



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

PCT

04-52217

21 EXPEDIENTE No _____

54 TITULO Combinacion farmaceutica

51 CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K31/44

71 SOLICITANTE PFIZER INC

DOMICILIO 235 East 42nd street, New York, NY 10017
EUA

74 APODERADO Carlos R Olarte

22 SANTAFE DE BOGOTA, D C Junio 04 de 2004

SS

OLARTE RAISBECK



SUPERINDUSTRIA Y CIENCIA

Radicación : 0403217 0300000

Folios: 92

Fecha (MD): 2004-06-04 09:42:23

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD**PATENTE PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL****SOLICITUD DE:**

①

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☐

Capítulo I.

☒

Capítulo II.

②

**S LICITANTE
(71)**Nombre: PFIZER INCDirección: 235 East 42nd Street, New York, NY
10017 E.U.A.Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSELugar de Constitución: Delaware, Estados
Unidos de América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓNC.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número _____

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: CARLOS R. OLARTEDirección: Wold Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799E-mail: office@olarteraisbeck.com**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 79782747Bta
TP 74.295**INVENTOR (ES)
(72)**Nombre: MICHAEL YEADON.Dirección: Ramsgate Road, Sandwich, Kent CT13 9NJ Reino Unido.Nacionalidad o Domicilio: BRITANICA

③

PCT (86)

Solicitud Internacional No.

PCT/IB02/04922Fecha Noviembre 22, 2002

Publicación Internacional No.

WO 03/047578Fecha Junio 12, 2003

④

Título (54) COMBINACION FARMACEUTICA.**Clasificación Internacional (51) A61K 31/44.****Prioridad**SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

Diciembre 7, 2001

(31) Número de Solicitud

0129395.0

⑤

Comprobante de pago No. 43,984**Fecha Junio 3, 200**

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☒

Documento de cesión del Interventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones.

☒

Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

☐

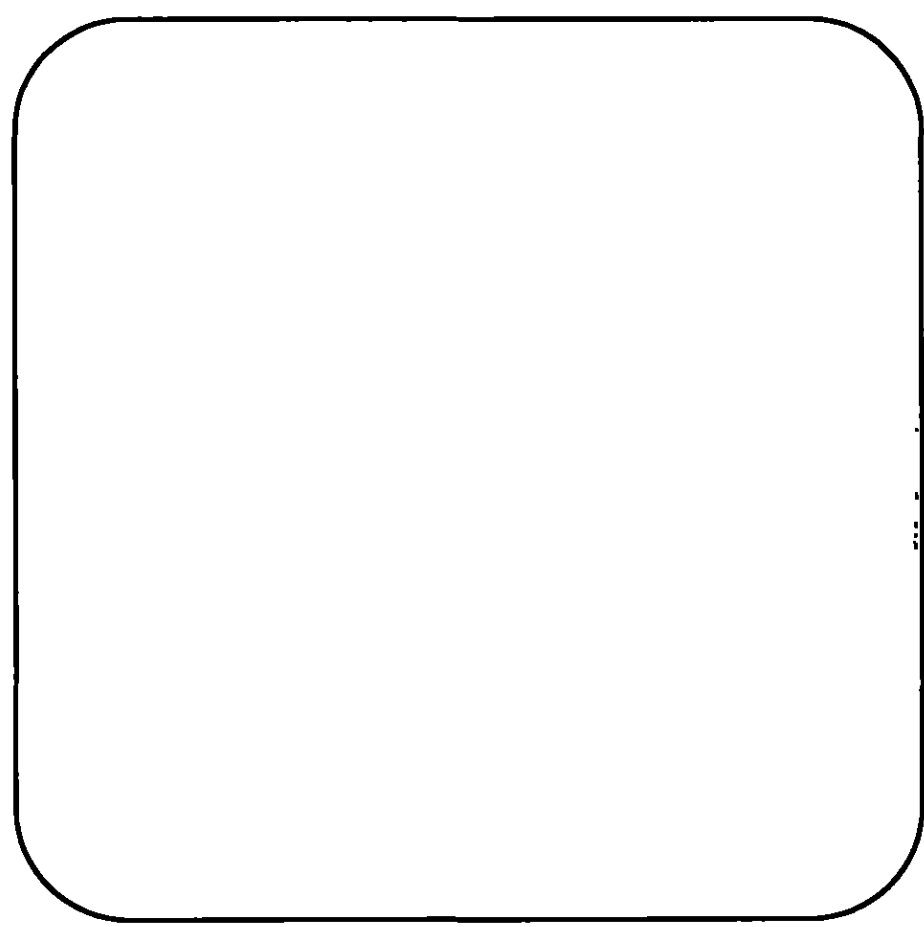
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 
C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04032217 06000000 Folios: 92
Fecha (RIB): 2004-06-04 09:42:23
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NNC1 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 43,984
FECHA : JUNIO 3 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
FREDERICK TORRES	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	21261189	02/03/2004	3,865,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
		TOTAL :	\$ 422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS



RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE

PFIZER INC.

Bilingüe inglés- español otorgado en Nueva York, Estados Unidos el 14 de julio de 2003 y firmado por J. Trevor Lumb, Vicepresidente de Pfizer Products Inc.

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth Greenwood certifica que J. Trevor Lumb, domiciliado en Nueva York ejercía funciones de Asistente General Consejero de Patentes la Compañía Pfizer Inc., con sede en Nueva York, Nueva York, Estados Unidos.

Firma del notario: Kenneth Greenwood

Sello notarial: certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham en Surrey, 14 julio, 2003 por el Notario Kenneth Greenwood-Horne Engall & Freeman

Sello Notario Público en alto relieve rojo.

APOSTILLA

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

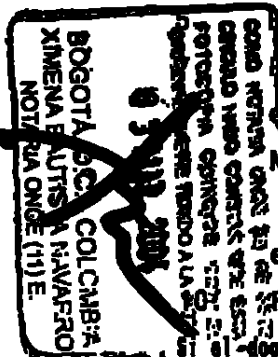
1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento Público
2. ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones de Notario Público
4. Lleva el sello de dicho Notario Público

CERTIFICADO

En Londres 6. El 17 de julio de 2003
Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
No. G210434
Sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado
Si el documento se usa en un país que no es parte de la convención de la Haya del 5 de octubre 1961, debe presentarse en sección consular de la misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 25 de julio-2003. Marlén Neira C

Marlén Neira C
MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117 del 17 de julio de 2003



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 Piso 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

by means of these presents hereby grants to Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents, Utility Models and Industrial Designs in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

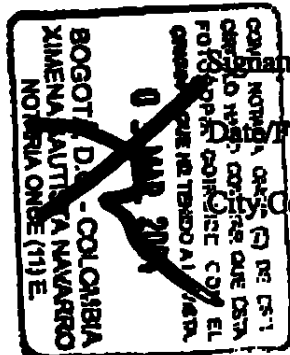
El suscrito,

Pfizer Inc.

domiciliado en

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

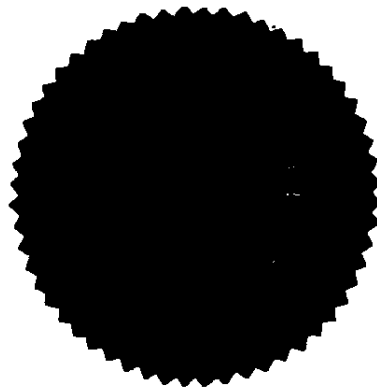
por medio del presente otorga a Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.



Signature/Firma: [Handwritten Signature]

Date/Fecha: July 14, 2003

City/Country/Ciudad, País: New York, USA



OLARTE RAISBECK

OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER - TORRE C
CALLE 100 No. 8A-55 Piso 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Notarial Certification

On this date,
July 14, 2003

The undersigned Notary Public certifies:

1. That *J. Trevor Lumb*
J. Trevor Lumb
of legal age and domiciled in
New York, USA New York
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing
document as Assistant General Patent Counsel
of Pfizer Inc.

3. That Pfizer Inc.,
having its principal place of business located in
New York, New York, U.S.A.
is duly incorporated, is currently in existence, and
that the purposes for which the Power of Attorney is
granted are within the scope of its corporate
purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the
Power of Attorney and that his/her representation is
legal.

5. The foundation for my certifications contained in
points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following
authentic document(s):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
J. Trevor Lumb
mayor de edad y domiciliado
New York
suscribió el documento que antecede.

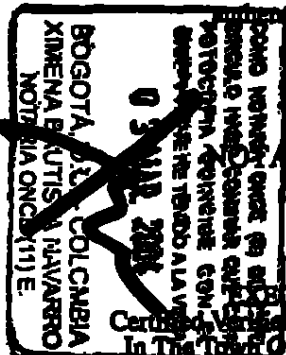
2. Que el otorgante ha suscrito el referido
documento en su carácter de
de

4. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia
legal vigente y que los propósitos para los cuales
se otorga el poder se encuentra dentro de los que
comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para
suscibir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones
contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición
de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):



NOTARY PUBLIC (Signature):

CERTIFICATION
Certified, Verified and Authenticated
In The Town Of Bogota, In Surrey

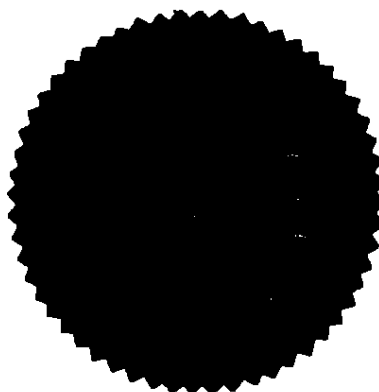
This 14th

Day Of

KENNETH GREENWOOD

NOTARY PUBLIC

HORN ENCALL AND FREEMAN



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)
UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by K Greenwood
a été signé par
3. Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

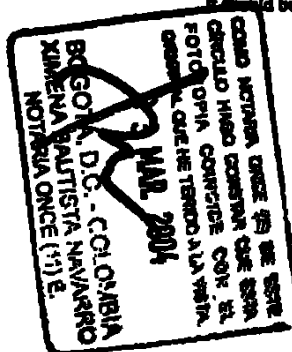
5. at London/Londres 6. the/le 17 July 2003
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/num No **G210434**
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: R. Rowden



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'R. Rowden', written over a horizontal line.

For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country.



CESION

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros por PFIZER LIMITED., sociedad constituida en virtud de las leyes del Inglaterra cuya dirección postal completa es Ramsgate Road, Sándwich, Kent CT13 9NJ, Reino Unido, por el presente vendemos y traspasamos a la citada PFIZER LIMITED, todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en COMBINACION FARMACEUTICA, en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada PFIZER LIMITED, de conformidad con esta Cesión.

En fe de lo cual, firmamos de nuestro puño y letra,

(Fdo) Michael Yeadon

Lugar, fecha y firma - Michael Yeadon

Sándwich, Kent, England - 30 Septiembre 2002

Certificado, verificado y autenticado
En la ciudad de Egham en Surrey

A los 30 días del mes de octubre de 2002

(Fdo) Kenneth Greenwood

KENNETH GREENWOOD
NOTARIO PUBLICO
HORNE ENGALL AND FREEMAN

(Adherido, sello notarial)

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. **País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte**
Este es documento público
2. **Ha sido firmado por** **K. Greenwood**
3. **Actuando en calidad de** **Notario Público**
4. **Lleva el sello/estampilla de** **El antedicho Notario Público**
5. **En Londres** **Certificado**
6. **El 30 de Octubre de 2002**
7. **Por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y de la Mancomunidad.**
8. **Número** **G048466**
9. **Sello/Estampilla** **10. Firma**
(Sello de la Oficina de **(Fdo) S. O'Donoghue**
Asuntos Exteriores y de la **Por el secretario de Estado.**
Mancomunidad

9

PC22050/700062

CESION

Por contraprestación valiosa pagada a nosotros por PFIZER INC, sociedad constituida en virtud de las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América, cuya dirección postal completa es 235 East 42nd Street, NewYork, New Cork 10017, Estados Unidos de América, por el presente vendemos y traspasamos a la citada PFIZER INC, todo nuestro derecho, título e interés en y sobre nuestro invento de una nueva y útil mejora en COMBINACION FARMACEUTICA, en cuanto respecta a la República de Colombia, tal como se indica y describe plenamente en la especificación y por el presente autorizamos y solicitamos al Comisionado de Patentes de Colombia expedir dicha patente a nombre de la citada PFIZER INC, de conformidad con esta Cesión.

En fe de lo cual, firmamos de nuestro puño y letra,

PFIZER LIMITED

(Fdo) David J. Wood

Lugar, fecha y firma - DAVID J. WOOD Director Departamento de Patentes UK

Sándwich, Kent, England - 24 Octubre 2002

Certificado, verificado y autenticado
En la ciudad de Egham en Surrey

A los 30 días del mes de octubre de 2002

(Fdo) Kenneth Greenwood

KENNETH GREENWOOD
NOTARIO PUBLICO
HORNE ENGALL AND FREEMAN

(Adherido, sello notarial)

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

2. País: Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este es documento público

2. Ha sido firmado por K. Greenwood

3. Actuando en calidad de Notario Público

4. Lleva el sello/estampilla de El antedicho Notario Público

5. En Londres **Certificado**
6. El 30 de Octubre de 2002

7. Por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y de la Mancomunidad.

8. Número G048467

9. Sello/Estampilla **10. Firma**

(Sello de la Oficina de Asuntos Exteriores y de la Mancomunidad **(Fdo) S. O'Donoghue**
Por el secretario de Estado.

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER LIMITED** a corporation organized under the laws of England whose full post office address is **Ramsgate Road, Sandwich, Kent CT13 9NJ, United Kingdom**, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER LIMITED**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in **PHARMACEUTICAL COMBINATION** so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER LIMITED** in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this



Place, date and signature - Michael Yeadon

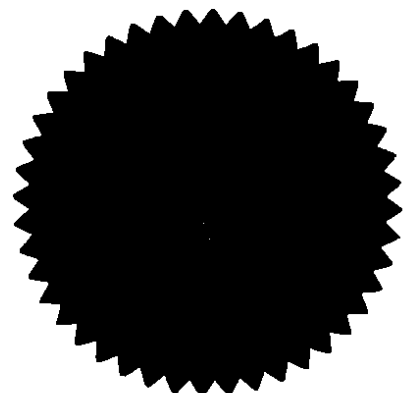
Sandwich, Kent, England - 30 September 2002

**Certified Verified And Authenticated
In The Town Of Egham In Surrey**

This

30th Day Of *Sept* 2002

**KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNE ENGALL AND FREEMAN**



APOSTILLE**(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)****UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND****Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland****Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord****This public document / Le présent acte public****Has been signed by K Greenwood
a été signé par****Acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de****Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de****at London/à Londres****Certified/Attesté****6. the/le 30 October 2002****by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.****Number/sous No****G048466****Stamp:
timbre:****10. Signature: S. O'Donoghue****For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat****If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the mission representing that country.**

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by PFIZER INC., a corporation organized under the laws of the State of Delaware, United States of America of 235 East 42nd Street, New York, New York 10017, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said PFIZER INC., all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in

PHARMACEUTICAL COMBINATION

so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said PFIZER INC. in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

PFIZER LIMITED

Sandwich, Kent, England - 24 October 2002

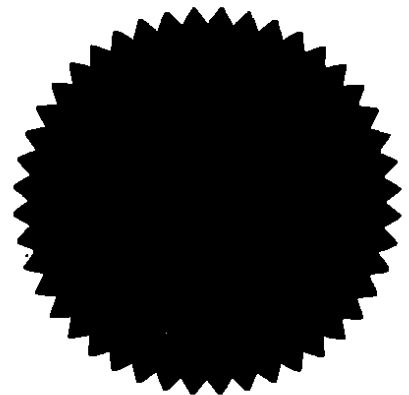
D. J. Wood
Place, date and signature - DAVID J. WOOD, EXECUTIVE DIRECTOR, UK PATENT DEPARTMENT

**Certified Verified And Authenticated
In The Town Of Egham In Surrey**

This

30th Day Of *Oct* 2002

**KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNE ENGALL AND FREEMAN**



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. **Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland**
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. **Has been signed by K Greenwood**
a été signé par
3. **Acting in the capacity of Notary Public**
agissant en qualité de
4. **Bears the seal/stamp of The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. **at London/à Londres**
6. **the/le 30 October 2002**

7. **by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /**
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. **Number/sous No G048467**

9. **Stamp:**
10. **Signature: S. O'Donoghue**




For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

(43) International Publication Date
12 June 2003 (12.06.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/047578 A1

(51) International Patent Classification⁷: A61K 31/44.
45X6. A61P 11AX

(74) Agents: LUMB, J., Trevor; c/o Simpson, Alison
Urquhart-Dykes & Lord, 30 Welbeck Street, London W1G
8LR et al. (GB).

(21) International Application Number: PCT/IB02/04922

(22) International Filing Date:
22 November 2002 (22.11.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0129395.0 7 December 2001 (07.12.2001) GB

(71) Applicant (for GB only): PFIZER LIMITED [GB/GB];
Ramsgate Road, Sandwich, Kent CT13 9NJ (GB).

(71) Applicant (for all designated States except GB, US):
PFIZER INC. [US/US]; 235 East 42nd Street, New York,
NY 10017 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): YEADON, Michael
[GB/GB]; Pfizer Global Research and Development,
Ramsgate Road, Sandwich, Kent CT13 9NJ (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GI, GR,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI), GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IL, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: COMBINATION OF A SELECTIVE PD14 INHIBITOR AND AN ADRENERGIC BETA-2 RECEPTOR AGONIST

(57) Abstract: The present invention relates to a combination of a selective PD14 inhibitor, as defined herein, and an adrenergic β_2 receptor agonist for simultaneous, sequential or separate administration by the inhaled route in the treatment of an obstructive airways or other inflammatory disease.

WO 03/047578 A1

COMBINATION OF A SELECTIVE PDE4 INHIBITOR AND AN ADRENERGIC BETA-2 RECEPTOR AGONIST

The present invention relates to an inhaled combination of a selective PDE4 inhibitor and an adrenergic $\beta 2$ receptor agonist, to pharmaceutical compositions, including devices for administering, and to the uses of such a combination.

A combination of a selective PDE4 inhibitor and an adrenergic $\beta 2$ receptor agonist is useful in the treatment of obstructive airways and other inflammatory diseases, particularly the obstructive airways diseases asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and other obstructive airways diseases exacerbated by heightened bronchial reflexes, inflammation, bronchial hyper-reactivity and bronchospasm. The combination is especially useful in the treatment of COPD.

Examples of particular diseases that may be treated with the present invention include the respiratory diseases asthma, acute respiratory distress syndrome, chronic pulmonary inflammatory disease, bronchitis, chronic bronchitis, chronic obstructive pulmonary (airway) disease and silicosis and diseases of the immune system such as allergic rhinitis and chronic sinusitis.

20

The 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) comprise a large class of enzymes divided into at least eleven different families which are structurally, biochemically and pharmacologically distinct from one another. The enzymes within each family are commonly referred to as isoenzymes, or isozymes. A total of more than fifteen gene products is included within this class, and further diversity results from differential splicing and post-translational processing of those gene products. The present invention is primarily concerned with the four gene products of the fourth family of PDEs, *i.e.*, PDE4A, PDE4B, PDE4C, and PDE4D. These enzymes are collectively referred to as being isoforms or subtypes of the PDE4 isoenzyme family (PDE4s).

30

PDE4s are characterized by selective, high affinity hydrolytic degradation of the second messenger cyclic nucleotide, adenosine 3',5'-cyclic monophosphate

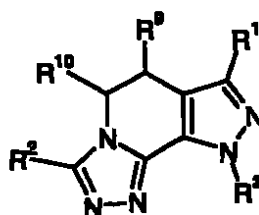
(cAMP), and by sensitivity to inhibition by rolipram. A number of selective inhibitors of the PDE4s have been discovered in recent years, and beneficial pharmacological effects resulting from that inhibition have been shown in a variety of disease models: see, e.g., Torphy *et al.*, *Environ. Health Perspect.* 102
5 Suppl. 10, 79-84, 1994; Duplantier *et al.*, *J. Med. Chem.* 39 120-125, 1996; Schneider *et al.*, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50 211-217, 1995; Banner and Page, *Br. J. Pharmacol.* 114 93-98, 1995; Barnette *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273 674-679, 1995; Wright *et al.* "Differential *in vivo* and *in vitro* bronchorelaxant activities of CP-80633, a selective phosphodiesterase 4
10 inhibitor," *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75 1001-1008, 1997; Manabe *et al.* "Anti-inflammatory and bronchodilator properties of KF19514, a phosphodiesterase 4 and 1 inhibitor," *Eur. J. Pharmacol.* 332 97-107, 1997; and Ukita *et al.* "Novel, potent, and selective phosphodiesterase-4 inhibitors as antiasthmatic agents: synthesis and biological activities of a series of 1-pyridylnaphthalene
15 derivatives," *J. Med. Chem.* 42 1088-1099, 1999.

Adrenergic β receptors occur in the sympathetic nervous system. There are at least two types. Adrenergic β_1 receptors are found in the heart and play a major role in regulating heart rate via the action of the agonists epinephrine and
20 norepinephrine. Adrenergic β_2 receptors are present on a number of cell types in the lung (e.g. airway smooth muscle cells, epithelial cells, and a variety of inflammatory cells) and adrenergic β_2 receptor agonists are effective bronchodilators, causing the relaxation of airway smooth muscle. Sympathomimetic amines have a long history of use in the treatment of chronic
25 airway diseases characterised by partially reversible airway narrowing such as COPD and asthma and were first used as bronchodilators in the form of intravenous epinephrine. Later, inhaled β -adrenergic agents such as isoprenaline were used which were relatively non-selective for β_2 over β_1 receptors and thus caused tachycardia at effective bronchodilator doses. More
30 recently, inhaled β -adrenergic agents such as salbutamol have been used which are more selective for the β_2 receptor but short-acting. Inhaled β -adrenergic agents formoterol, N-[2-hydroxy-5-(1-hydroxy-2-((2-(4-methoxyphenyl)-1-

methylethyl)amino)-ethyl)phenyl]formamide, and salmeterol are both selective for the β_2 receptor and long-acting.

It has now been surprisingly found that a combinations of particular selective
5 PDE4 inhibitors and adrenergic β_2 receptor agonists offer significant benefits in the treatment of obstructive airways and other inflammatory diseases over treatment with either agent alone and over other known combinations. The advantage of the combination is to provide optimal control of airway calibre through the mechanism most appropriate to the disease pathology, namely
10 adrenergic β_2 receptor agonism, together with effective suppression of inappropriate inflammation. In this way, symptoms of the disease are controlled by correcting inappropriate airway neural reflexes which drive cough, mucus production and dyspnea. By administering a combination of an adrenergic β_2 receptor agonist and a selective PDE4 inhibitor via the inhaled route, the
15 benefits of each class are realised without the unwanted peripheral effects. Further, the particular combinations of the invention result in unexpected synergy, producing greater efficacy than maximally tolerated doses of either class of agent used alone.

20 The invention therefore provides an inhaled combination of (a) a selective PDE4 inhibitor of the formula (I)

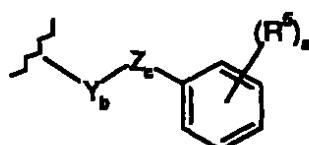


(I)

or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, wherein:

R^1 is H, (C₁-C₆) alkyl, (C₁-C₆) alkoxy, (C₂-C₄) alkenyl, phenyl, -N(CH₃)₂, (C₃-C₈) cycloalkyl, (C₃-C₈) cycloalkyl(C₁-C₃) alkyl or (C₁-C₆) acyl, wherein the alkyl, phenyl or alkenyl groups may be substituted with up to two -OH, (C₁-C₃) alkyl, or -CF₃ groups or up to three halogens;

- 5 R^2 and R^3 are each independently selected from the group consisting of H, (C₁-C₁₄) alkyl, (C₁-C₇) alkoxy(C₁-C₇) alkyl, (C₂-C₁₄) alkenyl, (C₃-C₇) cycloalkyl, (C₃-C₇) cycloalkyl(C₁-C₂) alkyl, a saturated or unsaturated (C₄-C₇) heterocyclic(CH₂)_n group wherein n is 0, 1 or 2, containing as the heteroatom one or two of the group consisting of oxygen, sulfur, sulfonyl, nitrogen and NR⁴ where R⁴ is H or (C₁-C₄) alkyl; or a group of the Formula (II):



(II)

wherein a is an integer from 1 to 5; b and c are 0 or 1; R⁵ is H, -OH, (C₁-C₅) alkyl, (C₂-C₅) alkenyl, (C₁-C₅) alkoxy, (C₃-C₆) cycloalkoxy, halogen, -CF₃, -CO₂R⁶,

- 15 -CONR⁶R⁷, -NR⁶R⁷, -NO₂, or -SO₂NR⁶R⁷ wherein R⁶ and R⁷ are each independently H, or (C₁-C₄) alkyl; Z is -O-, -S-, -SO₂-, -CO- or -N(R⁸)- wherein R⁸ is H or (C₁-C₄) alkyl; and Y is (C₁-C₆) alkylene or (C₂-C₆) alkenylene optionally substituted with up to two (C₁-C₇) alkyl or (C₃-C₇) cycloalkyl groups; wherein each of the alkyl, alkenyl, cycloalkyl, alkoxyalkyl or heterocyclic groups may be substituted with 1 to 14, preferably 1 to 5, (C₁-C₂) alkyl, CF₃, or halo groups; and
- 20 R⁹ and R¹⁰ are each independently selected from the group consisting of H, (C₁-C₆) alkyl, (C₁-C₆) alkoxy, (C₆-C₁₀) aryl and (C₆-C₁₀) aryloxy;

and (b) an adrenergic β 2 receptor agonist.

25

Further, the invention provides an inhaled combination of a selective PDE4 inhibitor of the formula (I), as defined above, and an adrenergic β 2 receptor agonist for use as a medicament.

18
20

Further, the invention provides an inhaled combination of a selective PDE4 inhibitor of the formula (I), as defined above, and an adrenergic $\beta 2$ receptor agonist for simultaneous, sequential or separate administration in the treatment of an obstructive airways or other inflammatory disease.

5

Further, the invention provides a pharmaceutical composition comprising a selective PDE4 inhibitor of the formula (I), as defined above, an adrenergic $\beta 2$ receptor agonist and a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier, for administration by the inhaled route in the treatment of an obstructive airways or other inflammatory disease.

10

Further, the invention provides the use of a selective PDE4 inhibitor of the formula (I), as defined above, or an adrenergic $\beta 2$ receptor agonist in the manufacture of a medicament for simultaneous, sequential or separate administration of both agents by the inhaled route in the treatment of an obstructive airways or other inflammatory disease.

15

Further, the invention provides a method of treating of an obstructive airways or other inflammatory disease comprising administering simultaneously, sequentially or separately, by the inhaled route, to a mammal in need of such treatment, an effective amount of a selective PDE4 inhibitor of the formula (I), as defined above, and an adrenergic $\beta 2$ receptor agonist.

20

Further, the invention provides an inhalation device for simultaneous, sequential or separate administration of a selective PDE4 inhibitor of the formula (I), as defined above, and an adrenergic $\beta 2$ receptor agonist in the treatment of an obstructive airways or other inflammatory disease.

25

A selective PDE4 inhibitor is one that has a greater affinity for the PDE4 isoenzyme than all other known PDE isoenzymes. Preferably, the affinity of a selective PDE4 inhibitor according to the invention is at least 100 fold greater for the PDE4 isoenzyme as compared with its affinity for the other PDE isoenzymes.

30

19
21

Preferred compounds of the formula (I) include those wherein R¹ is methyl, ethyl or isopropyl and those wherein R³ is (C₁-C₆) alkyl, (C₂-C₆) alkenyl, (C₃-C₇) cycloalkyl, (C₃-C₇)cycloalkyl(C₁-C₆)alkyl or phenyl optionally substituted with 1 or 2 of the group consisting of H, -OH, (C₁-C₆) alkyl, (C₂-C₆) alkenyl, (C₁-C₆) alkoxy, halogen, trifluoromethyl, -CO₂R⁶, -CONR⁶R⁷, -NR⁶R⁷, -NO₂ or -SO₂NR⁶R⁷ wherein R⁶ and R⁷ are each independently H or (C₁-C₄) alkyl.

Preferred individual compounds of the formula (I) include:

- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-phenyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-
10 α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(furan-2-yl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-pyridyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]pyridine;
- 15 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(4-pyridyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(3-thienyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]pyridine;
- 3-benzyl-9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-
20 α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-propyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]pyridine;
- 3,9-dicyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]pyridine;
- 25 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(1-methylcyclohex-1-yl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]pyridine;
- 3-(tert-butyl)-9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]pyridine;

90
22

- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-methylphenyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-methoxyphenyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 5 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(thien-2-yl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 3-(2-chlorophenyl)-9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-iodophenyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-
- 10 triazolo[4,3- α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-trifluoromethylphenyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine; and
- 5,6-dihydro-7-ethyl-9-(4-fluorophenyl)-3-(1-methylcyclohex-1-yl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 15 and the pharmaceutically acceptable salts and solvates thereof.

Particularly preferred compounds of the formula (I) include 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-thienyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine and 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(*tert*-butyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-

20 triazolo[4,3- α]pyridine and the pharmaceutically acceptable salts and solvates thereof.

The synthesis of compounds of the formula (I) is described in WO-A-96/39408.

- 25 Preferably, an adrenergic β 2 receptor agonist used in a combination according to the invention is a selective adrenergic β 2 receptor agonist, i.e. has a greater affinity for the adrenergic β 2 receptor than all other known adrenergic β receptors. Preferably, the affinity of such a selective adrenergic β 2 receptor agonist is at least 100 fold greater for the adrenergic β 2 receptor as compared
- 30 with its affinity for the other adrenergic β receptors.

24
23

Preferred adrenergic $\beta 2$ receptor agonists for use in the invention include salmeterol, formoterol and the pharmaceutically acceptable salts and solvates thereof.

5 Particularly preferred combinations include:

9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-thienyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, and salmeterol, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof;

10 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-thienyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, and formoterol, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof;

9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(tert-butyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, and salmeterol, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof; and

15 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(tert-butyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, and formoterol, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof.

A selective PDE4 inhibitor or an adrenergic $\beta 2$ receptor agonist used in
20 accordance with the invention may optionally be utilised in the form of a pharmaceutically acceptable salt or solvate. Such a salt may be an acid addition or a base salt.

Suitable acid addition salts are formed from acids which form non-toxic salts and
25 examples are the hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, sulphate, bisulphate, nitrate, phosphate, hydrogen phosphate, acetate, maleate, fumarate, lactate, tartrate, citrate, gluconate, succinate, saccharate, benzoate, methanesulphonate, ethanesulphonate, benzenesulphonate, p-toluenesulphonate and pamoate salts.

30

Suitable base salts are formed from bases which form non-toxic salts and examples are the sodium, potassium, aluminium, calcium, magnesium, zinc and diethanolamine salts.

22
24

For a review on suitable salts see Berge et al, J. Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977.

The pharmaceutically acceptable solvates of the selective PDE4 inhibitors and
5 adrenergic $\beta 2$ receptor agonists used in accordance with the invention, or salts thereof, include the hydrates thereof.

The selective PDE4 inhibitors and adrenergic $\beta 2$ receptor agonists of the invention may exist in one or more polymorphic forms.

10

The selective PDE4 inhibitors and adrenergic $\beta 2$ receptor agonists of the invention (henceforth, 'compounds of the invention') may contain one or more asymmetric carbon atoms and therefore exists in two or more stereoisomeric forms (e.g. R,R' formoterol is a preferred embodiment). Where such a
15 compound contains an alkenyl or alkenylene group, cis/trans (or Z/E) isomerism may also occur. The present invention includes these individual stereoisomers of the compounds of the invention and, where appropriate, the individual tautomeric forms thereof, together with mixtures thereof.

20 Separation of diastereoisomers or cis and trans isomers may be achieved by conventional techniques, e.g. by fractional crystallisation, chromatography or H.P.L.C. of a stereoisomeric mixture of a compound of the invention or a suitable salt or derivative thereof. An individual enantiomer of a compound of the invention may also be prepared from a corresponding optically pure intermediate
25 or by resolution, such as by H.P.L.C. of the corresponding racemate using a suitable chiral support or by fractional crystallisation of the diastereoisomeric salts formed by reaction of the corresponding racemate with a suitable optically active acid or base, as appropriate.

30 The present invention also includes all suitable isotopic variations of a compound of the invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof. An isotopic variation of a compound of the invention or a pharmaceutically acceptable salt thereof is defined as one in which at least one atom is replaced

23
25

by an atom having the same atomic number but an atomic mass different from the atomic mass usually found in nature. Examples of isotopes that can be incorporated into compounds of the invention and pharmaceutically acceptable salts thereof include isotopes of hydrogen, carbon, nitrogen, oxygen, phosphorus, sulphur, fluorine and chlorine such as ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F and ^{36}Cl , respectively. Certain isotopic variations of the compounds of the invention and pharmaceutically acceptable salts thereof, for example, those in which a radioactive isotope such as ^3H or ^{14}C is incorporated, are useful in drug and/or substrate tissue distribution studies. Tritiated, i.e., ^3H , and carbon-14, i.e., ^{14}C , isotopes are particularly preferred for their ease of preparation and detectability. Further, substitution with isotopes such as deuterium, i.e., ^2H , may afford certain therapeutic advantages resulting from greater metabolic stability, for example, increased *in vivo* half-life or reduced dosage requirements and hence may be preferred in some circumstances.

15

The types of diseases that may be treated using the combinations of the present invention include, but are not limited to, asthma, chronic or acute bronchoconstriction, chronic bronchitis, small airways obstruction, emphysema, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), COPD that has chronic bronchitis, pulmonary emphysema or dyspnea associated therewith and COPD that is characterised by irreversible, progressive airways obstruction.

20

Asthma

One of the most important respiratory diseases treatable with the combinations of therapeutic agents of the present invention is asthma, a chronic, increasingly common disorder encountered worldwide and characterized by intermittent reversible airway obstruction, airway hyper-responsiveness and inflammation. The cause of asthma has yet to be determined, but the most common pathological expression of asthma is inflammation of the airways, which may be significant even in the airways of patients with mild asthma. This inflammation drives reflex airway events resulting in plasma protein extravasation, dyspnea and bronchoconstriction. Based on bronchial biopsy and lavage studies it has been clearly shown that asthma involves infiltration by mast cells, eosinophils,

30

24
26

and T-lymphocytes into a patient's airways. Bronchoalveolar lavage (BAL) in atopic asthmatics shows activation of interleukin (IL)-3, IL-4, IL-5 and granulocyte/macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) that suggests the presence of a T-helper 2 (Th-2)-like T-cell population.

5

The combinations of therapeutic agents of the present invention are useful in the treatment of atopic and non-atopic asthma. The term "atopy" refers to a genetic predisposition toward the development of type I (immediate) hypersensitivity reactions against common environmental antigens. The most common clinical
10 manifestation is allergic rhinitis, while bronchial asthma, atopic dermatitis, and food allergy occur less frequently. Accordingly, the expression "atopic asthma" as used herein is intended to be synonymous with "allergic asthma", i.e., bronchial asthma which is an allergic manifestation in a sensitized person. The term "non-atopic asthma" as used herein is intended to refer to all other asthmas,
15 especially essential or "true" asthma, which is provoked by a variety of factors, including vigorous exercise, irritant particles, psychologic stresses, etc.

Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)

The combinations of therapeutic agents of the present invention are still further
20 useful in the treatment of COPD or COAD including chronic bronchitis, pulmonary emphysema or dyspnea associated therewith. COPD is characterized by poorly reversible, progressive airways obstruction. Chronic bronchitis is associated with hyperplasia and hypertrophy of the mucus secreting glands of the submucosa in the large cartilaginous airways. Goblet cell
25 hyperplasia, mucosal and submucosal inflammatory cell infiltration, edema, fibrosis, mucus plugs and increased smooth muscle are all found in the terminal and respiratory bronchioles. The small airways are known to be a major site of airway obstruction. Emphysema is characterized by destruction of the alveolar wall and loss of lung elasticity. A number of risk factors have also been
30 identified as linked to the incidence of COPD. The link between tobacco smoking and COPD is well established. Other risk factors include exposure to coal dust and various genetic factors. See Sandford *et al.*, "Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease," *Eur. Respir. J.* 10 1380-1391, 1997.

25
27

The incidence of COPD is increasing and it represents a significant economic burden on the populations of the industrialized nations. COPD also presents itself clinically with a wide range of variation from simple chronic bronchitis without disability to patients in a severely disabled state with chronic respiratory failure.

COPD is characterized by inflammation of the airways, as is the case with asthma, but the inflammatory cells that have been found in the bronchoalveolar lavage fluid and sputum of patients are neutrophils and macrophages rather than eosinophils. Elevated levels of inflammatory mediators are also found in COPD patients, including IL-8, LTB₄, and TNF- α , and the surface epithelium and sub-epithelium of the bronchi of such patients has been found to be infiltrated by T-lymphocytes and macrophages. Symptomatic relief for COPD patients can be provided by the use of β -agonist and anticholinergic bronchodilators, but the progress of the disease remains unaltered. COPD has been treated using theophylline, but without much success, due in part to its propensity to produce unwanted effects. Steroids have also failed to hold out much promise as satisfactory treatment agents in COPD as they are relatively ineffective as anti-inflammatory agents.

20

Accordingly, the use of the combinations of therapeutic agents of the present invention to treat COPD and its related and included obstructed airways diseases, represents a significant advance in the art. The present invention is not limited to any particular mode of action or any hypothesis as to the way in which the desired therapeutic objectives have been obtained by utilizing the combinations of therapeutic agents of the present invention.

25

Bronchitis and Bronchiectasis

In accordance with the particular and diverse inhibitory activities described above that are possessed by the combinations of therapeutic agents of the present invention, they are useful in the treatment of bronchitis of whatever type, etiology, or pathogenesis, including, e.g., acute bronchitis which has a short but severe course and is caused by exposure to cold, breathing of irritant

30

substances, or an acute infection; catarrhal bronchitis which is a form of acute bronchitis with a profuse mucopurulent discharge; chronic bronchitis which is a long-continued form of bronchitis with a more or less marked tendency to recurrence after stages of quiescence, due to repeated attacks of acute
5 bronchitis or chronic general diseases, characterized by attacks of coughing, by expectoration either scanty or profuse, and by secondary changes in the lung tissue; dry bronchitis which is characterized by a scanty secretion of tough sputum; infectious asthmatic bronchitis which is a syndrome marked by the development of symptoms of bronchospasm following respiratory tract infections
10 in persons with asthma; productive bronchitis which is bronchitis associated with a productive cough.

The effectiveness of the combinations of therapeutic agents of the present invention to treat atopic asthma or non-atopic asthma, COPD or other chronic
15 inflammatory airways diseases may be demonstrated by the use of a number of different models known in the art including the models described below.

Bronchodilator Activity - cAMP is involved not only in smooth muscle relaxation, but also exerts an overall inhibitory influence on airway smooth muscle
20 proliferation, both of which may result from elevation of cAMP by the PDE4 component of the invention. Airway smooth muscle hypertrophy and hyperplasia can be modulated by cAMP, and these conditions are common morphological features of chronic asthma.

25 Bronchospasmolytic Activity In Vitro - The ability of the combinations of therapeutic agents of the present invention to cause relaxation of guinea-pig tracheal smooth muscle is demonstrated in the following test procedure. Guinea-pigs (350-500 g) are killed with sodium pentothal (100 mg/kg i.p.). The trachea is dissected and a section 2-3 cm in length is excised. The trachea is transected
30 in the transverse plane at alternate cartilage plates so as to give rings of tissue 3-5 mm in depth. The proximal and distal rings are discarded. Individual rings are mounted vertically on stainless steel supports, one of which is fixed at the base of an organ bath, while the other is attached to an isometric transducer.

27
29

The rings are bathed in Krebs solution (composition μM : NaHCO_3 25; NaCl 113; KCl 4.7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2; KH_2PO_4 1.2; CaCl_2 2.5; glucose 11.7) at 37°C and gassed with O_2/CO_2 (95:5, v/v). Rings prepared in this manner are contracted by field stimulation. To ascertain spasmolytic activity, test combinations of therapeutic agents of the present invention are dissolved in physiological saline and added in increasing quantities to the organ bath at 5m intervals to provide a cumulative concentration-effect curve.

In the above test model, combinations of therapeutic agents of the present invention generally inhibit field stimulated contraction of guinea-pig tracheal ring preparations at concentrations in the range of from 0.001 to 1.0 μM .

Ozone-induced bronchial hyperreactivity model The ability of combinations of therapeutic agents of the present invention to prevent increased responsiveness of the airways to noxious stimuli, also known as bronchial hyperreactivity, is demonstrated in the determination of the effects of these agents on activity of lung responsiveness in guinea-pigs. Adult guinea-pigs (300-600g) are pretreated and prepared according to the method Yeadon et al, 1992, Pulm. Pharmacology, 5, 101-112. Responsiveness of the airways to a variety of stimuli are monitored at basal state and after various interventions which result in changes in pulmonary mechanics. Test articles were administered i.t. or by aerosol at various times prior to challenge. Ozone pretreatment in control animals resulted in a 3-100x increase in lung responsiveness which was dose-relatedly blocked by combinations of the therapeutic agents of the invention.

25

In the above test model the combinations of therapeutic agents of the present invention generally exhibit anti-inflammatory activity at dosages in the range of from 0.001 to 0.3 mg/kg i.t..

30 Relaxation of Human Bronchus - Samples of human lungs dissected during surgery for cancer are obtained within 3 days after removal. Small bronchi (inner diameter $\approx$ 2 to 5 mm) are excised, cut into segments and placed in 2 ml liquid nitrogen storage ampoules filled with fetal calf serum (FCS) containing 1.8M

28
30

dimethylsulfoxide (DMSO) and 0.1M sucrose as cryoprotecting agents. The ampoules are placed in a polystyrol box (11 x 11 x 22 cm) and slowly frozen at a mean cooling rate of about 0.6°C/m in a freezer maintained at -70°C. After 3-15h the ampoules are transferred into liquid nitrogen (-196°C) where they are stored until use. Before use the tissues are exposed for 30-60m to -70°C before being thawed within 2.5m by placing the ampoules in a 37°C water bath. Thereafter the bronchial segments are rinsed by placing them in a dish containing Krebs-Henseleit solution (μM : NaCl 118, KCl 4.7, MgSO_4 1.2, CaCl_2 1.2, KH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 25, glucose 11, EDTA 0.03) at 37°C, cut into rings and suspended in 10 ml organ baths for isometric tension recording under a preload of about 1g. Further increases in tension are induced via the application of field stimulation, which is known to induce activation of nerves in the airway sample and generate tension via release of acetylcholine and other neurally derived mediators. Concentration-response curves are produced by cumulative additions, each concentration being added when the maximum effect has been produced by the previous concentration. Papaverine (300 μM) is added at the end of the concentration response curve to induce complete relaxation of the bronchial rings. This effect is taken as 100% relaxation.

In the above test model the combinations of therapeutic agents of the present invention generally produce concentration-related relaxation of human bronchus ring preparations at concentrations in the range of from 0.001 to 1.0 μM with preferred embodiments being active at concentrations in the range of from 5.0 nM to 500 nM.

25

Suppression of Capsaicin-induced Bronchoconstriction - Male Dunkin-Hartley guinea-pigs (400-800g) having free access to food and water prior to the experiment, are anaesthetized with sodium phenobarbital (100 mg/kg i.p. [intra peritoneal]). Animals, maintained at 37°C with a heated pad, controlled by a rectal thermometer, are ventilated via a tracheal cannula (about 8 ml/kg, 1 Hz) with a mixture of air and oxygen (45:55 v/v). Ventilation is monitored at the trachea by a pneumotachograph connected to a differential pressure transducer in line with the respiratory pump. Pressure changes within the thorax are

30

31

monitored directly via an intrathoracic cannula, using a differential pressure transducer so that the pressure difference between the trachea and thorax can be measured and displayed. From these measurements of air-flow and transpulmonary pressure, both airway resistance (R_1 cmH₂O/l/s) and compliance (Cd_{dyn}) are calculated with a digital electronic respiratory analyzer for each respiratory cycle. Blood pressure and heart rate are recorded from the carotid artery using a pressure transducer.

When values for basal resistance and compliance are stable, an acute episode of bronchoconstriction is induced by an intravenous bolus of capsaicin. Capsaicin is dissolved in 100% ethanol and diluted with phosphate buffered saline. Test combinations of therapeutic agents of the present invention are administered when the response to capsaicin is stable, which is calculated to be after 2-3 such administrations at 10 min intervals. Reversal of bronchoconstriction is assessed over 1-8 h following either intratracheal or intraduodenal instillation or intravenous bolus injection. Bronchospasmolytic activity is expressed as a % inhibition of the initial, maximal resistance (R_D) following the infusion of capsaicin. ED₅₀ values represent the dose which causes a 50% reduction of the increase in resistance induced by capsaicin. Duration of action is defined as the time in minutes where bronchoconstriction is reduced by 50% or more. Effects on blood pressure (BP) and heart rate (HR) are characterized by ED₂₀ values; i.e., the doses which reduce BP or HR by 20% measured 5m after administration.

In the above test model the combinations of therapeutic agents of the present invention generally exhibit bronchodilator activity at dosages in the range of from 0.001 to 0.1 mg/kg i.t. [Intra tracheal]. Further, the combination delivered i.t. exhibits an at least additive inhibitory effect on bronchospasm, with each component alone being able to inhibit more than 50% of the observed control response.

LPS-Induced Lung Neutrophilia - The recruitment to and activation of neutrophils in the lungs is considered an important pathological feature in COPD and in

severe asthma. Consequently, inhibition of either or both of these endpoints in animals provides supportive evidence of the utility of the present invention.

Male Wistar-Albino rats (150-250g) or male Dunkin-Hartley guinea-pigs (400-600g) are pretreated with the test articles alone or in combination by inhalation or intratracheal (i.t.) instillation under brief general anaesthesia. After 1-24h after compound administration, animals are challenged with an inhalation aerosol of bacterial lipopolysaccharide (LPS) sufficient to induce over the subsequent 1-24h of a pronounced lung neutrophilia. The neutrophilia is assessed by cell counting in bronchial washings or by determination of neutrophil products in lung washings or tissue. In this test system, the therapeutic agents of the present invention generally exhibit anti-inflammatory activity at doses ranging from 0.0001 to 0.1 mg/kg i.t. Unexpectedly, the combination delivered i.t. exerts at least an additive effect on inflammation, despite the fact that one of the components does not on its own exert a significant anti-inflammatory effect. Further, equivalent anti-inflammatory effects of a high dose of one of the components can be observed with lower doses when used in combination as in this invention, thus minimising systemic unwanted effects.

Allergic guinea-pig Assay - A test for evaluating the therapeutic impact of the combinations of therapeutic agents of the present invention on the symptom of dyspnea and bronchospasm *i.e.*, difficult or labored breathing and increased lung resistance, and on the symptom of inflammation, *i.e.* lung neutrophilia and eosinophilia, utilizes Dunkin-Hartley guinea-pigs (400-600 g body weight).

25

The egg albumin (EA), grade V, crystallized and lyophilized, aluminum hydroxide, and mepyramine maleate used in this test are commercially available. The challenge and subsequent respiratory readings are carried out in a clear plastic box with internal dimensions of 10x6x4 inches. The head and body sections of the box are separable. In use the two are held firmly together by clamps, and an airtight seal between the chambers is maintained by a soft rubber gasket. Through the centre of the head end of the chamber a nebulizer is inserted *via* an airtight seal and each end of the box also has an outlet. A

30

24
33

- pneumotachograph is inserted into one end of the box and is coupled to a volumetric pressure transducer which is then connected to a dynograph through appropriate couplers. While aerosolizing the antigen, the outlets are open and the pneumotachograph is isolated from the chamber. The outlets are then closed and the pneumotachograph and the chamber are connected during the recording of the respiratory patterns. For challenge, 2 ml of a 3% solution of antigen in saline is placed in each nebulizer and the aerosol is generated with air from a small diaphragm pump operating at 10 psi and a flow rate of 8 l/m.
- 10 Guinea-pigs are sensitized by injecting subcutaneously and i.p. 1 ml of a suspension containing 1 mg EA and 200 mg aluminum hydroxide in saline. They are used between days 12 and 24 post-sensitization. In order to eliminate the histamine component of the response, guinea-pigs are pretreated i.p. 30min prior to aerosol challenge with 2mg/kg of mepyramine. Guinea-pigs are then exposed to an aerosol of 3% EA in saline for exactly 1m, then respiratory profiles are recorded for a further 30m. Subsequently, lung inflammation is determined post mortem over a period of 1-48h. The duration of continuous dyspnea is measured from the respiratory recordings.
- 20 Test combinations of therapeutic agents of the present invention are generally administered i.t. or by aerosol 0.5-4h prior to challenge. The combinations of compounds are either dissolved in saline or biocompatible solvents. The activity of the compounds is determined on the basis of their ability to decrease the magnitude and duration of symptoms of dyspnea and broncospasm and/or magnitude of lung inflammation in comparison to a group of vehicle-treated controls. Tests of the combinations of therapeutic agents of the present invention are evaluated over a series of doses and an ED₅₀ is derived that is defined as the dose (mg/kg) which will inhibit the duration of symptoms by 50%.
- 30 Anti-inflammatory Activity The anti-inflammatory activity of the combinations of therapeutic agents of the present invention is demonstrated by the inhibition of eosinophil or neutrophil activation. In this assay blood samples (50ml) are collected from non-atopic volunteers with eosinophil numbers ranging between

0.06 and $0.47 \times 10^9 \text{ L}^{-1}$. Venous blood is collected into centrifuge tubes containing 5 ml trisodium citrate (3.8%, pH 7.4).

- The anticoagulated blood is diluted (1:1, v:v) with phosphate-buffered saline (PBS, containing neither calcium nor magnesium) and is layered onto 15 ml isotonic Percoll (density 1.082 - 1.085 g/ml, pH 7.4), in a 50 ml centrifuge tube. Following centrifugation (30 minutes, $1000 \times g$, 20°C), mononuclear cells at the plasma/Percoll interface are aspirated carefully and discarded.
- 10 The neutrophil/eosinophil/erythrocyte pellet (ca. 5 ml by volume) is gently resuspended in 35 ml of isotonic ammonium chloride solution (NH_4Cl , 155mM; KHCO_3 , 10mM; EDTA, 0.1mM; $0-4^\circ\text{C}$). After 15-min, cells are washed twice (10 min, $400 \times g$, 4°C) in PBS containing fetal calf serum (2%, FCS).
- 15 A magnetic cell separation system is used to separate eosinophils and neutrophils. This system is able to separate cells in suspension according to surface markers, and comprises a permanent magnet, into which is placed a column that includes a magnetizable steel matrix. Prior to use, the column is equilibrated with PBS/FCS for 1 hour and then flushed with ice-cold PBS/FCS on
- 20 a retrograde basis via a 20 ml syringe. A 21G hypodermic needle is attached to the base of the column and 1-2 ml of ice cold buffer are allowed to efflux through the needle.
- Following centrifugation of granulocytes, supernatant is aspirated and cells are
- 25 gently resuspended with $100\mu\text{l}$ magnetic particles (anti-CD16 monoclonal antibody, conjugated to superparamagnetic particles). The eosinophil/neutrophil/anti-CD16 magnetic particle mixture is incubated on ice for 40 minutes and then diluted to 5 ml with ice-cold PBS/FCS. The cell suspension is slowly introduced into the top of the column and the tap is opened to allow the
- 30 cells to move slowly into the steel matrix. The column is then washed with PBS/FCS (35ml) which is carefully added to the top of the column so as not to disturb the magnetically labeled neutrophils already trapped in the steel matrix. Non-labeled eosinophils are collected in a 50ml centrifuge tube and washed (10

33
35

minutes, 400 x g, 4°C). The resulting pellet is resuspended in 5 ml Hank's balanced salt solution (HBSS) so that cell numbers and purity can be assessed prior to use. The separation column is removed from the magnet and the neutrophil fraction is eluted. The column is then washed with PBS (50ml) and
5 ethanol (absolute) and stored at 4°C.

Total cells are counted with a micro cell counter. One drop of lysogenic solution is added to the sample, which after 30s is recounted to assess contamination with erythrocytes. Cytospin smears are prepared on a Shandon Cytospin 2
10 cytospinner (100 µl samples, 3 minutes, 500 rpm). These preparations are stained and differential cell counts are determined by light microscopy, examining at least 500 cells. Cell viability is assessed by exclusion of trypan blue.

15 Eosinophils or neutrophils are diluted in HBSS and pipetted into 96 well microtiter plates (MTP) at $1-10 \times 10^5$ cells/well. Each well contains a 200 µl sample comprising: 100 µl cell suspension; 50 µl HBSS; 10 µl lucigenin; 20 µl activation stimulus; and 20 µl test compound.

20 The samples are incubated with test compound or vehicle for 10m prior to addition of an activation stimulus fMLP (1-10 µM) or C5a (1-100nM) dissolved in dimethylsulfoxide and thereafter diluted in buffer, such that the highest solvent concentration used is 1% (at 100 µM test compound). MTPs are agitated to facilitate mixing of the cells and medium, and the MTP is placed into a
25 luminometer. Total chemiluminescence and the temporal profile of each well is measured simultaneously over 20m and the results expressed as arbitrary units, or as a percentage of fMLP-induced chemiluminescence in the absence of test compound. Results are fitted to the Hill equation and IC_{50} values are calculated automatically.

30

The combinations of therapeutic agents of the present invention are generally active in the above test method at concentrations in the range of from 0.0001µM

34
36

to 0.5 μ M, with preferred embodiments being active at concentrations in the range of from 0.1 nM to 100 nM.

5 The anti-inflammatory activity of the combinations of therapeutic agents of the present invention is additionally demonstrated by the inhibition of plasma extravasation into rat airways. In this assay tracheal tissue is taken and the extent of plasma leakage determined. This assay relates equally to other chronic inflammatory diseases of the airways including but not limited to COPD and accordingly is not recapitulated in that section.

10

Wistar albino rats (150-200g) or Dunkin-Hartley guinea-pigs (450-600g) are anaesthetised with sodium pentobarbitone and venous and arterial cannulae installed. Evans Blue dye to bind plasma proteins is administered i.v. (30mg/kg). After 10mins the test agents are administered i.t. and 10mins later capsaicin
15 administered i.v. (3 μ g/kg). 30mins later, tracheal tissue is removed, extracted overnight into formamide and absorbance read at 620nm. In some experiments the order of dosing was reversed such that the compounds were administered before the Evans Blue and inflammatory stimulus.

20 In the above test model in the above test model the combinations of therapeutic agents of the present invention generally exhibit anti-inflammatory activity at dosages in the range of from 0.001 to 0.1 mg/kg i.t.

From the above it may be seen that the combinations of therapeutic agents of
25 the present invention are useful for the treatment of inflammatory or obstructive airways diseases or other conditions involving airways obstruction. In particular they are useful for the treatment of bronchial asthma.

In view of their anti-inflammatory activity and their influence on airways hyper-
30 reactivity, the combinations of therapeutic agents of the present invention are useful for the treatment, in particular prophylactic treatment, of obstructive or

35
37

inflammatory airways diseases. Thus, by continued and regular administration over prolonged periods of time the combinations of compounds of the present invention are useful in providing advance protection against the recurrence of bronchoconstriction or other symptomatic attack consequential to obstructive or
5 inflammatory airways diseases. The combinations of compounds of the present invention are also useful for the control, amelioration or reversal of the basal status of such diseases.

Having regard to their bronchodilator activity the combinations of therapeutic
10 agents of the present invention are useful as bronchodilators, e.g., in the treatment of chronic or acute bronchoconstriction, and for the symptomatic treatment of obstructive or inflammatory airways diseases.

Obstructive or inflammatory airways diseases to which the present invention
15 applies include asthma; pneumoconiosis; chronic eosinophilic pneumonia; chronic obstructive airways or pulmonary disease (COAD or COPD); and adult respiratory distress syndrome (ARDS), as well as exacerbation of airways hyper-reactivity consequent to other drug therapy, e.g., aspirin or β -agonist therapy.

20 The selective PDE4 inhibitors and adrenergic β 2 receptor agonists of the present invention can be administered alone or in combination but will generally be administered in admixture with a suitable pharmaceutical excipient, diluent or carrier.

25 The selective PDE4 inhibitors and adrenergic β 2 receptor agonists of the present invention are preferably administered by inhalation and are conveniently delivered in the form of a dry powder (either alone or as a mixture, for example a mixture with lactose) from a dry powder inhaler or an aerosol spray presentation from a pressurised container, pump, spray, atomiser (preferably an atomiser
30 using electrohydrodynamics to produce a fine mist) or nebuliser, with or without the use of a suitable propellant, e.g. dichlorodifluoromethane, trichlorofluoromethane, dichlorotetrafluoroethane, a hydrofluoroalkane such as 1,1,1,2-tetrafluoroethane (HFA 134A [trade mark]) or 1,1,1,2,3,3,3-

- heptafluoropropane (HFA 227EA [trade mark]), carbon dioxide, a further perfluorinated hydrocarbon such as Perflubron (trade mark) or other suitable gas. In the case of a pressurised aerosol, the dosage unit may be determined by providing a valve to deliver a metered amount. The pressurised container,
- 5 pump, spray, atomiser or nebuliser may contain a solution or suspension of the active compound, e.g. using a mixture of ethanol (optionally, aqueous ethanol) or a suitable agent for dispersing, solubilising or extending release and the propellant as the solvent, which may additionally contain a lubricant, e.g. sorbitan trioleate. Capsules, blisters and cartridges (made, for example, from
- 10 gelatin or HPMC) for use in an inhaler or insufflator may be formulated to contain a powder mix of the compound of the invention, a suitable powder base such as lactose or starch and a performance modifier such as L-leucine, mannitol or magnesium stearate.
- 15 Prior to use in a dry powder formulation or suspension formulation for inhalation the compound of the invention will be micronised to a size suitable for delivery by inhalation (typically considered as less than 5 microns). Micronisation could be achieved by a range of methods, for example spiral jet milling, fluid bed jet milling or use of supercritical fluid crystallisation.
- 20 A suitable solution formulation for use in an atomiser using electrohydrodynamics to produce a fine mist may contain from 1 µg to 10mg of the compound of the invention per actuation and the actuation volume may vary from 1 to 100 µl. A typical formulation may comprise a compound of the invention,
- 25 propylene glycol, sterile water, ethanol and sodium chloride. Alternative solvents may be used in place of propylene glycol, for example glycerol or polyethylene glycol.
- Aerosol or dry powder formulations are preferably arranged so that each metered
- 30 dose or "puff" contains from 1 to 4000 µg of a compound of the invention for delivery to the patient. The overall daily dose with an aerosol will be in the range of from 1 µg to 20mg which may be administered in a single dose or, more usually, in divided doses throughout the day.

The preferred ratio, by weight (w/w), of selective PDE4 inhibitor:adrenergic $\beta 2$ receptor agonist used will depend on the particular combination being examined. This is due to differences in the potency of individual compounds. The physician
5 in any event will determine the actual dosage of each compound which will be most suitable for any individual patient and it will vary with the age, weight and response of the particular patient.

It is to be appreciated that all references herein to treatment include curative,
10 palliative and prophylactic treatment.

Test data - Inhibition of elastase release from isolated human neutrophils

- Venous blood (90 ml) from healthy human volunteers of either sex was collected into 10ml 3.8% (w/v) sodium citrate, and 8ml aliquots were dispensed into 15ml
- 5 polypropylene centrifuge tubes each containing 4ml of 6% dextran (average Molecular Weight 148,000) in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS). The dextran/blood was mixed gently by inversion and left to stand at room temperature for 45 minutes to allow erythrocyte sedimentation. Aliquots of 16ml from the leukocyte-rich supernatant were overlaid on 10ml Ficoll-Hypaque
- 10 cushions in 50ml polypropylene centrifuge tubes and the tubes centrifuged at 400g for 35mins at 21°C. The plasma, mononuclear cell layer and Ficoll were removed leaving the granulocyte-rich pellet. The pellets were initially re-suspended in 10ml ice-cold distilled water for 45 seconds to lyse contaminating red blood cells, followed by the addition of 10ml of ice-cold double concentrated
- 15 phosphate buffered saline (PBS) solution to each tube to restore osmolarity. The suspensions were re-centrifuged at 200g for 10min at 4°C to generate neutrophil pellets. The supernatants were removed and the pellets gently resuspended in a total volume of 10ml ice-cold HBSS using a Pasteur pipette. A differential white cell count was performed on the resulting neutrophil suspension using a
- 20 Beckman Coulter Ac. T5 haematology analyser and the cells stored on ice until assay. Immediately prior to assay, aliquots of the neutrophil suspension were removed and diluted to a count of 4×10^6 neutrophils/ml ice-cold HBSS containing 2U/ml adenosine deaminase.
- 25 Inhibition of fMLP induced elastase release was performed using a 160µl assay volume in 96-well polystyrene microtiter plates. Elastase release was assayed by measuring the rate of cleavage of the synthetic substrate MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA. For measurement of elastase release, assay wells contained 8µl of 100µg/ml cytochalasin B (in 10% DMSO/90% HBSS), 8µl test compound (diluted
- 30 in HBSS), 40µl neutrophil suspension and 96µl of 156µM MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA (in HBSS). Assay plates were incubated at 37°C for 10 minutes before addition of 8µl of 2µM fMLP (in HBSS) and measurement of rate of substrate cleavage was measured at $\lambda=405\text{nm}$ for 3 minutes at 37°C. Basal elastase

34
41

release was determined by the addition of 8μl HBSS in place of fMLP. The data reproduced below in Table 1 are IC50 values, i.e. the concentration (in nM) of active agent required to achieve 50% inhibition of fMLP-induced elastase release. In the case of the combination experiments, 1000nM of 9-cyclopentyl-
5 5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-thienyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]pyridine (C) was added to the assay and a concentration response curve was then generated for formoterol (F) or salmeterol (S).

Table 1 - Inhibition of elastase release (IC50 values in nM)

10

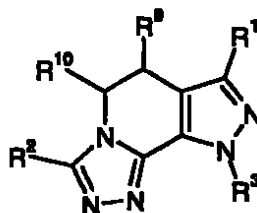
F	S	C	F+C	S+C
>1000	>1000	>1000	0.4	1.0

Combined application of a β2 agonist (formoterol or salmeterol) with a PDE4 inhibitor (9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-thienyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]pyridine) is demonstrated to produce synergistic inhibition of pro-
15 Inflammatory neutrophil function. Weak (μM) inhibition of fMLP-induced elastase release from the isolated human neutrophil was achieved by individual treatment with these pharmacological agents, and this was dramatically enhanced to highly potent (nM) inhibition by their combined application.

AD
42Claims

1. An inhaled combination of (a) a selective PDE4 inhibitor of the formula (I)

5

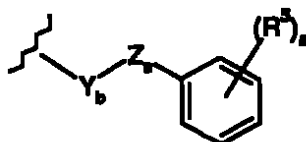


(I)

or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, wherein:

- 10 R^1 is H, (C_1-C_6) alkyl, (C_1-C_6) alkoxy, (C_2-C_4) alkenyl, phenyl, $-N(CH_3)_2$, (C_3-C_6) cycloalkyl, (C_3-C_6) cycloalkyl (C_1-C_2) alkyl or (C_1-C_6) acyl, wherein the alkyl, phenyl or alkenyl groups may be substituted with up to two $-OH$, (C_1-C_3) alkyl, or $-CF_3$ groups or up to three halogens;

- R^2 and R^3 are each independently selected from the group consisting of H,
15 (C_1-C_{14}) alkyl, (C_1-C_7) alkoxy (C_1-C_7) alkyl, (C_2-C_{14}) alkenyl, (C_3-C_7) cycloalkyl, (C_3-C_7) cycloalkyl (C_1-C_2) alkyl, a saturated or unsaturated (C_4-C_7) heterocyclic $(CH_2)_n$ group wherein n is 0, 1 or 2, containing as the heteroatom one or two of the group consisting of oxygen, sulfur, sulfonyl, nitrogen and NR^4 where R^4 is H or (C_1-C_4) alkyl; or a group of the Formula (II):



(II)

20

- wherein a is an integer from 1 to 5; b and c are 0 or 1; R^5 is H, $-OH$, (C_1-C_6) alkyl, (C_2-C_6) alkenyl, (C_1-C_6) alkoxy, (C_3-C_6) cycloalkoxy, halogen, $-CF_3$, $-CO_2R^6$, $-CONR^6R^7$, $-NR^6R^7$, $-NO_2$, or $-SO_2NR^6R^7$ wherein R^6 and R^7 are each
25 independently H, or (C_1-C_4) alkyl; Z is $-O-$, $-S-$, $-SO_2-$, $-CO-$ or $-N(R^8)-$ wherein R^8 is H or (C_1-C_4) alkyl; and Y is (C_1-C_6) alkylene or (C_2-C_6) alkenylene optionally substituted with up to two (C_1-C_7) alkyl or (C_3-C_7) cycloalkyl groups; wherein each

43

of the alkyl, alkenyl, cycloalkyl, alkoxyalkyl or heterocyclic groups may be substituted with 1 to 14, preferably 1 to 5, (C₁-C₂) alkyl, CF₃, or halo groups; and R⁹ and R¹⁰ are each independently selected from the group consisting of H, (C₁-C₆) alkyl, (C₁-C₆) alkoxy, (C₆-C₁₀) aryl and (C₆-C₁₀) aryloxy;

5

and (b) an adrenergic β 2 receptor agonist.

2. A combination as claimed in claim 1 wherein R¹ is methyl, ethyl or isopropyl.

3. A combination as claimed in claim 1 or claim 2 wherein R³ is (C₁-C₆) alkyl, (C₂-C₆) alkenyl, (C₃-C₇) cycloalkyl, (C₃-C₇)cycloalkyl(C₁-C₆)alkyl or phenyl optionally substituted with 1 or 2 of the group consisting of H, -OH, (C₁-C₆) alkyl, (C₂-C₆) alkenyl, (C₁-C₆) alkoxy, halogen, trifluoromethyl, -CO₂R⁶, -CONR⁶R⁷, -NR⁶R⁷, -NO₂ or -SO₂NR⁶R⁷ wherein R⁶ and R⁷ are each independently H or (C₁-C₄) alkyl.

4. A combination as claimed in any one of the preceding claims wherein the selective PDE4 inhibitor of the formula (I) is selected from:

9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-phenyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;

9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(furan-2-yl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;

9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-pyridyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;

9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(4-pyridyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;

9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(3-thienyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;

3-benzyl-9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;

9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-propyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;

42
44

- 3,9-dicyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(1-methylcyclohex-1-yl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 5 3-(*tert*-butyl)-9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-methylphenyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-methoxyphenyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-
10 triazolo[4,3- α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(thien-2-yl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 3-(2-chlorophenyl)-9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 15 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-iodophenyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-trifluoromethylphenyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine; and
- 5,6-dihydro-7-ethyl-9-(4-fluorophenyl)-3-(1-methylcyclohex-1-yl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine;
- 20 and the pharmaceutically acceptable salts and solvates thereof.
5. A combination as claimed in claim 4 wherein the selective PDE4 inhibitor of the formula (I) is selected from 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-thienyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine and 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(*tert*-butyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine and the
25 pharmaceutically acceptable salts and solvates thereof.
6. A combination as claimed in any one of the preceding claims wherein the adrenergic β 2 receptor agonist is selected from salmeterol, formoterol and the pharmaceutically acceptable salts and solvates thereof.
- 30 7. A combination as claimed in claim 1 wherein:

AB
45

the selective PDE4 inhibitor of the formula (I) is 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-thienyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, and the adrenergic β 2 receptor agonist is salmeterol, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof;

the selective PDE4 inhibitor of the formula (I) is 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(2-thienyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, and the adrenergic β 2 receptor agonist is formoterol, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof;

the selective PDE4 inhibitor of the formula (I) is 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(*tert*-butyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, and the adrenergic β 2 receptor agonist is salmeterol, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof; or

the selective PDE4 inhibitor of the formula (I) is 9-cyclopentyl-5,6-dihydro-7-ethyl-3-(*tert*-butyl)-9H-pyrazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]pyridine, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof, and the adrenergic β 2 receptor agonist is formoterol, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof.

8. A combination as claimed in any preceding claim for use as a medicament.

9. A combination as claimed in any one of claims 1 to 7 for simultaneous, sequential or separate administration in the treatment of an obstructive airways or other inflammatory disease.

10. A pharmaceutical composition comprising a selective PDE4 inhibitor of the formula (I), as defined in claim 1, an adrenergic β 2 receptor agonist and a pharmaceutically acceptable excipient, diluent or carrier, for administration by the inhaled route in the treatment of an obstructive airways or other inflammatory disease.

11. A pharmaceutical composition as defined in claim 10 wherein the selective PDE4 inhibitor of the formula (I) and the adrenergic β 2 receptor agonist are as defined in any one of claims 2 to 7.
12. The use of a selective PDE4 inhibitor of the formula (I), as defined in claim 5 1, or an adrenergic β 2 receptor agonist in the manufacture of a medicament for simultaneous, sequential or separate administration of both agents by the inhaled route in the treatment of an obstructive airways or other inflammatory disease.
13. The use of claim 12 wherein the selective PDE4 inhibitor of the formula (I) 10 and the adrenergic β 2 receptor agonist are as defined in any one of claims 2 to 7.
14. A method of treating of an obstructive airways or other inflammatory disease comprising administering simultaneously, sequentially or separately, by the inhaled route, to a mammal in need of such treatment, an effective amount of 15 a selective PDE4 inhibitor of the formula (I), as defined in claim 1, and an adrenergic β 2 receptor agonist.
15. A method as claimed in claim 14 wherein the selective PDE4 inhibitor of the formula (I) and the adrenergic β 2 receptor agonist are as defined in any one of claims 2 to 7.
- 20 16. An inhalation device for simultaneous, sequential or separate administration of a selective PDE4 inhibitor of the formula (I), as defined in claim 1, and an adrenergic β 2 receptor agonist in the treatment of an obstructive airways or other inflammatory disease.
- 25 17. An inhalation device as claimed in claim 16 wherein the selective PDE4 inhibitor of the formula (I) and the adrenergic β 2 receptor agonist are as defined in any one of claims 2 to 7.

O
AS
47Combinación farmacéutica

La presente invención se refiere a una combinación inhalada de un inhibidor selectivo de PDE4 y un agonista del receptor β 2-adrenérgico, a composiciones farmacéuticas, incluyendo los dispositivos para la administración, y a los usos de dicha combinación.

Una combinación de un inhibidor selectivo de PDE4 y un agonista del receptor β 2-adrenérgico es útil en el tratamiento de enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y otras enfermedades inflamatorias, en particular, de enfermedades obstructivas de las vías respiratorias, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) y otras enfermedades obstructivas de las vías respiratorias exacerbadas por reflejos bronquiales incrementados, inflamación, hiperreactividad bronquial y broncoespasmos. La combinación es especialmente útil en el tratamiento de COPD.

Ejemplos de enfermedades particulares que se pueden tratar con la presente invención incluyen las enfermedades respiratorias, asma, síndrome de dificultad respiratoria aguda, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, bronquitis, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar (vías respiratorias) obstructiva crónica y silicosis y enfermedades del sistema inmune tales como rinitis alérgica y sinusitis crónica.

Las fosfodiesterasas de los nucleótidos 3',5'-cíclicos (PDE) comprenden una amplia clase de enzimas divididas en al menos once familias diferentes que son estructural, bioquímica y farmacológicamente diferentes entre sí. Las enzimas de cada familia se denominan normalmente isoenzimas o isozimas. En esta clase se incluyen un total de más de quince productos génicos y se produce una diversidad adicional por corte y empalme diferencial y procesamiento postraduccion de dichos productos génicos. La presente invención se refiere principalmente a los cuatro productos génicos de la cuarta familia de PDE, es decir, PDE4A, PDE4B, PDE4C y PDE4D. Estas enzimas se denominan

46
48

conjuntamente isoformas o subtipos de la familia de isoenzimas PDE (PDE4).

Las PDE4 se caracterizan por una degradación selectiva, hidrolítica de alta afinidad del nucleótido cíclico como segundo mensajero, el nucleótido cíclico 3',5'-monofosfato de adenosina (AMPC) y por la sensibilidad a la inhibición por rolipram. En los últimos años se han descubierto una serie de inhibidores selectivos de PDE4 y se han demostrado en una diversidad de modelos de enfermedad los efectos beneficiosos y farmacológicos resultantes de dicha inhibición: véase, por ejemplo, Torphy et al. *Environ. Health Perspect.*, 102 Suppl. 10, 79-84, 1994; Duplantier et al., *J. Med. Chem.* 39 120-125, 1996; Schneider et al., *Pharmacol. Biochem. Behav.* 50 211-217, 1995; Banner and Page, *Br. J. Pharmacol.* 114 93-98, 1995; Barnette et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273 674-679, 1995; Wright et al. "Differential in vivo and in vitro bronchorelaxant activities of CP-80633, a selective phosphodiesterase 4 inhibitor," *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75 1001-1008, 1997; Manabe et al. "Anti-inflammatory and bronchodilator properties of KF19514, a phosphodiesterase 4 and 1 inhibitor", *Eur. J. Pharmacol.* 332 97-107, 1997; y Ukita et al. "Novel, potent, and selective phosphodiesterase-4 inhibitors as antiasthmatic agents: synthesis and biological activities of a series of 1-pyridylnaphthalene derivatives", *J. Med. Chem.* 42 1088-1088, 1999.

Los receptores β -adrenérgicos están presentes en el sistema nervioso simpático. Existen al menos dos tipos. Los receptores β 1-adrenérgicos se encuentran en el corazón y desempeñan una función importante en la regulación de la frecuencia cardíaca mediante la acción de los agonistas epinefrina y norepinefrina. Los receptores β 2-adrenérgicos están presentes en una serie de tipos de células en el pulmón (por ejemplo, células del músculo liso de las vías respiratorias, células epiteliales y una diversidad de células inflamatorias) y los agonistas del receptor β 2-

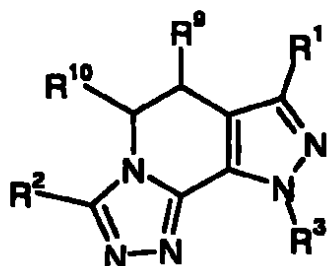
A1
49

adrenérgico son eficaces broncodilatadores, provocando la relajación del músculo liso de las vías respiratorias. Las aminas simpaticomiméticas tienen una larga historia de uso en el tratamiento de enfermedades crónicas de las vías respiratorias caracterizadas por un estrechamiento parcialmente reversible de las vías respiratorias tales como COPD y asma y se usaron inicialmente como broncodilatadores en forma de epinefrina intravenosa. Posteriormente, se usaron agentes β -adrenérgicos inhalados tales como isoprenalina que eran relativamente no selectivos por los receptores β_2 sobre los β_1 y por ello provocaban taquicardia en dosis broncodilatadoras eficaces. Más recientemente, se han usado agentes β -adrenérgicos inhalados como salbutamol que tienen más selectividad por el receptor β_2 pero con una acción corta. Los agentes β -adrenérgicos inhalados formoterol, N-[2-hidroxi-5-(1-hidroxi-2-((2-(4-metoxifenil)-1-metiletil)amino)-etil)-fenil]formamida y salmeterol son ambos selectivos por el receptor β_2 y de acción prolongada.

Se ha descubierto ahora de forma sorprendente que una combinación de inhibidores selectivos de PDE4 particulares y agonistas del receptor β_2 -adrenérgico ofrecen beneficios significativos en el tratamiento de enfermedades obstructivas de las vías respiratorias y otras enfermedades inflamatorias con respecto al tratamiento con el agente solo o con respecto a otras combinaciones conocidas. La ventaja de la combinación es proporcionar un control óptimo del calibre de las vías respiratorias mediante el mecanismo más apropiado a la patología de la enfermedad, a saber, agonismo del receptor β_2 -adrenérgico, junto con la supresión efectiva de la inflamación inapropiada. De este modo, se controlan los síntomas de la enfermedad corrigiendo los reflejos neurales de las vías respiratorias inapropiados que conducen a tos, producción de mocos y disnea. Administrando una combinación de un agonista del receptor β_2 -adrenérgico y un inhibidor selectivo de PDE4

por vía inhalada se consiguen los beneficios de cada clase sin los efectos periféricos indeseados. Además, las combinaciones particulares de la presente invención tienen como resultado una sinergia inesperada, produciendo una mayor eficacia que las dosis toleradas máximas de cualquiera de las clases de agentes usados solos.

La invención proporciona por tanto una combinación inhalada de (a) un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula:



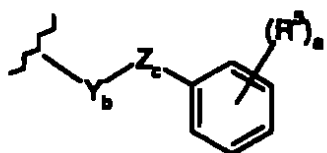
(I)

10

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que

R¹ es H, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, alquenilo C₂-C₄, fenilo, -N(CH₃)₂, cicloalquilo C₃-C₆, (cicloalquil C₃-C₆) (alquilo C₁-C₃) o acilo C₁-C₆, pudiendo estar los grupos alquilo, fenilo o alquenilo sustituidos con hasta dos grupos -OH, alquilo C₁-C₃ o -CF₃ o con hasta tres halógenos;

cada uno de R² y R³ se selecciona independientemente del grupo formado por H, alquilo C₁-C₁₄, (alcoxi C₁-C₇) (alquilo C₁-C₇), alquenilo C₂-C₁₄, cicloalquilo C₃-C₇, (cicloalquil C₃-C₇) (alquilo C₁-C₂), un grupo (heterocíclico C₄-C₇) (CH₂)_n saturado o insaturado en el que n es 0, 1 ó 2, que contiene como heteroátomo uno o más del grupo formado por oxígeno, azufre, sulfonilo, nitrógeno y NRⁱ, siendo Rⁱ H o alquilo C₁-C₄; o un grupo de Fórmula (II):



(II)

en la que a es un número entero de 1 a 5; b y c son 0 ó 1; R⁵ es H, -OH, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alcoxi C₁-C₅, cicloalcoxi C₃-C₆, halógeno, -CF₃, -CO₂R⁶, -CONR⁶R⁷, -NR⁶R⁷, -NO₂ o -SO₂NR⁶R⁷, siendo cada uno de R⁵ y R⁷ 5 independientemente H o alquilo C₁-C₄; Z es -O-, -S-, -SO₂-, -CO- o -N(R⁸)-, siendo R⁸ H o alquilo C₁-C₄; e Y es alquilenilo C₁-C₅ o alquenilenilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido con hasta dos grupos alquilo C₁-C₇ o cicloalquilo C₃-C₇; pudiendo estar cada uno de los grupos alquilo, alquenilo, 10 cicloalquilo, alcoxi alquilo o heterocíclico sustituidos con 1 a 14, preferiblemente 1 a 5 grupos alquilo C₁-C₂, CF₃ o halo; y

cada uno de R⁹ y R¹⁰ se selecciona independientemente del grupo formado por H, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, arilo 15 C₆-C₁₀ y ariloxi C₆-C₁₀;

y (b) un agonista del receptor β2-adrenérgico.

Además, la invención proporciona una combinación inhalada de un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I), como la definida antes, y un agonista del receptor β2- 20 adrenérgico, para usar como medicamento.

Además, la invención proporciona una combinación inhalada de un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I), como la definida antes, y un agonista del receptor β2- adrenérgico, para la administración simultánea, secuencial 25 o por separado en el tratamiento de una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias u otra enfermedad inflamatoria.

Además, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un inhibidor selectivo de PDE4 30 de fórmula (I), como la definida antes, un agonista del receptor β2-adrenérgico y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, para la administración por vía inhalada en el tratamiento de una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias u otra 35 enfermedad inflamatoria.

Además, la invención proporciona el uso de un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I), como la

52

definida antes, o un agonista del receptor $\beta 2$ -adrenérgico, en la fabricación de un medicamento para la administración simultánea, secuencial o por separado de ambos agentes por vía inhalada en el tratamiento de una enfermedad obstruictiva de las vías respiratorias u otra enfermedad inflamatoria.

Además, la invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad obstruictiva de las vías respiratorias u otra enfermedad inflamatoria que comprende administrar, de forma simultánea, secuencial o por separado, por vía inhalada, a un mamífero que necesite dicho tratamiento, una cantidad eficaz de un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I), como la definida antes, y un agonista del receptor $\beta 2$ -adrenérgico.

Además, la invención proporciona un dispositivo de inhalación para la administración simultánea, secuencial o por separado, de un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I), como la definida antes, y un agonista del receptor $\beta 2$ -adrenérgico, en el tratamiento de una enfermedad obstruictiva de las vías respiratorias u otra enfermedad inflamatoria.

Un inhibidor selectivo de PDE4 es aquel que posee una afinidad mayor por la isoenzima PDE4 que por el resto de isoenzimas PDE conocidas. Con preferencia, la afinidad de un inhibidor selectivo de PDE4 conforme a la invención es al menos 100 veces mayor por la isoenzima PDE4 cuando se compara con su afinidad por las otras isoenzimas PDE.

Los compuestos preferidos de fórmula (I) incluyen aquellos en los que R^1 es metilo, etilo o isopropilo y aquellos en los que R^3 es alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_6 , cicloalquilo C_3-C_7 , (cicloalquil C_3-C_7) (alquilo C_1-C_6) o fenilo opcionalmente sustituidos con 1 ó 2 del grupo formado por H, -OH, alquilo C_1-C_5 , alqueno C_2-C_5 , alcoxi C_1-C_5 , halógeno, trifluorometilo, $-CO_2R^6$, $-CONR^6R^7$, $-NR^6R^7$, $-NO_2$ o $-SO_2NR^6R^7$, siendo cada uno de R^6 y R^7 independientemente H o alquilo C_1-C_4 .

Los compuestos preferidos individuales de fórmula (I)

incluyen:

- 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-fenil-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 5 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(furan-2-il)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-piridil)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(4-piridil)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 10 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(3-tienil)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 3-Bencil-9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-propil-9H-
15 pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 3,9-Diciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-9H-pirazolo[3,4-
c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(1-metilciclohex-1-
il)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 20 3-(Terc-butil)-9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-metilfenil)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-metoxifenil)-9H-
25 pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(tien-2-il)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 3-(2-Clorofenil)-9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 30 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-yodofenil)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;
- 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-
trifluorometilfenil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-
 α]piridina; y
- 35 5,6-Dihidro-7-etil-9-(4-fluorofenil)-3-(1-
metilciclohex-1-il)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-

52-54

α]piridina;

y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

Los compuestos particularmente preferidos de fórmula (I) incluyen 9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-tienil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina y 9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(terc-butil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

La síntesis de los compuestos de fórmula (I) se describe en el documento WO-A-96/39408.

Con preferencia, un agonista del receptor β 2-adrenérgico usado en una combinación conforme a la invención es un agonista del receptor β 2-adrenérgico selectivo, es decir, tiene una mayor afinidad por el receptor β 2-adrenérgico que por los otros receptores β -adrenérgicos conocidos. Con preferencia, la afinidad de dichos agonistas del receptor β 2-adrenérgico selectivos es al menos 100 veces mayor por el receptor β 2-adrenérgico cuando se compara con su afinidad por los otros receptores β adrenérgicos.

Los agonistas preferidos del receptor β 2-adrenérgico para usar en la invención incluyen salmeterol, formoterol y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

Combinaciones particularmente preferidas incluyen:

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-tienil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables y salmeterol, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-tienil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables y formoterol, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(terc-butil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina, o una de

sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables y salmeterol, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables; y

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(terc-butil)-9H-
5 pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables y formoterol, o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

Opcionalmente, se puede utilizar un inhibidor
10 selectivo de PDE4 o un agonista del receptor β 2-adrenérgico usado conforme a la invención en forma de una sal o solvato farmacéuticamente aceptable. Dicha sal puede ser una sal de adición de ácidos o de bases.

Las sales de adición de ácidos adecuadas se forman de
15 ácidos que forman sales no tóxicas y ejemplos de los cuales son las sales hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, bisulfato, nitrato, fosfato, fosfato ácido, acetato, maleato, fumarato, lactato, tartrato, citrato, gluconato, succinato, sacarato, benzoato, metanosulfonato,
20 etanosulfonato, bencenosulfonato, *p*-toluenosulfonato y pamoato.

Las sales de bases adecuadas se forman de bases que forman sales no tóxicas y son ejemplos las sales de sodio, potasio, aluminio, calcio, magnesio, cinc y dietanolamina.

25 Puede encontrarse una revisión de sales adecuadas en Berge et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19, 1977.

Los solvatos farmacéuticamente aceptables de los inhibidores selectivos de PDE4 y los agonistas del receptor β 2-adrenérgico usados conforme a la invención, o sus sales,
30 incluyen sus hidratos.

Los inhibidores selectivos de PDE4 y los agonistas del receptor β 2-adrenérgico de la invención pueden existir en una o más formas polimórficas.

Los inhibidores selectivos de PDE4 y los agonistas del
35 receptor β 2-adrenérgico de la invención (en lo sucesivo "compuestos de la invención") pueden contener uno o más átomos de carbono asimétricos y, por tanto, existir en dos

o más formas estereoisoméricas (por ejemplo, una realización preferida es R,R'-formoterol). Cuando tales agonistas contengan un grupo alquenilo o alquenileno, puede presentarse también isomería cis/trans (o Z/E). La presente
5 invención incluye estos estereoisómeros individuales de los compuestos de la invención y, cuando sea apropiado, las formas tautómeras individuales de los mismos, junto con sus mezclas.

La separación de diastereoisómeros o isómeros cis y
10 trans puede conseguirse por técnicas convencionales, por ejemplo, por cristalización fraccionada, cromatografía o HPLC de una mezcla de estereoisómeros de un compuesto de la invención o de una de sus sales o derivados adecuados. También se puede preparar un enantiómero individual de un
15 compuesto de la invención a partir del intermedio ópticamente puro correspondiente o por resolución, tal como por HPLC del racemato correspondiente usando un soporte quiral adecuado o por cristalización fraccionada de las sales diastereoisoméricas formadas por reacción del
20 racemato correspondiente con un ácido o base ópticamente activo adecuado, según sea lo más apropiado.

La presente invención también incluye todas las variaciones isotópicas adecuadas de un compuesto de la invención o de una de sus sales farmacéuticamente
25 aceptables. Se define una variación isotópica de un compuesto de la invención o de una de sus sales farmacéuticamente aceptables como aquella en la que al menos un átomo está reemplazado por un átomo que tiene el mismo número atómico pero una masa atómica diferente de la
30 masa atómica encontrada normalmente en la naturaleza. Ejemplos de isótopos que pueden incorporarse en compuestos de la invención y en sus sales farmacéuticamente aceptables incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor y cloro tales como ^2H , ^3H ,
35 ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F y ^{36}Cl , respectivamente. Ciertas variaciones isotópicas de los compuestos de la invención y de sus sales farmacéuticamente

aceptables, por ejemplo, aquellas en las que se incorpora un isótopo radiactivo tal como ^3H o ^{14}C , son útiles en estudios de distribución en los tejidos de fármacos y/o sustratos. Los isótopos tritio, es decir, ^3H , y carbono 14, es decir, ^{14}C , son particularmente preferidos por su facilidad de preparación y de detección. Además, la sustitución con isótopos como el deuterio, es decir, ^2H , puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas originadas por la mayor estabilidad metabólica, por ejemplo, una mayor semivida *in vivo* o menores requerimientos de dosificación y, por tanto, pueden ser preferidos en algunas circunstancias.

Los tipos de enfermedades que se pueden tratar usando las combinaciones de la presente invención incluyen, aunque no quedan limitadas a las mismas, asma, broncoconstricción crónica o aguda, bronquitis crónica, obstrucción de las vías respiratorias menores, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), COPD con bronquitis crónica, enfisema pulmonar o disnea asociada con el mismo y COPD que se caracterice por obstrucción irreversible y progresiva de las vías respiratorias.

Asma

Una de las enfermedades respiratorias más importantes que puede tratarse con las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención es asma, un trastorno crónico, cada vez más común, presente en todo el mundo y caracterizado por obstrucción reversible intermitente de las vías respiratorias, hipersensibilidad de las vías respiratorias e inflamación. La causa del asma no se ha determinado todavía, pero la expresión patológica más común del asma es la inflamación de las vías respiratorias, la cual puede ser significativa, incluso en las vías respiratorias de pacientes con asma leve. Esta inflamación conduce a sucesos reflejos en las vías respiratorias que producen la extravasación de proteínas plasmáticas, disnea y broncoconstricción. Tomando como base estudios de biopsias y lavados bronquiales se ha demostrado

5658

inequívocamente que el asma implica la infiltración por células cebadas, eosinófilos y linfocitos T en las vías respiratorias del paciente. El lavado broncoalveolar (BAL) en asmáticos atópicos muestra la activación de
5 interleuquina (IL)-3, IL-4, IL-5 y el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) que sugiere la presencia de una población de linfocitos T como los linfocitos T auxiliares 2 (Th-2).

Las combinaciones de agentes terapéuticos de la
10 presente invención son útiles en el tratamiento de asma atópica y no atópica. El término "atopia" se refiere a la predisposición genética hacia el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad tipo I (inmediatas) contra los antígenos del entorno comunes. La manifestación clínica más
15 corriente es rinitis alérgica, aunque se producen con menos frecuencia asma bronquial, dermatitis atópica y alergia a alimentos. Por consiguiente, la expresión "asma atópica" tal y como se usa en la presente memoria, se pretende que sea sinónimo de "asma alérgica", es decir, asma bronquial
20 que es una manifestación alérgica en una persona sensibilizada. La expresión "asma no atópica" tal y como se usa en la presente memoria se pretende que se refiera al resto de asmas, especialmente asma esencial o "verdadera", que está provocada por una diversidad de factores,
25 incluyendo ejercicio intenso, partículas irritantes, estrés psicológico y factores similares.

Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (COPD)

Las combinaciones de agentes terapéuticos de la
30 presente invención son además útiles en el tratamiento de COPD o COAD, incluyendo bronquitis crónica, enfisema pulmonar o disnea asociada con los mismos. La COPD se caracteriza por una obstrucción poco reversible y progresiva de las vías respiratorias. La bronquitis crónica
35 se asocia con hiperplasia e hipertrofia de las glándulas que segregan moco de la submucosa en las vías respiratorias cartilaginosas grandes. La hiperplasia de células de

Goblet, infiltración de células inflamatorias en la mucosa y submucosa, edema, fibrosis, tapones de moco y músculo liso agrandado se encuentran todas en los bronquiolos terminales y respiratorios. Se sabe que las pequeñas vías respiratorias son el principal sitio de obstrucción de las vías respiratorias. El enfisema se caracteriza por destrucción de la pared alveolar y pérdida de elasticidad del pulmón. También se han identificado una serie de factores de riesgo asociados con la incidencia de COPD. Está bien establecida la asociación entre tabaco y COPD. Otros factores de riesgo incluyen exposición a polvo de carbón y diversos factores genéticos. Véase Sandford et al., "Genetic risk factors for chronic obstructive pulmonary disease", *Eur. Respir. J.*, 10 1380-1391, 1997. La incidencia de COPD va en aumento y representa una carga económica significativa en las poblaciones de países industrializados. La COPD también se presenta en sí misma clínicamente con un amplio margen de variación desde la bronquitis crónica simple sin incapacidad hasta pacientes en un estado gravemente incapacitado con insuficiencia respiratoria crónica.

La COPD se caracteriza por inflamación de las vías respiratorias, como es el caso del asma, pero las células inflamatorias que se han encontrado en el líquido de lavados broncoalveolares y en esputos de pacientes son neutrófilos y macrófagos en lugar de eosinófilos. También se han encontrado elevados niveles de mediadores inflamatorios en pacientes con COPD, incluyendo IL-8, LTB₄ y TNF- α , y se ha encontrado que el epitelio y el subepitelio superficial de los bronquios de tales pacientes tienen infiltraciones de linfocitos T y macrófagos. El alivio sintomático para pacientes con COPD puede proporcionarse usando broncodilatadores de agonistas β y broncodilatadores anticolinérgicos, pero el progreso de la enfermedad permanece inalterado. Se ha tratado COPD usando teofilina, pero sin demasiado éxito, debido en parte a su propensión a producir efectos indeseados. También han

fallado los esteroides en mantenerse como agentes prometedores para el tratamiento satisfactorio en COPD ya que son relativamente ineficaces como agentes antiinflamatorios.

5 Por consiguiente, el uso de combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención para tratar COPD y sus enfermedades de las vías respiratorias obstruidas relacionadas e incluidas representa un avance significativo en la técnica. La presente invención no está limitada a
10 ningún modo de acción particular o a ninguna hipótesis en cuanto a la forma en que se han obtenido los objetivos terapéuticos deseados utilizando las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención.

15 **Bronquitis y bronquiectasias**

Conforme a las actividades inhibidoras particulares y diversas descritas antes que poseen las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención, éstas son útiles en el tratamiento de bronquitis de cualquier tipo,
20 etiología o patogénesis, incluyendo, por ejemplo, bronquitis aguda que tiene un curso corto pero severo y está causada por exposición al frío, respirar sustancias irritantes o por una infección aguda; bronquitis catarral que es una forma de bronquitis aguda con una descarga
25 mucopurulenta profusa; bronquitis crónica que es una forma continuada a largo plazo de bronquitis con una tenencia más o menos acentuada a recurrencia después de etapas de inactividad, debida a ataques repetidos de bronquitis aguda o enfermedades generales crónicas, caracterizada por
30 ataques de tos, por expectoración ya sea ligera o profusa y por cambios secundarios en el tejido pulmonar; bronquitis seca que está caracterizada por secreción ligera de esputos con tos; bronquitis asmática infecciosa que es un síndrome marcado por el desarrollo de síntomas de broncoespasmo
35 seguido de infecciones del tracto respiratorio en personas con asma; bronquitis productiva que es bronquitis asociada con una tos productiva.

SA
61

El uso de combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención para tratar asma atópica o asma no atópica, COPD u otra enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias se puede demostrar por el uso de una
5 serie de modelos diferentes conocidos en la técnica que incluyen los modelos descritos a continuación.

Actividad broncodilatadora - El AMPc no solo está implicado en la relajación del músculo liso, sino también ejerce una influencia inhibidora general sobre la
10 proliferación del músculo liso de las vías respiratorias, los cuales se pueden producir ambos por la elevación del AMPc por el componente de PDE4 de la invención. La hipertrofia e hiperplasia del músculo liso de las vías respiratorias se pueden modular por el AMPc y estos estados
15 son características morfológicas comunes del asma crónica.

Actividad broncoespasmolítica in vitro - En el siguiente procedimiento de ensayo se demuestra la capacidad de las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente
20 invención para provocar la relajación del músculo liso de la tráquea de cobayos. Se sacrifican cobayos (350 a 500 g) con pentotal sódico (100 mg/kg i.p.). Se disecciona la tráquea y se separa una sección de 2 a 3 cm de longitud. Se corta transversalmente la tráquea en el plano transversal
25 en placas de cartílago alternadas para proporcionar anillos de tejido de 3 a 5 mm de profundidad. Se descartan los anillos distal y proximal. Los anillos individuales se montan verticalmente en soportes de acero inoxidable, uno de los cuales se fija en la base de un baño de órganos,
30 mientras que el otro se fija a un transductor isométrico. Los anillos se introducen en solución de Krebs (composición μM : NaHCO_3 25; NaCl 113; KCl 4,7; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; CaCl_2 2,5; glucosa 11,7) a 37°C y se gasifican con O_2/CO_2 (95:5 v/v). Los anillos preparados de esta forma se
35 contraen por estimulación de campo. Para determinar la actividad espasmolítica, se disuelven combinaciones de ensayo de agentes terapéuticos de la presente invención en

solución salina fisiológica y se añaden en cantidades crecientes al baño de órganos en intervalos de 5 minutos para proporcionar una curva concentración - efecto acumulativa.

- 5 En el modelo de ensayo anterior, las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención inhiben por lo general la contracción estimulada por campo de las preparaciones de anillos de tráquea de cobayos en concentraciones en el intervalo de 0,001 a 1,0 μ M.

10

Modelo de hiperreactividad bronquial inducido por ozono -

- Se demuestra la capacidad de combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención para prevenir la mayor sensibilidad de las vías respiratorias a estímulos nocivos, también conocida como hiperreactividad bronquial, determinando los efectos de estos agentes sobre la actividad de la sensibilidad pulmonar en cobayos. Se tratan con anticipación cobayos adultos (300 a 600 g) y se preparan conforme al procedimiento de Yeadon et al., 1992, Pulm. Pharmacology, 5, 101-112. Se controla la sensibilidad de las vías respiratorias a una serie de estímulos en estado basal y después de diversas intervenciones que producen cambios en los mecanismos pulmonares. Los artículos de ensayo se administraron i.t. o por aerosol en diversos tiempos antes de la estimulación provocada. El tratamiento previo con ozono en animales control produjo un aumento de 3 a 100 veces en la sensibilidad pulmonar, el cual fue bloqueado de forma relacionada a la dosis por las combinaciones de agentes terapéuticos de la invención.

- 30 En el modelo de ensayo anterior, las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención mostraron por lo general actividad antiinflamatoria en dosis en el intervalo de 0,001 a 0,3 mg/kg i.t.

- 35 **Relajación de bronquios humanos** - Se obtienen muestras de pulmones humanos diseccionadas durante cirugía para el cáncer dentro de los tres días siguientes a su extirpación.

Se separan los bronquios pequeños (diámetro interno aproximadamente 2 a 5 mm), se cortan en segmentos y se colocan en ampollas de almacenamiento de nitrógeno líquido de 2 ml llenas con suero bovino fetal (FCS) que contiene
5 dimetil sulfoxido 1,8M (DMSO) y sacarosa 0,1M como agentes crioprotectores. Las ampollas se colocan en una caja de poliestireno (11 x 11 x 12 cm) y se congelan lentamente a una velocidad media de enfriamiento de aproximadamente 0,6°C/minuto en un congelador mantenido a -70°C. Después de
10 3 a 15 horas, se transfieren las ampollas a nitrógeno líquido (-196°C) en el que se almacenan hasta su uso. Antes de usar, se exponen los tejidos durante 30 a 60 minutos a -70°C antes de descongelarse en 2,5 minutos colocando las ampollas en un baño de agua a 37°C. A continuación, se
15 aclaran los segmentos bronquiales colocándolos en una placa que contenía solución de Krebs-Henseleit (μ M: NaCl 118; KCl 4,7; $MgSO_4$ 1,2; $CaCl_2$ 1,2; KH_2PO_4 1,2, $NaHCO_3$ 25, glucosa 11, EDTA 0,03) a 37°C, se cortan en anillos y se suspenden en baños de órganos de 10 ml para el registro de la tensión
20 isométrica bajo una carga predeterminada de aproximadamente 1 g. Se inducen aumentos posteriores de tensión mediante la aplicación de estimulación de campo, que se conoce por inducir la activación de nervios en la muestra de las vías respiratorias y generar tensión mediante la liberación de
25 acetilcolina y otros mediadores neuralmente derivados. Las curvas de concentración-respuesta se producen mediante adiciones acumuladas, añadiéndose cada concentración cuando se ha producido el máximo efecto por la concentración previa. Se añade papaverina (300 μ M) al finalizar la curva
30 de concentración-respuesta para inducir la relajación completa de los anillos bronquiales. Este efecto se toma como relajación del 100%.

En el modelo de ensayo anterior, las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención producen por
35 lo general la relajación relacionada con la concentración de preparaciones de anillos de bronquios humanos en concentraciones en el intervalo de 0,001 a 1,0 μ M, siendo

las realizaciones preferidas activas en concentraciones en el intervalo de 5,0 nM a 500 nM.

Supresión de la broncoconstricción inducida por capsaicina

5 - Se anestesian con fenobarbital sódico (100 mg/kg intraperitonealmente) cobayos macho Dunkin-Hartley (400 a 800 g) con acceso libre a comida y agua antes del experimento. Los animales, mantenidos a 37°C con un lecho calefactado, controlado por un termómetro rectal, se
10 ventilan mediante una cánula en la tráquea (aproximadamente 8 ml/kg, 1Hz) con una mezcla de aire y oxígeno (45:55 v/v). La ventilación se controla en la tráquea por un neumotacógrafo conectado a un transductor de presión diferencial en línea con la bomba respiratoria. Los cambios
15 de presión en el tórax se controlan directamente a través de una cánula intratorácica, usando un transductor de presión diferencial de modo que se puede medir y registrar la diferencia de presión entre la tráquea y el tórax. A partir de estas medidas de flujo de aire y presión
20 transpulmonar, se calculan la resistencia de las vías respiratorias (R_1 cm H₂O/l/s) y la compliancia (Cd_{dyn}) con un analizador respiratorio electrónico digital para cada ciclo respiratorio. Se registran la tensión arterial y la frecuencia cardíaca de la arteria carótida usando un
25 transductor de presión.

Cuando los valores basales para la resistencia y la compliancia son estables, se induce un episodio agudo de broncoconstricción mediante una inyección intravenosa de gran tamaño de capsaicina. La capsaicina se disuelve en
30 etanol al 100% y se diluye con solución salina tamponada con fosfato. Las combinaciones de ensayo de los agentes terapéuticos de la presente invención se administran cuando la respuesta a la capsaicina es estable, lo que se calcula después de 2 a 3 de tales administraciones a intervalos de
35 10 minutos. La reversión de la broncoconstricción se valora durante 1 a 8 horas después de la instilación intratraqueal o intraduodenal o la inyección intravenosa de gran tamaño.

La actividad broncoespasmolítica se expresa como el % de inhibición de la resistencia máxima inicial (R_D) después de la infusión de capsaicina. Los valores de ED_{50} representan la dosis que causa una reducción del 50% del aumento en la
5 resistencia inducida por capsaicina. La duración de la acción se define como el tiempo en minutos en el que se reduce la broncoconstricción en un 50% o más. Los efectos sobre la tensión arterial (BP) y frecuencia cardíaca (HR) se caracterizan por los valores de ED_{20} , es decir, las
10 dosis que reducen la BP o HR en un 20%, medidas 5 minutos después de la administración.

En el modelo de ensayo anterior, las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención presentan por lo general actividad broncodilatadora en dosis en el
15 intervalo de 0,001 a 0,1 mg/kg i.t. [intratraquealmente]. Además, la combinación administrada i.t. presenta al menos un efecto inhibidor aditivo sobre los broncoespasmos, siendo capaz cada componente solo de inhibir más del 50% de la respuesta de control observada.

20

Neutrofilia pulmonar inducida por LPS - El reclutamiento y activación de neutrófilos en los pulmones se considera una característica patológica importante en la COPD y en el asma severa. Por consiguiente, la inhibición de cualquiera
25 de estas dos consecuencias o ambas en animales proporciona una evidencia que apoya la utilidad de la presente invención.

Se tratan con antelación con los artículos de ensayo solos o combinados por inhalación o instilación
30 intratraqueal (i.t.) bajo anestesia general ratas macho Wistar-Albino (150 a 250 g) o cobayos macho Dunkin-Hartley (400 a 600 g). Después de 1 a 24 horas tras la administración del compuesto, los animales se estimulan de forma provocada con un aerosol por inhalación de
35 lipopolisacárido bacteriano (LPS) suficiente para inducir durante las siguientes 1 a 24 horas una pronunciada neutrofilia pulmonar. La neutrofilia se valora por recuento

celular en lavados bronquiales o por determinación de productos neutrófilos en lavados pulmonares o en tejido. En este sistema de ensayo, los agentes terapéuticos de la presente invención presentan por lo general una actividad antiinflamatoria en dosis que varían de 0,0001 a 0,1 mg/kg i.t. De forma inesperada, la combinación administrada i.t. ejerce al menos un efecto aditivo sobre la inflamación, a pesar del hecho de que uno de los componentes no ejerce por sí mismo un efecto antiinflamatorio significativo. Además, se pueden observar efectos antiinflamatorios equivalentes de una dosis elevada de uno de los componentes con dosis menores cuando se usan en combinación como en esta invención, minimizando así los efectos sistémicos indeseados.

15

Ensayo en cobayos alérgicos - Un ensayo para evaluar el impacto terapéutico de las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención sobre el síntoma de disnea y broncoespasmos, es decir, respiración costosa o dificultad respiratoria y mayor resistencia pulmonar y sobre el síntoma de inflamación, es decir: neutrofilia y eosinofilia pulmonar, utiliza cobayos Dunkin-Hartley (400 a 600 g de peso corporal).

La albúmina de huevo (EA), calidad V, cristalizada y liofilizada, hidróxido de aluminio y maleato de mepiramina usados en este ensayo están disponibles de forma comercial. La estimulación provocada y posteriores lecturas respiratorias se llevan a cabo en una caja de plástico transparente con unas dimensiones internas de 25,4 x 15,24 x 10,16 cm. Las secciones de cabeza y cuerpo de la caja pueden separarse. En uso, las dos se sujetan firmemente mediante pinzas y se mantiene un cierre hermético al aire entre las cámaras por medio de una junta blanda de caucho. Por el centro del extremo de la cabeza de la cámara se inserta un nebulizador a través de un cierre hermético al aire y cada extremo de la caja tiene también una salida. Se inserta un neumotacógrafo en un extremo de la caja y se

acopla a un transductor de presión volumétrica que se conecta a su vez a un dinógrafo mediante los adaptadores apropiados. Mientras el antígeno se aplica en forma de aerosol, las salidas están abiertas y el neumotacógrafo está aislado de la cámara. Las salidas se cierran entonces y se conectan el neumotacógrafo y la cámara durante el registro de los patrones respiratorios. Para la estimulación provocada, se colocan 2 ml de una solución al 3% de antígeno en solución salina en cada nebulizador y se genera el aerosol con aire desde una pequeña bomba de diafragma que funciona a 68,96 kPa y un caudal de 8 l/min.

Los cobayos se sensibilizan inyectando por vía subcutánea e intraperitoneal 1 ml de una suspensión que contiene 1 mg de EA y 200 mg de hidróxido de aluminio en solución salina. Se usan entre los días 12 y 24 después de la sensibilización. Con el fin de eliminar el componente histamínico de la respuesta, se tratan previamente los cobayos intraperitonealmente, 30 minutos antes de la estimulación provocada con aerosol, con 2 mg/g de mepiarmina. Los cobayos se exponen entonces a un aerosol de EA al 3% en solución salina exactamente durante 1 minuto y luego se registran los perfiles respiratorios durante otros 30 minutos. A continuación, se determina la inflamación pulmonar después de la muerte durante un período de 1 a 48 horas. La duración de la disnea continua se mide a partir de las medidas respiratorias.

Las combinaciones de ensayo de agentes terapéuticos de la presente invención se administran por lo general i.t. o por aerosol de 0,5 a 4 horas antes de la estimulación provocada. Las combinaciones de compuestos están disueltas en solución salina o en disolventes biocompatibles. La actividad de los compuestos se determina en base a su capacidad para reducir la magnitud y duración de los síntomas de disnea y broncoespasmos y/o la magnitud de la inflamación pulmonar en comparación con un grupo control tratado con vehículo. Los ensayos de las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención se evalúan

sobre una serie de dosis y se obtiene una ED₅₀ que se define como la dosis (mg/kg) que inhibirá la duración de los síntomas en un 50%.

- 5 Actividad antiinflamatoria - La actividad antiinflamatoria de las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención se demuestra por la inhibición de la activación de eosinófilos y neutrófilos. En este ensayo se obtienen muestras de sangre (50 ml) de voluntarios no atópicos con
10 números de eosinófilos que varían de 0,06 a 0,47 x 10⁹ l⁻¹. Se recoge la sangre venosa en tubos de centrifuga que contienen 5 ml de citrato trisódico (3,8%, pH 7,4).

La sangre anticoagulada se diluye (1:1, v:v) con solución salina tamponada con fosfato (PBS, que no contiene
15 calcio ni magnesio) y se estratifica sobre 15 ml de Percoll isotónico (densidad 1,082 - 1,085 g/ml, pH 7,4) en un tubo de centrifuga de 50 ml. Después de centrifugar (30 minutos, 1000 x g, 20°C) se aspiran cuidadosamente y se descartan las células mononucleares en la interfase plasma/Percoll.

- 20 El sedimento de neutrófilos/eosinófilos/eritrocitos (aproximadamente 5 ml en volumen) se resuspende suavemente en 35 ml de solución de cloruro amónico isotónico (NH₄Cl, 155 mM; KHCO₃, 10 mM; EDTA, 0,1 mM; 0-4°C). Después de 15 minutos, se lavan las células dos veces (10 min, 400 x g,
25 4°C) en PBS que contenía suero bovino fetal (2%, FCS).

Para separar los eosinófilos y neutrófilos se usa un sistema de separación magnético. Este sistema puede separar las células en suspensión conforme a marcadores de superficie y comprende un imán permanente en el que se
30 coloca una columna que incluye una matriz de acero magnetizable. Antes de usar, se equilibra la columna con PBS/FCS durante 1 hora y luego se infunde con PBS/FCS enfriada en hielo de una forma progresiva mediante una jeringa de 20 ml. Se fija una aguja hipodérmica 21G a la
35 base de la columna y se deja que 1 a 2 ml de tampón enfriado en hielo salgan a través de la aguja.

Después de centrifugar los granulocitos, se aspira el

líquido sobrenadante y se resuspenden suavemente las células con 100 µl de partículas magnéticas (anticuerpos monoclonales anti-CD16, conjugados con partículas superparamagnéticas). La mezcla de eosinófilos/neutrófilos/partículas magnéticas anti-CD16 se incuba en hielo durante 40 minutos y luego se diluye hasta 5 ml con PBS/FCS enfriado en hielo. La suspensión celular se introduce lentamente en la parte superior de la columna y se abre la tapa permitiendo que las células se muevan lentamente en la matriz de acero. La columna se lava entonces con PBS/FCS (35 ml) que se añade cuidadosamente en la parte superior de la columna para no alterar los neutrófilos marcados magnéticamente todavía atrapados en la matriz de acero. Los eosinófilos no marcados se recogen en un tubo de centrifuga de 50 ml y se lavan (10 minutos, 400 x g, 4°C). El sedimento resultante se resuspende en solución salina equilibrada de Hank (HBSS), de modo que se puedan valorar los números y pureza de las células antes de usar. La columna de separación se retira del imán y se eluye la fracción de neutrófilos. La columna se lava entonces con PBS (50 ml) y etanol (absoluto) y se almacena a 4°C.

Se realiza el recuento de células totales con un contador microcelular. Se añade una gota de solución lisógena a la muestra, que después de 30 segundos se vuelve a contar para valorar la contaminación con eritrocitos. Se preparan muestras de citospina en un aparato Shandon Cytospin 2 Cytospinner (muestras de 100 µl, 3 minutos, 500 rpm). Estas preparaciones se tiñen y se determinan los recuentos celulares diferenciales por microscopía visible, examinando al menos 500 células. La viabilidad celular se valora por exclusión en azul de tripano.

Los eosinófilos y neutrófilos se diluyen en HBSS y se extraen con pipetas en placas de microvaloración de 96 pocillos (MTP) a $1 - 10 \times 10^3$ células/pocillo. Cada pocillo contiene una muestra de 200 µl que comprende: suspensión celular, 100 µl; HBSS, 50 µl; lucigenina, 10 µl; estímulo

de activación, 20 μ l; y compuesto de ensayo, 20 μ l.

Las muestras se incuban con el compuesto de ensayo o vehículo durante 10 minutos antes de añadir un estímulo de activación fMLP (1-10 μ M) o C5a (1-100 nM) disuelto en dimetil sulfoxido y se diluye seguidamente en tampón, tal que la máxima concentración de disolvente usada sea 1% (a 100 μ M de compuesto de ensayo). Se agitan las MTP para facilitar la mezcla de las células y el medio y se colocan las MTP en un luminómetro. Se mide la quimioluminiscencia total y el perfil temporal de cada pocillo simultáneamente durante 20 minutos y los resultados se expresan como unidades arbitrarias, o como un porcentaje de la quimioluminiscencia inducida por fMLP en ausencia de compuesto de ensayo. Los resultados se ajustan a la ecuación de Hill y se calculan los valores de IC_{50} automáticamente.

Por lo general, las combinaciones de los agentes terapéuticos de la presente invención son activas en el procedimiento de ensayo anterior en concentraciones en el intervalo de 0,0001 μ M a 0,5 μ M, siendo las realizaciones preferidas activas en concentraciones en el intervalo de 0,1 nM a 100 nM.

La actividad antiinflamatoria de las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención se demuestra además por la inhibición de la extravasación de plasma en las vías respiratorias de ratas. En este ensayo se toma tejido traqueal y se determina el grado de pérdida de plasma. Este ensayo se refiere igualmente a otras enfermedades inflamatorias crónicas de las vías respiratorias que incluyen COPD, pero sin estar limitadas a la misma, y por consiguiente no se recapitula en esta sección.

Se anestesian con pentobarbitona sódica ratas albinas Wistar (150 a 200 g) o cobayos Dunkin-Hartley (450-600 g) y se instalan cánulas venosas y arteriales. Se administra i.v. (30 mg/kg) colorante azul de Evans para ligar las proteínas plasmáticas. Después de 10 minutos, se

administran los agentes de ensayo i.t. y 10 minutos después se administra capsaicina i.v. (30 ug/kg). 30 minutos después se extirpa tejido traqueal, se extrae durante la noche en formamida y se lee la absorbancia a 620 nm. En algunos experimentos se invierte el orden de dosificación tal que los compuestos se administraron antes del azul de Evans y el estímulo inflamatorio.

En el modelo de ensayo anterior, las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención presentan por lo general actividad antiinflamatoria en dosis en el intervalo de 0,001 a 0,1 mg/kg i.t.

A partir de lo anterior puede observarse que las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias u obstructivas de las vías respiratorias u otros estados que impliquen obstrucción de las vías respiratorias. En particular, son útiles para el tratamiento de asma bronquial.

A la vista de su actividad antiinflamatoria y de su influencia sobre la hiperreactividad de las vías respiratorias, las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención son útiles para el tratamiento, en particular el tratamiento profiláctico, de enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias. Así, mediante una administración continuada y regular durante períodos prolongados de tiempo, las combinaciones de compuestos de la presente invención son útiles para proporcionar protección por anticipado contra la recurrencia de broncoconstricción u otros ataques sintomáticos consecuencia de enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias. Las combinaciones de compuestos de la presente invención son también útiles para el control, alivio o reversión de estados basales de tales enfermedades.

Haciendo referencia a su actividad broncodilatadora, las combinaciones de agentes terapéuticos de la presente invención son útiles como broncodilatadores, por ejemplo,

en el tratamiento de broncoconstricción crónica o aguda y para el tratamiento sintomático de enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias.

Las enfermedades obstructivas o inflamatorias a las que se aplica la presente invención incluyen: asma; 5 neumoconiosis; neumonía eosinofílica crónica; enfermedad pulmonar o de las vías respiratorias obstructiva crónica (COAD o COPD); y síndrome de dificultad respiratoria en el adulto (ARDS), así como la exacerbación de hiperreactividad 10 de las vías respiratorias consecuencia de una terapia farmacológica, por ejemplo, terapia con aspirina o con agonistas β .

Los inhibidores selectivos de PDE4 y los agonistas del receptor β 2-adrenérgico de la presente invención se pueden 15 administrar solos o combinados, aunque por lo general se administrarán mezclados con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los inhibidores selectivos de PDE4 y los agonistas del receptor β 2-adrenérgico de la presente invención se 20 administran preferiblemente por inhalación y se liberan convenientemente en forma de un polvo seco (solo o mezclado, por ejemplo, una mezcla con lactosa) desde una presentación de inhalador de polvo seco o un pulverizador de aerosol desde un recipiente a presión, bomba, 25 pulverizador, atomizador (preferiblemente un atomizador que use la electrodinámica para producir una niebla fina) o nebulizador con o sin el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluormetano, triclorofluormetano, diclorotetrafluoretano, un hidrofluoralcano tal como 30 1,1,1,2-tetrafluoretano (HFA 134A™) o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluorpropano (HFA 227EA™), dióxido de carbono, otro hidrocarburo perfluorado tal como Perflubron™ u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la dosis unitaria puede determinarse disponiendo una válvula para 35 que libere una cantidad medida. El recipiente a presión, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador puede contener una solución o suspensión de compuesto activo, por

ejemplo, usando una mezcla de etanol (opcionalmente, etanol acuoso) o un agente adecuado para liberar por dispersión, solubilización o dilución y el propulsor como disolvente, que puede contener además un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitán. Se pueden formular cápsulas, blisters y cartuchos (realizados, por ejemplo, en gelatina o HPMC) para usar en un inhalador o insuflador que contengan una mezcla de polvo del compuesto de la invención, una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón y un modificador del comportamiento tal como 1-leucina, manitol o estearato de magnesio.

Antes de usar en una formulación de polvo seco o en una formulación de suspensión para inhalación, el compuesto de la invención se micronizará hasta un tamaño adecuado para liberar por inhalación (de forma típica considerado menos de 5 micrómetros). La micronización se conseguirá por una serie de procedimientos, por ejemplo, molino de chorro en espiral, molino de chorro en lecho fluido o usando cristalización en fluido supercrítico.

Una formulación en solución adecuada para usar en un atomizador que usa la electrohdrodinámica para producir una niebla fina puede contener de 1 µg a 10 mg de un compuesto de la invención por actuación y el volumen de cada actuación puede variar de 1 a 100 µl. Una formulación típica puede comprender un compuesto de la invención, propilenglicol, agua estéril, etanol y cloruro sódico. Se pueden usar disolventes alternativos en lugar de propilenglicol, por ejemplo, glicerol o polietilenglicol.

Las formulaciones de aerosol o polvo seco se disponen preferiblemente de modo que cada dosis medida o "aplicación" contenga de 1 a 4000 µg de un compuesto de la invención para administrar al paciente. La dosis diaria total con un aerosol variará en el intervalo de desde 1 µg a 20 mg, que se pueden administrar en una única dosis o, más normalmente, en dosis divididas durante todo el día.

La relación preferida, en peso (p/p) de inhibidor selectivo de PDE4 : agonista del receptor β2-adrenérgico

7274

usada dependerá de la combinación particular que se examine. Esto se debe a las diferencias en la potencia farmacológica de los compuestos individuales. En cualquier caso, el médico determinará la dosis real de cada compuesto
5 que será la más adecuada para un paciente particular y ésta variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular.

Se apreciará que todas las referencias en la presente memoria al tratamiento incluyen el tratamiento curativo,
10 paliativo y profiláctico.

Datos de ensayo - Inhibición de la liberación de elastasa de neutrófilos humanos aislados

Se recogió sangre venosa (90 ml) de voluntarios
15 humanos sanos de ambos sexos en 10 ml de citrato sódico al 3,8% (v/v) y se dispensaron alícuotas de 8 ml en tubos de centrífuga de polipropileno de 15 ml que contenía cada uno 4 ml de dextrano al 6% (Peso Molecular medio 148.000) en Solución Salina Equilibrada de Hanks (HBSS). La mezcla
20 dextrano/sangre se homogeneizó suavemente por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos para permitir la sedimentación de los eritrocitos. Se depositaron alícuotas de 16 ml del líquido sobrenadante rico en leucocitos sobre 10 ml de almohadillas Ficoll-
25 Hypaque en tubos de centrífuga de polipropileno de 50 ml y los tubos se centrifugaron a 400g durante 35 minutos a 21°C. El plasma, la capa de células mononucleares y el Ficoll se retiraron dejando el sedimento rico en granulocitos. Los sedimentos se resuspendieron inicialmente
30 en 10 ml de agua destilada enfriada en hielo durante 45 segundos para lisar los glóbulos rojos contaminantes, seguido por la adición a cada tubo de 10 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) doblemente concentrada enfriada en hielo para restaurar la osmolaridad. Se
35 volvieron a centrifugar las suspensiones a 200g durante 10 minutos a 4°C para generar sedimentos de neutrófilos. Se retiraron los líquidos sobrenadantes y los sedimentos se

resuspendieron suavemente en un volumen total de 10 ml de HBSS enfriada en hielo usando una pipeta Pasteur. Se llevó a cabo un recuento leucocitario diferencial sobre la suspensión de neutrófilos resultante usando un analizador hematológico Beckman Coulter A. T5 y las células se almacenaron en hielo hasta el ensayo. Inmediatamente antes del ensayo, se extrajeron alícuotas de la suspensión de neutrófilos y se diluyeron hasta un recuento de 4×10^6 neutrófilos/ml de HBSS enfriada en hielo que contenía 2 U/ml de adenosina desaminasa.

La inhibición de la liberación de elastasa inducida por fMLP se llevó a cabo usando un volumen de ensayo de 160 μ l en placas de microvaloración de poliestireno de 96 pocillos. La liberación de elastasa se ensayó midiendo la velocidad de ruptura del sustrato sintético MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA. Para la medida de la liberación de elastasa, los pocillos de ensayo contenían 8 μ l de citocalasina B 100 μ g/ml (en DMSO al 10%/HBSS al 90%), 8 μ l de compuesto de ensayo (diluido en HBSS), 40 μ l de suspensión de neutrófilos y 96 μ l de MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-pNA 156 μ M (en HBSS). Las placas de ensayo se incubaron a 37°C durante 10 minutos antes de la adición de 8 μ l de fMLP 2 μ M (en HBSS) y se midió el valor de la velocidad de ruptura del sustrato a una $\lambda=405$ nm durante 3 minutos a 37°C. Se determinó la liberación de elastasa basal mediante la adición de 8 μ l de HBSS en lugar de fMLP. Los datos reproducidos en la Tabla 1 siguiente son valores de IC_{50} , es decir, la concentración (en mM) de agente activo requerida para conseguir una inhibición del 50% de la liberación de elastasa inducida por fMLP. En el caso de los experimentos de combinación, se añadieron al ensayo 1000 nM de 9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-tienil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina (C) y se generó entonces una curva de concentración - respuesta para formoterol (F) y salmeterol (S).

Tabla 1 - Inhibición de la liberación de elastasa (valores de IC₅₀ en nM)

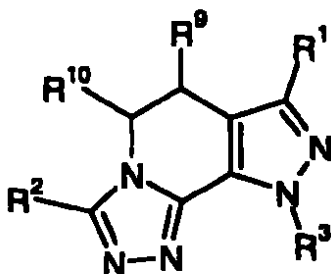
F	S	C	F + C	S + C
> 1000	> 1000	> 1000	0,4	1,0

Se demuestra que la aplicación combinada de un agonista β_2 (formoterol o salmeterol) con un inhibidor de PDE4 (9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-tienil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina) produce una inhibición sinérgica de la función proinflamatoria de neutrófilos. Se consiguió una inhibición débil (orden μM) de la liberación de elastasa inducida por fMLP en neutrófilos humanos aislados mediante el tratamiento individual con estos agentes farmacológicos y se mejoró notablemente esto hasta una inhibición potente (orden nM) mediante su aplicación combinada.

4577

REIVINDICACIONES

1. Una combinación inhalada de (a) un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula:



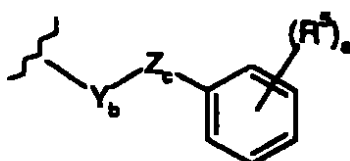
(I)

5

o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables, en la que

R¹ es H, alquilo C₁-C₄, alcoxi C₁-C₆, alquenilo C₂-C₄, fenilo, -N(CH₃)₂, cicloalquilo C₃-C₆, (cicloalquil C₃-C₆) (alquilo C₁-C₃) o acilo C₂-C₆, pudiendo estar los grupos alquilo, fenilo o alquenilo sustituidos con hasta dos grupos -OH, alquilo C₁-C₃ o -CF₃ o con hasta tres halógenos;

cada uno de R² y R³ se selecciona independientemente del grupo formado por H, alquilo C₁-C₁₄, (alcoxi C₁-C₇) (alquilo C₁-C₇), alquenilo C₂-C₁₄, cicloalquilo C₃-C₇, (cicloalquil C₃-C₇) (alquilo C₁-C₂), un grupo (heterocíclico C₄-C₇) (CH₂)_n saturado o insaturado en el que n es 0, 1 ó 2, que contiene como heteroátomo uno o más del grupo formado por oxígeno, azufre, sulfonilo, nitrógeno y NR⁴, siendo R⁴ H o alquilo C₁-C₄; o un grupo de Fórmula (II):



(II)

en la que a es un número entero de 1 a 5; b y c son 0 ó 1; R⁵ es H, -OH, alquilo C₁-C₅, alquenilo C₂-C₅, alcoxi C₁-C₅, cicloalcoxi C₃-C₆, halógeno, -CF₃, -CO₂R⁶, -CONR⁶R⁷, -NR⁶R⁷, -NO₂ o -SO₂NR⁶R⁷, siendo cada uno de R⁶ y R⁷ independientemente H o alquilo C₁-C₄; Z es -O-, -S-, -SO₂-,

25

76
78

-CO- o -N(R⁵)-, siendo R⁵ H o alquilo C₁-C₄; e Y es alquilenilo C₁-C₅ o alquilenilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido con hasta dos grupos alquilo C₁-C₇ o cicloalquilo C₃-C₇; pudiendo estar cada uno de los grupos alquilo, alquilenilo, 5 cicloalquilo, alcoxialquilo o heterocíclico sustituidos con 1 a 14, preferiblemente 1 a 5 grupos alquilo C₁-C₂, CF₃ o halo; y

cada uno de R⁹ y R¹⁰ se selecciona independientemente del grupo formado por H, alquilo C₁-C₆, alcoxi C₁-C₆, arilo 10 C₆-C₁₀ y ariloxi C₆-C₁₀;

y (b) un agonista del receptor β₂-adrenérgico.

2. Una combinación según la reivindicación 1, en la que R¹ es metilo, etilo o isopropilo.

3. Una combinación según la reivindicación 1 o la 15 reivindicación 2, en la que R³ es alquilo C₁-C₆, alquilenilo C₂-C₆, cicloalquilo C₃-C₇, (cicloalquil C₃-C₇) (alquilo C₁-C₆) o fenilo opcionalmente sustituido con 1 ó 2 del grupo formado por H, -OH, alquilo C₁-C₆, alquilenilo C₂-C₆, alcoxi C₁-C₆, halógeno, trifluorometilo, -CO₂R⁶, -CONR⁶R⁷, -NR⁶R⁷, 20 -NO₂ o -SO₂NR⁶R⁷, siendo cada uno de R⁶ y R⁷ independientemente H o alquilo C₁-C₄.

4. Una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I) se selecciona de:

25 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-fenil-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]piridina;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(furan-2-il)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]piridina;

30 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-piridil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]piridina;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(4-piridil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]piridina;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(3-tienil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]piridina;

35 3-Bencil-9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-α]piridina;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-propil-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;

3,9-Diciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-9H-pirazolo[3,4-
c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;

5 9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(1-metilciclohex-1-
il)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;

3-(Terc-butil)-9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-metilfenil)-9H-
10 pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-metoxifenil)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(tien-2-il)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;

15 3-(2-Clorofenil)-9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-yodofenil)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina;

9-Ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-
20 trifluorometilfenil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-
 α]piridina; y

5,6-Dihidro-7-etil-9-(4-fluorofenil)-3-(1-
metilciclohex-1-il)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3-
 α]piridina;

25 y sus sales y solvatos farmacéuticamente aceptables.

5. Una combinación según la reivindicación 4, en la
que el inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I) se
selecciona de 9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-
tienil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina y
30 9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(terc-butil)-9H-
pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina y sus sales
y solvatos farmacéuticamente aceptables.

6. Una combinación según una cualquiera de las
reivindicaciones anteriores, en la que el agonista del
35 receptor β 2-adrenérgico se selecciona de salmeterol,
formoterol y sus sales y solvatos farmacéuticamente

aceptables.

7. Una combinación según la reivindicación 1, en la que:

5 el inhibidor selectivo de PDE4 de formula (I) es 9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-tienil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables y el agonista del receptor β 2-adrenérgico es salmeterol o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables; o

10 el inhibidor selectivo de PDE4 de formula (I) es 9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(2-tienil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables y el agonista del receptor β 2-adrenérgico es formoterol o una de
15 sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

el inhibidor selectivo de PDE4 de formula (I) es 9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(terc-butil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables y el
20 agonista del receptor β 2-adrenérgico es salmeterol o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables;

el inhibidor selectivo de PDE4 de formula (I) es 9-ciclopentil-5,6-dihidro-7-etil-3-(terc-butil)-9H-pirazolo[3,4-c]-1,2,4-triazolo[4,3- α]piridina o una de
25 sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables y el agonista del receptor β 2-adrenérgico es formoterol o una de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables.

8. Una combinación según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para usar como medicamento.

30 9. Una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la administración simultánea, secuencial o por separado en el tratamiento de una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias u otra enfermedad inflamatoria.

35 10. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I), según se define

en la reivindicación 1, un agonista del receptor β 2-adrenérgico y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable, para administración por vía inhalada en el tratamiento de una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias u otra enfermedad inflamatoria.

11. Una composición farmacéutica según la reivindicación 10, en la que el inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I) y el agonista del receptor β 2-adrenérgico son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

12. Uso de un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I), como se define en la reivindicación 1, o de un agonista del receptor β 2-adrenérgico, en la fabricación de un medicamento para la administración simultánea, secuencial o por separado de ambos agentes por vía inhalada en el tratamiento de una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias u otra enfermedad inflamatoria.

13. Uso según la reivindicación 12, en el que el inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I) y el agonista del receptor β 2-adrenérgico son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

14. Un procedimiento para tratar una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias u otra enfermedad inflamatoria, que comprende administrar de forma simultánea, secuencial o por separado, por vía inhalada, a un mamífero que necesita dicho tratamiento, una cantidad eficaz de un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I), como se define en la reivindicación 1, y un agonista del receptor β 2-adrenérgico.

15. Un procedimiento según la reivindicación 14, en el que el inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I) y el agonista del receptor β 2-adrenérgico son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

16. Un dispositivo de inhalación para la administración simultánea, secuencial o por separado de un inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I), como se define

4882

en la reivindicación 1, y un agonista del receptor β 2-adrenérgico, en el tratamiento de una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias u otra enfermedad inflamatoria.

- 5 17. Un dispositivo de inhalación según la reivindicación 16, en el que el inhibidor selectivo de PDE4 de fórmula (I) y el agonista del receptor β 2-adrenérgico son como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

83

COMBINACIÓN FARMACÉUTICA

RESUMEN

La presente invención se refiere a una combinación de un inhibidor selectivo de PDE4 como se define en la presente memoria y un agonista del receptor β 2-adrenérgico, para la administración simultánea, secuencial o por separado por vía inhalada en el tratamiento de una enfermedad obstructiva de las vías respiratorias u otra enfermedad inflamatoria.

PATENT COOPERATION TREATY

84

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Rule 71.1)

To: LUMB, Trevor J. URQUHART-DYKES & LORD c/o Simpson, Alison 30 Welbeck Street London W1G 8ER GRANDE BRETAGNE

Date of mailing <i>(day/month/year)</i>	31.10.2003
--	-------------------

Applicant's or agent's file reference 22050/700062
--

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No. PCT/B02/04922

International filing date <i>(day/month/year)</i> 22.11.2002
--

Priority date <i>(day/month/year)</i> 07.12.2001
--

Applicant PFIZER LIMITED et al.

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tlx 523856 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer Senkel, H Tel. +49 89 2399-8071	
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT
(PCT Article 36 and Rule 70)03
85

Applicant's or agent's file reference 22050/700062	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEA/16)	
International application No. PCT/B02/D4922	International filing date (day/month/year) 22.11.2002	Priority date (day/month/year) 07.12.2001
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC A61K31/44		
Applicant PFIZER LIMITED et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

I ☒ Basis of the opinion

II ☐ Priority

III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

IV ☐ Lack of unity of invention

V ☒ Reasoned statement under Rule 68.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

VI ☐ Certain documents cited

VII ☐ Certain defects in the international application

VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 14.01.2003	Date of completion of this report 31.10.2003
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523856 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4455	Authorized Officer Beeck, M Telephone No. +49 89 2399-8473 

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/B02/04922

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, Pages

1-26 as originally filed

Claims, Numbers

1-17 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)).

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

88
87

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/IB02/04922**

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 14,15

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 14,15 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the Standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the Standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	5,7
	No: Claims	1-4,6,8-17
Inventive step (IS)	Yes: Claims	5,7
	No: Claims	1-4,6,8-17
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-13,16,17
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

SECTION III:

Claims 14 and 15 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

SECTION V:

- 1) Document WO 01 13953 already describes inhaled combinations of a PDE4 inhibitor which falls under the general formula (I) of present claim 1 and an adrenergic β_2 receptor agonist (see page 6, third line, compound in the middle, the paragraph bridging pages 15 and 16, and the claims) for obstructive airways diseases.

Therefore the subject-matter of claims 1 to 4, 6, 8, 9 to 17 is not novel (Article 33 (2) PCT).

- 2) The specific combinations of claims 5 and 7 are not obvious in view of the prior art cited in the Search Report.

Therefore the subject-matter of claims 5 and 7 involves an inventive step.

- 3) For the assessment of the present claims 14 and 15 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern I Application No

PCT/IB 02/04922

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/44 A61K45/06 A61P11/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, PAJ, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96 39408 A (PFIZER) 12 December 1996 (1996-12-12) claims 1-4	1-4
A	WO 01 13953 A (BYK GULDEN LOMBERG CHEMISCHE FABRIK) 1 March 2001 (2001-03-01) claims 1-3 page 16, paragraph 1 -page 17, paragraph 1 page 17, paragraph 4	1,6,8-17
A	WO 00 12078 A (SMITHKLINE BEECHAM) 9 March 2000 (2000-03-09) claims 1-4 page 5, line 18-25	1,6,8-10
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the International filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

28 January 2003

Date of mailing of the International search report

05/02/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Peeters, J

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	L. OTTONELLO E.A.: "Inhibitory effects of salmeterol on the respiratory burst of adherent human neutrophils" CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, vol. 106, no. 1, 1996, pages 97-102, XP001064259 page 97 page 99, column 2	1,6,8,9
A	R.B. DOWLING E.A.: "The effect of rolipram, a type IV phosphodiesterase inhibitor, on Pseudomonas aeruginosa infection of respiratory mucosa" JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, vol. 282, no. 3, 1997, pages 1565-1571, XP001064249 page 1565 page 1570, column 2	1,6,8,9
A	P.M.R. SILVA E.A.: "Modulation of eotaxin formation and eosinophil migration by selective inhibitors of phosphodiesterase type 4 isoenzyme" BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 134, no. 2, 2001, pages 283-294, XP001064265 page 283 page 284, column 1	1,6,8,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In: International application No.
PCT/IB 02/04922

91

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: —
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.: —
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

40
92

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 14 and 15 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

Continuation of Box I.2

Present claims 1-5,8-17 relate to a product/compound/method/apparatus defined by reference to a desirable characteristic or property, namely "adrenergic beta-2 agonist"

The claims cover all products/compounds/methods/apparatus having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such products/compounds/methods/apparatus. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the product/compound/method/apparatus by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to the products/compounds/methods/apparatus mentioned in claims 6 and 7, with due regard to the general idea underlying the present application.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat Application No
 PCT, no 02/04922

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9639408	A	12-12-1996	CA 2223624 A1 12-12-1996
			HU 9601541 A2 28-02-1997
			WO 9639408 A1 12-12-1996
			AP 609 A 03-09-1997
			AT 214700 T 15-04-2002
			AU 694871 B2 30-07-1998
			AU 5477396 A 19-12-1996
			BG 62568 B1 29-02-2000
			BG 100640 A 31-03-1997
			BR 9602627 A 01-09-1998
			CN 1142499 A ,B 12-02-1997
			CZ 9601626 A3 15-01-1997
			DE 69525978 D1 25-04-2002
			DE 69525978 T2 19-12-2002
			DK 837860 T3 27-05-2002
			EP 0837860 A1 29-04-1998
			FI 974434 A 05-12-1997
			HR 960268 A1 31-08-1997
			IL 118485 A 17-02-2000
			JP 10510242 T 06-10-1998
			JP 3107827 B2 13-11-2000
			KR 191972 B1 15-06-1999
			KR 225719 B1 15-10-1999
			LV 11620 A 20-12-1996
			LV 11620 B 20-04-1997
			NO 962320 A 09-12-1996
			NZ 286734 A 26-02-1998
			PL 314459 A1 09-12-1996
			PT 837860 T 31-07-2002
			RO 115881 B1 28-07-2000
			RU 2161158 C2 27-12-2000
			SG 54341 A1 16-11-1998
			SI 9600186 A 30-04-1997
			SK 71896 A3 07-05-1997
			TR 970185 A1 21-03-1997
			TW 460469 B 21-10-2001
			US 6004974 A 21-12-1999
WO 0113953	A	01-03-2001	AU 6701600 A 19-03-2001
			BR 0013478 A 30-04-2002
			CN 1370081 T 18-09-2002
			CZ 20020641 A3 14-08-2002
			WO 0113953 A2 01-03-2001
			EP 1212089 A2 12-06-2002
			HU 0203098 A2 28-01-2003
			NO 20020815 A 19-02-2002
			SK 2552002 A3 04-06-2002
			TR 200201317 T2 21-11-2002
WO 0012078	A	09-03-2000	AU 754379 B2 14-11-2002
			AU 5493999 A 21-03-2000
			BR 9913152 A 15-05-2001
			CA 2341488 A1 09-03-2000
			CN 1314811 T 26-09-2001
			CZ 20010692 A3 13-02-2002
			EP 1107747 A1 20-06-2001
			HU 0103160 A2 28-01-2002
			JP 2002523452 T 30-07-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat
Application No
PCT, ID 02/04922

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0012078	A	NO 20010882 A	21-02-2001
		PL 346271 A1	28-01-2002
		TR 200100500 T2	21-06-2001
		WO 0012078 A1	09-03-2000
		US 6288118 B1	11-09-2001
		US 2001056122 A1	27-12-2001

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION MODELO DE UTILIDAD	()	(/)
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	(/)
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	(/)
- Descripción de la invención.	()	(/)
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	(/)
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.		
COMPLETA () INCOMPLETA ()		
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()		

Firma Responsable:**Fecha:**

97.
96

2020
Bogotá D C

Doctor(a)
CARLOS R. OLARTE
Apoderado
PFIZER INC.

Oficio N° 00134

ASUNTO:

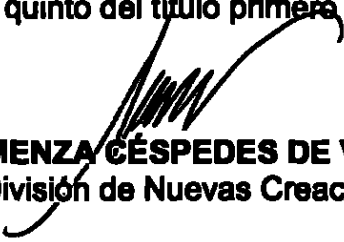
Radicación N°	04-052217
Solicitud internacional	PCT/IB02/4922
Fecha inicio fase nacional	07/07/2004
Trámite	011
Evento	379
Actuación	416
Folios	002

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- El solicitante debe presentar un nuevo título, que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente (Regla 4.3 PCT, Art. 27, 27 Decisión 486, Circular Única 5.2.9).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha,
_____ 02 JUL. 2004

202044