(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 639 642**

(51) Int. CI.:

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 15178848 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.06.2017 EP 2987490**

(54) Título: **Formas 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:
27.10.2017

(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

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

DESCRIPCIÓN

Formas de base libre cristalina de un compuesto de bifenilo

Antecedentes de la invención

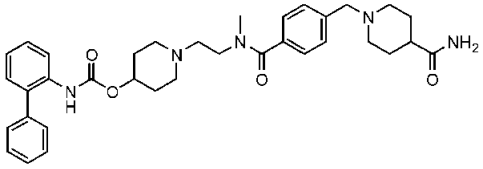
Campo de la invención

La presente invención se refiere a una forma cristalina novedosa 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 dicho compuesto, a procesos e intermedios para preparar dicho compuesto cristalino, y encuentra utilidad en métodos de uso de dicho compuesto para tratar un trastorno pulmonar.

Estado de la técnica

La publicación de patente de los EE.UU. N.º 2005/0203133 a Mammen et al. desvela compuestos de bifenilo novedosos que se espera que sean útiles para tratar trastornos pulmonares tales como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el asma. En particular, el compuesto de éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-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.

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



I

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

Los 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 (IPS), inhaladores de dosis medida (IDM) e inhaladores nebulizadores. Cuando se preparan composiciones farmacéuticas y formulaciones para su uso en dichos dispositivos, es altamente deseable tener una forma cristalina del agente terapéutico que no sea ni higroscópica ni delicuescente y que tenga un punto de fusión relativamente alto permitiendo de este modo 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 los EE.UU. N.º 2007/0112027 a Axt et al. como la forma I y la forma II, las formas de base libre cristalina de la presente invención tienen propiedades diferentes y particularmente útiles, que incluyen puntos de fusión más altos.

Sumario de la invención

La invención se refiere a una base libre cristalina del éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico, designada como 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 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,7 ± 0,1 y 20,2 ± 0,1; y adicionalmente caracterizada por tener cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados entre 10,6 ± 0,1, 15,0 ± 0,1, 16,0 ± 0,1, 17,3 ± 0,1, 17,7 ± 0,1, 20,9 ± 0,1, 21,4 ± 0,1, 22,6 ± 0,1, 24,6 ± 0,1 y 27,8 ± 0,1.

También se describe, pero no se reivindica en el presente documento, una base libre cristalina de éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico, designada como forma III, que se caracteriza por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ de 6,6 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,7 ± 0,1 y 20,2 ± 0,1; y adicionalmente caracterizada por tener cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados entre 8,8 ± 0,1, 10,1 ± 0,1, 11,4 ± 0,1, 11,6 ± 0,1, 14,8 ± 0,1, 15,2 ± 0,1, 16,1 ± 0,1, 16,4 ± 0,1, 16,9 ± 0,1, 17,5 ± 0,1, 18,2 ± 0,1, 19,3 ± 0,1, 19,9 ± 0,1, 20,8 ± 0,1, 21,1 ± 0,1, 21,7 ± 0,1 y 22,3 ± 0,1.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la base libre cristalina de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otro aspecto más de la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden la base libre cristalina de la invención en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. En consecuencia, 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 entre un agente antiinflamatorio esteroideo tal como un corticoesteroide; 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. En consecuencia, se espera que una base libre cristalina del compuesto de fórmula I tenga la misma actividad, y de este modo encuentre utilidad en el tratamiento de trastornos pulmonares tales como asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica. De este modo, otro aspecto de la invención encuentra utilidad 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. Otro aspecto más de la invención encuentra utilidad 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 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 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 IV 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 IV del éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino}etil)piperidin-4-ílico 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 IV 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 IV 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

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

La FIG. 1 muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo (DRXP) de 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 (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 (CDB) y la FIG. 6, que muestra un trazo de análisis termogravimétrico (ATG).

La FIG. 2 muestra un patrón de DRXP de la forma IV de la base libre cristalina del compuesto de fórmula I. La FIG. 3 muestra una transparencia de los patrones de DRXP 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 CDB, y la FIG. 7, que muestra un trazo de ATG.

Descripción detallada de la invención

Sorprendentemente, se ha encontrado que la forma de base libre cristalina IV 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. La forma de base libre cristalina III tiene un punto de fusión de aproximadamente 125 ºC. La forma IV de la base libre cristalina tiene un punto de fusión de aproximadamente 119 ºC.

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. En consecuencia, 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. Las expresiones "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. En consecuencia, 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 IV.

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 en la que habitualmente se usa la expresión "que comprende".

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material que no es inaceptable biológicamente o de otro modo cuando se usa en la invención. Por ejemplo, la expresión "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. Dichos materiales farmacéuticamente aceptables normalmente han cumplido los criterios requeridos de ensayos toxicológicos y de fabricación, e incluyen aquellos materiales identificados como principios inactivos adecuados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad suficiente para efectuar el tratamiento cuando se administra a un paciente que necesita el 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 la cantidad necesaria para producir broncodilatación. Por otra parte, la expresión "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 la EPOC) en un paciente tal como un mamífero (en particular 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 ralentizando o deteniendo 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, la expresión "tratar la EPOC" incluiría prevenir que se produzca la EPOC, mejorar la EPOC, suprimir la EPOC y aliviar los síntomas de la EPOC. El término "paciente" pretende incluir aquellos mamíferos, tales como seres humanos, que necesitan el tratamiento o la prevención de la enfermedad o que actualmente están siendo tratados para la prevención de la enfermedad o el tratamiento de una enfermedad específica o afección médica. El término "paciente" también incluye sujetos de ensayo en los que se evalúan los compuestos de la invención o sujetos de ensayo 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 a continuación 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 proporcionan 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 como que significa una temperatura dentro del intervalo habitualmente asociado a la temperatura ambiente en un entorno de laboratorio, y normalmente estará en el intervalo de aproximadamente 25 ºC a aproximadamente 50 ºC. En otros casos se realizaron reacciones o cristalizaciones a temperatura ambiente, y la temperatura se midió y registró realmente. Todos los pesos, volúmenes y equivalentes son con respecto al material de partida éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-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, cuyos ejemplos 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-carbamoilpiperidin-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 disponibles en el mercado usando los procedimientos descritos en los ejemplos, o usando los procedimientos descritos en la publicación de patente de los EE.UU. N.º 2005/0203133 a Mammen et al. y la publicación de patente de los EE.UU. N.º 2007/0112027 a Axt et al.

Las relaciones molares descritas en los métodos de la invención pueden determinarse fácilmente por diversos métodos disponibles para los expertos en la materia. Por ejemplo, dichas relaciones molares pueden determinarse fácilmente por RMN ^{1}H. Como alternativa, 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-carbamoil-piperidin-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.

La base libre cristalina de forma III puede prepararse poniendo en contacto el éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-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 ºC. Los sólidos se aíslan después por filtración al vacío y se secan.

Como alternativa, 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-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico en acetato de isopropilo y agua para formar una solución; c) y añadir el cristal semilla a la solución. Más específicamente, la sal de difosfato del éster (peso 1) se suspende en acetato de isopropilo (17,5 vol) y agua (10 vol) a 20 ± 3 ºC en atmósfera de nitrógeno. La suspensión se calienta a 53 ± 3 ºC y se añade NaOH 10 M (0,5 vol). La mezcla se agita a esa temperatura durante un tiempo corto, después 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 retira. 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 solución transparente se reduce a 53 ± 3 ºC, luego se siembra con una suspensión de la forma III de la base libre cristalina (peso 0,005; 0,5 % en peso) en acetato de isopropilo (0,08 vol). La suspensión resultante se agita a 53 ± 3 ºC durante al menos 2 horas, después se enfría a 10 ± 3 ºC a una tasa de enfriamiento aproximada de 0,19 ºC/min. La suspensión se agita a 10 ± 3 ºC durante al menos 2 horas y después se recoge por filtración. La torta de filtración resultante se lava con acetato de isopropilo (3 volúmenes, 2 veces) y después el producto se seca para producir la base libre cristalina de la forma III.

Forma IV

En una realización, la base libre cristalina de la forma IV se prepara 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 solución; c) y añadir el cristal semilla a la solución. 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 ºC. Después se aíslan los sólidos por filtración al vacío y se secan.

Propiedades cristalinas

Como es bien sabido 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 (DRXP) 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 DRXP para la forma III y la forma IV de la base libre cristalina como se expone en el Ejemplo 5. De este modo, en una realización, un compuesto cristalino de la invención se caracteriza por un patrón de DRXP que tiene determinadas posiciones de picos.

Cada forma de base libre cristalina presenta un patrón de DRXP diferentes, pero con determinados picos comunes. Ambas formas III y IV 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 se caracterizan por un patrón de difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ seleccionados entre 6,6 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,7 ± 0,1 y 20,2 ± 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 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,7 ± 0,1 y 20,2 ± 0,1; y adicionalmente caracterizada por tener cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados entre 8,8 ± 0,1, 10,1 ± 0,1, 11,4 ± 0,1, 11,6 ± 0,1, 14,8 ± 0,1, 15,2 ± 0,1, 16,1 ± 0,1, 16,4 ± 0,1, 16,9 ± 0,1, 17,5 ± 0,1, 18,2 ± 0,1, 19,3 ± 0,1, 19,9 ± 0,1, 20,8 ± 0,1, 21,1 ± 0,1, 21,7 ± 0,1 y 22,3 ± 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 entre 6,6 ± 0,1, 11,4 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 16,1 ± 0,1, 17,5 ± 0,1, 18,2 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,3 ± 0,1, 19,7 ± 0,1, 19,9 ± 0,1, 20,2 ± 0,1, 20,8 ± 0,1, 21,1 ± 0,1, 21,7 ± 0,1 y 22,3 ± 0,1. En otra realización más, la forma III de la base libre cristalina se caracteriza por un patrón de DRXP en el que las posiciones de picos están sustancialmente de acuerdo con aquellas que se muestran 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 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,7 ± 0,1 y 20,2 ± 0,1; y adicionalmente caracterizada por tener cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados entre 10,6 ± 0,1, 15,0 ± 0,1, 16,0 ± 0,1, 17,3 ± 0,1, 17,7 ± 0,1, 20,9 ± 0,1, 21,4 ± 0,1, 22,6 ± 0,1, 24,6 ± 0,1 y 27,8 ± 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 entre 6,6 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 15,0 ± 0,1, 17,3 ± 0,1, 17,7 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,7 ± 0,1, 20,2 ± 0,1, 20,9 ± 0,1, 21,4 ± 0,1 y 22,6 ± 0,1. En otra realización más, la forma IV de la base libre cristalina se caracteriza por un patrón de DRXP en el que las posiciones de picos están sustancialmente de acuerdo con aquellas que se muestran 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 (CDB). Los termogramas de CDB se obtuvieron como se expone en el Ejemplo 6. Los puntos de fusión notificados en el presente documento se estiman basándose en la aparición del fundido registrada durante el análisis de CDB. De este modo, en una realización, el compuesto cristalino de la invención se caracteriza por su termógrafo de CDB. La forma III de la base libre cristalina se caracteriza por un termógrafo de CDB que muestra un comienzo del flujo de calor endotérmico a aproximadamente 123 ºC y un punto de fusión de aproximadamente 125 ºC, como se observa en la FIG. 4. La forma IV de la base libre cristalina se caracteriza por un termógrafo de CDB que muestra un comienzo de flujo de calor endotérmico a aproximadamente 66 ºC, un segundo comienzo de flujo de calor endotérmico a aproximadamente 119 ºC y un punto de fusión de aproximadamente 119 ºC, como se observa en la FIG. 5.

Se realizó análisis termogravimétrico (ATG) en las formas de base libre cristalina de la invención como se describe en el Ejemplo 6. De este modo, en una realización, la base libre cristalina se caracteriza por su trazo de ATG. La forma III de la base libre cristalina se caracteriza por el trazo de ATG representado en la FIG. 6. La forma IV de la base libre cristalina se caracteriza por el trazo de ATG representado en la FIG. 7.

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

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. Dichas afecciones médicas incluyen, a modo de ejemplo, trastornos pulmonares o enfermedades que incluyen aquellas asociadas a la 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.

En consecuencia, en una realización, la invención encuentra utilidad en un método de tratamiento de un trastorno pulmonar, comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la forma IV 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. 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. En consecuencia, en otra realización, la invención encuentra utilidad en un método de producir broncodilatación en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad productora de broncodilatación de la base libre cristalina de la forma IV del éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-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 método de tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el asma, comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la base libre cristalina de la forma IV del éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico. Cuando se usa para tratar la EPOC o el 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 la EPOC o el asma oscilará de aproximadamente 10 µg/día a 200 µg/día. Como se usa en el presente documento, la EPOC incluye la bronquitis obstructiva crónica y el 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. En consecuencia, en una realización particular, las composiciones farmacéuticas y métodos de la invención comprenden adicionalmente una cantidad terapéuticamente eficaz de un agonista de adrenorreceptor β_2, un corticoesteroide, un agente antiinflamatorio no esteroideo o una 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 una base libre cristalina de la invención se administra al mamífero. Si se desea, los efectos de antagonizar el receptor muscarínico después pueden determinarse usando procedimientos y equipo convencionales.

Las propiedades y utilidad de la base libre cristalina de la invención, tales como la actividad antagonista de receptores muscarínicos, pueden demostrarse usando diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* que son muy conocidos para los 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 hM_1, hM_2, hM_3, hM_4 y hM_5 (por ejemplo, como se describe en el Ensayo 1). Ensayos funcionales útiles para determinar la actividad antagonista 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 monofosfato de adenosina 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 5'-O-(γ-tio)trifosfato de guanosina ($[^{35}S]GTP\gamma S$) en membranas aisladas mediante el intercambio catalizado por receptor de $[^{35}S]GTP\gamma S$ por GDP, cambios mediados por ligando en iones calcio intracelulares libres (medidos, por ejemplo, con un lector de placas de formación de imágenes asociado a fluorescencia o FLIPR® de Molecular Devices, Inc.), y similares. Se describen ensayos a modo de ejemplo 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.

De este modo, 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 los 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 Einthoven de rata. Otro ensayo *in vivo* útil es el ensayo de antisialogogo de rata (por ejemplo, como se describe en el Ensayo 4).

Composiciones farmacéuticas y formulaciones

La base libre cristalina de la invención normalmente se administra a un paciente en forma de una composición farmacéutica o formulación. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente por cualquier vía de administración aceptable que incluye, pero no se limita a, modos de administración por vía inhalada, oral, nasal, tópica (incluyendo transdérmico) y parenteral. Sin embargo, se entenderá por los 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.

En consecuencia, en una realización, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable y la forma IV 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, dichas 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 patología. A este respecto, la preparación de una composición farmacéutica adecuada para un modo de administración particular está bien dentro del alcance de los expertos en las técnicas farmacéuticas. Adicionalmente, los ingredientes para dichas composiciones están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Sigma, P.O. Box 14508, San Luis, MO 63178. A modo de ilustración adicional, se describen técnicas de formulación convencionales 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).

Los 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 cártamo, 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; solución 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 minuciosa e íntimamente 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 después conformarse o cargarse en comprimidos, cápsulas, píldoras, botes, cartuchos, dispensadores y similares usando procedimientos y equipo convencionales.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de la invención son adecuadas para la administración inhalada. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración inhalada normalmente estarán en forma de un aerosol o un polvo. Dichas composiciones se administran generalmente usando dispositivos de administración bien conocidos tales como un inhalador nebulizador, un inhalador de dosis medida (IDM), un inhalador de polvo seco (IPS) 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. Dichos dispositivos nebulizadores normalmente producen una corriente de aire de alta velocidad que hace que la composición farmacéutica que comprende el agente activo se pulverice en forma de una niebla que es llevada a las vías respiratorias del paciente. En consecuencia, 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 solución. Los 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 solución 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 solución 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-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]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 IPS. Dichos IPS normalmente administran el agente activo en forma de 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 habitual 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., a condición de que pueda obtenerse el tamaño de partícula deseado.

Una composición farmacéutica representativa para su uso en un IPS 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 de este tipo puede prepararse, por ejemplo, combinando la lactosa con el agente activo de base libre cristalina y después mezclando en seco los componentes. Como alternativa, si se desea, el agente activo de base libre cristalina puede formularse sin un excipiente. La composición farmacéutica se carga después 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.

Los ejemplos de dispositivos de administración de IPS incluyen Diskhaler (GlaxoSmithKline, Research Triangle Park, NC; véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 5.035.237 a Newell et al.); Diskus (GlaxoSmithKline; véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 6.378.519 a Davies et al.); Turbuhaler (AstraZeneca, Wilmington, DE; véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 4.524.769 a Wetterlin); Rotahaler (GlaxoSmithKline; véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 4.353.365 a Hallworth et al.) y Handihaler (Boehringer Ingelheim). Se describen otros ejemplos de dispositivos IPS adecuados en las patentes de los EE.UU. N.º 5.415.162 a Casper et al., 5.239.993 a Evans, y 5.715.810 a Armstrong et al., y referencias citadas en las mismas. 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 IDM, que normalmente descarga una cantidad medida del agente activo usando gas propulsor comprimido. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas administradas usando un IDM normalmente comprenden una solución o suspensión del agente activo de base libre cristalina en un propulsor licuado. Puede emplearse cualquier propulsor licuado adecuado incluyendo clorofluorocarbonos tales como CCl_3F e hidrofluoroalcanos (HFA) tales como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134a) y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-n-propano, (HFA 227). Debido a las preocupaciones acerca de que los clorofluorocarbonos afectan a la capa de ozono, generalmente se prefieren las formulaciones que contienen HFA. Los componentes de HFA opcionales adicionales incluyen cosolventes tales como etanol o pentano, y tensioactivos tales como trioleato de sorbitano, ácido oleico, lecitina y glicerina. Véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. N.º 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.

Dichas 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 después se combina con el propulsor. La formulación se carga después en un bote de aerosol, que forma una porción de un dispositivo inhalador de dosis medida. Se describen ejemplos de dispositivos inhaladores de dosis medida desarrollados específicamente para su uso con propulsores de HFA en las patentes de los EE.UU. N.º 6.006.745 a Marecki y 6.143.277 a Ashurst et al. Como alternativa, 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 los EE.UU. N.º 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 el 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 la administración por vía oral. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la 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 solución 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 la administración por vía oral en una forma de dosificación sólida (es decir, en forma de 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, dichas formas de dosificación sólidas también pueden comprender: cargas o diluyentes 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 solución 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.

También pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Los 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 etilendiamina tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares. Los agentes de recubrimiento para comprimidos, cápsulas, píldoras, y similares, incluyen los que se usan 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), carboximetiletilcelulosa (CMEC), acetato-succinato de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMCAS), y similares.

Si se desea, las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden formularse para proporcionar la 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 determinada porción del tubo gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los 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 apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Las formas de dosificación líquidas adecuadas para la administración por vía oral incluyen, a modo de ilustración, emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Dichas 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 tetrahidrofurílico, 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 por vía transdérmica 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. Pueden usarse en dichas composiciones transdérmicas excipientes adicionales incluyendo gelificantes, emulsionantes y tampones, si se desea.

Una base libre cristalina de la invención también puede coadministrarse 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). Los métodos de formulación de múltiples agentes juntos en la misma formulación o en formas de dosificación unitaria separadas son bien conocidos en la técnica. La expresión "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, dichas formas de dosificación unitaria pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras y similares.

El agente o agentes terapéuticos adicionales pueden seleccionarse entre otros broncodilatadores (por ejemplo, inhibidores de la PDE_3, moduladores de adenosina 2b y agonistas de receptores β_2-adrenérgicos); agentes antiinflamatorios (por ejemplo, agentes antiinflamatorios esteroideos tales como corticoesteroides; agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINE) e inhibidores de la PDE_4); otros antagonistas de receptores muscarínicos (es decir, agentes anticolinérgicos); agentes antiinfecciosos (por ejemplo, antibióticos grampositivos y gramnegativos o antivíricos); antihistamínicos; inhibidores de la proteasa; y bloqueantes aferentes (por ejemplo, agonistas de D_2 y moduladores de neurocinina).

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 entre un agente antiinflamatorio esteroideo tal como un corticoesteroide; un agonista de receptores adrenérgicos β_2; 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 adrenérgicos β_2 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.

Los agonistas de receptores adrenérgicos β_2 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 β2-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 los EE.UU. N.º 6.576.793 a Moran et al.; *N*-{2-[4-(3-fenil-4-metoxifenil)aminofenil]etil}-(*R*)-2-hidroxi-2-(8-hidroxi-2(1*H*)-quinolinon-5-il)etilamina y compuestos relacionados descritos en la patente de los EE.UU. N.º 6.653.323 a Moran et al.; y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. En una realización particular, el agonista de adrenorreceptores β_2 es una sal de monoclorhidrato cristalina de *N*-{2-[4-((*R*)-2-hidroxi-2-feniletilamino)fenil]etil}-(*R*)-2-hidroxi-2-(3-formamido-4-hidroxifenil)etilamina. Cundo se emplea, el agonista de adrenorreceptores β_2 estará presente en la composición farmacéutica en una cantidad terapéuticamente eficaz. Normalmente, el agonista de adrenorreceptores β_2 estará presente en una cantidad suficiente para proporcionar de aproximadamente 0,05 µg a 500 µg por dosis. Las divulgaciones de las patentes y publicaciones anteriormente mencionadas se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

Los 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 6α,9α-difluoro-17α-[(2-furanilcarbonil)oxi]-11β-hidroxi-16α-metil-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17β-carbotioico, éster (2-oxo-tetrahidrofuran-3S-ílico) del ácido 6α,9α-difluoro-11β-hidroxi-16α-metil-3-oxo-17α-propioniloxi-androsta-1,4-dieno-17β-carbotioico, 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 emplea, 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 µg a 500 µg por dosis.

Una combinación a modo de ejemplo es una base libre cristalina de la invención, coadministrada con salmeterol como el agonista de receptores adrenérgicos β_2, y propionato de fluticasona como el agente antiinflamatorio esteroideo. Otra combinación a modo de ejemplo es una base libre cristalina de la invención, coadministrada con una sal de monoclorhidrato 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 adrenorreceptores β_2, y éster *S*-fluorometílico del ácido 6α,9α-difluoro-17α-[(2-furanilcarbonil)oxi]-11β-hidroxi-16α-metil-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17β-carbotioico como el agente antiinflamatorio esteroideo. Como se ha indicado 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, nedocromilo de sodio e inhibidores de fosfodiesterasas (PDE) tales como teofilina, inhibidores de la PDE4 e inhibidores mixtos de la PDE3/PDE4); antagonistas de leucotrieno (por ejemplo, montelukast); inhibidores de la síntesis del leucotrieno; inhibidores de iNOS; inhibidores de la proteasa tales como inhibidores de triptasa 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 αIL), específicamente, una terapia con αIL-4, una terapia con αIL-13, o una combinación de los mismos); o inhibidores de la síntesis de citocinas.

Los inhibidores de la fosfodiesterasa-4 (PDE4) o inhibidores mixtos de la 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-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexano-1-carboxílico, 2-carbometoxi-4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ona; *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ol]; ácido *cis*-4-ciano-4-[3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]ciclohexano-1-carboxílico y similares, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Otros inhibidores de la PDE4 o mixtos de la 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).

Los 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, copirrolato (Robinul), yoduro de isopropamida, bromuro de mepenzolato, cloruro de tridihexetilo (Pathilone), metilsulfato de hexociclio, clorhidrato de ciclopentolato, tropicamida, clorhidrato de trihexifenidilo, pirenzepina, telenzepina, AF-DX 116 y metoctramina y similares, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos; o, para los compuestos enumerados como una sal, una sal farmacéuticamente aceptable alternativa de los mismos.

Los 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 los compuestos enumerados como una sal, una sal farmacéuticamente aceptable alternativa de los mismos.

A menos que se indique lo contrario, las 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.

Las siguientes formulaciones ilustran composiciones farmacéuticas representativas de la invención, además de métodos de preparación a modo de ejemplo. Pueden formularse opcionalmente uno o más agentes secundarios con una base libre cristalina de la invención (agente activo primario). Como alternativa, el agente o agentes secundarios pueden formularse por separado y coadministrarse con el agente activo primario, tanto simultáneamente como secuencialmente. Por ejemplo, en una realización, una formulación en polvo seco unitaria puede fabricarse para incluir tanto la base libre cristalina de la invención como uno o más agentes secundarios. En otra realización, una formulación se fabrica para contener la base libre cristalina de la invención y se fabrica una formulación o formulaciones separadas que contienen el agente o agentes secundarios. Dichas formulaciones en polvo seco después pueden envasarse en envases blíster separados y administrarse con un dispositivo IPS individual.

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

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

Formulación en polvo seco a modo de ejemplo para la 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) 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.

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

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

Como alternativa, se prepara una suspensión que contiene el 5 % en peso de una base libre cristalina de la invención, el 0,5 % en peso de lecitina y el 0,5 % en peso de trehalosa dispersando 5 g de la base libre cristalina en forma de partículas micronizadas con un tamaño medio inferior a 10 µm en una solución 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 en partículas que tienen un diámetro medio inferior a 1,5 µm. Las partículas se cargan en botes con 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado.

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

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

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

Los siguientes ingredientes se combinan minuciosamente y después 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, para un total de 460 mg de composición por cápsula.

Formulación en suspensión a modo de ejemplo para la 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.

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 (solución 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. 100 ml

Formulación inyectable a modo de ejemplo

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

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

Ejemplos

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 convencional:

AC	adenilil ciclasa
BSA	albúmina de suero bovino
AMPc	3'-5' adenosin monofosfato cíclico
CHO	ovario de hámster chino
cM_5	receptor M5 de chimpancé clonado
DCM	diclorometano
dPBS	solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
EDTA	ácido etilendiaminatetraacético
EtOAc	acetato de etilo
FBS	suero bovino fetal
FLIPR	lector de placas de formación de imágenes fluorométricas
HBSS	solución salina tamponada con Hank
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico
hM_1	receptor M1 humano clonado
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
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
MCh	metilcolina
MeCN	acetonitrilo

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

Preparación 1

Éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Se disolvió la sal de difosfato del éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-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 después 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 para producir el compuesto del título (9,6 g).

EJEMPLO 1 (no es parte de la invención)

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

Se disolvió éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (102,4 mg) en MeCN (500 µl). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 80 minutos y se formó un precipitado sólido de color blanco. La mezcla se dispuso en un bloque agitador para someterse a ciclos térmicos (0-40 ºC en bloques de una hora) durante 48 horas. Se observó un sólido inmóvil denso de color 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 al vacío usando un embudo de sinterización, después se dispusieron en la secadora de pistón a 40 ºC en vacío completo durante 15,5 horas, para producir 76,85 mg del compuesto cristalino del título.

EJEMPLO 2 (no es parte de la invención)

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

Se suspendió la sal de difosfato del éster 1-(2-{[4-(4-carbamoil-piperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico ($C_{35}H_{43}N_5O_4 \cdot 2H_3PO_4$; PM 793,75; 632,9 g) en acetato de isopropilo (11,08 l) y agua (6,33 l) a temperatura ambiente en atmósfera de nitrógeno. La suspensión se calentó a 53 ± 3 ºC 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 ºC. La mezcla se agitó durante aproximadamente 5 minutos a 53 ± 3 ºC antes de permitir que las fases sedimentaran. Después, las fases se separaron y la fase acuosa se retiró. Se añadió agua (3,16 l) a la fase orgánica mientras que se mantenía la temperatura de la mezcla por encima de 50 ºC. La mezcla se agitó durante 5 minutos a 53 ± 3 ºC antes de permitir que las fases sedimentaran. Las fases se separaron y la fase acuosa se retiró. Se añadió acetato de isopropilo (6,33 l) y después 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 solución transparente se redujo a 53 ± 3 ºC, después 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 bifenil-2-ilcarbámico (forma III; 3,2 g) en acetato de isopropilo (51 ml). La suspensión resultante se agitó a 53 ± 3 ºC durante 2 horas, después se enfrió a 10 ± 3 ºC durante 4 horas. La suspensión se agitó a 10 ± 3 ºC durante al menos 2 horas y después los sólidos se recogieron por filtración. La torta de filtración resultante se lavó con acetato de isopropilo (1,9 l, 2 veces) y el producto se secó al vacío a 50 ºC para producir el compuesto cristalino del título ($C_{35}H_{43}N_5O_4$; PM 597,76; 382,5 g, rendimiento del 80,3 %).

EJEMPLO 3 (no es parte de la invención)

Recristalización 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 (forma III)

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

EJEMPLO 4

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

Se disolvió éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (preparado como se ha descrito en la Preparación 1; 2,5 g) en MeCN (10 ml) para producir un material aceitoso viscoso de color amarillo pálido. Se añadió MeCN adicional (5 ml) para diluir el material. La solución se sembró con base libre cristalina (20 mg; forma III preparada como se ha descrito en el Ejemplo 1) y se agitó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Se observó una gran cantidad de precipitado de color 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 ºC 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 solución/suspensión fue por una barra agitadora magnética en cruz. El bloque agitador era una pieza separada del equipo que se calentó y se enfrió por un baño Julabo externo. El material se retiró a 0 ºC. Se observó que la suspensión había sedimentado, dejando una solución de color amarillo pálido encima del precipitado de color blanco. La suspensión se agitó y se dispuso de nuevo en el bloque agitador para someterla a ciclos térmicos. El material se retiró a 40 ºC, 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 al 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 al vacío durante 40 minutos para producir 2,3 g de un polvo de color blanco a reflujo. El material se dispuso en una secadora de pistón a 40 ºC durante 65 horas, para producir 2,2 g del compuesto cristalino del título en forma de un polvo de color blanco (pureza del 99,6 %).

La mayoría de los espectros de Raman del producto fueron coherentes con los 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 después 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 obtuvieron patrones de difracción de rayos X de polvo (DRXP) 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 XCelerator. Las condiciones de adquisición fueron radiación: Cu Kα; tensión del generador: 40 kV; corriente del generador: 45 mA; ángulo inicial 2,0° 2θ; ángulo final 40,0° 2θ, tamaño de etapa: 0,0167° 2θ. El tiempo por etapa fue de 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 características de los picos y las separaciones d calculadas se resumen a continuación, notificando solo de 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 los picos es de aproximadamente ± 0,1° 2θ. Las intensidades relativas de los picos variarán debido a la orientación preferida.

Forma III		
Pos. [º 2 Th]	Separación d [Å]	Int. rel. [%]
6,6	13,5	53,8
8,8	10,1	14,8
10,1	8,8	14,1
11,4	7,8	21,7
11,6	7,6	14,7
13,1	6,8	29,3
14,8	6,0	15,2
15,2	5,8	15,8

Forma IV		
Pos. [º 2 Th]	Separación d [Å]	Int. rel. [%]
6,6	13,4	27,1
10,6	8,4	13,7
13,1	6,8	42,0
15,0	5,9	58,4
16,0	5,5	15,0
17,3	5,1	41,2
17,7	5,0	45,6
18,6	4,8	100,0

Forma III		
Pos. [º 2 Th]	Separación d [Å]	Int. rel. [%]
16,1	5,5	30,1
16,4	5,4	13,9
16,9	5,2	13,8
17,5	5,1	25,5
18,2	4,9	38,4
18,6	4,8	23,6
19,3	4,6	23,1
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

Forma IV		
Pos. [º 2 Th]	Separación d [Å]	Int. rel. [%]
19,7	4,5	81,2
20,2	4,4	29,7
20,9	4,2	34,8
21,4	4,1	74,8
22,6	3,9	34,3
24,6	3,6	18,1
27,8	3,2	16,1

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

EJEMPLO 6

Análisis térmico

Se obtuvieron termogramas de calorimetría diferencial de barrido (CDB) 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 recipiente de aluminio, se colocó una tapa de recipiente encima y se plegó ligeramente sin sellar el recipiente. Los experimentos se realizaron usando una tasa de calentamiento de 10 ºC/min.

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

Un termógrafo de CDB representativo para la forma IV de la base libre cristalina se muestra en la FIG. 5. El termógrafo de CDB demuestra que la forma IV se caracteriza por un termógrafo de CDB 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 ºC (entalpía 0,8 J/g) y una segunda aparición principal de flujo de calor endotérmico que se produce a 118,8 ºC (entalpía 66,8 J/g).

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

Un trazo de ATG 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 ATG 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 es coherente con la perdida de disolvente residual.

ENSAYO 1

Ensayo de unión a radioligando

Preparación de membranas a partir de células que expresan los subtipos de receptor muscarínico hM_1, hM_2, hM_3 y hM_4

Se cultivaron estirpes celulares CHO que expresan establemente los subtipos de receptores muscarínicos hM_1, hM_2, hM_3 y hM_4 humanos clonados, respectivamente, a casi confluencia en medio que consistía en medio de HAM F-12 complementado con FBS al 10 % y 250 µg/ml de geneticina. Las células se cultivaron en una estufa de incubación de 5 % de CO_2, 37 ºC, 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 ºC 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 ºC. El sedimento de membranas se resuspendió después 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 ºC o se usaron inmediatamente. Las alícuotas de membranas de receptor hM_5 preparadas se obtuvieron directamente de Perkin Elmer y se guardaron a -80 ºC hasta su uso.

Ensayo de unión a radioligando sobre los subtipos de receptor muscarínico hM_1, hM_2, hM_3, hM_4 y hM_5

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 hM_1, hM_2, hM_3, hM_4 como hM_5 en tampón de ensayo a las siguientes concentraciones objetivo específicas de proteína (µg/pocillo): 10 µg para hM_1, 10-15 µg para hM_2, 10-20 µg para hM_3, 10-20 µg para hM, y 10-12 µg para hM_5. Las membranas se homogeneizaron brevemente usando un disruptor de tejido Polytron (10 segundos) antes de la adición a la placa de ensayo. Se realizaron estudios de unión de saturación para determinar los valores de K_D del radioligando usando cloruro de metilo de L-[*N*-metil-^{3}H]escopolamina ([^{3}H]-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 ensayo se realizaron con [^{3}H]-NMS a 1 nM y once concentraciones de compuestos de ensayo diferentes. Los compuestos de ensayo se disolvieron inicialmente a una concentración de 40 µM en tampón de dilución y después 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 BSA al 0,1 %, 25 µl de radioligando, 100 µl de compuesto de ensayo diluido y 50 µl de membranas. Las placas de ensayo se incubaron durante 6 horas a 37 ºC. 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 polietilenimina (PEI) al 0,3 %. Las placas de filtro se aclararon tres veces con tampón de lavado (HEPES 10 mM) para eliminar la radiactividad no unida. Después, las placas se secaron al aire y se añadieron 50 µl de líquido de centelleo líquido Microscint-20 (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA) a cada pocillo. Después, 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 competencia de un sitio. Los valores de K_i para los compuestos de ensayo 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 después se convirtió 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 ensayo 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 ensayo se determina midiendo la capacidad del compuesto de ensayo 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}I-AMPc (NEN SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Las células se aclaran una vez con dPBS y se elevaron con solución de tripsina-EDTA (tripsina al 0,05 %/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 después 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 $1,6 \times 10^6$ - $2,8 \times 10^6$ células/ml.

El compuesto de ensayo se disuelve inicialmente a una concentración de 400 µM en tampón de dilución (dPBS complementado con BSA 1 mg/ml (0,1 %)), y después 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 ensayo 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 ensayo diluido y 50 µl de células a los restantes pocillos de ensayo.

Las reacciones se incuban durante 10 minutos a 37 ºC 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 competencia 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.

En este ensayo, un menor valor de K_i indica que el compuesto de ensayo 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 inhibición por oxotremorina de la acumulación de AMPc mediada por forskolina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2, cuando se ensayó en este ensayo o un ensayo similar.

Bloqueo de la unión de [^{35}S]GTPγS mediada por agonista

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

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

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

Para determinar la capacidad de un compuesto de ensayo para inhibir la unión de [^{35}S]GTPγS estimulada por oxotremorina, lo siguiente se añade a cada pocillo de placas de 96 pocillos: 25 µl de tampón de ensayo con [^{35}S]GTPγS (0,4 nM), 25 µl de oxotremorina (CE_{90}) y GDP (3 µM), 25 µl de compuesto de ensayo diluido y 25 µl de membranas de células CHO que expresan el receptor hM_2. Las placas de ensayo se incuban después a 37 ºC 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 después se secan al aire o al vacío. Se añade líquido de centelleo Microscint-20 (50 µl) 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 competencia 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 ensayo y la concentración de oxotremorina en el ensayo como K_D y [L], concentración ligando, respectivamente.

En este ensayo, un menor valor de K_i indica que el compuesto de ensayo 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]GTPγS estimulada por oxotremorina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2, cuando se ensayó en este ensayo o un ensayo similar.

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 emite fluorescencia 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 retirar medios de crecimiento y dejando 50 µl/pocillo de tampón FLIPR. Las células se incuban después con 50 µl/pocillo de FLUO-4AM 4 µM (se preparó una solución 2X) durante 40 minutos a 37 ºC, 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 µl/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 de acuerdo con el método detallado en la medición de FLIPR y la sección de reducción de datos después, conjuntamente con la fórmula CE_F = ((F/100-F)^1/H) * CE_{50}. Se prepara una concentración de oxotremorina de 3 x 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 de acuerdo con la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng & Prusoff, 1973).

En este ensayo, un menor valor de K_i indica que el compuesto de ensayo 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 ensayó en este ensayo o un ensayo similar.

Ensayo 3

Ensayo de Einthoven de rata

Este ensayo *in vivo* se usa para evaluar los efectos broncoprotectores de compuestos de ensayo que presentan actividad de antagonista de receptores muscarínicos. Todos los compuestos de ensayo 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 solución de compuesto de ensayo 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. Después se direcciona la tráquea y se inserta una cánula 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, después las ratas se exponen no acumulativamente a aumentos incrementales de 2 veces del MCh broncoconstrictor (5, 10, 20, 40 y 80 µg/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 ensayo tiene un efecto broncoprotector. Se espera que el compuesto de fórmula I, cuando se ensayó en este ensayo a una dosis de 100 µg/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 convencionales en el ensayo de rata de Einthoven 1,5 h después de la dosis. Se determinó que el orden de potencia (DI_{50}) para los cinco patrones probados era: ipratropio (4,4 µg/ml) > tiotropio (6 µg/ml)> des-metil-tiotropio (12 µg/ml) > glicopirrolato (15 µg/ml) > LAS-34237 (24 µg/ml). La potencia del compuesto de ensayo 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 µg/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 máxima 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 ensayo, 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 les inserta una cánula 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 ensayo. 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 máximos 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 pretratamiento correspondiente, a cada dosis.

Se espera que los compuestos a modo de ejemplo de la invención que se someten a ensayo 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 ensayo. Generalmente se prefieren los compuestos que tienen un índice de selectividad de pulmón aparente superior a aproximadamente 5.

REIVINDICACIONES

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 una difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ de 6,6 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,7 ± 0,1 y 20,2 ± 0,1, y que tiene cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados entre 10,6 ± 0,1, 15,0 ± 0,1, 16,0 ± 0,1, 17,3 ± 0,1, 17,7 ± 0,1, 20,9 ± 0,1, 21,4 ± 0,1, 22,6 ± 0,1, 24,6 ± 0,1 y 27,8 ± 0,1.

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 entre 6,6 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 15,0 ± 0,1, 17,3 ± 0,1, 17,7 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,7 ± 0,1, 20,2 ± 0,1, 20,9 ± 0,1, 21,4 ± 0,1 y 22,6 ± 0,1.

3. El compuesto cristalino de la reivindicación 1, adicionalmente caracterizado por un patrón de difracción de rayos X de polvo en el que las posiciones de los picos están sustancialmente de acuerdo con las posiciones de los picos del patrón que se muestra en la FIG. 2.

4. El compuesto de la reivindicación 1, adicionalmente caracterizado por un termograma de calorimetría diferencial de barrido que muestra un punto de fusión de aproximadamente 119 ºC.

5. El compuesto de la reivindicación 1, adicionalmente caracterizado por un termograma de calorimetría diferencial de barrido sustancialmente de acuerdo con el que se muestra en la FIG. 5.

6. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y el compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. La composición de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente un agente seleccionado entre agonistas de receptores adrenérgicos β_2, 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.

8. La composición de la reivindicación 7, que comprende un agonista de receptores adrenérgicos β_2 y un agente antiinflamatorio esteroideo.

9. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en forma micronizada.

10. Un proceso para la preparación de la base libre cristalina de la reivindicación 1, que comprende a) formar un cristal de semilla de una base libre cristalina de éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]-metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico caracterizado por una difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ de 6,6 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,7 ± 0,1 y 20,2 ± 0,1 y que tiene cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados entre 8,8 ± 0,1, 10,1 ± 0,1, 11,4 ± 0,1, 11,6 ± 0,1, 14,8 ± 0,1, 15,2 ± 0,1, 16,1 ± 0,1, 16,4 ± 0,1, 16,9 ± 0,1, 17,5 ± 0,1, 18,2 ± 0,1, 19,3 ± 0,1, 19,9 ± 0,1, 20,8 ± 0,1, 21,1 ± 0,1, 21,7 ± 0,1 y 22,3 ± 0,1; b) disolver una base libre cristalina de éster 1-(2-{[4-(4-carbamoilpiperidin-1-ilmetil)benzoil]-metilamino}etil)piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico caracterizado por una difracción de rayos X de polvo que comprende picos de difracción a valores 2θ de 6,6 ± 0,1, 13,1 ± 0,1, 18,6 ± 0,1, 19,7 ± 0,1 y 20,2 ± 0,1 y que tiene cinco o más picos de difracción adicionales a valores 2θ seleccionados entre 8,8 ± 0,1, 10,1 ± 0,1, 11,4 ± 0,1, 11,6 ± 0,1, 14,8 ± 0,1, 15,2 ± 0,1, 16,1 ± 0,1, 16,4 ± 0,1, 16,9 ± 0,1, 17,5 ± 0,1, 18,2 ± 0,1, 19,3 ± 0,1, 19,9 ± 0,1, 20,8 ± 0,1, 21,1 ± 0,1, 21,7 ± 0,1 y 22,3 ± 0,1 en acetonitrilo para formar una solución; y c) añadir el cristal semilla a la solución.

11. Un proceso para la 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 1-5.

12. Un compuesto como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en terapia.

13. Un compuesto como se reivindica en la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el asma, o para la producción de broncodilatación.

14. El uso de un compuesto como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o el asma, o para la producción de broncodilatación.

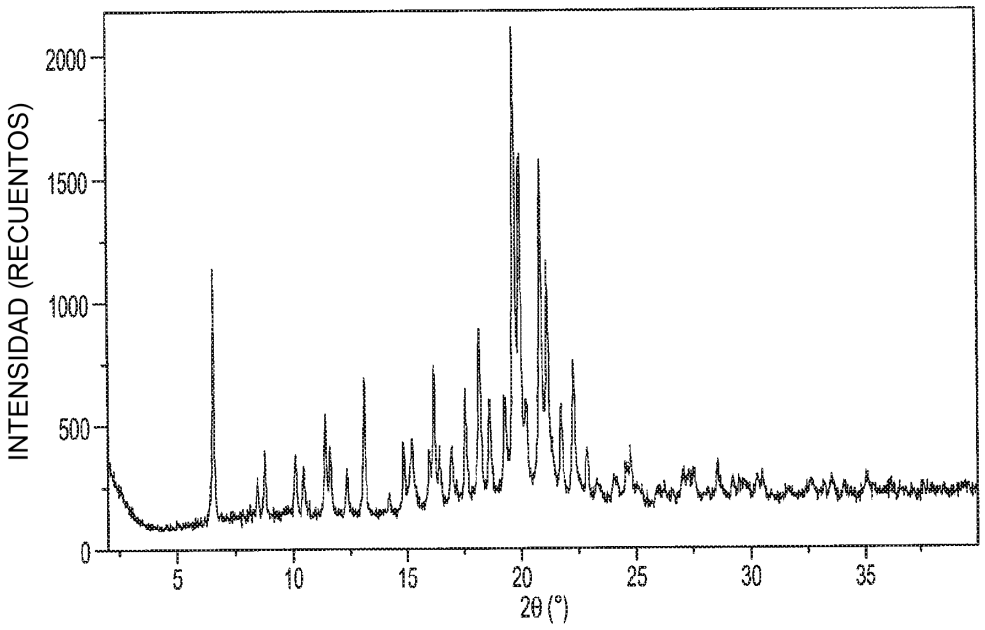

INTENSIDAD (RECUENTOS)
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
30
35
2θ (°)

FIG. 1

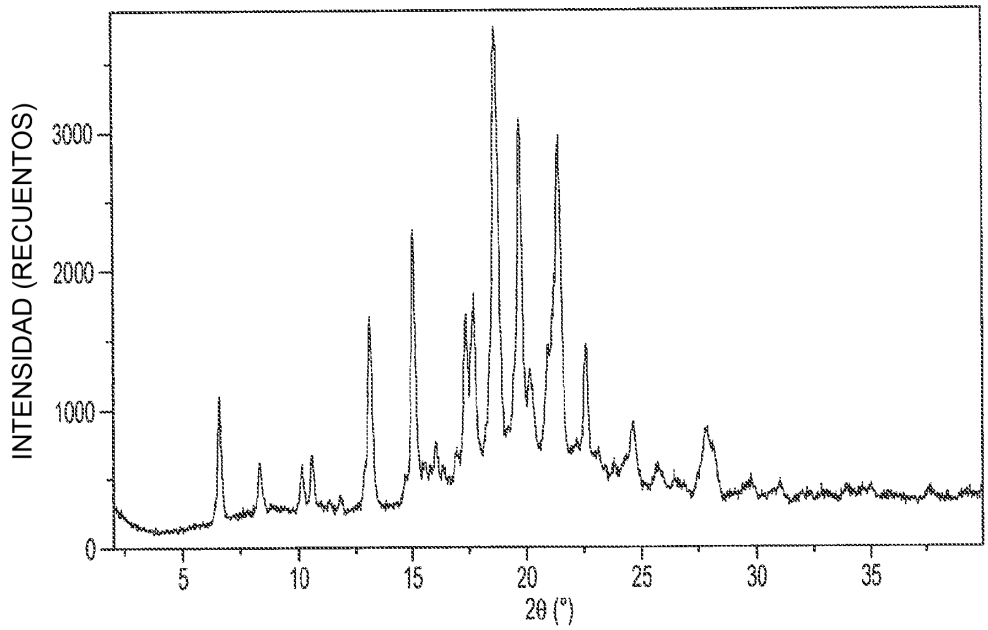

INTENSIDAD (RECUENTOS)
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
30
35
2θ (°)

FIG. 2

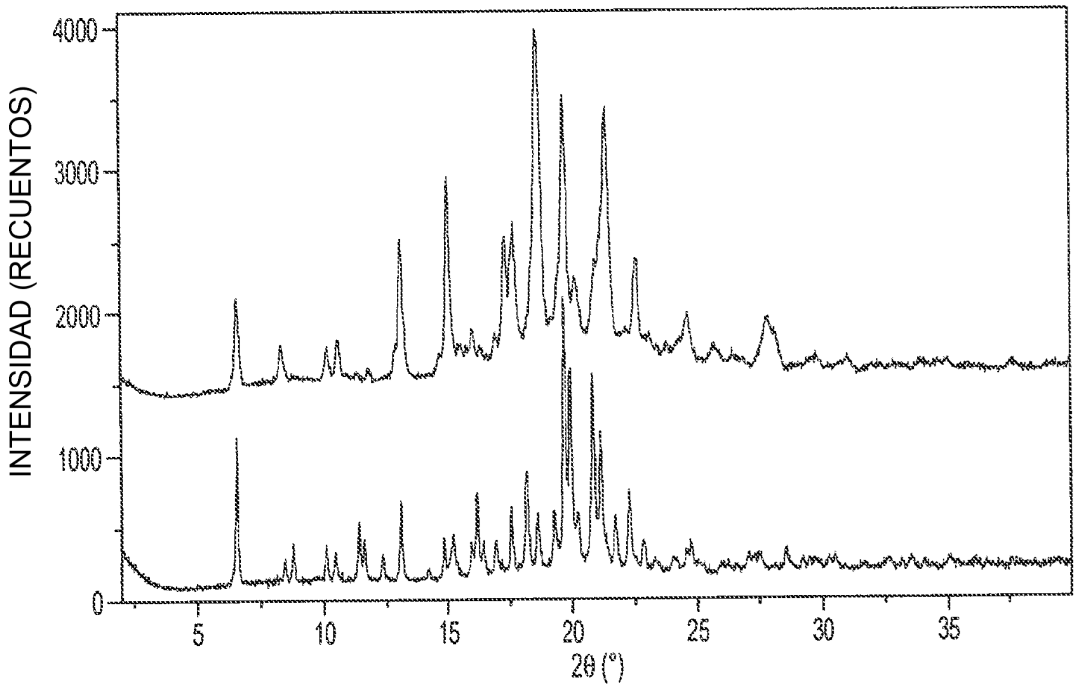

INTENSIDAD (RECUENTOS)
4000
3000
2000
1000
0
5
10
15
20
25
30
35
2θ (°)

FIG. 3

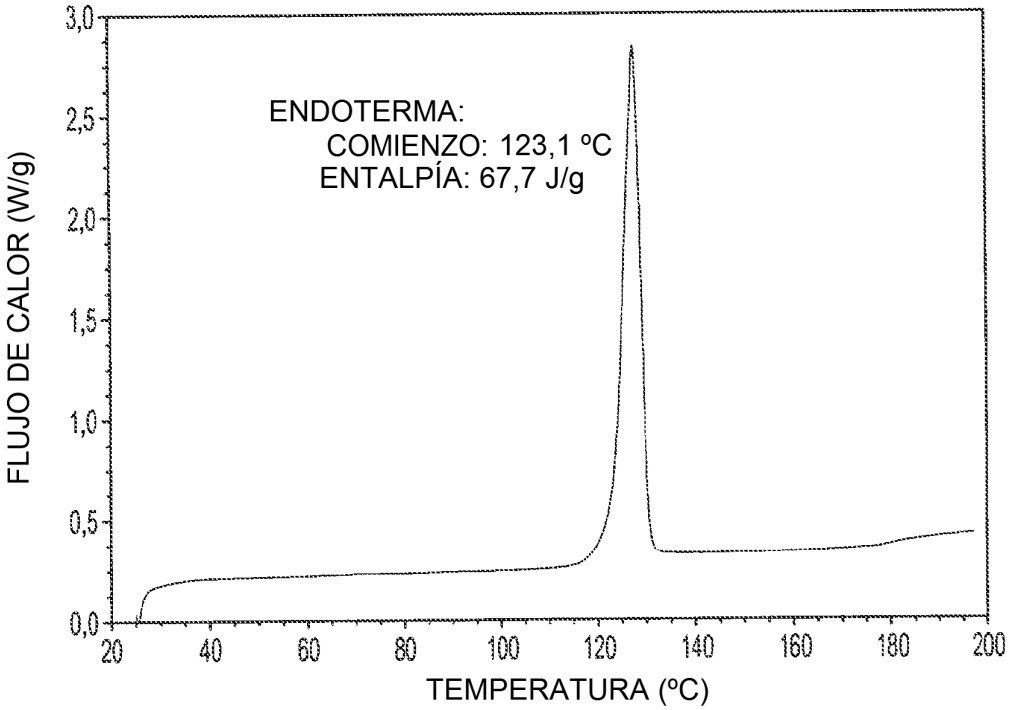

ENDOTERMA:
COMIENZO: 123,1 ºC
ENTALPÍA: 67,7 J/g
FLUJO DE CALOR (W/g)
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
TEMPERATURA (ºC)

FIG. 4

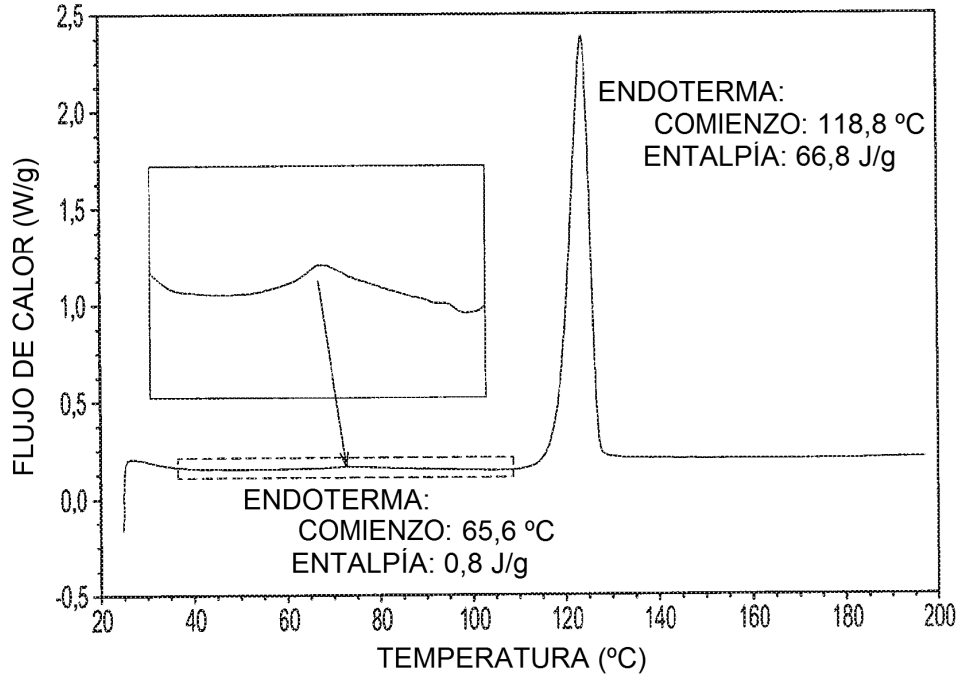

FLUJO DE CALOR (W/g)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-0,5
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
TEMPERATURA (ºC)
ENDOTERMA:
COMIENZO: 118,8 ºC
ENTALPÍA: 66,8 J/g
ENDOTERMA:
COMIENZO: 65,6 ºC
ENTALPÍA: 0,8 J/g

FIG. 5

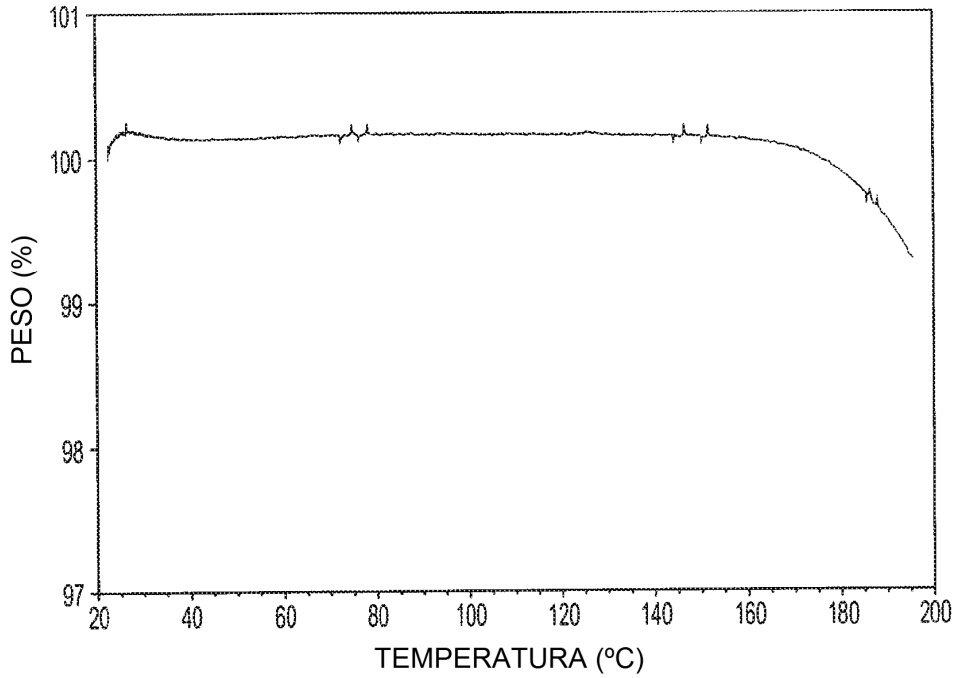

PESO (%)
101
100
99
98
97
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
TEMPERATURA (ºC)

FIG. 6

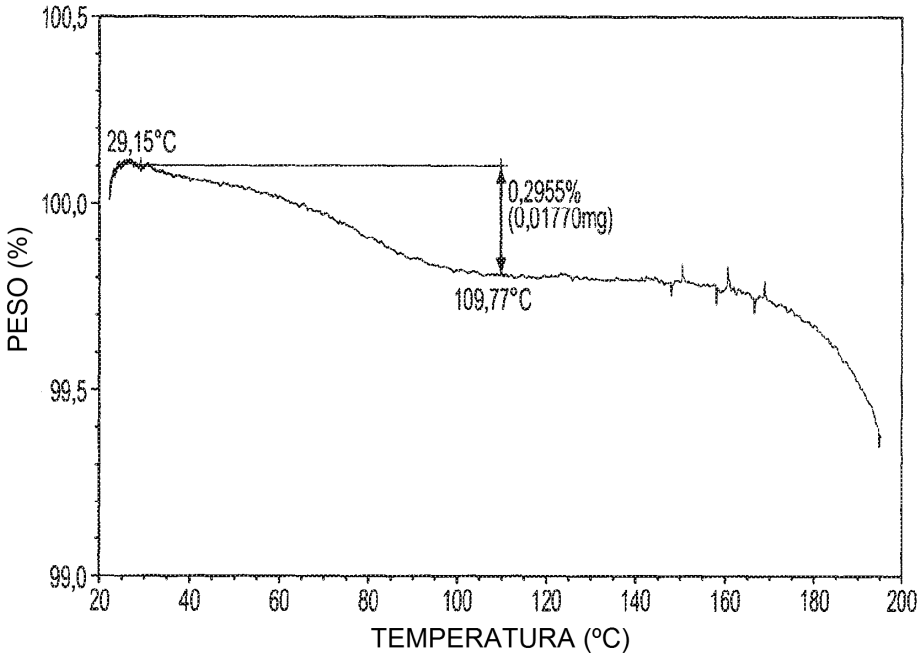

100,5
100,0
99,5
99,0
PESO (%)
29,15°C
0,2955%
(0,01770mg)
109,77°C
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
TEMPERATURA (ºC)

FIG. 7