



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

Organización CSA Ltda

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

21. **EXPEDIENTE No.**

00-14625

54. **TITULO**

METODO PARA TRATAR COPD

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

A61K 31/40

71. **SOLICITANTE**

SMITHKLINE BEECHAM CORPORATION

DOMICILIO

FILADELFIA, ESTADO DE PENNSYLVANIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. **APODERADO**

GERMAN CASTILLO GRAU

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.**

- 1 MAR 2000

200038



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

Ciudad FILADELFIA

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO PODER No.15479

Nombre GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección y Domicilio Carrera 13 No.37-43, Piso. 12

Ciudad Santafé de Bogotá

Teléfono 2837460

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es) Siegfried B. Christensen

Mary S. Barnette

Theodore. J. Thorpy

Identificación

Dirección Filadelfia, Pennsylvania, E.U.A.-West Chester, Pennsylvania,

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

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención METODO PARA TRATAR COPD

PRIORIDAD REIVINDICADA SI ☒ NO ☐ TIPO DE PRIORIDAD ANDINA ☐ UNIONISTA ☒

(33) País E.U.A. (32) Fecha Marzo 1, 1999 (31) No. Solicitud 60/122,315

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

La invención se refiere a un método para la profilaxis o para tratar
COPD, administrando un inhibidor de PDE4 que tiene una relación terapéu-
tica definida.

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 : 14,833
FECHA : MARZO 1 DE 2000

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 00014625 00000000 Folios: 29
Fecha (ARC): 2000-03-01 13:49:56
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

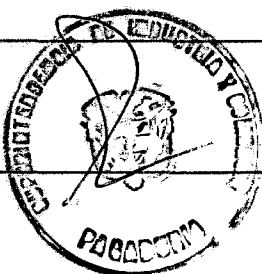
***** CONCEPTO *****

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 COPD

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 enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD). Estas formas de isoenzimas, que se cree son formas diferentes de conformaciones no interconvertibles de la misma enzima, aunque esto no ha sido probado, 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 tratar selectivamente la enfermedad pulmonar obstructiva crónica inhibiendo preferentemente la forma de baja afinidad de la localización catalítica en la isoenzima PDE 4. También se describe un método para tratar COPD que comprende administrar un compuesto que se une preferentemente a la localización de unión de baja afinidad. También se describe un método para tratar selectivamente asma inducida por ejercicio (EIA), inhibiendo preferentemente la forma de baja afinidad de la localización catalítica en la isoenzima PDE 4.

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, 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.

30 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 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. 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. Tomada colectivamente, esta información sugiere que los efectos secundarios 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. 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 [^3H]-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 [^3H]-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 iniciaron 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 pueden 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 distinguen 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 el 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.

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.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) es una terminología paraguas que se utiliza frecuentemente para describir dos estados de enfermedad de las vías respiratorias fija, la bronquitis crónica y el enfisema. La bronquitis crónica y el enfisema están causados en los casos más corrientes por el consumo de tabaco; aproximadamente el 90% de enfermos con COPD son o han sido fumadores. Aunque aproximadamente el 50% de los fumadores desarrollan bronquitis crónica, sólo el 15% de los fumadores desarrollan una obstrucción discapacitante de las vías respiratorias. Ciertos mamíferos, en particular los caballos, también sufren COPD.

La obstrucción del caudal de aire asociada a la COPD es progresiva, puede ir acompañada de hiperreactividad de las vías respiratorias y puede ser parcialmente reversible. La hiper-sensibilidad no específica de las vías respiratorias también puede desempeñar un papel en la evolución de COPD y puede predecir un ritmo acelerado de declinación de la función pulmonar en los fumadores.

La COPD es una causa importante de muerte y discapacidad. Actualmente es la cuarta causa de muerte en los Estados Unidos de América y en Europa. Las directrices de su tratamiento recomiendan la detección precoz y la implantación de programas de abandono del consumo de tabaco para disminuir la morbilidad y la mortalidad debidas a la enfermedad. Sin embargo la detección y diagnóstico precoz ha sido difícil por diversas razones.

La COPD tarda años en evolucionar y los fumadores casi siempre niegan que sus síntomas de enfermedad se deban al consumo del tabaco, atribuyendo los primeros indicios de advertencia de la falta de aliento acrecentada como un signo de la edad. De modo similar, los episodios agudos de bronquitis casi nunca son reconocidos por los médicos de cabecera como signos precoces de COPD. Muchos enfermos presentan signos de más de una enfermedad (p.ej. bronquitis crónica o bronquitis asmática) convirtiendo en un reto la diagnosis exacta, en particular en las primeras fases de la enfermedad. También, muchos enfermos no solicitan ayuda médica hasta que sufren síntomas más intensos asociados con una función pulmonar disminuida, tales como disnea, tos persistente y producción de esputos. Como consecuencia, la inmensa mayoría de enfermos no son diagnosticados o tratados hasta que están en una fase más avanzada de la

enfermedad.

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

5 **Sumario de la invención**

Esta invención se refiere a un método para la profilaxis o el tratamiento de COPD, a la vez que se minimizan 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

La COPD se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico en el pulmón, marcado por un incremento en la activación y/o el número de macrófagos alveolares, células T $CD8^+$ y neutrófilos. Lo más notable con respecto a la terapia de COPD es la capacidad de alterar el tráfico y la activación de los neutrófilos. Se cree que los neutrófilos desempeñan un papel fundamental en la patofisiología de COPD. La activación de los neutrófilos da como resultado la liberación de diversos mediadores y proteinasas inflamatorias, el más importante la neutrófilo-elastasa, que contribuye a la progresiva fibrosis, estenosis de las vías respiratorias y destrucción del parénquima pulmonar, conduciendo a una declinación acelerada de la función respiratoria. La neutrófilo-elastasa también es un poderoso secretagogo de moco y, por tanto, puede contribuir a la característica hipersecreción de moco que caracteriza a la COPD. Los compuestos de esta invención tienen marcados efectos sobre la actividad de los neutrófilos, inhibiendo la quimiotaxis y la desgranulación de neutrófilos *in vitro*. En modelos animales, los presentes compuestos disminuyen la extravasación de neutrófilos fuera de la circulación, su secuestro en los pulmones y las respuestas edematosas a cierto número de ataques inflamatorios *in vivo*.

Actividades adicionales que pueden contribuir a la actividad terapéutica de los inhibidores de PDE4 en COPD incluyen broncodilatación y modulación de la actividad neuronal pulmonar. Aunque el grado de reversibilidad del caudal respiratorio disminuido es bajo en COPD, un pequeño incremento puede tener un efecto positivo agudo, así como una disminución gradual en la pendiente de la declinación, lo que puede dar como resultado un profundo efecto sobre la calidad de vida para los enfermos de COPD. La capacidad de los antagonistas muscarínicos inhalados de producir mejoras clínicamente significativas en la función pulmonar en COPD, al menos de forma aguda, sugiere que un componente importante de la obstrucción reversible de las vías respiratorias en esta enfermedad está asociado con una disfunción de los nervios pulmonares. Aunque no se ha estudiado en detalle todavía, los inhibidores de PDE4 también pueden modular la actividad de las células epiteliales de las vías respiratorias, una fuente rica de mediadores

proinflamatorios que se liberan tras un ataque medioambiental (p.e., humo de tabaco), e inhiben la hiperplasia de los músculos lisos vasculares, un cambio estructural en la fase terminal de COPD que está asociado con una insuficiencia del corazón venoso.

Para los fines de esta invención, la localización catalítica de cAMP que 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 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 evaluar 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 determinaron las potencias de los compuestos seleccionados, 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.

Tabla I

	Compuesto	IC ₅₀ de baja afinidad	IC ₅₀ de alta afinidad	Relación alta/baja
5	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
10	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
15	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
20	1-(4-aminobencil)-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-2-imidazolidinona	1,4	0,1	0,07
	denbufilina	0,29	0,05	0,17
25	3-(ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-1-(4-N'-[N2-ciano-S-metil-isotioureido]bencil)-2-pirrolidona	0,1	0,03	0,30
30	(R)-(+)-1-(4-bromobencil)-4-[(3-ciclopentiloxi)-4-metoxifenil]-2-pirrolidona	0,06	0,02	0,33
	IBMX	29,1	20,3	0,698

	[4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)pirrolidin-2-iliden]acetato de (S)-(-)-etilo	0,46	0,45	0,98	
5	Papaverina	10	10	0,1	
	cis-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)-ciclohexan-1-carboxilato]	0,095	0,110	1,1	
10	cis-[4-ciano-4-(3-ciclopropilmetoxi-4-difluorometoxifenil)ciclohexan-1-ol]	0,021	0,04	2,0	
15	[4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)pirrolidin-2-iliden]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	
	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-dimetoxiisoquinolina. 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 buscada 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, ahora 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.

10 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 según el ensayo expuesto 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.

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 1 nM de [3H]R-rolipram 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 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.

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 presentes 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 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 estearato de magnesio, terra alba, talco, gelatina, goma arábiga, ácido esteárico, almidón, lactosa y sacarosa. Cuando la composición está en forma de cápsula, es adecuado cualquier encapsulamiento habitual, por ejemplo, usando los vehículos mencionados anteriormente en una cubierta de cápsula de gelatina dura. Cuando la composición está en forma de una cápsula de cubierta de gelatina blanda, se puede considerar cualquier vehículo farmacéutico usado rutinariamente para preparar dispersiones 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 arakis 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.

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 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 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 para tratar COPD. 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.

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. Por favor, refiérase a las reivindicaciones para las que se reservan los inventores de este documento más abajo.

5

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.

15

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 dado. 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.

35

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 (PDE 4 recombinante humana) 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 evaluar usando ensayos estándares para la actividad catalítica de PDE 4, empleando [3 H]-cAMP 1 μ M como sustrato (Torphy y col., *J. of Biol. Chem.*, Vol. 267, N° 3, p. 1798-1804, 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 que fueran idénticas a las condiciones del ensayo de PDE, excepto por el cAMP: 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 5mM MgCl₂, y [3 H]-rolipram 1 nanoM (Torphy y col., *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 y [3 H]5'-AMP. Los datos presentados en la Tabla I, página 7, se generaron usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1A.

Ejemplo 1B

Medida de la actividad de la fosfodiesterasa

Se evaluó 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 MgCl₂, 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 [3 H]cAMP 0,05 μ M, mientras que la PDE4 se determinó usando [3 H]cAMP 1 μ M como sustrato. La actividades de PDE1B, PDE1C, PDE" y PDE5 se determinaron usando [3 H]cGMP 1 μ M como sustrato.

Ensayo de unión de [3 H]R-rolipram

El ensayo de unión de [3 H]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 [3 H]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 MgCl₂, albúmina de suero bovino al 0,05%, [³H]-rolipram 2 nM (5,7 x 10⁴ 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]-R-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 tampón frío, se secaron, y se contaron vía espectrometría de centelleo de líquidos.

10 **Ejemplo 2 - Acumulación de aminopirina**

Ciertas metilxantinas y otros inhibidores de PDE no selectivos incrementan la secreción de ácido en una variedad de especies. Ciertos inhibidores de PDE 4 selectivos, por ejemplo, rolipram y Ro 20-1724, aumentan la secreción de ácido en ratas, particularmente cuando se dan en combinación con un activador de adenilato-ciclase, tal como histamina. Este incremento en la secreción de ácido 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 afirma sirve como un marcador bioquímico para la secreción incrementada de ácido. El ensayo es como sigue:

Preparación de la glándula gástrica

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 Berlinth y Obrink (1976) y Sack y Spenney (1982). La mucosa se picó y se sometió a digestión con colagenasa 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.

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 μ M). Los valores de EC_{50} 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 $\frac{1}{2}$ 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 día de 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 ED_{50} 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 con 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 formilMet-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 periodos 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, el control de la tensión arterial, y la 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).

- 5 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

15 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

25 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 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/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
30 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_{α} se midieron utilizando un ensayo ELISA (Winston), empleando un anticuerpo monoclonal anti- TNF_{α} humano de mrido (véase más abajo) como el anticuerpo de captura, y un anticuerpo policlonal anti- TNF_{α} 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 para peroxidasa (1 mg/ml de ortofenilendiamina con peróxido de urea al 0,1%). Los niveles de TNF_{α} en las muestras se calcularon a partir de una curva estándar generada con TNF_{α} humano recombinante producido en *E. coli*. Se prepararon anticuerpos monoclonales a TNF_{α} humano a partir de bazos de ratones BALB/c inmunizados con TNF_{α} humano recombinante mediante una modificación del método de Kohler y Millstein (*Nature*, Vol. 256, p. 495-497, 1975). Se prepararon anticuerpos policlonales anti- TNF_{α} humano de conejo mediante inmunización repetida de conejos blancos de raza New Zealand con TNF_{α} humano recombinante emulsionado en adyuvante de Freund completo.

Supresión *in vivo* de la producción de TNF_{α} humano en un modelo de peritonitis adoptivo

Métodos

Se extrajo media unidad de sangre entera venosa heparinizada de voluntarios sanos que no estaban recibiendo ningún tipo de medicación. Se separaron leucocitos polimorfonucleares colocando la sangre en Histopaque-1077 con centrifugación a $800 \times g$ durante 30 min a 25°C . Se cosech la porción linfocítica/monocítica, y se lavó dos veces con DPBS (disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) sin Ca^{2+} y Mg^{2+} a 1000 rpm durante 10 min a 25°C . El pelete se resuspendió en 5 ml de DPBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , 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 $550 \times g$ durante 30 min a 25°C . Se retiró la capa flotante de monocitos, y se lavó dos veces con DPBS sin Ca^{2+} y Mg^{2+} , 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).

Se mantuvieron ratones BALB/c macho (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) en grupos de 4  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, los ratones se trataron con el vehículo o el compuesto mediante dosificación oral durante 15 min. Entonces 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

eutanasiaaron 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 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 - 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 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.

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 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 ($50 \mu\text{l}$) del sobrenadante con $100 \mu\text{l}$ de sustrato (*o*-dianisidina, 0,53 mM; H_2O_2 , 0,147 mM; concentración final) en tampón de fosfato de Na 50 mM ($\text{pH} 6,0$). La reacción se terminó por adición de $50 \mu\text{l}$ de H_2SO_4 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 PGE_2 solo). Puesto que la inhibición máxima observada para la mayoría de los compuestos fue 30%, se calcularon los valores de $\log(\text{IC}_{15})$ 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 une rolipram con una alta afinidad dividida por la IC_{50} para la forma catalítica de PDE 4 que une 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. Éstos 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 COPD, el compuesto *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxilato] se administró a seres humanos que padecen COPD. Estos pacientes experimentaron reducción de inflamación, broncodilatación y neuromodulación pulmonar.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la profilaxis o tratamiento de COPD en un ser humano, administrando un inhibidor específico de PDE 4 que inhibe 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, excluyendo *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxilato].
2. El método de la reivindicación 1, en el que el inhibidor tiene una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o más en relación con la relación del valor de IC_{50} para competir con la unión de 1 nM de [3H]R-rolipram a una forma de PDE4 que une rolipram con alta afinidad comparado con el valor de IC_{50} para inhibir la actividad catalítica de PDE4 de una forma que une rolipram con baja afinidad utilizando [3H]-cAMP 1 μ M como sustrato.
3. El método de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha relación de los IC_{50} es 0,5 o más.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicha relación de los IC_{50} es 1,0 o más.
5. Un inhibidor específico de PDE4 en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o para tratar COPD, en el que el inhibidor 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, excluyendo *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxilato].
6. La fabricación según la reivindicación 5, en la que el inhibidor tiene una relación de IC_{50} de aproximadamente 0,1 o más en relación con la relación del valor de IC_{50} para competir con la unión de 1 nM de [3H]R-rolipram a una forma de PDE4 que une rolipram con alta afinidad comparado con el valor de IC_{50} para inhibir la actividad catalítica de PDE4 de una forma que une rolipram con baja afinidad utilizando [3H]-cAMP 1 μ M como sustrato.
7. La fabricación según la reivindicación 5 ó 6, en la que dicha relación de los IC_{50} es 0,5 o más.

8. La fabricación según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, en la que dicha relación de los IC_{50} es 1,0 o más.

25

RESUMEN

La invención se refiere a un método para la profilaxis o para tratar COPD, administrando un inhibidor de PDE4 que tiene una relación terapéutica definida.

28

27

--	--

5. Un inhibidor específico de PDE4 en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o para tratar COPD, en el que el inhibidor 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, excluyendo *cis*-[4-ciano-4-(3-ciclopentiloxi-4-metoxifenil)ciclohexan-1-carboxilato].



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADM

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 00014625 00000000
Fecha (AMD): 2000-03-01 13:49:58
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 411 PRESENTAC
Dependencia: 2620 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 29

PATENTE DE INVENCION []

MODELO DE UTILIDAD []

- Nombre e identificación del Solicitante []
- Nombre e identificación del Inventor []
- Título o nombre de la Invención []
- Descripción 8 []
- Reivindicaciones 24 []
- Resumen 26 []
- Comprobante de Pago 3 []

COMPLETA []

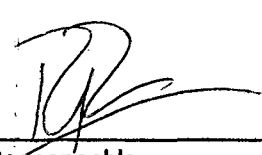
INCOMPLETA []

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 0-014625.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

2000-03-02
430

EXPEDIENTE 0-014625

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 [x]** **NO []** **NO APLICABLE []** Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).
- SI [x]** **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 [x]** **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 [x]** **NO []** **EXTEMPORANEAMENTE []** Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de Paris.
- SI []** **NO [x]** **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 [x]** **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 [x]** **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 [x]** Se ajusta a los aspectos **FORMALES** indicados en la Decisión 344 y por tanto,
- SI []** **NO [x]** 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

31
Folio 33

2000-05-17
430

RADICACIÓN Nº 00-14625
CONCEPTO TÉCNICO Nº 741

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL DE PATENTES A61K 31/40

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 17/00

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

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
1º EXAMEN DE FORMA

CONCEPTO TÉCNICO N° 741

EXPEDIENTE N° 0-14625

IPC A61K 31/40

En la reivindicación 5 se desea proteger un inhibidor específico de PDE4, pero dicho compuesto no se encuentra definido como tal, por lo tanto dicha reivindicación no permite precisar el alcance de la invención. Además, puede observarse que el término: "El uso de" se encuentra cubierto con corrector.

En la reivindicación 6 se desea proteger la fabricación de la reivindicación 5; en la reivindicación 7 se quiere proteger la fabricación según la reivindicación 5 ó 6; y en la reivindicación 8 se desea proteger la fabricación según una cualquiera de las reivindicaciones 5-7, pero en la reivindicación 5 no se hace referencia a la fabricación, sino a un inhibidor específico de PDE4. Esto se presta para confusión. Además, en dichas reivindicaciones no se define claramente la fabricación que se desea proteger, por lo tanto no se precisa en forma clara el alcance de la invención.

Al modificar las reivindicaciones, debe anexarse un nuevo capítulo reivindicatorio.

Al corregir la reivindicación 5, debe corregirse el resumen que aparece en el extracto para publicación. Por este motivo, debe anexarse nuevo extracto para publicación.

Santa Fe de Bogotá D.C., 17 de mayo de 2000

Examinador Técnico de Patentes
Q.F. Cód. 202010

2000-05-25
430

EXPEDIENTE 0-014625

AUTO 0599

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, requiérese 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

23 MAY 2000

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los _____

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