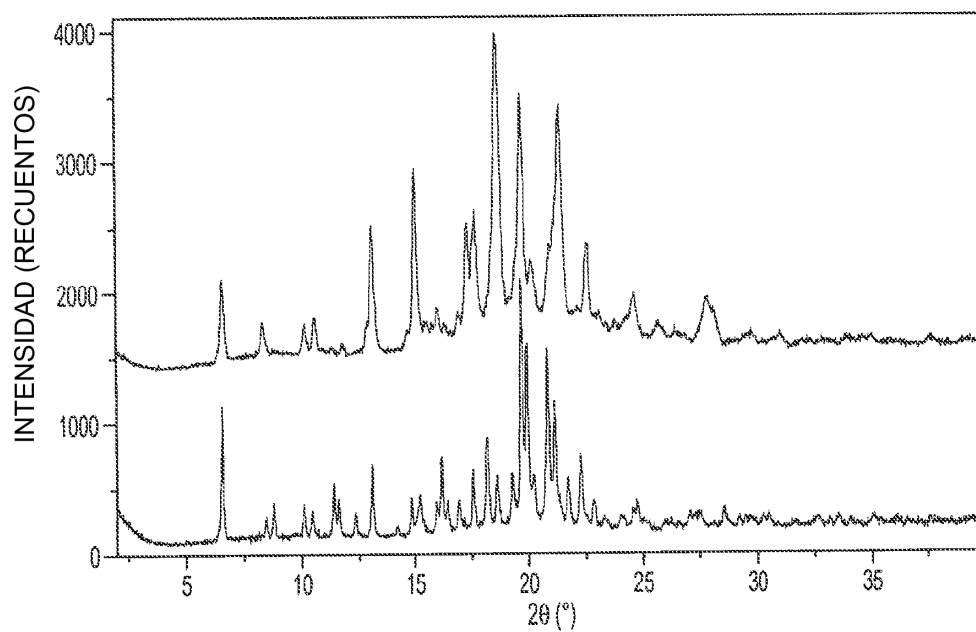


FIG. 3

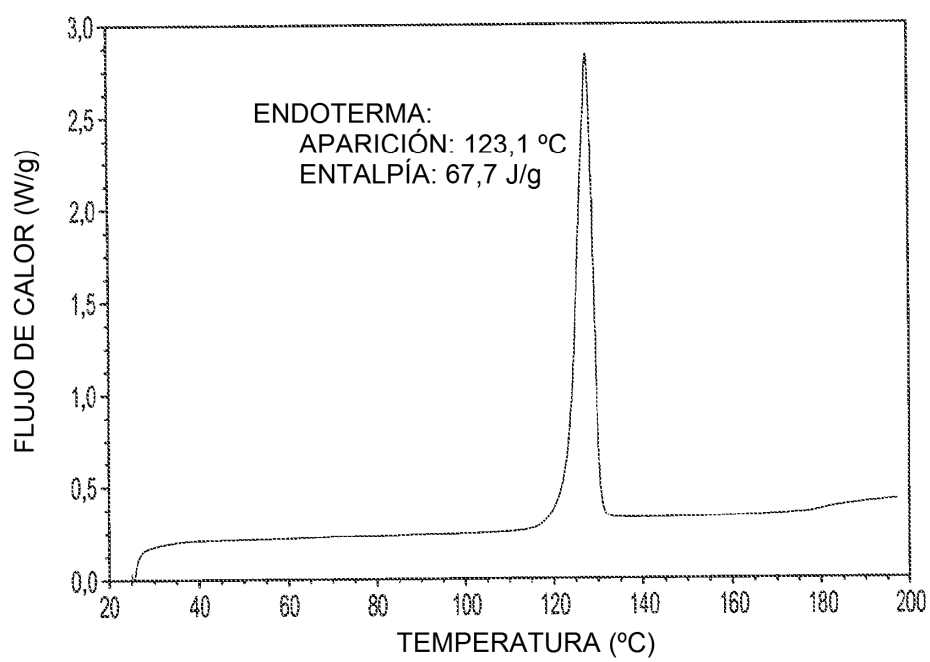


FIG. 4

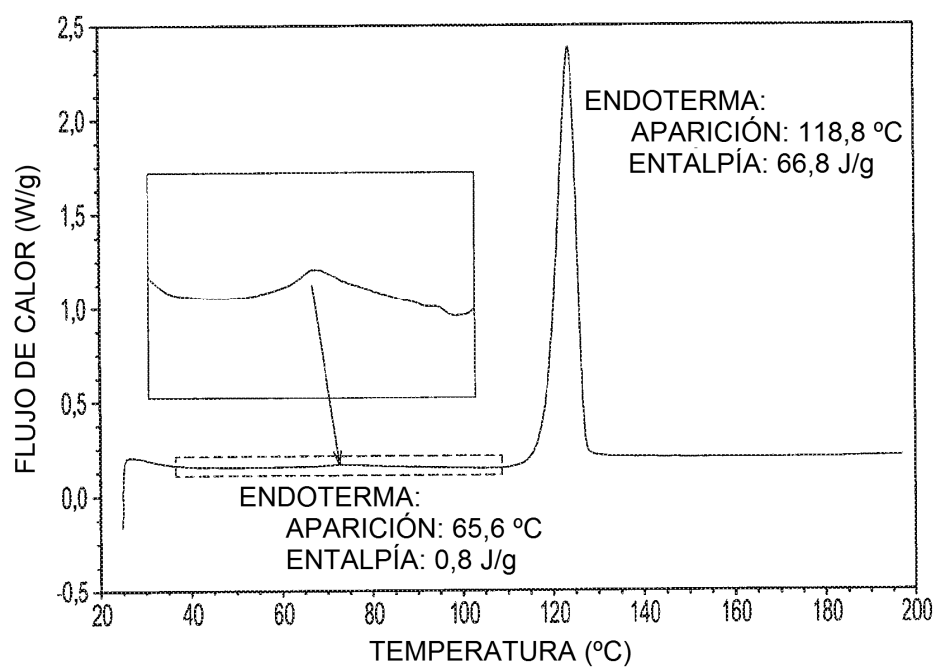


FIG. 5

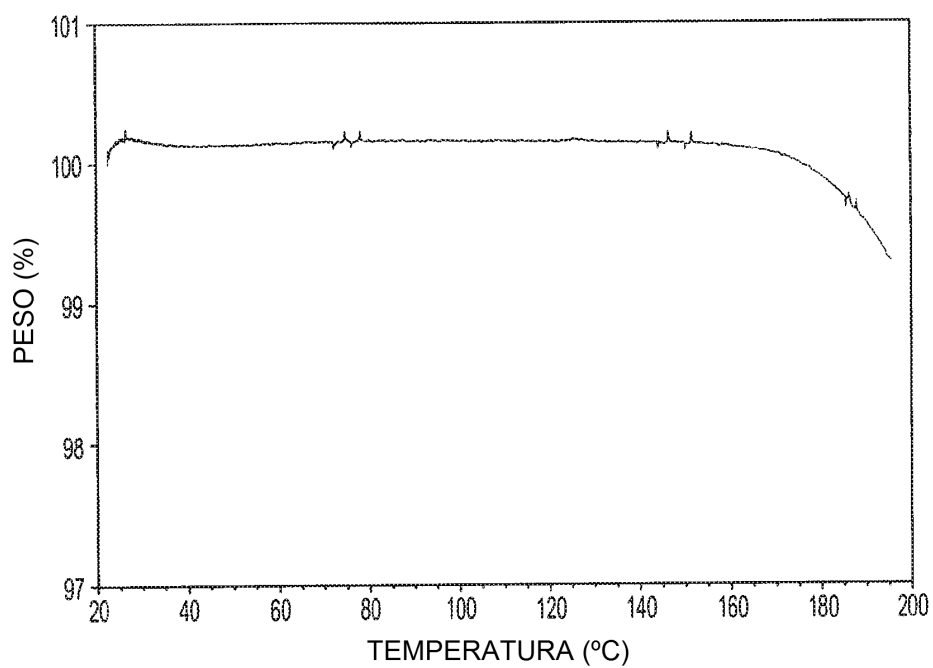


FIG. 6

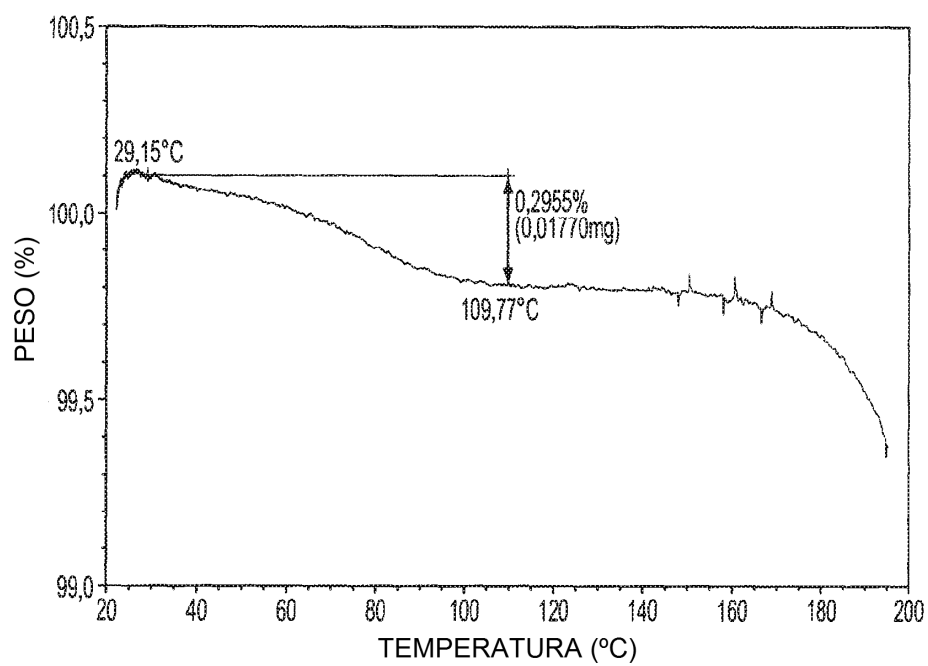


FIG. 7