



00 14624

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

GERMAN CASTILLO GRAU

País de Domicilio

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

Departamento o Estado

PENNSYLVANIA

Dirección

One Franklin Plaza

Ciudad

FILADELFIA

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO PODER No.15.479

Nombre

GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección y Domicilio

Carrera 13 No.37-43, Piso 12

Ciudad

Santafé de Bogotá

Teléfono 285-74-60

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

Siegfried Christensen

Theodore J. Torphy

Richard Nieman

Identificación

Dirección

Filadelfia, Pennsylvania, E.U.A. -Bryn Mawr, Pennsylvania, E.U.A.

Filadelfia, Pennsylvania, E.U.A.

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

METODO PARA TRATAR ASMA INDUCIDA POR EL EJERCICIO

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☒

(33) País E.U.A.

(32) Fecha

Marzo 1, 1999

(31) No. Solicitud

60/122,464

Junio 28, 1999

60/141,291

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☐ 12 meses

☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

(51) CLASIFICACION INTERNACIONAL

RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Se describen métodos para tratar asma inducida por ejercicio, usando un inhibidor de PDE4.

ANEXOS DE LA SOLICITUD

Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica	☒
Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC	☒
Recibo de la tasa respectiva	☒
Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación	☐
Si se reivindica prioridad Andina:	
Copia de la primera solicitud	☐
Traducción oficial	☐
Si se reivindica prioridad Unionista:	
Copia certificada de la primera solicitud:	☐
Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior	
Traducción simple	☐
Capítulo descriptivo	☒
Dibujos, planos necesarios	☐
Capítulo reivindicatorio	☒
Tarjeta archivo propietarios según formato	☒
Tarjeta archivo temático según formato	☒
Extracto para publicación según formato	☒
Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms	☐
Otros Documentos	☐

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

NOMBRE GERMAN CASTILLO GRAU

CC.17'017.671 Btá

T.P.No. 2978



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 14,834
FECHA : MARZO 1 DE 2000

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 00014624 00000000 Folios: 30
Fecha (AMD): 2000-03-01 13:46:36
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	SUCURSAL	CUENTA	No. PAGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	BOGOTA	050-00024-9	767241	1,216,000.00

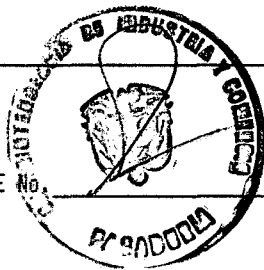
***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	608,000.00
		TOTAL :	\$ 608,000.00

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.



Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10
Conmutador: 334 12 21
Fax: 281 31 25
Santa Fe de Bogotá, D.C., Colombia

METODO PARA TRATAR ASMA INDUCIDA POR EL EJERCICIO

Campo de la invención

- 5 Esta invención se refiere a compuestos que inhiben o se unen preferentemente a una forma de una isoenzima fosfodiesterasa denominada 4 (en lo sucesivo, PDE4), mientras exhiben una unión o inhibición igual, o preferiblemente menor, para una segunda forma de la enzima, y de este modo son útiles para tratar broncoconstricción inducida por el ejercicio en pacientes con asma. Estas formas de isoenzimas, que se cree son formas diferentes de conformaciones no
- 10, interconvertibles de la misma enzima, se distinguen por su elevada afinidad por rolipram, un inhibidor PDE 4 arquetípico. El rolipram se une con elevada afinidad a una localización de una forma, pero con baja afinidad a la localización catalítica de la otra. En este documento, una forma se denomina localización de unión del rolipram de elevada afinidad, y la otra forma se identifica como localización de unión del rolipram de baja afinidad. También se describe un método para
- 15 tratar selectivamente el asma inducida por el ejercicio (EIA) inhibiendo preferentemente la forma de baja afinidad de la localización catalítica en la isoenzima PDE 4. También se describe un método para tratar (EIA) administrando un compuesto que se une preferentemente a la localización de unión de baja afinidad.

Antecedentes de la invención

- Las nucleótido-fosfodiesterasas (PDE) cíclicas representan una familia de enzimas que hidrolizan los segundos mensajeros intracelulares ubicuos, 3',5'-monofosfato de adenosina (cAMP) y 3',5'-monofosfato de guanosina (cGMP) para dar sus correspondientes metabolitos 5'-monofosfatos inactivos. Se cree que existen al menos nueve clases distintas de isoenzimas PDE,
- 25 cada una de las cuales posee características físicas y cinéticas singulares, y cada una de las cuales representa un producto de una familia génica diferente. Éstas se distinguen utilizando los números arábigos 1 a 9.

- La enzima diana en esta invención es la isoenzima PDE4 en todas sus diversas formas y en el dominio completo de sus distribuciones en todas las células. Es una enzima cAMP-selectiva de baja K_m (K_m para cAMP = 1-5 μM) que tiene poca actividad contra cGMP ($K_m > 100 \mu M$). Los miembros de esta clase de isoenzimas tienen las características interesantes de existir en dos o más formas no interconvertibles o lentamente interconvertibles que se unen a rolipram y a otros inhibidores de PDE 4 con potencias de orden de rango distinto. Así, el mismo producto génico puede existir en más de un estado conformacional catalíticamente activo. Es importante
- 35 señalar que las proporciones relativas de las diferentes formas ligantes pueden variar dependiendo del tipo de célula de los tejidos. Por ejemplo, las células inflamatorias pueden contener una proporción relativamente alta de la forma que se une a rolipram con baja afinidad, mientras que las células cerebrales y parietales pueden contener una proporción relativamente alta de la forma

que se une a rolipram con alta afinidad.

De particular interés en esta invención es el papel que juega esta clase de isoenzimas en la inflamación y en el músculo liso de las vías respiratorias. Los estudios indican que juega un papel prominente en la regulación de cAMP en una amplia variedad de células inflamatorias (es decir, mastocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, y monocitos) y el músculo liso de las vías respiratorias. El trabajo de esta invención es particularmente aplicable a células inflamatorias y al músculo liso de las vías respiratorias; es de particular interés el tipo de isoenzima expresado en monocitos humanos. Esto es debido a que el AMP cíclico sirve como un segundo mensajero para inhibir la quimiotaxis y activación de las células inflamatorias. Además, el cAMP media la relajación del músculo liso de las vías respiratorias. Esto, acoplado con el papel principal de PDE 4 en el metabolismo de cAMP, ha proporcionado los soportes para investigar los inhibidores de PDE 4: en virtud de su capacidad para elevar el contenido de cAMP en leucocitos y músculo liso de las vías respiratorias, los inhibidores de PDE 4 pueden poseer actividades antiinflamatorias y broncodilatadoras.

Los inhibidores actuales de PDE utilizados en el tratamiento de la inflamación y como broncodilatadores, fármacos como la teofilina y la pentoxifilina, inhiben las isoenzimas PDE de forma indiscriminada en todos los tejidos. Estos compuestos exhiben efectos secundarios, aparentemente debido a que inhiben no selectivamente todas las clases, o la mayoría, de isoenzimas PDE en todos los tejidos. Esto es una consideración para evaluar el perfil terapéutico de estos compuestos. Tomada colectivamente, esta información sugiere que los efectos laterales asociados con el uso de inhibidores de PDE no selectivos estándares se pueden reducir buscando nuevos inhibidores selectivos de isoenzimas para el PDE predominante en el tejido o célula de interés. El estado de enfermedad específico puede ser tratado eficazmente por dichos compuestos, pero se pueden presentar efectos secundarios no deseados que, si pudieran ser evitados o minimizados, aumentaría el efecto terapéutico global de esta estrategia para tratar ciertos estados de enfermedad. Aunque, en teoría, los inhibidores de PDE isoenzima-selectivos han de representar una mejora sobre los inhibidores no selectivos, los inhibidores selectivos ensayados hasta la fecha no están desprovistos de efectos secundarios producidos como una extensión de la inhibición de la isoenzima de interés en un tejido inapropiado o no específico. Por ejemplo, estudios clínicos con el inhibidor selectivo de PDE 4 rolipram, que se desarrolló como antidepresivo, indican que tiene actividad psicotrópica y produce efectos gastrointestinales, por ejemplo, pirosis, náuseas y emesis. Hay indicaciones de que los efectos secundarios de la denbufilina, otro inhibidor de PDE 4 específico para el tratamiento de demencia por multi-infarto, también pueden incluir pirosis, náuseas y emesis. Se piensa que estos efectos secundarios ocurren como resultado de la inhibición de PDE 4 en zonas específicas del sistema nervioso central (SNC) y del sistema gastrointestinal.

En 1986, Schneider y colaboradores describieron la presencia y características de localizaciones de unión de [3 H]-rolipram estereoselectivas, de alta afinidad, en homogenatos de cerebro de rata. Aunque se asumió que estas localizaciones de unión representadas por la

localización catalítica de la "fosfodiesterasa cAMP, no calmodulina-dependiente" (es decir, PDE 4) del cerebro de rata, se observó una anomalía sorprendente. Bajo condiciones experimentales similares, aunque no idénticas, los datos mostraron que el rolipram tuvo un $K_d = 1 \text{ nM}$, mientras que inhibió la actividad de PDE 4 de cerebro de rata con un $K_i = 1 \mu\text{M}$. Así, hubo una diferencia de 1000 veces en la afinidad de rolipram por la localización de unión frente a su influencia sobre la actividad catalítica. Aunque no se establecieron ni relaciones de actividad de estructura (SAR) detalladas para la inhibición de PDE ni la competición para la unión de $[^3\text{H}]$ -rolipram, la diferencia sustancial en la potencia de rolipram como un inhibidor de PDE 4, comparada con su potencia en la localización de unión, pareció cuestionar la validez del supuesto de que ambas actividades estaban contenidas dentro del mismo lugar molecular.

Debido a este enigma, se han iniciado varios estudios. Uno de ellos pretende determinar si la localización de unión de alta afinidad del rolipram existe en la misma proteína que la de la localización catalítica de cAMP. Otro estudio pretende determinar si la SAR para la inhibición de PDE 4 fue la misma, o no, que la SAR para la competición con la localización de unión del rolipram de alta afinidad. Un tercer estudio se llevó a cabo para probar y elucidar qué importancia biológica, si la hay, puede haber en estos hallazgos, particularmente si se puede relacionar con el desarrollo de nuevas terapias de fármacos.

A medida que los datos se recogían de varios ensayos, se hizo manifiesto que hay al menos dos formas de unión sobre PDE 4 recombinante de monocitos humanos (hPDE 4) al que se unen los inhibidores. Una explicación para estas observaciones es que hPDE 4 existe en dos formas diferenciadas. Una de ellas une los análogos de rolipram y denbufilina con alta afinidad mientras que la otra une estos compuestos con baja afinidad. En este documento se distingue estas formas haciendo referencia a ellas como la forma ligante de rolipram con alta afinidad (HPDE 4) y la forma ligante de rolipram con baja afinidad (LPDE 4).

La importancia de estos hallazgos reside en el descubrimiento de que los compuestos que compiten poderosamente por la forma ligante de rolipram de alta afinidad (HPDE 4) tiene más efectos secundarios, o efectos secundarios más intensos, que los que compiten más poderosamente con LPDE 4 (forma ligante de rolipram de baja afinidad). Ahora se dispone de datos que indican que los compuestos pueden ser dirigidos específicamente a la forma ligante de baja afinidad de PDE 4, y que esta forma se diferencia de la forma ligante para la cual el rolipram es un ligante de alta afinidad. Se ha encontrado que existen distintos SAR para inhibidores que actúan en la forma ligante de rolipram de alta afinidad frente a la forma ligante de rolipram de baja afinidad. Además, estas dos formas parecen tener diferentes papeles funcionales. Así, compuestos que interaccionaban con la forma ligante de rolipram de baja afinidad parecen tener actividad anti-inflamatoria, mientras que los que interaccionan con la forma ligante de rolipram de alta afinidad producen efectos secundarios, o exhiben más intensamente esos efectos secundarios.

No hay una explicación clara para estos hallazgos. Sin embargo, se ha propuesto que PDE 4 puede existir en dos estados, terciario y cuaternario, diferentes. Se cree que ambas formas

son catalíticamente activas. El rolipram se une a una localización catalítica de una forma con alta afinidad, definida en este documento como aquella que tiene un K_i menor que 10 nanomolar, y a la otra forma con baja afinidad, definida en este documento como aquella que tiene un K_i mayor que 100 nanomolar.

- 5 Una consecuencia útil de estos hallazgos es que ahora es posible identificar compuestos que inhiben preferentemente la actividad catalítica de cAMP cuando la enzima está en la forma que se une a rolipram con baja afinidad, reduciendo con ello los efectos secundarios que están unidos aparentemente a la inhibición de la forma que se une a rolipram con alta afinidad.

- 10 Esta invención proporciona así un índice terapéutico superior en relación con EIA frente a los efectos secundarios.

Sumario de la invención

- 15 Esta invención se refiere a un método para tratar asma inducida por el ejercicio, a la vez que se minimiza los efectos gastrointestinales y psicotrópicos, cuyo método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto que tenga una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o más en relación con la IC_{50} para la forma catalítica de PDE 4 que une rolipram con una alta afinidad dividida por la IC_{50} para la forma que une rolipram con una baja afinidad.

Descripción detallada de la invención

- 20 El asma es una enfermedad compleja, multifactorial, caracterizada por la obstrucción reversible de las vías respiratorias, inflamación de las vías respiratorias e hiperreactividad no específica de las vías respiratorias a una variedad de retos farmacológicos y medioambientales. Diversos mediadores, liberados de células inflamatorias e inmunes activadas, producen edema
25 pulmonar, broncoconstricción e hipersecreción de la mucosa que conduce a cambios en la morfología de las vías respiratorias. Hay evidencia que implica a la inflamación de las vías respiratorias como el principal proceso patológico subyacente, responsable de la manifestación del asma.

- El asma inducida por el ejercicio (EIA) se define como un incremento temporal en la
30 resistencia de las vías respiratorias, que ocurre varios minutos después del ejercicio intenso. El EIA afecta al 80% de los asmáticos, y un 35-40% de pacientes con rinitis alérgica experimenta EIA. En pacientes con EIA, el ejercicio conduce a la hiperventilación, pérdida de agua respiratoria, y enfriamiento de las vías respiratorias lo que, a su vez, puede desencadenar que los mastocitos y basófilos circulantes liberen productos químicos que median la inflamación,
35 secreción de las mucosas, contracción del músculo liso, y vasodilatación durante el ejercicio.

Además del ejercicio, otros factores pueden desencadenar un incremento temporal en la resistencia de las vías respiratorias. Estos factores incluyen pero no se limitan a contaminantes, por ejemplo SO_2 , y cambios de temperatura, especialmente debido al aire frío. Así, el tratamiento

del asma inducido por la contaminación (PIA) y del asma inducido por aire frío (CIA) también están dentro del alcance de esta invención.

La razón fundamental de los inhibidores PDE 4 en esta enfermedad se basa en el papel del monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) como mensajero secundario que media una amplia supresión de actividad de células inmunes e inflamatorias, junto con el conocimiento de que la PDE 4 es la principal isoenzima que hidroliza el cAMP en estos músculos lisos, aunque parece ser menos dominante aquí que en las células inflamatorias.

Para los fines de esta invención, la localización catalítica de cAMP que se une a rolipram con baja afinidad se denomina la localización de unión "de baja afinidad" (LPDE 4), y la otra forma de esta localización catalítica que se une a rolipram con alta afinidad se denomina la localización de unión "de alta afinidad" (HPDE 4).

Se realizaron experimentos iniciales para establecer y validar un ensayo de unión de [³H]-rolipram. Los detalles de este trabajo se dan en el Ejemplo 1, más abajo.

Para determinar si ambas actividades, la actividad de unión de alta afinidad y la actividad de unión de baja afinidad, residían en el mismo producto génico, se transformaron las levaduras por métodos conocidos, y se siguió la expresión de PDE 4 recombinante a lo largo de un período de fermentación de 6 horas. El análisis de transferencia western que usa un anticuerpo dirigido contra PDE 4 indicó que se incrementó con el tiempo la cantidad de PDE 4 expresado, alcanzando un máximo después de 3 horas de crecimiento. Además, más del 90% del producto inmunorreactivo estaba en el sobrenadante de alta velocidad (100.000 x g) de los lisados de levadura. La unión de [³H]R-(-)-rolipram y la actividad de PDE se siguió junto con la expresión proteínica. La actividad de PDE 4 se coexpresó con la actividad ligante de rolipram, indicando que ambas funciones existen en el mismo producto génico. Similares a los resultados con el análisis de transferencia western, se encontró que más del 85% de la actividad de PDE inhabitable de rolipram, y la actividad ligante de [³H]-rolipram, estaba presente en la fracción sobrenadante de la levadura.

Globalmente, la mayoría del PDE 4 recombinante expresado en este sistema existe como LPDE 4, y sólo una pequeña fracción existe como HPDE 4. En consecuencia, la inhibición de la actividad catalítica de PDE 4 recombinante refleja principalmente las acciones de los compuestos en LPDE 4. La inhibición de la actividad catalítica de PDE 4 se puede usar así como un índice de la potencia de los compuestos en LPDE 4. La potencia de los compuestos en HPDE 4 se puede determinar examinando su capacidad para competir por [³H]R-rolipram. Para desarrollar las relaciones de actividad de estructura (SAR) para ambas localizaciones de unión de rolipram de baja afinidad y de alta afinidad, se determinó las potencias de los compuestos en dos sistemas de ensayo. Se tabularon los resultados de los experimentos, usando compuestos estándares. Como se esperaba, ciertos compuestos eran claramente más potentes para competir con [³H]-rolipram en la localización para la que el rolipram demostró una unión de alta afinidad según se compara con la otra localización, aquella en la que el rolipram es un ligante de baja afinidad. La correlación

de SAR entre la unión de alta afinidad y la unión de baja afinidad fue pobre, y se concluyó que la SAR para la inhibición de la unión de [³H]-rolipram de alta afinidad fue diferente de la SAR para la unión a la localización de unión de rolipram de baja afinidad. La Tabla I proporciona los resultados para este trabajo de SAR.

5

Tabla I

Compuesto	IC ₅₀ de baja afinidad	IC ₅₀ de alta afinidad	Relación alta/baja
10 1-(5-tetrazol)-3-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclopentano	1,1	0,002	0,0018
cis-[3-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-ciclopentan-1-carboxilato]	2,7	0,021	0,0078
15 N-[2-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)etil]oxamida	0,89	0,012	0,013
R-rolipram	0,31	0,004	0,013
N-[2-(3,4-bisdifluorometoxifenil)etil]oxamida	1,6	0,4	0,25
Ro 20-1724	2,6	0,19	0,07
20 S-rolipram	1,1	0,095	0,086
(R)-(+)-1-(4-bromobencil)-4-[(3-ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]-2-pirrolidona	4,0	0,45	0,11
25 1-(4-aminobencil)-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-2-imidazolidinona	1,4	0,1	0,07
denbufilina	0,29	0,05	0,17
30 3-(ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-1-(4-N'-[N2-ciano-S-metil-isotioureido]bencil)-2-pirrolidona	0,1	0,03	0,30

10

	(R)-(+)-1-(4-bromobencil)-4-[(3-ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]-2-pirrolidona	0,06	0,02	0,33
	IBMX	29,1	20,3	0,698
5	[4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)pirrolidin-2-ilden]acetato de (S)-(-)-etilo	0,46	0,45	0,98
	<i>Papaverina</i>	10	10	0,1
10	cis-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-ciclohexan-1-carboxilato]	0,095	0,110	1,1
15	cis-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ol]	0,021	0,04	2,0
	[4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)pirrolidin-2-ilden]acetato de (R)-(+)-etilo	0,14	0,3	2,143
20	2-carbometoxi-4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ona	0,140	0,5	3,571
	trequinsina	1,6	5,0	3,125
25	dipiridamol	5,2	32,5	6,25

La denbufilina es 7-acetonil-1,3-dibutilxantina fabricada por SmithKline Beecham. La papaverina es 1-[(3,4-dimetoxifenil)metil]-6,7-dimetoxiisouquinolina. La trequinsina es 2,3,6,7-tetrahidro-2-(mesitilimino)-9,10-dimetoxi-3-metil-4H-pirimido[6,1-a]isoquinolin-4-ona. El dipiridamol es el nombre genérico para 2,2',2'',2'''-[(4,8-dipiperidinopirimido[5,4-d']pirimidin-2,6-diil)dinitrilo]tetraetanol.

Estos resultados ilustran que algunos compuestos pueden inhibir selectivamente la forma llamada de baja afinidad según se compara con la forma de alta afinidad, y viceversa. La importancia de este hallazgo es que es factible minimizar los efectos secundarios diseñando o eligiendo compuestos que inhiben selectivamente (preferentemente) una localización, afectando con ello la respuesta deseada a la exclusión de otra respuesta, no deseada, o al menos minimizar la respuesta no específica hasta un grado en el que no interfiere con la terapia pretendida hasta un

grado inaceptable.

A pesar de este trabajo, no se ha definido la base para las SAR dispares para la unión de rolipram de alta afinidad y la unión de rolipram de baja afinidad en la isoenzima PDE 4. Sin embargo, se ha descubierto que si un compuesto exhibe una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o más, calculada como la relación de la IC_{50} para la forma de unión de rolipram de alta afinidad dividida por la IC_{50} para la forma que une rolipram con una baja afinidad, tendrá un índice terapéutico aceptable. Esto es, se puede tratar con éxito una variedad de enfermedades inmunes e inflamatorias a la vez que no se afectan en absoluto otros fenómenos fisiológicos, o hasta un grado inaceptable. En este documento, la realización mucho más preferida comprende inhibir la localización de unión de rolipram de baja afinidad como un medio para tratar enfermedades inflamatorias o alérgicas.

Compuestos

Esta invención abarca aquellos compuestos que tienen una relación de IC_{50} (unión alta/baja) de aproximadamente 0,1 o mayor. Esto incluye cualquiera y todos los compuestos que son inhibidores de PDE 4 como la prueba expuesta en este documento, y que demuestran en estos ensayos, o similares, una relación dentro del intervalo definido; de particular interés son aquellos compuestos que no son de dominio público y/o no están probados o conocidos como inhibidores de PDE 4 antes de la fecha de presentación de esta solicitud.

Los ejemplos de compuestos que cumplen la relación estándar de IC_{50} se dan en la Tabla 1 anterior, así como en la patente de EE.UU. 5.448.686; la patente de EE.UU. 5.605.923; y la patente de EE.UU. 5.552.438. Cada una de estas solicitudes se incorpora aquí como referencia en su totalidad como si se expusieran en este documento.

Una técnica preferida para seleccionar compuestos útiles es aquella que determina un compuesto que tiene una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o relación mayor del valor de IC_{50} para competir con la unión de [3H]R-rolipram 1 nM a una forma de PDE4 que se une a rolipram con alta afinidad comparado con el valor de IC_{50} para inhibir la actividad catalítica de PDE4 de una forma que se une a rolipram con baja afinidad utilizando [3H]-cAMP 1 μ M como sustrato.

Los compuestos preferidos de esta invención son aquellos que tienen una relación de IC_{50} mayor que 0,5, y particularmente aquellos compuestos que tienen una relación mayor que 1,0. Compuestos tales como *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxilato], 2-carbometoxi-4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ona, y *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ol] son ejemplos de estructuras que se unen preferentemente a la localización de unión de baja afinidad y que tienen una relación de IC_{50} de 0,1 o más.

Los presente compuestos y sales farmacéuticamente aceptables se pueden administrar de manera estándar para el tratamiento de las enfermedades indicadas, por ejemplo, de forma oral,

parenteral, sublingual, dérmicamente, transdérmicamente, rectalmente, vía inhalación o vía administración bucal. También se puede utilizar una preparación de liberación controlada.

Los presentes compuestos y sales farmacéuticamente aceptables, que son activos cuando se administran oralmente, se pueden formular como jarabes, comprimidos, cápsulas, preparación
5 de liberación controlada, o tabletas. Una formulación de jarabe comprenderá generalmente una suspensión o disolución del compuesto o sal en un vehículo líquido, por ejemplo, etanol, aceite de cacahuete, aceite de oliva, glicerina o agua, con un agente saborizante o colorante. Cuando la composición está en forma de comprimido, se puede usar cualquier vehículo farmacéutico usado rutinariamente para preparar formulaciones sólidas. Los ejemplos de tales vehículos incluyen
10 estarato de magnesio, terra alba, talco, gelatina, goma arábica, ácido esteárico, almidón, lactosa y sacarosa. Cuando la composición está en forma de cápsula, es adecuado cualquier encapsulamiento, por ejemplo, usando los vehículos mencionados anteriormente en una cubierta de cápsula de gelatina dura. Cuando la composición está en forma de una cubierta de gelatina blanda, se puede considerar cualquier vehículo farmacéutico usado rutinariamente para preparar dispersiones
15 o suspensiones, por ejemplo, gomas acuosas, celulosas, silicatos o aceites, y se incorporan en una cubierta de cápsula de gelatina blanda.

Las composiciones parenterales típicas comprenden una disolución o suspensión de un compuesto o sal en un vehículo acuoso o no acuoso, estéril, que contiene opcionalmente un aceite parenteralmente aceptable, por ejemplo, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, lecitina, aceite de
20 araquís o aceite de sésamo.

Las composiciones típicas para inhalación están en forma de una disolución, suspensión o emulsión que se puede administrar como un polvo seco, o en forma de un aerosol, usando un propelente convencional, tal como diclorodifluorometano o triclorofluorometano.

Una formulación de supositorio típico comprende el presente compuesto, o una sal
25 farmacéuticamente aceptable del mismo, que es activo cuando se administra de este modo, con un agente aglutinante y/o lubricante, por ejemplo, glicoles poliméricos, gelatinas, manteca de cacao u otras ceras o grasas vegetales de bajo punto de fusión, o análogos sintéticos.

Las formulaciones dérmicas o transdérmicas típicas comprenden un vehículo acuoso o no acuoso convencional, por ejemplo, una crema, ungüento, loción o pasta, o están en forma de
30 una escayola, parche o membrana medicados.

Preferiblemente, la composición está en forma de dosis unitaria, por ejemplo un comprimido, cápsula o dosis de aerosol medida, de forma que el paciente se puede administrar una dosis única.

Cada unidad de dosis para la administración oral contiene adecuadamente de 0,3 mg a
35 60 mg/Kg, y preferiblemente de 1 mg a 30 mg/Kg de un compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las dosis preferidas incluyen 10 mg y 15 mg/Kg. Cada unidad de dosis para la administración parenteral contiene adecuadamente de 0,1 mg a 100 mg/Kg del compuesto, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Cada unidad de dosis para la administración

intranasal contiene adecuadamente 1-400 mg y preferiblemente 10 a 200 mg por persona. Una formulación tópica contiene adecuadamente 0,01 a 5,0% del presente compuesto.

El ingrediente activo se puede administrar de 1 a 6 veces al día, suficiente para exhibir la actividad deseada. Preferiblemente, el ingrediente activo se administra alrededor de una a dos veces al día, más preferiblemente dos veces al día.

Los presentes compuestos son útiles para la profilaxis o tratamiento de EIA, PIA y CIA, tanto como estados crónicos así como intermitentemente, anticipadamente a los estímulos en cuestión. Preferiblemente, los presentes compuestos se usan para la terapia de larga duración.

No se esperan efectos toxicológicos inaceptables cuando se administran, según la presente invención, los compuestos de ésta.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar cómo hacer y usar la invención. No pretenden limitar de ninguna forma el alcance de la invención, de ninguna manera o en ningún grado.

Ejemplos

Se usaron los siguientes ensayos diferentes, repartidos entre cinco especies, para desarrollar datos que apoyen la selección de una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o más. Los ensayos fueron: estimulación de la producción de ácido a partir de glándula parietal aislada de conejo; inhibición de desgranulación inducida por FMLP (liberación de mieloperoxidasa) en neutrófilos humanos; inhibición de formación de O_2^- inducido por FMLP en eosinófilos de cobaya; inhibición de producción de TNF_α inducido por LPS en monocitos humanos; producción de emesis en perros; inhibición de broncoconstricción inducida por antígenos, en cobayas; inversión de hipotermia inducida por reserpina, en ratones; e inhibición de producción de TNF_α inducido por LPS a partir de monocitos humanos transferidos adaptativamente, en ratones. Estos ensayos y datos se presentan más abajo.

25

Análisis estadístico

Para examinar la hipótesis de que la inhibición del PDE 4 de la localización de baja afinidad está asociada con las acciones antiinflamatorias de esta clase de compuestos, mientras que la inhibición de la localización de alta afinidad está asociada con la producción de ciertos efectos secundarios, se determinó la capacidad de diversos inhibidores de PDE 4 para bloquear la función de las células inflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo*, y la capacidad de estos compuestos para producir efectos secundarios en modelos *in vitro* e *in vivo*. Para comparar la capacidad de los inhibidores de PDE 4 para provocar un efecto terapéutico o efecto secundario dados, con su capacidad para inhibir la localización de unión de baja afinidad frente a su capacidad para inhibir la localización de alta afinidad de PDE 4, se comparó la potencia de estos compuestos en los ensayos *in vitro* o *in vivo* con su potencia frente a la actividad catalítica de la enzima aislada, o la localización de alta afinidad, mediante una correlación lineal de (r^2) o una correlación de orden por rangos (Rho de Spearman). La correlación lineal indaga si se puede usar la potencia

de un compuesto que inhibe tanto la localización de baja afinidad como la localización de alta afinidad para predecir la capacidad para provocar un efecto antiinflamatorio o secundario deseado. Las pruebas de correlación de orden por rangos como la potencia de orden por rangos para producir un efecto antiinflamatorio o secundario dado es similar a la potencia de orden por rangos para inhibir la localización de baja afinidad o la de alta afinidad. Tanto r^2 como la Rho de Spearman se calcularon usando el programa de ordenador STAT View II para Macintosh.

Unión de alta afinidad de PDE IV frente a Rolipram

Ejemplo 1

Ensayos de unión de fosfodiesterasa y rolipram

Ejemplo 1A

Se determinó que PDE 4 y hrPDE 4 de monocitos humanos aislados existían principalmente en forma de baja afinidad. Por lo tanto, la actividad de los compuestos de prueba frente a la forma de baja afinidad de PDE 4 se puede determinar usando ensayos estándares para la actividad catalítica de PDE 4, empleando [3 H]-cAMP 1 μ M como sustrato (Torphy y col., 1992).

Se usaron sobrenadantes de alta velocidad de cerebro de rata como fuente de proteína. Los enantiómeros de [3 H]-rolipram se prepararon hasta una actividad específica de 25,6 Ci/mmol. Las condiciones de ensayo estándares se modificaron a partir del procedimiento publicado para ser idénticas a las condiciones del ensayo de PDE, excepto por el cAMP: 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 5mM $MgCl_2$, y [3 H]-rolipram 1 nM (Torphy y col., The J. of Biol. Chem., Vol. 267, N° 3, p. 1798-1804, 1992). El ensayo se realizó durante 1 hora a 30°C. Se terminó la reacción y se separó el ligando enlazado del ligando libre usando una cosechadora Brandel de células. La competición por la localización de unión de alta afinidad se determinó en condiciones que eran idénticas a las usadas para medir la actividad de PDE de baja afinidad, excepto que no estaba presente [3 H]-cAMP. Los datos presentados en la Tabla I, página 6, se generaron usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1A.

Ejemplo 1B

Medida de la actividad de la fosfodiesterasa

Se determinó la actividad de PDE usando un ensayo de proximidad por centelleo (SPA) de [3 H]-cAMP o un ensayo de enzima SPA [3 H]cGMP, como se describe por el fabricante (Amersham Life Sciences). Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos a temperatura ambiente, en 0,1 ml de tampón de reacción que contiene (concentraciones finales): 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 8,3mM $MgCl_2$, 1,7 mM EGTA, [3 H]cAMP o [3 H]cGMP (aproximadamente 200 dpm/pmol), enzima y diversas concentraciones de los inhibidores. El ensayo se dejó transcurrir durante 1 h, y se terminó añadiendo 50 μ l de perlas de silicato de itrio SPA en presencia de sulfato de cinc. Las placas se agitaron y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 20 min. La formación de producto marcado con radioisótopos se determinó mediante espectrometría de

centelleo. Las actividades de PDE3 y PDE7 se determinaron usando [^3H]cAMP 0,05 μM , mientras que la PDE4 se determinó usando [^3H]cAMP 1 μM como sustrato.

Ensayo de unión de [^3H]R-rolipram

5 El ensayo de unión de [^3H]R-rolipram se llevó a cabo mediante modificación del método de Schneider y colaboradores, véase Nicholson, y col., *Trends Pharmacol. Sci.*, Vol. 12, p. 19-27 (1991) y McHale y col., *Mol. Pharmacol.*, Vol. 39, 109-113 (1991). El R-rolipram se une a la localización catalítica de PDE4, véase Torphy y col., *Mol. Pharmacol.*, Vol. 39, p. 376-384 (1991). En consecuencia, la competición por la unión de [^3H]R-rolipram proporciona una confirmación independiente de las potencias del inhibidor de PDE4 de competidores no marcados. El ensayo se llevó a cabo a 30°C durante 1 h en 0,5 μl de tampón que contiene (concentraciones finales): 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5mM MgCl_2 , albúmina de suero bovino al 0,05%, [^3H]rolipram 2 nM ($5,7 \times 10^4$ dpmo/pmol), y diversas concentraciones de inhibidores no marcados radioisotópicamente. La reacción se detuvo mediante adición de 2,5 ml de tampón de reacción enfriado en hielo (sin [^3H]rolipram), y filtración rápida a vacío (cosechadora de células Brandel) a través de filtros Whatman GF/B que se empaparon en polietilenimina al 0,3%. Los filtros se lavaron con 7,5 ml adicionales de un tampón frío, se secaron, y se contaron vía espectrometría de centelleo de líquidos.

Ejemplo 2

Acumulación de aminopirina

20 Ciertas metilxantinas y otros inhibidores de PDE no selectivos incrementan la secreción de ácidos en una variedad de especies. Ciertos inhibidores de PDE 4 selectivos, por ejemplo, rolipram y Ro 20-1724, aumentan la secreción de ácidos en ratas, particularmente cuando se dan en combinación con un activador de adenilato-ciclasa, tal como histamina. Este incremento en la secreción de ácidos está acompañado por una elevación de la acumulación de cAMP inducida por histamina. Se probó esta información dada para determinar si el fenómeno existía. La capacidad de los compuestos para inducir la secreción de ácidos se correlacionó con su capacidad frente a la localización de baja afinidad o la localización de alta afinidad. El ensayo usado en este trabajo fue la acumulación de una base débil, aminopirina marcada radioisotópicamente, que se ha expuesto que sirve como un marcador bioquímico para la secreción incrementada de ácidos. El ensayo es como sigue:

Preparación de la glándula gástrica

35 Se sometieron a eutanasia conejos de ambos sexos mediante dislocación cervical, y se retiró el estómago. La mucosa se diseccionó del corpus; se descartaron las porciones craneal y antral del estómago. Se aislaron las glándulas gástricas por modificación de los métodos descritos por Berlindh y Obrink (1976) y Sack y Spenny (1982). La mucosa se picó y se sometió a digestión con collagenasa para aislar las glándulas gástricas. Las glándulas digeridas se filtraron,

se lavaron, y se resuspendieron 1:15 (vol:vol) en medio de incubación de la siguiente composición: NaCl, 132,4 mM; KCl, 5,4 mM; Na₂HPO₄, 5,0 mM; NaH₂PO₄, 1,0 mM; MgSO₄, 1,2 mM; CaCl₂, 1,0 mM; Na₂HCO₃, 12,0 mM; albúmina de suero de conejo, 2 mg/ml; dextrosa, 2 mg/ml; a un pH de 7,4.

5

Acumulación de aminopirina

Para determinar la secreción de ácidos, se incubaron a 37°C las glándulas gástricas, en combinación con [¹⁴C]-aminopirina, diversas concentraciones de inhibidores de PDE 4 selectivos, y una concentración umbral de histamina (0,3-1,0 μM), en un agitador horizontal (110 ciclos/min) durante 20 minutos, según los procedimientos de Sack y Spinney (1982). Entonces se centrifugaron las muestras, y se determinó la radioactividad en partes alícuotas de la fracción del sobrenadante y del pelete. Las relaciones de aminopirina se calcularon como se describe por Sack y Spinney (1982). Los datos se expresaron como porcentaje de respuesta producida por una concentración máxima de histamina (100 μM). Los valores de EC₅₀ se determinaron mediante interpolación lineal usando la respuesta máxima obtenida para cada compuesto.

Ejemplo 3

Evaluación del potencial emético de inhibidores de PDE selectivos en perros

Se obtuvieron perros cruzados (n=5, para cada estudio) de ambos sexos a partir de la colonia de animales. Después de un ayuno de una noche, los perros se alimentaron con ½ lata de comida para perros (Big Bet) al menos 30 minutos antes del estudio. Se colocó una cánula en la vena cefálica de cualquier pata delantera para administrar los fármacos. Se pasó 1 ml de disolución salina isotónica (0,9%) a través de la cánula antes de la administración del compuesto experimental. Los compuestos se disolvieron en una mezcla de polietilenglicol y disolución salina, o bien en polietilenglicol al 100%, y se administraron a un volumen de 1,0-2,0 ml/10Kg. Para asegurarse de que la dosis completa entró la circulación, se pasó a través de la cánula 0,5-1,0 ml adicionales de disolución salina. Se devolvió al animal a la jaula durante un período de observación de 1 hora. Se observó cada perro en busca de signos de arcadas o vómitos, y se anotó el tiempo después de la administración del compuesto hasta que aparece este comportamiento. Al final del período de observación, el animal se devolvió a su jaula habitual. Cada estudio se separó por 7 días. Cada compuesto se administró en dosis ascendentes para cada perro, en días sucesivos de estudio hasta que se observó un efecto emético. En este momento, el perro individual se retiró del estudio, y se evaluaron mayores dosis sólo en aquellos perros que no hubieran respondido aún.

Los datos se expresaron como el porcentaje acumulado de perros que responden a cada dosis, según se describe en la literatura para curvas de respuesta de dosis cuantales. Se calculó un valor de ED₅₀ usando el análisis por probitas.

Ejemplo 4

Ensayo de eosinófilos en cobayas

Aislamiento y purificación de eosinófilos

Se inyectó 1 ml de suero de caballo, semanalmente durante 4-6 semanas, a cobayas macho (Hartley, Hazelton Labs) antes de su uso. Los animales se anestesiaron con una mezcla de cetamina/xilazina (88 mg; 12 mg/ml; 0,4 ml/Kg, al menos 24 h después de una inyección de suero de caballo). Después de la inducción de la anestesia, se lavó la cavidad peritoneal con 50 ml de disolución salina estéril tibia (0,9%). El fluido de lavado se recogió usando un catéter 14 G en tubos de centrifuga cónicos plásticos de 50 ml. Los cobayas se dejaron recuperar de la anestesia, y se pudieron usar nuevamente después de un período de descanso de dos semanas.

Las células se aislaron del fluido de lavado por centrifugación (400 x g, 10 min), y se resuspendieron en 35 ml de disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se les superpuso una capa de 10 ml de Percoll isotónico (1,075 g/ml). Esta suspensión se centrifugó durante 30 min a 300 x g. El pelete que contiene principalmente eosinófilos y eritrocitos se lavó en PBS, y se destruyeron los eritrocitos. Estas células se resuspendieron en medio RPMI 1640 con FBS al 20%, y se incubaron toda la noche a 37°C en una incubadora de CO₂ al 5% humidificada. Las células del siguiente día se lavaron y se resuspendieron en PBS para la determinación de la viabilidad (exclusión por tripán azul) y pureza de la célula.

Producción de anión superóxido (O₂⁻)

Se resuspendieron eosinófilos purificados (viabilidad >95% y pureza >90%) en PBS con tampón HEPES 20 mM (pH 7,4) y gelatina al 0,1% a una concentración 1-2 x 10⁶ células/ml. Se añadieron eosinófilos (1 x 10⁵) a una placa de 96 pocillos, y se incubaron durante aproximadamente 1 h a 37°C. Se añadieron los inhibidores de PDE 4 durante 10 min antes del comienzo de la reacción. La reacción se inició por adición de citocromo C (160 µM) y formilMeet-Leu-Phe (fMLP) (30 nM), en ausencia o presencia de 60 unidades de superóxido-dismutasa (SOD). La reducción del citocromo C se siguió en un lector de placa Dynatech MR 7000 a 550 nm, con una referencia de 630 nm, a diversos períodos de tiempo. Se determinó la velocidad de producción de O₂⁻ mediante análisis de regresión lineal, usando la absorbancia neta de los pocillos en ausencia o presencia de SOD en varios puntos de tiempo. Los resultados se expresaron como porcentaje de la producción de control de O₂⁻, corregido para la liberación basal. Puesto que la inhibición máxima observada fue de 60%, se calcularon los log IC₃₀ usando interpolación lineal de la concentración y acotando al 30%.

Ejemplo 5

Broncoconstricción en cobayas

Se sensibilizaron cobayas macho Hartley (200-250 g/4 semanas, Hazelton Research, Denver, PA) con inyecciones i.m. de 0,35 ml de una disolución al 5% (p/v) de ovoalbúmina/salina, en cada muslo (0,7 ml en total), en los días 1 y 4. Los cobayas estaban listos para su uso después del día 25°.

Procedimiento experimental

Se anestesiaron los cobayas macho Hartley (600-800 g Hazelton), sensibilizados activamente a la ovoalbúmina, con pentobarbital sódico (40 mg/Kg i.p.), aproximadamente 10-15 minutos antes de la cirugía. Se canuló la vena yugular, la arteria carótida, y la traquea (catéteres radiopacos de resina de polímero Deseret Intracath® Vialon® (Deseret Medical, Inc., Sandy, UT), 22 GA y 19 GA, y tubos de PE 260, respectivamente) para la administración del fármaco, control de la tensión arterial, y ventilación. Se realizó una vagotomía bilateral para minimizar la interferencia colinérgica. Los animales se paralizaron (bromuro de pancuronio, 0,1 mg/Kg i.v.) Y se ventilaron (45 respiraciones/min) vía un respirador para roedores Harvard (modelo 683, Harvard Apparatus, South Natick, MA). Los cambios de presión en las vías respiratorias se midieron vía una rama lateral de la cánula de la traquea con un transductor Elcomatic (Buxco Electronics, Sharon, CT). El volumen de cada ciclo ventilatorio se ajustó para producir una presión en el brazo lateral de 8 cm de H₂O (alrededor de 5 cc de aire ambiental). La tensión arterial se midió con un transductor de tensión física Statham P23XL (Viggo-Spectramed, Oxnard, CA). Las tensiones se registraron en un polígrafo Grass Modelo 7D (Grass Instrument Co., Quincy, MA). Los animales se mantuvieron calientes en una mesa de calefacción durante el experimento, para mantener la temperatura corporal.

Los compuestos de prueba, o vehículo, se administraron vía i.v., 10 minutos antes de la provocación con el antígeno. En el momento de tiempo 0, se administran 0,1 mg/Kg de ovoalbúmina vía i.v. En el pico de la respuesta del antígeno, se administró una dosis adicional de antígeno, 0,2 mg/Kg de ovoalbúmina. Después de la respuesta pico del antígeno hasta que se alcanzaron 0,3 mg/Kg de ovoalbúmina acumulada, se administró una disolución saturada de KCl, 1 cc/Kg, i.v., lo que produjo una broncoconstricción máxima.

Ejemplo 6

Inhibición de TNF_α inducido por LPS en monocitos humanos

Estudios in vitro

Para determinar si la inhibición de TNF_α está relacionada con la inhibición de LPDE 4 o HPDE 4, se examinó una serie de inhibidores de PDE 4, que tienen un intervalo de potencias para LPDE 4 y HPDE 4, en busca de su capacidad para inhibir la producción de TNF_α en monocitos humanos estimulados con lipopolisacáridos (LPS) *in vitro*. Se consideró que el uso de células humanas primarias para este experimento era extremadamente importante dado que especies diferentes parece que difieren dramáticamente en la contribución relativa de LPDE 4 y HPDE 4 a la hidrólisis de cAMP en células inflamatorias.

Métodos

La inhibición de TNF_α se determinó en monocitos de sangre periférica humana, que se purificaron (Collata) o bien a partir de capas leucocitarias o de residuos de plasmaforesis de sangre

67

a partir de donantes humanos sanos. Los monocitos se cultivan en placas a una densidad de 1×10^6 células/ml de medio/pocillo, en placas múltiples de 24 pocillos. Se deja que las células se adhieran por espacio de 1 hora, después de la cual se aspira el sobrenadante y se añade 1 ml de medio de nueva aportación (RPMI-1640, que contiene suero vacuno fetal al 1% más penicilina y estreptomicina a 10 unidades/ml). Las células se incubaron durante 45 minutos en presencia o ausencia de los compuestos de ensayo, a intervalos de concentración que oscilan de 1 nM a 1 mM antes de la adición de LPS (*E. coli* 055:B5, Sigma Chemicals) para dar una concentración final de 100 ng/ml. Los compuestos de prueba se solubilizan y se diluyen en una concentración 50:50 de dimetilsulfóxido/etanol, de modo que la concentración final de disolvente en el medio de cultivo de monocito fue de 0,5% de dimetilsulfóxido y 0,5% de etanol. Los cultivos sobrenadantes se retiraron de los monocitos después de una incubación de 14-16 horas a 37°C/5% de CO₂, y se centrifugaron a 100 x G para separar el desecho celular. Se llevaron a cabo ensayos de citoquina inmediatamente, o bien los sobrenadantes de los cultivos se almacenaron a -70°C hasta que se ensayaron.

Los niveles de TNF $_{\alpha}$ se midieron utilizando un ensayo ELISA (Winston), empleando un anticuerpo monoclonal anti-TNF $_{\alpha}$ humano de murino (véase más abajo) como el anticuerpo de captura, y un anticuerpo policlonal anti-TNF $_{\alpha}$ humano de conejo como el segundo anticuerpo. Para la detección, se añadió anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa (Boehringer Mannheim, Cat. N°605222), seguido de un sustrato de peroxidasa (1 mg/ml de ortofenilendiamina con peróxido de urea al 0,1%). Los niveles de TNF $_{\alpha}$ en las muestras se calcularon a partir de una curva estándar generada con TNF $_{\alpha}$ humano recombinante producido en *E. coli*. Se prepararon anticuerpos monoclonales a TNF $_{\alpha}$ humano a partir de bazo de ratones BALB/c inmunizados con TNF $_{\alpha}$ humano recombinante mediante una modificación del método de Kohler y Millstein (*Nature*, Vol. 256, p. 495-497, 1975). Se prepararon anticuerpos policlonales anti-TNF $_{\alpha}$ humano de conejo mediante inmunización repetida de conejos blancos de raza New Zealand con TNF $_{\alpha}$ humano recombinante emulsionado en adyuvante de Freund completo.

Supresión *in vivo* de la producción de TNF $_{\alpha}$ humano en un modelo de peritonitis adoptivo

Métodos

Se extrajo media unidad de sangre entera venosa heparinizada de empleados sanos que no estaban recibiendo ningún tipo de medicación. Se separaron leucocitos polimorfonucleares colocando la sangre en Histopaque-1077 con centrifugación a 800 x g durante 30 min a 25°C. Se cosechó la porción linfocítica/monocítica, y se lavo dos veces con DPBS (disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) sin Ca²⁺ y Mg²⁺ a 1000 rpm durante 10 min a 25°C. El pelete se resuspendió en 5 ml de DPBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺, se colocó en 5 ml de disolución de Percoll preparada en medio RPMI 1640, que estaba desprovisto suero, a 25°C, y se centrifugó a 550 x g durante 30 min a 25°C. Se retiró la capa flotante de monocitos, y se lavó dos veces con DPBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺, a 1000 rpm durante 10 min a 25°C. El aislado de monocito lavado final se suspendió

en $6-10 \times 10^6$ células/ml en DPBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , a 25°C . También se aislaron los monocitos, por el mismo procedimiento de los paquetes de Leucocitos Fuente (Source Leukocytes). Las preparaciones monocíticas oscilaron de 65 a 90%, y la viabilidad de las células fue $>97\%$ (exclusión por tripán azul).

- 5 Se mantuvieron ratones BALB/c machos (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) en grupos de 4 ó 5, en una instalación apoyada por barreras. Se inyectó a los ratones, que pesan 18-25 g y que tienen la misma edad, con 0,5 ml de $6-10 \times 10^6$ monocitos/ml en el peritoneo, usando una ligera presión en una jeringuilla con una aguja 23 ga, de forma que los monocitos se expusieron a fuerzas de cizallamiento y tensión mínimas. A los 2 min de recibir los monocitos,
- 10 los ratones se trataron con el vehículo o el compuesto mediante dosificación oral durante 15 min. Se inyectó intraperitonealmente (i.p.) a los animales 0,2 ml de 125 mg/ml de endotoxina (*E. Coli*, tipo W, Difco) disuelta en DPBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} . Dos h después, los animales se eutanasiaron por asfixia con dióxido de carbono, y se inyectaron i.p. 1,5 ml de DPBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} (4°C). Se masajeó suavemente el peritoneo, y el lavado se retiró y se colocó en tubos de polipropileno, en
- 15 un baño de hielo. Las muestras se aclararon por centrifugación ($12.500 \times g$ durante 5 min a 4°C). Los sobrenadantes se decantaron en nuevos tubos (se pueden almacenar a -20°C), y se analizaron para determinar el TNF_α humano y de ratón mediante la técnica de ELISA. Los valores de ED_{50} se calcularon mediante procedimientos estándares.

Ejemplo 7

20 Métodos de neutrófilos humanos

Aislamiento y purificación

- Se aislaron neutrófilos (PMN) a partir de sangre heparinizada, por centrifugación gradiente, usando Ficoll (Histopaque 1077), seguido de sedimentación con dextrano para eliminar los eritrocitos. Cualesquiera eritrocitos restantes se destruyeron con agua durante 30 segundos, y
- 25 se restauró la tonicidad usando 10X DB-PBS (con/sin Ca^{2+} o Mg^{2+}). Los PMN se aislaron por centrifugación, y se lavaron una vez más con 1X DB-PBS antes de determinar el número de células y la viabilidad (exclusión por tripán azul). El número de células se ajustó a $0,75-1,5 \times 10^6$ células/ml, dependiendo del donante individual.

30 Desgranulación (liberación de mieloperoxidasa)

- Se incubó una parte alícuota (0,1 ml) de la suspensión celular anterior en una disolución de sal equilibrada Earles, que contiene tampón HEPES 20 mM ($\text{pH} = 7,4$) y gelatina al 0,1%, en presencia de $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B, durante 5 min a 37°C en un baño de agua agitado. Las células se pretrataron durante 5 min adicionales con diversas concentraciones de inhibidores de
- 35 PDE 4 selectivos y PGE_2 (3-10 nM) antes de la adición de fMLP (30 nM). Se añadió fMLP, y la incubación se continuó durante 30 min adicionales. La reacción se terminó colocando las muestras en hielo, seguido de centrifugación. La fracción sobrenadante se eliminó y se almacenó congelada (-30°C) hasta el ensayo para determinar la actividad de mieloperoxidasa.

Determinación de actividad de mieloperoxidasa

La actividad de mieloperoxidasa se determinó usando *o*-dianisidina como sustrato, y peroxidasa de rábano picante como patrón. Se incubó una parte alícuota (50 µl) del sobrenadante con 100 µl de sustrato (*o*-dianisidina, 0,53 mM; H₂O₂, 0,147 mM; concentración final) en tampón de fosfato de Na 50 mM (pH 6,0). La reacción se terminó por adición de 50 µl de H₂SO₄ 4 M. La formación de producto se determinó midiendo la absorbancia a 410 nm, y la actividad se determinó por comparación con la curva patrón usando peroxidasa de rábano picante. Los datos se expresaron como porcentaje de control (cantidad de mieloperoxidasa liberada en presencia de PGE₂ solo). Puesto que la inhibición máxima observada para la mayoría de los compuestos fue 30%, se calcularon los valores de log (IC₁₅) usando interpolación lineal de las concentraciones acotando al 15%.

Ejemplo 8

Inversión de la hipotermia inducida por reserpina en ratones

Se aislaron individualmente ratones macho CF-1 o BALB/c en jaulas de alambre. Se registró la temperatura rectal de cada ratón antes del pretratamiento con reserpina (10 mg/Kg, i.p.). Cuatro horas después de la reserpina, se registraron las temperaturas rectales, y se administró a los animales individuales diversas dosis (oralmente) bien de compuestos de prueba, o de vehículo, o bien de rolipram (10 mg/Kg). Entonces se registraron las temperaturas rectales cada 30 min durante 2 h. Los datos se expresaron como el cambio en la temperatura a partir de la observada cuatro horas después de la reserpina (las temperaturas cayeron aproximadamente 10-15°C por debajo de los niveles basales). Se construyeron curvas de dosis-respuesta, usando cambios de temperatura registrados a los 90 ó 120 min después del tratamiento. Se determinaron los valores de ED₅₀ mediante análisis por probitas o regresión lineal de las medias de 6-9 animales. Para comparar la capacidad de los compuestos para invertir la hipotermia inducida por reserpina con su capacidad para inhibir la unión de baja afinidad o unión de alta afinidad, los valores de ED₅₀ e IC₅₀ se expresaron como -log(valor).

Ejemplo 9

Relación entre función biológica e inhibición de PDE 4

Para determinar si ciertos efectos biológicos de la inhibición de PDE 4 estaban asociados con la inhibición de LPDE 4 o de HPDE 4, se llevó a cabo una comparación entre la capacidad de los compuestos para producir un efecto y la capacidad de los compuestos para inhibir LPDE 4 o HPDE 4, usando una correlación lineal o de orden por rangos. Estas correlaciones pueden estar influidas por varios factores: 1) la estabilidad de los compuestos; 2) la capacidad de los compuestos para entrar en las células; 3) en estudios *in vivo*, la biodisponibilidad de los compuestos; 4) los valores de correlación, especialmente la correlación lineal, son sensibles a la diferencia en potencias, con lo que cuanto mayor sea el rango de los valores de las potencias, más fácil es medir una correlación lineal importante. Estas advertencias se tuvieron en cuenta cuando

se analizó y resumió la correlación entre la inhibición de LPDE 4 o HPDE 4 y la función biológica en los diversos sistemas de ensayo.

Usando células inflamatorias aisladas, la supresión de la producción de TNF_α monocítico y la inhibición de la producción de superóxido, en eosinófilos de cobaya, se correlacionó mejor con la inhibición de LPDE 4 y no con la de HPDE 4. Además, la prevención de la broncoconstricción inducida por antígenos *in vivo* se correlacionó mejor con la inhibición de LPDE 4 que con HPDE 4. En este modelo *in vivo*, los inhibidores de PDE 4 parece que actúan previniendo la desgranulación de los mastocitos (Underwood y col., en prensa). Sin embargo, la inhibición de la función de las células inflamatorias no siempre estaba asociada con la inhibición de LPDE 4, debido a que se encontró que la inhibición de la desgranulación de neutrófilos estaba mejor correlacionada con la inhibición de HPDE 4 que con la de LPDE 4. De este modo, parece que cierta supresión, aunque no toda, de la actividad de las células inflamatorias estaba asociada con la inhibición de LPDE 4. Por contra, el aumento de la secreción de ácido, la producción de emesis y la inversión de la hipotermia inducida por reserpina (una medida del potencial psicotrópico de los inhibidores de PDE 4) estaban mejor correlacionados con la inhibición de HPDE 4 y no con la de LPDE 4. Así, la mayoría de los efectos secundarios potenciales de esta clase de compuestos estaban asociados con la inhibición de HPDE 4.

De este modo, estos hallazgos sugieren que los compuestos que inhiben preferentemente LPDE 4 producirán efectos antiinflamatorios beneficiosos, con potencial reducido para provocar efectos secundarios indeseados. De este modo, la selección de compuestos con una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o más en relación con la IC_{50} para la forma catalítica de PDE 4 que una rolipram con una alta afinidad dividida por la IC_{50} para la forma catalítica de PDE 4 que una rolipram con una baja afinidad (HPDE 4/LPDE 4) debería dar por resultado un incremento en su índice terapéutico, es decir, se maximiza el efecto saludable y se minimiza el efecto dañino.

Para determinar si esta guía de selección identificaría ciertamente los compuestos con un índice terapéutico mejorado, se evaluaron tres modelos que comparan un efecto terapéutico con un efecto secundario. Estos incluyeron una comparación *in vitro* entre la capacidad de los compuestos para suprimir la producción de TNF_α a partir de monocitos humanos aislados con su capacidad para estimular la secreción de ácido en glándulas parietales de conejo aisladas, y dos comparaciones *in vivo* que examinan la capacidad de los compuestos para prevenir la broncoconstricción inducida por antígenos, en cobayas, y la capacidad para provocar emesis en perros, y la capacidad de los compuestos para suprimir la producción de TNF_α en un modelo de transferencia adoptivo, en ratones, y su capacidad para invertir la hipotermia inducida por reserpina en ratones.

Los inhibidores de PDE 4 con una relación de selectividad (HPDE 4/LPDE 4) igual o mayor que 0,1 mostraron una mejora notable en su índice terapéutico. Por ejemplo, *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxilato], 2-carbometoxi-4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ona, y *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-

4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ol], todos con una relación de selectividad $\geq 0,1$, demostraron una mejora de 100 veces en su índice terapéutico, en comparación con el inhibidor de PDE 4 arquetípico, R-rolipram. De este modo, esto demuestra que, usando la guía de selección de HPDE 4 $IC_{50}/LPDE 4 IC_{50} \geq 0,1$, se identifican compuestos con una comparación *in vitro* de índice terapéutico incrementado.

Respecto al tratamiento de EIA, el compuesto *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxilato] se administró a seres humanos que padecen EIA. Estos pacientes experimentaron reducción de inflamación, broncodilatación y neuromodulación pulmonar.

Estudio de provocación por ejercicio

Se realizó un estudio cruzado en dos períodos, controlado con placebo, doble ciego, aleatorio, para evaluar la eficacia, seguridad y tolerancia de *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxilato] en pacientes con EIA. Se asignaron aleatoriamente 27 pacientes con EIA para recibir el compuesto, 10 mg de comprimido BID de liberación inmediata, o el placebo, durante 7 días seguido de un fracaso de 7 días y el tratamiento alternativo durante 7 días. Se realizaron pruebas de provocación por ejercicio después de una dosis única en el 1^{er} día, y nuevamente en el 7^o día (predosis y post-dosis a tres horas).

La población de pacientes comprendía hombres y mujeres no fumadores, con edades de 18 a 60 años, con EIA, tales que:

- a) su volumen expiratorio forzado en un segundo (FEV_1) fue mayor o igual al 70% del normal predicho,
- b) la caída documentada en el FEV_1 fue mayor o igual al 15% en respuesta a la prueba de ejercicio en una visita de escrutinio, y
- c) no estaban tomando corticosteroides inhalados u otros medicamentos para el asma.

El Protocolo de Provocación por Ejercicio como sigue. Los pacientes se sometieron a ejercicio físico en una rueda de ardilla motorizada durante seis minutos a un ritmo cardíaco específico. La velocidad e inclinación se ajustaron para lograr un ritmo cardíaco específico, para cada paciente, de 85% de la predicción máxima ajustada según la edad. Los pacientes respiraron aire comprimido (humedad del 0% a temperatura ambiente) durante la prueba, a través de una máscara facial. Las pruebas de función pulmonar (*pneumotach* de KoKo, aparato que convierte un caudal de aire en una presión diferencial) se realizaron a 1, 5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos después de la terminación de la prueba, y continuaron después si el FEV_1 no hubiese vuelto dentro del 10% de la línea base.

La principal variable de eficacia fue el porcentaje de disminución máximo (MPD) en el FEV_1 en respuesta al ejercicio. Los resultados indicaron una mejora significativa en el MPD del FEV_1 después de una dosis del compuesto, desde un MPD medio de 32,88% a 23,57%. Hubo un efecto de incremento del compuesto después de 7 días de dosificación, con una mejora adicional

24

en el MPD medio del FEV₁ hasta 21,8%. Después de una semana de tratamiento, el 40% de los pacientes que recibían el compuesto tuvieron una caída en el MPD del FEV₁ menor o igual al 15% después del ejercicio. El compuesto fue seguro y bien tolerado, sin episodios o retiradas adversas serias relacionadas con el tratamiento. Véase también Am. J. Resp. Crit. Care Med. 1998:157; 5 A413, incorporado aquí en su integridad como referencia.

Todas las publicaciones, incluyendo pero no limitándose a las patentes y solicitudes de patentes citadas en esta Memoria, se incorporan aquí como referencia, como si se indicara específica e individualmente que cada publicación individual se incorpora como referencia como si se expusiera con todo detalle.

REIVINDICACIONES

1. Un método para prevenir o tratar asma inducida por ejercicio, asma inducida por aire frío o asma inducida por contaminación, en un mamífero que la puede padecer o la está padeciendo, inhibiendo preferentemente la forma catalítica de PDE 4 que une R-rolipram con una baja afinidad, cuyo método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto que tiene una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o más en relación con la IC_{50} para la forma de PDE 4 que une R-rolipram con una alta afinidad dividida por la IC_{50} para la forma catalítica que une R-rolipram con una baja afinidad.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la relación de los IC_{50} es 0,5 o más.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la relación de los IC_{50} es 1,0 o más.
4. Un método según la reivindicación 1, en el que el compuesto administrado es *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxilato], administrado como una preparación oral de liberación inmediata o de liberación controlada.
5. Un método según la reivindicación 1 ó 4, en el que el estado prevenido o tratado es asma inducida por ejercicio.
6. El uso de un inhibidor específico de PDE4 en la fabricación de un medicamento para uso en la prevención o tratamiento de asma inducida por ejercicio, asma inducida por aire frío o asma inducida por contaminación, en un mamífero que la puede padecer o la está padeciendo, en el que el inhibidor es aquel capaz de inhibir la forma catalítica de PDE 4 que une R-rolipram con una baja afinidad, cuyo método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto que tiene una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o más en relación con la IC_{50} para la forma de PDE 4 que une R-rolipram con una alta afinidad dividida por la IC_{50} para la forma catalítica que une R-rolipram con una baja afinidad.
7. La fabricación según la reivindicación 6, en el que la relación de los IC_{50} es 0,5 o más.
8. El método según la reivindicación 6, en el que la relación de los IC_{50} es 1,0 o más.

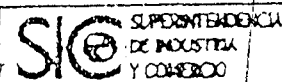
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en el que el compuesto usado es *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxy-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxilato], y se fabrica como una preparación oral de liberación inmediata o como una preparación oral de liberación controlada.

RESUMEN

Se describen métodos para tratar asma inducida por ejercicio, usando un inhibidor de PDE4.

22

EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) No. SOLICITUD: 00-14624

(51) INT. CL.: A61K 31/40

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN: 00-03-01

(71) SOLICITANTE:

(30) PRIORIDAD: si

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

(31) No. DE SOLICITUD: 60/122,464
60/141,291

(72) INVENTORES:

Siegfried Christensen - Theodore J. Torphy
Richard Nieman

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN: Marzo 1, 1999
Junio 28, 1999

(33) PAÍS: E.U.A.

(74) APODERADO:

GERMAN CASTILLO GRAU

(54) TÍTULO: METODO PARA TRATAR ASMA INDUCIDA POR EL EJERCICIO

(57) RESUMEN:

1. Un método para prevenir o tratar asma inducida por ejercicio, asma inducida por aire frío o asma inducida por contaminación, en un mamífero que la puede padecer o la está padeciendo, inhibiendo preferentemente la forma catalítica de PDE 4 que une R-rolipram con una baja afinidad, cuyo método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto que tiene una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o más en relación con la IC_{50} para la forma de PDE 4 que une R-rolipram con una alta afinidad dividida por la IC_{50} para la forma catalítica que une R-rolipram con una baja afinidad.

6. El uso de un inhibidor específico de PDE4 en la fabricación de un medicamento para uso en la prevención o tratamiento de asma inducida por ejercicio, asma inducida por aire frío o asma inducida por contaminación, en un mamífero que la puede padecer o la está padeciendo, en el que el inhibidor es aquel capaz de inhibir la forma catalítica de PDE 4 que une R-rolipram con una baja afinidad, cuyo método comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto que tiene una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o más en relación con la IC_{50} para la forma de PDE 4 que une R-rolipram con una alta afinidad dividida por la IC_{50} para la forma catalítica que une R-rolipram con una baja afinidad.

29

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION

Radicación : 00014524 00000000 Folios: 30
Fecha (AMD): 2000-03-01 13:48:36
Trámite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION [X]

- Nombre e identificación del Solicitante
- Nombre e identificación del Inventor
- Título o nombre de la Invención
- Descripción 7
- Reivindicaciones 25
- Resumen 27
- Comprobante de Pago 3

MODELO DE UTILIDAD []

- []
- []
- []
- []
- []
- []
- []

COMPLETA [X]

INCOMPLETA []

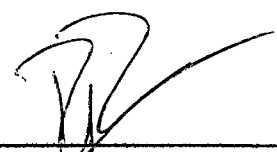
DISEÑO INDUSTRIAL []

- Nombre e identificación del peticionario
- Nombre e identificación del inventor o diseñador
- Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse
- Representación gráfica
- Comprobante de pago

- []
- []
- []
- []
- []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha: _____

INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 0-014624.

Fecha: 2 de marzo del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 13 de octubre de 1994,
del folio 78.086 al folio 78.091 del
libro de Protocolo N° 265, obra el poder
N° 15.479 conferido por SMITHKLINE
BEECHAM CORPORATION

domiciliado(a) en Filadelfia - Pensilvania.
E.U.A.

al doctor GERMAN CASTILLO GRAU y/o ADRIANA
CASTILLO GIBSONE y/o LUIS FELIPE CASTILLO
GIBSONE.

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los
mismos.

Facultad para desistir SI.

Revisado_____.

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
PRIMER EXAMEN DE FORMA

31
2000-03-02
430

EXPEDIENTE 0-014624

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ **NO APLICABLE** ☐ Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).
- SI ☒ NO ☐ **NO APLICABLE** ☐ Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).
- SI ☒ NO ☐ **NO APLICABLE** ☐ Presentó, en forma correcta el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de enero del 2000).
- SI ☒ NO ☐ **EXTEMPORANEAMENTE** ☐ Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.
- SI ☐ NO ☒ **NO APLICABLE** ☐ Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.
- SI ☐ NO ☒ **NO APLICABLE** ☐ Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.).
- SI ☐ NO ☒ **CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS**

OBSERVACIONES JURIDICAS CONVENIO DE PARIS: En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

- SI ☐ NO ☒ Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,
- SI ☐ NO ☒ Se recomienda **PUBLICAR** el extracto correspondiente.

Santafé de Bogotá, D.C., 2 de marzo del 2000.

EXAMINADOR JURIDICO: Código 202002

DIVISIÓN NUEVAS CREACIONES

1º EXAMEN DE FORMA

Folio 34

32

RADICACIÓN Nº 00-14624

CONCEPTO TÉCNICO Nº 740

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE PATENTES A61K 31/40

2000-05-16
430

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
- SI ☐ NO ☒ Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
- SI ☐ NO ☒ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94.
- SI ☐ NO ☒ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).

SI ☐ NO ☒ **CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., Mayo 16/00

-----cód 202010-----
EXAMINADOR TÉCNICO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
1º EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TÉCNICO N° 740

EXPEDIENTE N° 0-14624

IPC A61K 31/40

Debe tenerse en cuenta que en la reivindicación 7 se desea proteger la fabricación según la reivindicación 6, pero en dicha reivindicación hace referencia es al uso de un inhibidor específico de PDE4, esto se presta para confusión.

Al modificar dicha reivindicación, debe anexarse un nuevo capítulo reivindicatorio.

Santa Fe de Bogotá D.C., 16 de mayo de 2000

Examinador Técnico de Patentes
Q.F. Cód. 202010

EXPEDIENTE 0-014624

AUTO 0598

2000-05-23
430

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

DISPONE

ARTICULO PRIMERO: Reconocer personería al doctor German Castillo Grau, como apoderado del solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido

ARTICULO SEGUNDO: Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérrese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

ARTICULO TERCERO: Notificar por estado el presente auto, advirtiéndolo que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

NOTIFIQUESE Y CUMPLASE

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los 23 MAY 2000

LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL

NOTIFICADO POR ESTADO

Santafé de Bogotá D.C., 25 MAY 2000 notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO

SOLICITO PRORROGA TERMINO SI ____ NO ____

VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA