

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, CO

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
1814
743

Señor Director
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-106509- -00009-0000

Fecha: 2011-04-28 11:24:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 33

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 06.106.509
Asunto : SOLICITUD DE PATENTE PARA: **"COMPOSICIONES QUE CONTIENEN BENZOXAZINA, UNA SAL DE TIOTROPIO Y UN ESTEROIDE PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES DE LAS VIAS RESPIRATORIAS"**
Solicitante : BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
Fecha de solicitud : Octubre 20 de 2006

1. Yo, Luz Clemencia de PAEZ, obrando como apoderada del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. **16440** notificado por fijación en lista del 23 de diciembre de 2010.

2. Mediante memorial radicado el día 16 de marzo de 2011 solicité plazo de treinta (30) días para atender el oficio No. **16440**.

3. Mediante el Oficio No. **16440** se puso en conocimiento del solicitante el informe del examen de fondo que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Atiendo a las observaciones de la manera siguiente:

3.1 Reivindicaciones

Afirma el Examinador que "las composiciones reclamadas en la reivindicación 1 no tienen sustento con un ejemplo de una composición que contenga los dos o tres principios activos, en una misma forma farmacéutica".

Adicionalmente, afirma que las reivindicaciones 8 y 9 no son claras al mencionar "que contiene 1 y 2".

3.2 Análisis de patentabilidad

3.2.1 Nivel Inventivo

Para este requisito considera el Examinador que "la solicitud, tal como se reivindica, es obvia, porque el Experto en la Materia enfrentado al problema de "cómo obtener una composición del compuesto de fórmula (1a), útil broncoconstrictor, para tratar enfermedades de las vías respiratorias, alternativa, a las ya divulgadas", incluiría la sal de tiotropio que se revela en D2 (folio 325, pg2, líneas 22-24), dentro de las composiciones que se enseñan en D1, logrando de esta forma las combinaciones objeto de esta solicitud".

4. Respuesta a las objeciones

De este modo y con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se desean poner de presente las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

4.1 Modificación de una solicitud en trámite y aclaraciones

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 12 reivindicaciones.

De esta manera, y teniendo en cuenta las siguientes modificaciones y aclaraciones, consideramos que se deben tener por superadas las objeciones hechas en cuanto a la claridad del pliego reivindicatorio:

Inicialmente, deseamos poner de presente que el pliego reivindicatorio ha sido modificado y el esteroide de la composición reclamada corresponde ahora a ciclesonida. De esta

manera, la anterior reivindicación 4 no ha sido incluida con el fin de guardar coherencia entre la materia reclamada en el nuevo pliego reivindicatorio.

Adicionalmente, las anteriores reivindicaciones 9 y 10 (ahora reivindicaciones 8 y 9) se han modificado para que se especifique claramente que las composiciones reclamadas contienen un compuesto de la fórmula 1a, una sal de tiotropio (2a.1) y ciclesonida (2c.11), los cuales corresponden a los ingredientes activos 1 y 2, anteriormente referenciados con la expresión "que contiene 1 y 2".

Finalmente, deseamos aclarar que la materia revelada en la presente invención, la cual se reclama en las reivindicaciones modificadas, se encuentra debidamente soportada en la descripción. Así, respetuosamente llamamos la atención del Examinador que independientemente de lo revelado en la página 4 de la descripción, en las páginas 76 y 78 de la misma se revela lo siguiente:

"Los dos componentes activos 1 y 2 pueden ser aplicados -juntos o separados temporalmente- de una manera en sí conocida, por inhalación, por vía oral, parenteral o por otra vía en las más diversas formulaciones usuales, tales como, por ejemplo, comprimidos, grageas, píldoras, granulados, aerosoles, jarabes, emulsiones, suspensiones, polvos y disoluciones, utilizando excipientes o disolventes inertes, no tóxicos, farmacéuticamente apropiados".

"Con preferencia, también en la aplicación separada de ambos componentes 1 y 2 se aplica al menos el componente 1 por inhalación. Si el componente 1 se aplica por inhalación, el componente 2 se puede aplicar con una administración separada de ambos principios activos, por ejemplo, por vía oral o incluso parenteral sobre la base de formulaciones usuales en el estado de la técnica tales como comprimidos, grageas, píldoras, granulados, aerosoles, jarabes, emulsiones, suspensiones, polvos y disoluciones, utilizando excipientes o disolventes inertes, no tóxicos, farmacéuticamente apropiados".

De esta manera, consideramos que si bien los ejemplos de la solicitud ayudan a una persona versada en la materia a entender y a mostrar las posibles realizaciones de la invención, no deben revelar de manera exclusiva la totalidad de la invención, ya que de ser así sería imposible para el solicitante redactar los ejemplos suficientes al momento de presentar una solicitud.

Así las cosas, y considerando que según las enseñanzas encontradas en la descripción de la presente solicitud, una persona versada en la materia estaría en capacidad de reproducir la composición reclamada en una formulación de dosis fija, en donde se administren los ingredientes activos en una misma forma farmacéutica (por ejemplo en comprimidos, grageas, píldoras, granulados, aerosoles, jarabes, emulsiones, suspensiones, polvos y disoluciones), respetuosamente solicitamos se tenga por superada la objeción en cuanto a la supuesta falta de sustento.

Solicitamos atentamente tener en cuenta el nuevo pliego reivindicatorio de la solicitud compuesto por 12 reivindicaciones, que consideramos, cumple con las disposiciones de la Decisión 486 y que además, no extiende el alcance de la solicitud.

Finalmente deseamos poner de presente, que a pesar de que en el nuevo pliego reivindicatorio no se incluyó materia inicialmente reivindicada, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.

4.2 Argumentos a favor del nivel inventivo de la solicitud

En concordancia con el Artículo 18 de la Decisión 486, una invención se considerará inventiva si la misma no hubiese resultado obvia a partir del arte previo, para una persona del oficio normalmente versada en la materia.

Esto a su vez implica que el Examinador a cargo de esta evaluación debe colocarse en el momento exacto en el que el inventor buscaba resolver el problema técnico contemplado en la solicitud y para el cual poseía la literatura y el conocimiento disponibles en dicho momento.

Siguiendo entonces los lineamientos de la Jurisprudencia aplicable al análisis del nivel inventivo de una solicitud de patente, se considera que una anterioridad o una combinación de dos anterioridades puede afectar dicho requerimiento de patentabilidad, si

una persona medianamente versada en la materia encuentra enseñanzas o sugerencias claras que le indiquen cómo llegar a la invención reivindicada.

Ahora bien, con respecto a la objeción formulada por el Señor Examinador, deseamos poner de presente lo siguiente:

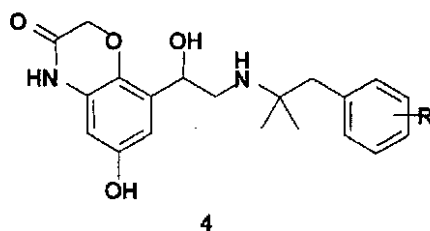
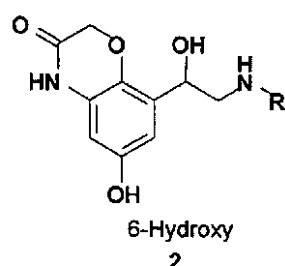
Inicialmente, el Examinador ha afirmado que no se demuestra que una composición que contenga los tres componentes activos de la invención, presente un efecto sinérgico y que de esta manera “es importante mencionar que composiciones entre varias posibilidades conocidas sin que se muestre un efecto inesperado (sinergia), es un indicio de falta de nivel inventivo”.

En consecuencia, cabe aclarar que a continuación se presentaran los argumentos y aclaraciones que se han considerado necesarias para demostrar que la materia revelada en la presente invención es inventiva, ya que la composición reclamada presenta un efecto mejorado, el cual corresponde a un efecto sinérgico debido a la combinación de los ingredientes activos de la misma.

Inicialmente, poner de presente que los beta miméticos de acción prolongada y corta son usados por su efecto bronquio dilatador para el tratamiento de enfermedades pulmonares y por lo tanto, se proponen por la Iniciativa Global para la Enfermedad de Obstrucción Pulmonar Crónica (GOLD) como una medicina controladora y aliviadora para el tratamiento de la enfermedad de obstrucción crónica pulmonar (COPD; ver la guía de bolsillo GOLD 2008 en www.goldcorpd.com, páginas 18 y 21). Para evitar efectos secundarios indeseados, particularmente efectos secundarios cardiovasculares (por ejemplo, taquicardia, otros efectos secundarios son hipokalemia y temblores musculares) es importante, que el beta mimético usado sea tan inactivo como sea posible en el receptor adrenérgico β_1 . Por lo tanto, dichos beta miméticos son los más adecuados, los cuales se caracterizan en la agrupación funcional usada ya sea por:

- i) Una baja actividad intrínseca del receptor adrenérgico β_1 ,
- ii) Una selectividad alta (calculada del radio de valores EC50 del receptor adrenérgico β_1 y el receptor adrenérgico β_2), o

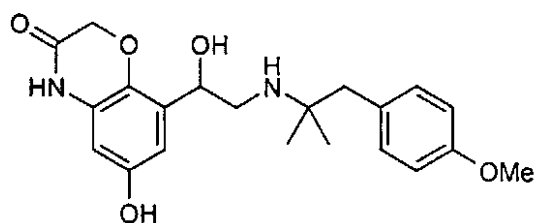
- Adicionalmente al criterio general indicado en i) a iv), solo compuestos que demuestren suficiente eficacia en modelos animales preclínicos que reflejen la constricción bronquial vista en pacientes con COPD, pueden ser adecuados para el uso en un ambiente clínico. Muchas 5-hidroxi-benzo oxazinonas de la estructura general 1 son agonistas potentes de los receptores adrenérgicos β_2 . Sin embargo los compuestos de este tipo son generalmente no selectivos hacia los receptores adrenérgicos β_1 .



Los compuestos de la estructura **2** son obtenidos si el grupo hidroxilo fenólico en la posición 5 es movido a la posición 6. Estos compuestos son caracterizados generalmente por una selectividad mayor para los receptores adrenérgicos β_2 . Sin embargo, este cambio es normalmente acompañado con una pérdida de actividad (baja actividad intrínseca para el receptor adrenérgico β_2) y usualmente compuestos inactivos se obtienen como resultado. Se encontró que los compuestos de la estructura general **4** son

potentes y agonistas selectivos de los receptores adrenérgicos β_2 . Las 5-hidroxi-benzo oxazinonas **3** correspondientes son menos selectivas.

Así las cosas, y considerando que el ingrediente activo de formula 1a de la presente invención puede corresponder a Olodaterol, el cual es un beta mimético, deseamos presentar la siguiente información con el fin de demostrar el nivel inventivo de combinaciones de Tiotropio y/o Ciclesonida con el beta mimético llamado Olodaterol. El beta mimético tiene la siguiente estructura:



Olodaterol

El Olodaterol tiene un beneficio terapéutico en el tratamiento de COPD y es caracterizado por una duración de actividad más larga y puede por lo tanto, ser usada para preparar composiciones farmacéuticas con una duración de actividad más larga (una vez al día).

Adicionalmente, el Olodaterol era desconocido en las publicaciones del estado del arte al momento de la presentación de la presente solicitud y fue revelado por primera vez en el documento WO04/045618. De acuerdo a las oficinas de patentes en Europa, Japón y EEUU, el Olodaterol es tanto novedoso como inventivo. Las patentes otorgadas a este respecto corresponden a: EP 1562603, JP 4317138, US 4056916, US 7727984; US 7786111.

En consecuencia, deseamos se tenga en cuenta lo anterior para demostrar el nivel inventivo de la presente invención, ya que una combinación que contenga un compuesto novedoso e inventivo no puede ser nada más que novedosa e inventiva.

Adicionalmente, tal como se mencionó anteriormente, deseamos presentar los siguientes datos que muestran la superioridad del Olodaterol y de las composiciones farmacéuticas que contienen dicho compuesto, tal como se revelan en la presente invención.

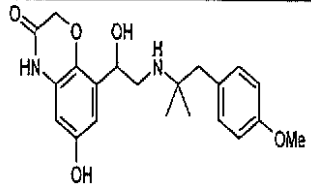
4.2.1 Información Biológica del Olodaterol

El Olodaterol fue evaluado en exámenes funcionales celulares para determinar su potencia, eficacia y selectividad por el receptor adrenérgico humano $\beta 2$. En lo siguiente se demuestra porque ejemplos del estado del arte carecen de ventajas comparados con los ejemplos de la presente invención. En los análisis, el incremento de cAMP intracelular inducido por un β -agonista es medido en líneas celulares CHO expresando ya sea el humano recombinante receptor adrenérgico $\beta 1$ o $\beta 2$, respectivamente, y los valores EC_{50} y las actividades intrínsecas (como marcadores de eficacia) para los dos receptores adrenérgicos β , son determinados. Los resultados de estos exámenes son demostrados abajo en la Tabla 1. Una descripción exacta se proporciona en el Procedimiento Operacional Estándar en el apéndice 1 adjunto a este memorial.

El Olodaterol de la presente invención es un potente, agonista parcial del receptor humano $\beta 2$ con un valor EC_{50} de 1.4 nM y demuestra excelente selectividad sobre los receptores $\beta 1$. La selectividad calculada $EC_{50}(\beta 1)/EC_{50}(\beta 2)$ es 258. Ya que la actividad intrínseca es de solo 7% en el receptor $\beta 1$, el Olodaterol también puede ser considerado como inactivo en el receptor $\beta 1$. Por lo tanto, el Olodaterol de la presente invención demuestra propiedades excelentes y un perfil deseado para un beta mimético en estos análisis.

Tabla 1: resultados del análisis celular de medición de la acumulación de cAMP en las líneas celulares CHO expresando receptores adrenérgicos $\beta 1$ o $\beta 2$ humanos clonados. El Olodaterol fue evaluado en este análisis celular y los resultados son resumidos. IA= actividad intrínseca en comparación a la iso prenalina (IA iso prenalina = 100%). Para más detalles ver el Procedimiento Operacional Estándar en el apéndice 1.

Ejemplo	Estructura	$\beta 1$ IA [%]	$\beta 1$ EC_{50} [nM]	$\beta 2$ IA [%]	$\beta 2$ EC_{50} [nM]
---------	------------	------------------	--------------------------	------------------	--------------------------

Olodaterol		7	358	53	1.4
------------	---	---	-----	----	-----

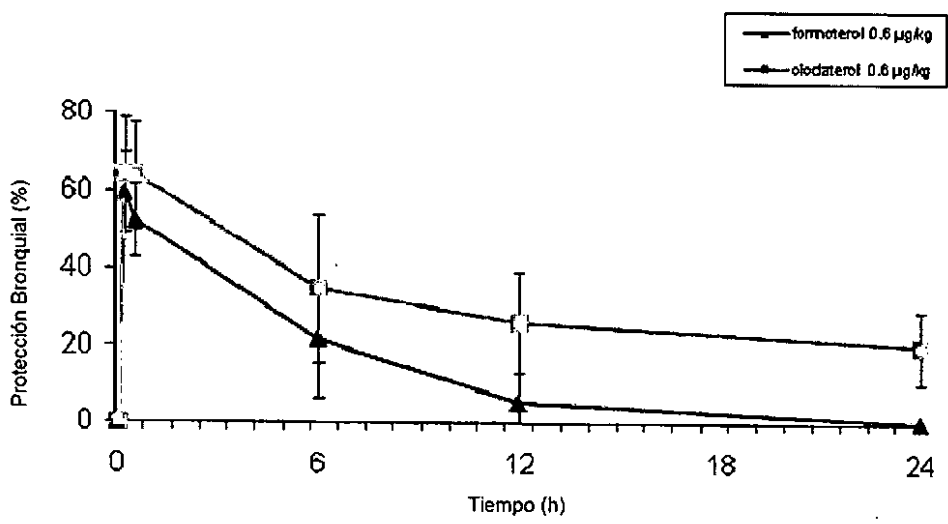
Adicionalmente, el Olodaterol fue evaluado en un modelo de constricción bronquial en vivo en conejillos de indias (ver ejemplo de la sección 4.2.4). También de este modelo se puede concluir que el Olodaterol tiene el perfil deseado para un beta mimético de acción prolongada.

Inclusive, la descripción de la solicitud demuestra el compuesto reivindicado como adecuado para un tratamiento en COPD **de una vez diaria**. Para cubrir este tema, el ejemplo de la presente solicitud ha sido evaluado en un modelo de constricción bronquial en perros. En esta evaluación ejemplar, los compuestos fueron administrados por inhalación usando el inhalador Respimat® directamente conectado al tubo traqueal de perros ventilados y anestesiados y la constricción bronquial es inducida por inyecciones intravenosas de acetilcolina en diferentes lapsos de tiempo antes y después de la administración del compuesto. Aun mas, los efectos fármaco dinámicos de limitación de dosis clínica simétrica de los agonistas beta primordialmente incrementos en ritmo cardiaco e hipokalemia, son determinados. Este modelo puede predecir la situación clínica ya que:

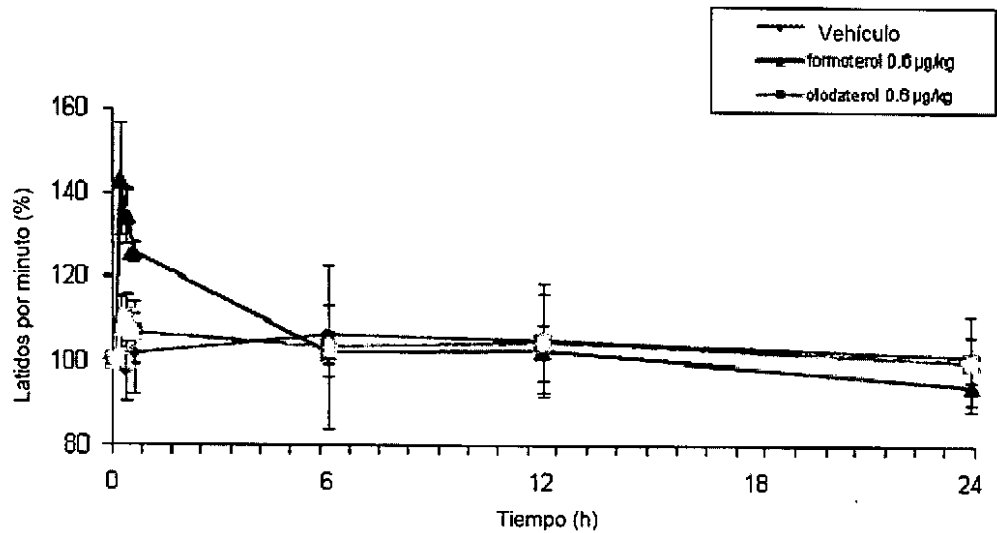
- i) Permite la evaluación de los efectos fármaco dinámicos primarios de los agonistas beta (= dilatación bronquial; llamada protección bronquial en las siguientes figuras),
- ii) Un tono colinérgico incrementado se ve en la fisiopatología de COPD
- iii) Permite la determinación de los efectos fármaco dinámicos sistémicos limitantes de dosis clínicamente de los agonistas beta ej. incremento en ritmo cardiaco e hipokalemia (para mas detalles por favor ver el apéndice 1).

La duración de acción del Olodaterol de las reivindicaciones modificadas fue comparada en el modelo preclínico a la duración de acción del Formoterol, un agonista beta con un régimen de tratamiento de dos veces al día, el cual sirvió como una referencia en la fecha de presentación de la presente solicitud. Ambos compuestos fueron evaluados en su dosis efectiva máxima.

Figura 1: protección bronquial de Olodaterol y Formoterol en perros a través de 24 h. Duración de acción de Olodaterol y Formoterol en perros anestesiados. Olodaterol y Formoterol fueron administrados de manera intra-traqueal usando el inhalador Respimat® en dosis de 0.6 µg/ kg. La constricción bronquial fue inducida 0.1, 0.5, 1, 6, 12 y 24 h después de la administración. La protección bronquial es expresada como un porcentaje de inhibición del incremento de resistencia pulmonar inducida por acetilcolina antes de la administración de la inhalación de la droga. Cada valor representa el promedio ± SD (n= 2-4).



Los efectos cardiovasculares de Olodaterol y Formoterol en perros anestesiados a través de 24 h. Perfiles de ritmo cardiaco de Olodaterol (0.6 µg/ kg) y Formoterol (0.6 µg/ kg) 0.1, 0.5, 1, 6, 12 y 24 h después de la administración inhalada usando el inhalador Respimat® son demostrados. El incremento en ritmo cardiaco es expresado como un porcentaje del ritmo cardiaco (latidos/ minuto) archivados antes de la inhalación de la droga (n= 2-4).



Los resultados están de acuerdo con el régimen de dosis de dos veces al día para Formoterol vistos en un ambiente clínico y demuestran que el Olodaterol mencionado, en contraste con el Formoterol, tiene una duración a lo largo de 24 h. El Olodaterol es por lo tanto adecuado para ser administrado una vez al día. Adicionalmente, el Olodaterol ejerce un perfil de efecto farmacodinámico sistémico superior al del Formoterol. Esto es demostrado por el incremento significativo en el ritmo cardiaco observado en Formoterol pero no en Olodaterol (ver la figura 1 y 2). Al ser tomada a la vez, la información confirma que el compuesto farmacéutico que incluye Olodaterol, tal como se revela en las reivindicaciones actuales, cumple con las características de un agonista beta con un régimen de tratamiento de una vez al día.

4.2.2 Ejemplo Olodaterol + Tiotropio comparado a Formoterol + Tiotropio; Perro bajo Constricción bronquial por 24 horas:

Animales

Perros Beagle machos y hembras con un peso corporal en un rango desde 10 – 14 kg son obtenidos de estaciones de crianza interna. Los animales se mantienen en la perrera de la casa de animales local, ayunados por la noche antes del experimento, pero tienen acceso libre al agua de beber.

Anestesia y preparación

Los perros son anestesiados repetidamente para medir la función pulmonar 10 min, 30 min 6 h, 12 h y 24 horas después de la administración del compuesto de prueba. Mientras tanto a los perros se les permite despertarse. Anestesia es inducida por inyección intravenosa rápida de 10 mg/ kg de propofol seguida por una infusión intravenosa de 30 mg/kg/h de propofol dentro de la vena cefálica. Los perros son intubados y después ventilados con presión controlada por volumen con una mezcla de aire ambiental y oxígeno (3:1) usando un respirador Siemens a un ritmo de 15 golpes por minuto. La ventilación óptima es asegurada por medición regular del estado ácido- base y la saturación de oxígeno en la sangre. La vena cefálica contra lateral es preparada para las inyecciones de acetilcolina (ACh). Electrodo adhesivos son puestos dentro de la piel rasurada localmente de las cuatro patas y son usados para grabación ECG de las marcaciones de las extremidades para la evaluación del ritmo cardíaco.

La presión tras pulmonar es monitoreada por medio de un transductor de presión diferencial (Sensortech GmbH, Puchheim, Alemania) usando un catéter conectado con el tubo endotraqueal para las medidas neumotacográficas del flujo respiratorio. La temperatura corporal es mantenida a 37- 38 °C por medio de una cuna térmica.

Evaluación Sanguínea

El estado de gas y oxígeno de la sangre como también las concentraciones de sodio, potasio, calcio, cloro, glucosa, y lactato en las muestras de sangre arterial heparinizada son evaluadas con un analizador ABL 605 (Radiómetro Copenhagen, Dinamarca).

Protocolo Experimental

Un periodo de control de 30 minutos sigue el cumplimiento de la instrumentación. Acetilcolina es inyectado repetidamente de forma intravenosa a una dosis de 10 µg/kg para la inducción del bronco espasmo transitorio (aprox. 30% de incremento en resistencia bronquial) en tiempos: - 45 min, - 30 min, y - 15 min antes de la inhalación de la droga y después 10 min, 30 min, 6 h, 12 h, y 24 h después de la inhalación de la droga. El compuesto es dado inhalado en 3 accionamientos de 10 µl (cada accionamiento) con el

uso de un inhalador de niebla suave. Los compuestos dados como combinaciones son solubilizados juntos y también se administran inhalados en 3 accionamientos de 10 µl en el mismo inhalador de niebla suave. Los parámetros cardiovasculares son evaluados a la misma vez inmediatamente antes de la inducción de bronco espasmos. Al final del experimento, los perros se despiertan y serán reutilizados después de un periodo de lavado de por lo menos 4 semanas.

Drogas

El compuesto es disuelto en 60 % etanol en concentraciones que permitan su administración inhalada en 3 activaciones de 10 µl (cada accionamiento) con el uso de un inhalador de niebla suave. Los compuestos administrados, como combinaciones, también son disueltos en la misma solución de 60% etanol y administrados en 3 activaciones de 10 µl con el mismo inhalador de niebla suave. Acetilcolina, disuelta en salina, es inyectada de forma intravenosa (Acetilcolina oftalmicum Dispers de Dispersa GmbH, Germering, Alemania). Propofol (Propofol- Lipuro 2 %) es de B Braun Melsungen AG, (D- 34209 Melsungen, Alemania). Bromuro de Tiotropio y Olodaterol fueron sintetizados por el Departamento de Desarrollo Químico de Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG.

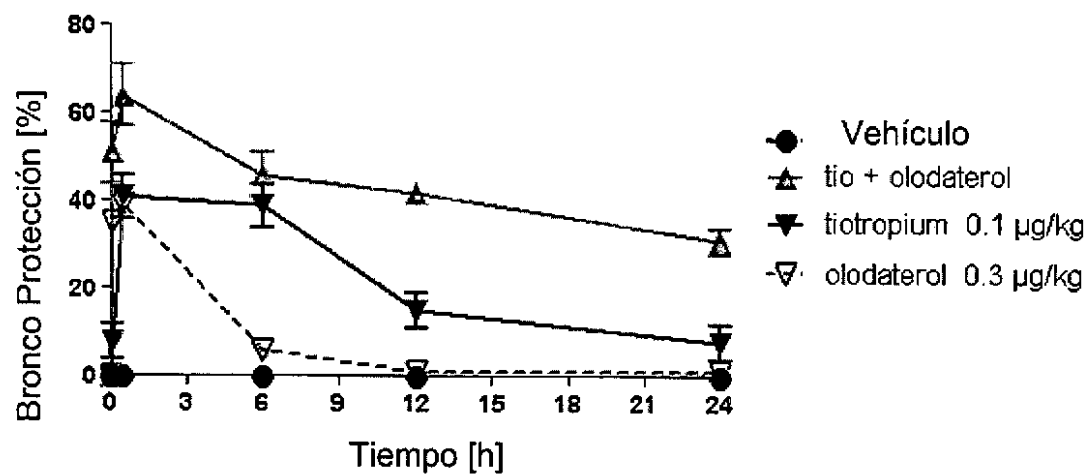
Resultados

El transcurso de tiempo del efecto inhibitor del Olodaterol en combinación con bromuro de Tiotropio en constricción bronquial inducida por acetilcolina a través de 24 horas después de una única administración fue investigada en comparación a la mono terapia respectiva. La meta del estudio fue investigar potenciales efectos sinérgicos de administraciones combinadas de Tiotropio y Olodaterol en un modelo de constricción bronquial inducida por ACh en perros a través de 24 horas. La combinación entre Formoterol y Tiotropio fue también incluida en este estudio como una regla de oro, para así evaluar los efectos sinérgicos, dosis de cada droga induciendo 40- 50 % de protección bronquial fueron usadas, por lo tanto efectos aditivos de las combinaciones pudieron ser medidas.

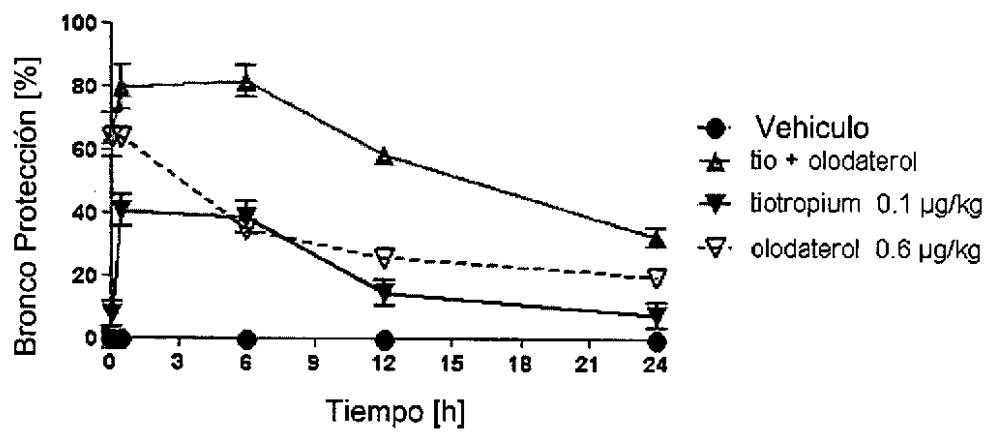
Los perros recibieron Olodaterol (0.3 µg/ kg o 0.6 µg/ kg) o Formoterol (0.6 µg/ kg) o bromuro de Tiotropio (0.1 µg/ kg) o combinaciones de Olodaterol con Tiotropio o Formoterol con Tiotropio por inhalación. Los siguientes parámetros fueron medidos:

Presión Tras pulmonar, resistencia pulmonar y ritmo cardiaco. Las medidas fueron hechas en cinco periodos de tiempo distintos (10 min, 30 min, 6 h, 12 h, y 24 h después de cada administración) en el mismo animal bajo anestesia a corto plazo usando propofol. En cada periodo de tiempo la constricción bronquial fue inducida por una inyección intravenosa de 10 µg/ kg de acetilcolina (es decir un reto con ACh). Adicionalmente, los niveles sanguíneos de potasio, glucosa y lactato como también el ritmo cardiaco fueron medidos.

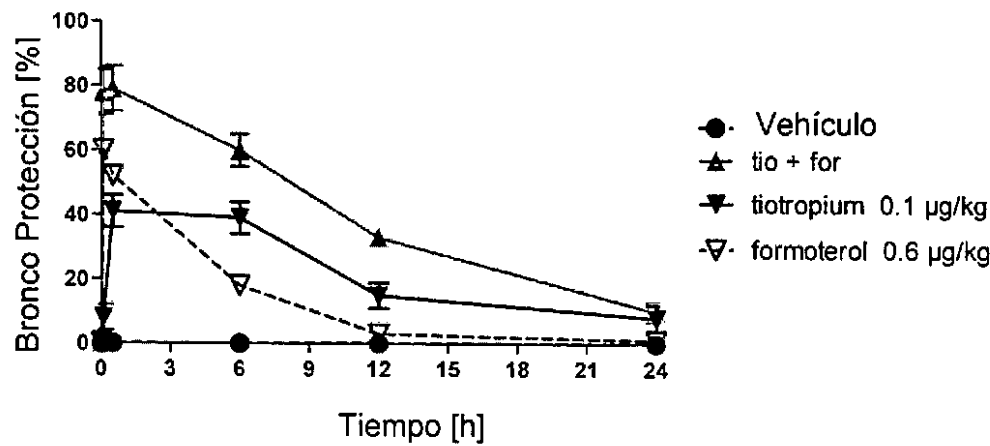
La administración combinada de Tiotropio y Olodaterol resulto en una protección bronquial sinérgica clara en este modelo. Particularmente en una menor dosis de 0.3 µg / kg de Olodaterol este efecto parece ser significativamente mayor que los valores resumidos de las mono- terapias respectivas. Esto es muy obvio 12 y 24 horas después de la inhalación de los compuestos de prueba. Ningún efecto secundario relevante fue observado con respecto a los niveles sanguíneos de potasio, glucosa y lactato después de las administraciones combinadas de Tiotropio y Olodaterol. Efectos relevantes en el ritmo cardiaco no fueron observados en la combinación de Olodaterol con Tiotropio. La combinación de Formoterol con Tiotropio obtuvo protección bronquial sinérgica a 12 horas pero no a las 24 horas. Aun más, se registro un incremento en el ritmo cardiaco durante las primeras horas después de la administración de la droga. **Por los efectos sinérgicos bronco protectores, la combinación de Tiotropio anti colinérgico de acción prolongada y el agonista beta 2 de acción prolongada, Olodaterol, es una mejor opción terapéutica que la combinación de Tiotropio con compuestos de dos veces al día como el Formoterol, para pacientes que sufren de enfermedades de obstrucción de vías respiratorias.**



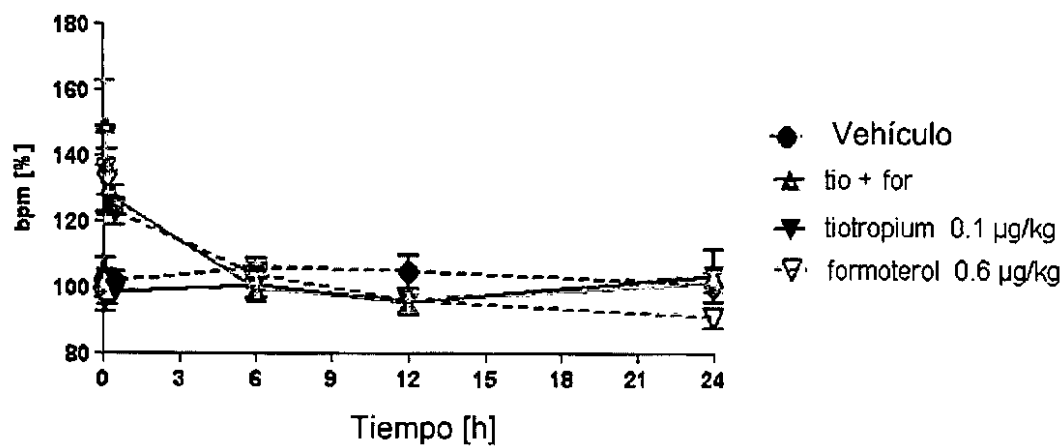
Protección bronquial de la combinación entre Olodaterol (0.3 µg / kg) y Tiotropio (0.1 µg / kg) contra los bronco espasmos inducidos por acetilcolina en perros anestesiados).



Protección bronquial de la combinación entre Olodaterol (0.6 µg / kg) y Tiotropio (0.1 µg/ kg) contra los bronco espasmos inducidos por acetilcolina en perros anestesiados.



Protección bronquial de la combinación entre Formoterol (0.6 µg /kg) y Tiotropio (0.1 µg /kg) contra los bronco espasmos inducidos por acetilcolina en perros anestesiados.



Efecto de la combinación entre Formoterol (0.6 µg /kg) y Tiotropio (0.1 µg /kg) en el ritmo cardiaco (bpm) por 24 h en perros anestesiados.

4.2.3 Ejemplo Olodaterol + Tiotropio + Ciclesonida - Perro bajo Constricción bronquial por 3 + 24 horas:

Animales

Perros Beagle machos y hembras con un peso corporal en un rango desde 10 – 14 kg son obtenidos de las estaciones de crianza internas. Los animales se mantienen en la perrera

local de la casa de animales, ayunados por la noche antes del experimento, pero tienen acceso libre al agua de beber.

Anestesia y Preparación

Anestesia es inducida por inyección intravenosa rápida de 10 mg/ kg de propofol seguida por una infusión intravenosa de 30 mg/ kg/h propofol dentro de la vena cefálica. Los perros son intubados y después ventilados con presión controlada por volumen con una mezcla de aire ambiental y oxígeno (3:1) usando un respirador Siemens a un ritmo de 15 golpes por minuto. La ventilación óptima es asegurada por medición regular del estado ácido- base y la saturación de oxígeno en la sangre. La vena cefálica contra lateral es preparada para las inyecciones de acetilcolina (ACh). Electrodo adhesivos son puestos dentro de la piel rasurada localmente de las cuatro patas y son usados para grabación ECG de las marcaciones de las extremidades para la evaluación del ritmo cardíaco.

La presión tras pulmonar es monitoreada por medio de un transductor de presión diferencial (Sensortech GmbH, Puchheim, Alemania) usando un catéter conectado con el tubo endotraqueal. Un tubo-Fleisch tipo 1 (Hugo Sachs Elektronik- Harvard Aparato GmbH, March Hugstetten, Alemania) es conectado con el tubo endotraqueal para las medidas neumotacográficas del flujo respiratorio. La temperatura corporal es mantenida a 37- 38 °C por medio de una cuna térmica.

Protocolo Experimental

Un periodo de control de 30 minutos después de completarse la instrumentalización. Después, un primer tratamiento inhalado es llevado a cabo después de un intervalo de observación de 3 horas. Acetilcolina es inyectado repetidamente de forma intravenosa a una dosis de 10 µg/ kg para la inducción del espasmo bronquial transitorio (aprox. 30% de incremento en resistencia bronquial) en los lapsos de tiempo: - 45 min, - 30 min, y - 15 min antes de la inhalación de la droga y después 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, y 180 minutos después de la inhalación de la droga. El compuesto es dado inhalado en 5 activaciones de 10 µl (cada accionamiento) con el uso de un inhalador de niebla suave. Los compuestos dados como combinaciones son solubilizados juntos y también administrados en 5 activaciones de 10µl en el mismo inhalador de niebla suave. Los

parámetros cardiovasculares son evaluados en los mismos periodos inmediatamente antes de la inducción de los espasmos bronquiales. La protección bronquial del compuesto también es evaluado durante 24 horas. A los perros se les permite levantarse después del estudio de 3 horas y son anestesiados 20 horas después (ej. 23 horas después de la administración de la droga) para la medida del valor de 24 horas (descrito previamente). Al final del experimento, los perros se despiertan y serán reutilizados después de un periodo de lavado de por lo menos 4 semanas.

Drogas

Los compuestos son disueltos en 100% etanol a concentraciones que permitan su administración en 5 activaciones de 10 µl (en cada accionamiento) con el uso de un inhalador de niebla suave. Los compuestos suministrados como combinación también son disueltos en la misma solución de 100 % etanol y administrados en 5 accionamientos de 10 µl. La acetilcolina disuelta en salina, es administrada de manera intravenosa (Acetilcolina oftálmica Dispers de Dispersa GmbH Germering, Alemania). Propofol (Propofol –Lipuro 2 %) es de B Braun Melsungen AG, (D- 34209 Melsungen, Alemania). Bromuro de Tiotropio, Olodaterol y ciclesonida fueron sintetizados por el Departamento de Desarrollo Químico de Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG.

Resultado

La duración del efecto inhibitor del bromuro de Tiotropio en combinación con el Olodaterol y Ciclesonida en constricción bronquial inducida por acetilcolina sobre un periodo de 24 horas después de una única administración fue investigada en comparación a las mono- terapias respectivas. La meta de este estudio fue la investigación de potenciales efectos sinérgicos de la administración combinada de bromuro de Tiotropio con Olodaterol y ciclesonida en un modelo de constricción bronquial inducida por ACh en el perro en el curso de 24 horas. Para evaluar los efectos sinérgicos, dosis de ambos bromuro de Tiotropio y Olodaterol fueron escogidos para lograr una protección bronquial máxima de 50%. Es importante aclarar que la Ciclesonida no era conocida por proporcionar ninguna protección bronquial. Por lo tanto, un efecto aditivo de las combinaciones podría ser medido.

Cada compuesto o vehículo fue inhalado como una mono- terapia: Bromuro de Tiotropio a 0.06 µg / kg, Olodaterol a 0.3 µg / kg y Ciclesonida a 0.1 mg / kg. La combinación triple fue después evaluada por inhalación. Los siguientes parámetros fueron medidos: presión tras pulmonar, resistencia pulmonar y ritmo cardíaco. Las medidas fueron tomadas en diferentes lapsos de tiempo (-45, -30, -15, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos) después del tratamiento inicial, en el mismo animal bajo anestesia usando propofol. La protección bronquial del compuesto también fue evaluada 24 horas después de la administración de la droga. A los perros se les permitió despertarse después del estudio de 3 horas y fueron anestesiados 20 horas después (ej. 23 horas después de la administración de la droga) para las medidas de un valor de 24 horas. En cada lapso de tiempo, la constricción bronquial fue inducida por una inyección intravenosa de 10 µg/ kg de acetilcolina (= reto- ACh). Adicionalmente el ritmo cardíaco fue medido.

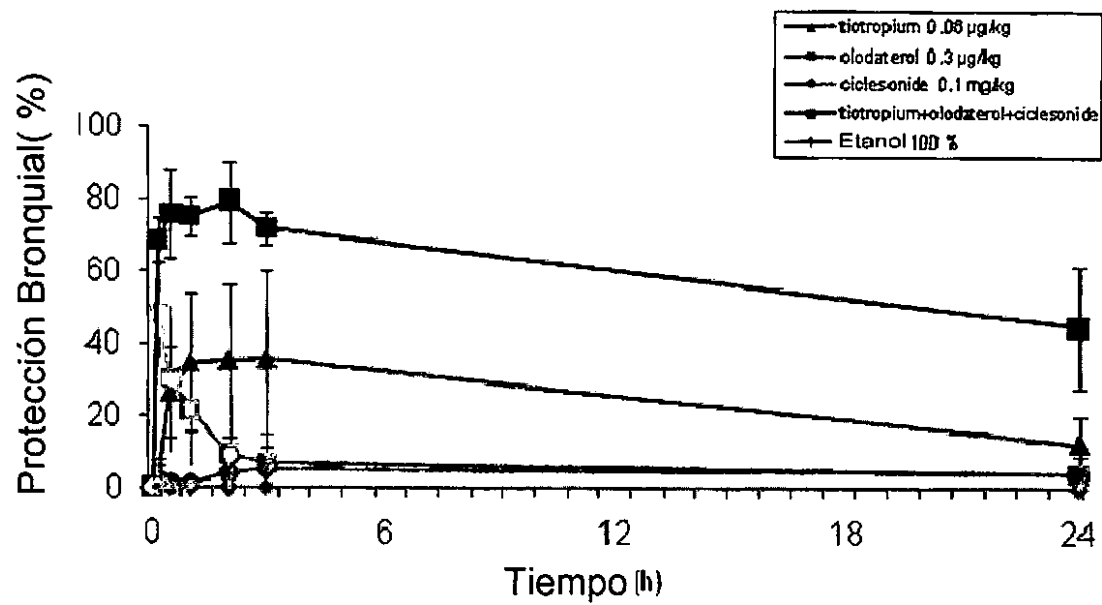
El bromuro de Tiotropio a 0.06 µg/ kg demostró protección bronquial con un lento inicio de acción y logro, una hora después de ser administrado, un efecto máximo de 35 ± 19 % el cual siguió estable por más de 3 horas. Al final del estudio, el bromuro de Tiotropio aun mantuvo una protección bronquial de 12 ± 7 %.

El Olodaterol aplicado en 0.3 µg /kg demostró protección bronquial con un rápido inicio de acción y un efecto máximo de 48 ± 11 % dentro de los primeros 10 minutos después de ser administrado. Después su actividad se redujo rápidamente a 7 ± 10 % a las tres horas y a 4 ± 6 % a las 24 horas. La ciclesonida aplicada a 0.1 mg/ kg solo indujo una leve protección bronquial de 5 ± 10 %, 3 horas después de la inhalación de la droga la cual se mantuvo constante durante 24 horas.

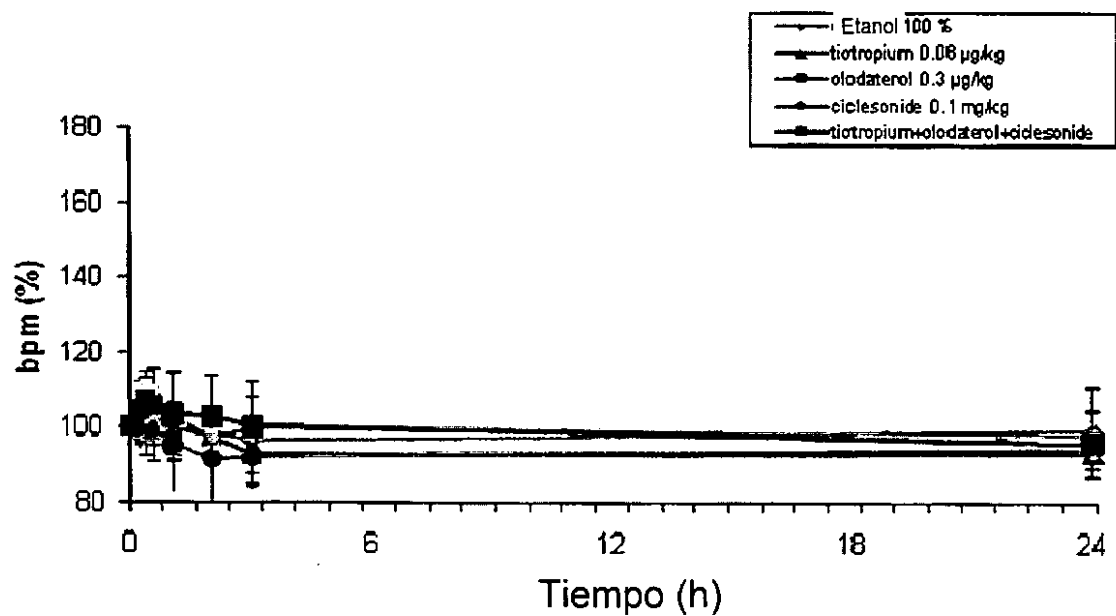
Comparado a la eficacia de cada mono- terapia, la combinación triple de dosis sub-máximas de bromuro de Tiotropio (0.06 µg/ kg) con Olodaterol (0.3 µg/ kg) y ciclesonida (0.1 mg/ kg) resulto en una protección bronquial mayor- que- aditiva inesperada de 72 ± 5 % a las 3 horas y de 45 ± 17 % después de 24 horas.

La administración combinada de bromuro de Tiotropio con Olodaterol y Ciclesonida resulto en una protección bronquial sinérgica muy clara en este modelo. Esto es

demasiado obvio a las 3 y 24 horas después de la inhalación de los compuestos de prueba.



Protección bronquial de la combinación entre Olodaterol, Tiotropio y Ciclesonida contra los espasmos bronquiales inducidos por acetilcolina en perros anestesiados.



El efecto de la combinación triple: bromuro de Tiotropio, Olodaterol, Ciclesonida en el ritmo cardíaco por 24 horas en perros.

4.2.4 Ejemplo Olodaterol + Tiotropio + Ciclesonida – Conejillo de indias bajo Constricción bronquial:

Animales

Conejillos de indias Dunkin- Harley machos y hembras son obtenidos del Centro de Crianza Animal Experimental de Harlan Winkermann (Alemania). Después de ayunar por la noche, pero con acceso libre al agua de beber, los animales con un peso corporal de 400 – 500 g fueron usados.

Anestesia y preparación

Una pesa profunda con pentobarbital fue usada antes del reto de ovalbúmina. La anestesia fue inducida por una inyección intra peritoneal de 50 mg/ kg de pentobarbital. La anestesia prolongada por una infusión intravenosa de pentobarbital (15 mg/ kg/ h) a través de la vena ocular yugular. Una cánula traqueal fue introducida después de la traqueotomía para la ventilación artificial.

Los espasmos bronquiales fueron archivados con una versión modificada del método de Konzett- RÖBler descrito por Walland et al, 1997 [Walland A, Palluk R, Burkard S, Hammer R. Compensación de efectos bronquiales muscarínicos de talsaclidina por activación simpática concomitante en conejillos de indias. Resumen Europeo de Farmacología. 1997; Volumen 330: 213- 219]. Los animales fueron ventilados por medio de una bomba de pistones (ventilador starling, Hugo Sachs Elektronik, Alemania) a un volumen de golpe de 1 ml/100 g de peso corporal y a un ritmo de 60 golpes por minuto.

Los tubos los cuales conectaban la cánula traqueal con el ventilador fueron provistos con una rama que llegaba al transductor de espasmos bronquiales (transductor de espasmos bronquiales 7020, Ugo Basile, Italia). Las mediciones del flujo de aire fueron basadas en el principio Anemómetro de cableado caliente. Cualquier flujo de aire reducirá la temperatura del cable, por lo tanto reduciendo su resistencia en proporción al flujo. Mientras que el elemento del cable sea una rama de un puente Weaststone, las variaciones en la resistencia generaran una salida de voltaje proporcional la cual abastece el sistema amplificador/ archivador (Notocord-hem, Notocord, Francia).

La presión sanguínea y el ritmo cardíaco fueron monitoreados desde la arteria carótida para así revisar la anestesia y la variabilidad de la preparación.

Protocolo Experimental

Los conejillos de indias fueron sensibilizados en 2 días consecutivos con 20 µg OVA (Sigma, St. Louis, MO) y 20 mg Al (OH)₃ en 0.5 ml de salina, la cual fue administrada de forma subcutánea. Los experimentos, los cuales incluyeron el reto OVA, fueron conducidos 2 semanas después de la sensibilización.

Aproximadamente 2 horas antes del reto OVA, los animales fueron anestesiados con una inyección intra peritoneal de 50 mg/ kg de pentobarbital. La anestesia fue prolongada por una infusión intravenosa de pentobarbital (15 mg/ kg/ h) a través de la vena yugular. Una cánula traqueal fue introducida después de la traqueotomía para la ventilación artificial. La vena yugular interna fue canulada para la inyección de la droga mientras que la arteria carótida fue canulada para la medición de la presión sanguínea y el ritmo cardíaco. 30 minutos después del comienzo de la medición del flujo de aire y la presión sanguínea, OVA a una dosis fija de 50 µg/ kg inhalada usando un inhalador de niebla suave (Respimat®) fue administrada para así inducir una única constricción bronquial. El incremento en la resistencia pulmonar causada por el reto OVA (constricción bronquial) fue archivada por 10 minutos y medida como el sobre flujo (en ml). Los compuestos de prueba de sus combinaciones fueron administrados intra traquealmente como una solución por gotas (200 µl/ animal) 2 horas antes del reto OVA.

Los compuestos fueron evaluados como mono- terapia a dosis de: Ciclesonida: 0.1 mg/ kg; Olodaterol: 0.003 y 0.01 µl/ animal); Olodaterol (0.003 y 0.01 µg/ kg) con una dosis fija de bromuro de Tiotropio (0.1 µg/ kg) y una dosis fija de Ciclesonida (0.1 mg/ kg). Los animales tratados- por vehículo recibieron 200 µl de salina intra traquealmente. Cada grupo contenía de cuatro a seis conejillos de indias.

Al final del experimento a los animales se les hizo la eutanasia con una sobredosis de pentobarbital (100 mg/ kg i.v.). La protección bronquial de la droga (ej. inhibición de la respuesta de OVA constricción bronquial) fue expresada como un porcentaje de la

inhibición del incremento en el sobre flujo inducido por ovalbúmina en el grupo de vehículo. Cada valor representado por el promedio $\pm$ SEM (n= 4- 6).

Drogas

Los compuestos o sus combinaciones fueron disueltos en salina y fueron administrados intra traquealmente como una gota por solución (instilación de 200 μ l/ animal).

La ovalbúmina, nombre huevo de albumina liofilo (Serva electroforesis GmbH, numero de catalogo 11840). Pentobarbitona (Narcoren®) es de Rhone Merieux GmbH, (88471 Laupheim, Alemania). El bromuro de Tiotropio, Olodaterol y Ciclesonida fueron sintetizados por el Departamento de Desarrollo Químico de Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG.

Resultados

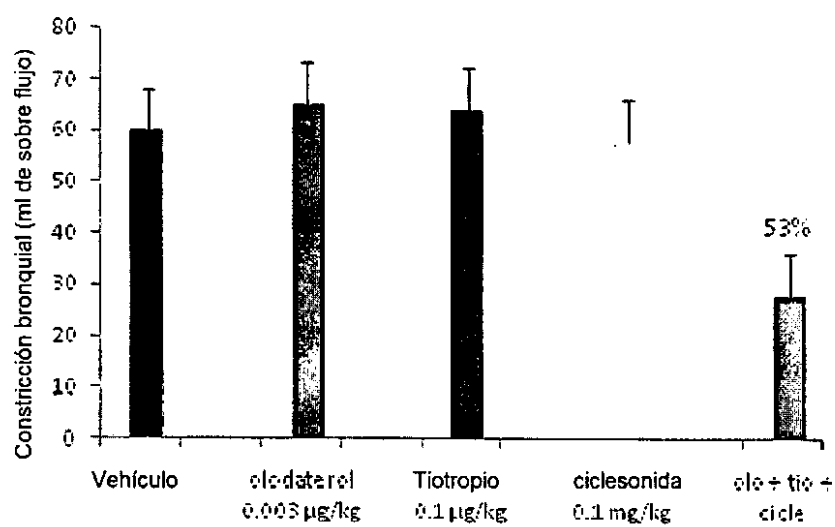
El resultado inhibitor del Olodaterol en combinación con el bromuro de Tiotropio y Ciclesonida en la constricción bronquial inducida por ovalbúmina después de una única administración fue investigada en comparación a las mono- terapias respectivas. La meta del estudio fue investigar los efectos sinérgicos potenciales de la administración combinada de bromuro de Tiotropio con Olodaterol y Ciclesonida en un modelo de constricción bronquial inducida por OVA en el conejillo de indias anestesiado.

Cada compuesto o vehículo fue inducido como mono- terapia: bromuro de Tiotropio a 0.1 μ g/ kg, Olodaterol a 0.003 μ g/ kg o 0.01 μ g/ kg y ciclesonida a 0.1 mg/kg. La combinación triple después fue evaluada por instilación intra traqueal. El incremento en la resistencia pulmonar causada por el reto OVA (constricción bronquial) fue archivada por 10 minutos y medida como el sobre flujo (en ml).

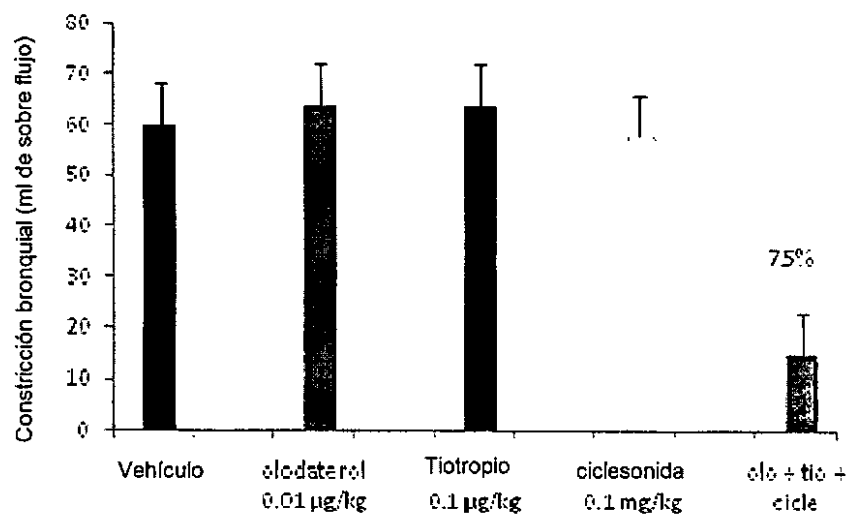
Comparado al grupo vehicular (constricción bronquial de 60 ml de sobre flujo), ninguno de los compuestos administrados como una mono- terapia demostró protección bronquial contra la constricción bronquial inducida por OVA en el conejillo de indias anestesiado.

Por otro lado, la combinación triple de bromuro de Tiotropio con Olodaterol y Ciclesonida resulto una protección mas- que- aditiva **inesperada** de $53 \pm 8\%$ con Olodaterol a $0.003 \mu\text{g/ kg}$ y $75 \pm 10 \%$ con Olodaterol a $0.01 \mu\text{g/ kg}$.

La administración combinada de bromuro de Tiotropio con Olodaterol y Ciclesonida resulto en una claramente inesperada protección bronquial sinérgica en este modelo.



La protección bronquial de la combinación entre Olodaterol ($0.003 \mu\text{g/ kg}$), Tiotropio y Ciclesonida contra la constricción bronquial inducida por ovalbúmina en conejillos de indias anestesiados.



Protección bronquial de la combinación entre Olodaterol (0.01 µg/ kg), Tiotropio y Ciclesonida contra la constricción bronquial inducida por ovalbúmina en conejillos de indias anestesiados.

4.2.5 Conclusiones:

Así las cosas, considerando que la composición de la presente invención presenta un efecto sinérgico en cuanto a la bronco protección, tal como se demostró en los ejemplos anteriores, queda demostrado la ventaja de la composición reclamada, por lo tanto es claro que la presente invención resuelve un problema no antes resuelto en el estado de la técnica y que proporciona un efecto sorprendente e inesperado, lo cual no ha sido tenido en cuenta por el Examinador.

En consecuencia, no sería obvio para una persona versada en la materia obtener los polvos de la presente invención a partir de las enseñanzas de D1 y D2, debido a que dichas anterioridades no incitan a hacerlo con la expectativa de resolver el problema técnico resuelto por la presente invención.

Solicitamos atentamente tener en cuenta los argumentos anteriores, los cuales consideramos demuestran de manera suficiente que la presente solicitud es inventiva sobre el arte previo de manera que las objeciones formuladas a este respecto se ven superadas.

Puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, respetuosamente solicito se continúe con su tramitación. Sin embargo, en el evento que el Despacho considere que una modificación adicional es necesaria, respetuosamente le solicito hacer uso de la facultad que le otorga el artículo 45 inciso 2 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina a efecto de requerir nuevamente de nuestra parte cualquier complementación o aclaración.

5. Anexos.

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 12 reivindicaciones.
- Formulario para modificaciones.
- Apéndice I.

Señor Director,

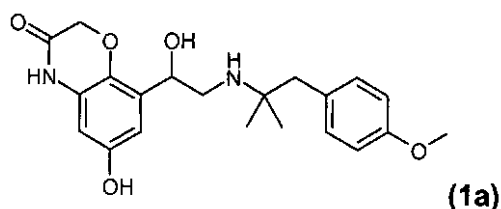
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
T.P.A. No. 23.555
CC. 35.456.444 de Usaquén

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1	SOLICITUD DE: ☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud	
2 SOLICITANTE	Nombre: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania. Dirección: 55216 Ingelheim am Rhein, Alemania Domicilio: Ingelheim am Rhein, Alemania Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	IDENTIFICACION C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: Luz Clemencia de PAEZ Dirección: Carrera 4ª No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com	IDENTIFICACION C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número: <u>35.456.344</u> TP <u>23.555</u>
4	Número de expediente: <u>06.106.509</u>	
5	Descripción de la corrección o modificación solicitada: Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 12 reivindicaciones con el fin de superar las objeciones hechas por Su Despacho a la presente solicitud de patente y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.	
6	Comprobante de pago No. _____ Fecha: _____	
7	Anexos ☐ Comprobante de pago de la tasa por \$118.000, por concepto de modificaciones. ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por. ☐ Poderes, si fuere el caso ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.	
8	NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ FIRMA: <u>Luz Clemencia de Paez</u> C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555	

REIVINDICACIONES

1. Composición caracterizada porque comprende de 0.1 a 1000 µg de un compuesto de la fórmula 1a,



y adicionalmente de 0.1 a 80 µg de una sal de tiotropio (2a.1) y opcionalmente de 1 a 1000 µg de ciclesonida (2c.11), eventualmente en forma de sus racematos, enantiómeros o diastereoisómeros y eventualmente en forma de sus sales y derivados, sus solvatos y/o hidratos.

2. Composición según la reivindicación 1 caracterizada porque comprende de 0.1 a 1000 µg de un compuesto de la fórmula 1a y adicionalmente de 0.1 a 80 µg de una sal de tiotropio (2a.1).

3. Composición según la reivindicación 1 caracterizada porque comprende de 0.1 a 1000 µg de un compuesto de la fórmula 1a y adicionalmente de 0.1 a 80 µg de una sal de tiotropio (2a.1) y de 1 a 1000 µg de ciclesonida (2c.11), eventualmente en forma de sus racematos, enantiómeros o diastereoisómeros y eventualmente en forma de sus sales y derivados, sus solvatos y/o hidratos.

4. Composiciones de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que contienen un compuesto de fórmula 1a en forma del distinto isómero óptico, mezclas de los distintos enantiómeros o racematos.

5. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que contienen un compuesto de fórmula general 1a en forma de sales por adición de ácidos con ácidos farmacológicamente inocuos, así como eventualmente en forma de los hidratos.

6. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque existe como forma de administración apropiada para inhalación.

7. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque se trata de una forma de administración seleccionada del grupo polvos para inhalación, aerosoles dosificadores con contenido de gas propelente y disoluciones o suspensiones para inhalación sin gas propelente.

8. Composición de acuerdo la reivindicación 6, caracterizada porque la forma de administración es un polvo para inhalación que contiene un compuesto de la fórmula 1a, una sal de tiotropio (2a.1) y ciclesonida (2c.11) en mezcla con coadyuvantes apropiados fisiológicamente inocuos seleccionados del grupo compuesto por monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, polialcoholes, sales o mezclas de estos coadyuvantes entre sí.

9. Composición de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque la forma de administración es un aerosol para inhalación con contenido de gas propelente que contiene un compuesto de la fórmula 1a, una sal de tiotropio (2a.1) y ciclesonida (2c.11) en forma disuelta o dispersa.

10. Composición de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizada porque el aerosol para inhalación contiene como gas propelente hidrocarburos tales como n-propano, n-butano o isobutano o hidrocarburos halogenados tales como derivados clorados y/o fluorados del metano, etano, propano, butano, ciclopropano o ciclobutano.

11. Composición de acuerdo con la reivindicación 10, caracterizada porque el gas propelente representa TG11, TG12, TG134a, TG227 o sus mezclas, con preferencia TG134a, TG227 o una de sus mezclas.

12. Composición de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque en el caso de la forma de administración se trata de una disolución o suspensión para inhalación sin gas propelente que, como disolvente, contiene agua, etanol o una mezcla de agua y etanol.

Apéndice 1

Análisis Celular

CHO β 1

Determinación de agonismo de receptor adrenérgico Beta 1, por la estimulación de la síntesis cAMP en células CHO.

Determinación de EC 50 y actividad intrínseca (IA).

Materiales: PBS (Cat. No. # 14190- 169), DMEM medio (Cat No. # 31966- 021), Pen/Strep (Cat No. # 15140- 106), MEM (Cat.No. # 11140-035), Geneticin (Cat. No. #10131-027), Trypsin/EDTA (Cat.No. #25300-054) y Versene (Cat.No. #15040-033) fueron de Invitrogen. FBS fue de Bio Whittaker (CatNo. #14-602F). HBSS IOx (Cat.No. #14065-049) fue comprado de Gibco BRL. Tween 20 (Cat.No. #37240) fue ordenado de Serva. BSA (Cat.No. # A-7030), DMSO (Cat.No. # D-5879), NaCl (Cat.No. # S-3014), IBMX (Cat.No. # 1-7018), Iso prenalina (Cat.No. # 1-5627) and cAMP (Cat.No. # A-6885) fueron de Sigma. Las placas planas inferiores de área 96- media fueron compradas en Corning (# 3697). La placa de pocillo OptiPlate 384 fue de Packard Bioscience (#6007290). El equipo de detección AlphaScreen cAMP (Cat.-No. 6760600M) fue de BioSignal Packard. Todos los otros materiales fueron del mayor grado disponible comercialmente.

Las células CHO que expresaban el receptor adrenérgico humano beta 1 fueron generados por métodos de biología molecular estándar. Estas células expresan el receptor adrenérgico humano. La secuencia descrita en (Frielle et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7920-7924, 1987).

Método:

Medio de cultura:	DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep, 1% MEM, 1mg/ml Geneticin
Solución reguladora de estimulación:	0.1%BSA, 0.5 mM IBMX, 5 mM Hepes, 1x HBSS (I Ox)
Solución reguladora de lisis:	0.3% Tween 20, 5 mM Hepes, 0.1% BSA
Solución reguladora de gota:	0.1%BSA, 6% 50mM Hepes, 4% HBSS

Las células CHO son cultivadas a 70- 80% de confluencia. Después de lavar las células 3x con PBS, las células fueron separadas usando Versene y resuspendidas en 10 ml de solución reguladora de estimulación. Después de centrifugación (5 min 900 rpm), el sobrenadante fue removido y las células fueron re suspendidas en 10ml de la solución reguladora de estimulación seguida por otro paso de centrifugación. Después las células fueron ajustadas a 0.65×10^6 células/ ml usando la solución

reguladora de estimulación usando el sistema Casy.

10 µl de los compuestos de prueba diluidos en 0.9% NaCl (concentración final de compuestos: 0.1 nM a 10 µM; DMSO 1%) fueron añadidos a la placa de pocillo 96 y fueron mezclados con 20 µl de la suspensión celular. Después de la incubación de 30 minutos a RT, 20 µl de la solución reguladora de lisis son añadidos seguidos por una incubación de por lo menos 30 min en hielo 5 µl de la suspensión celular lisada son después transferidos cuádruplicados dentro de una placa de pocillo 384, seguidos por la adición de 10 µl de granos selectores (concentración final de 15 µg/ml en la solución reguladora de granos). Las placas son incubadas en RT por 30 min en la oscuridad ante 10 µl de los granos donantes (concentración final de 20 pg/ml en la solución reguladora de granos) que incluye.

cAMP biotinizada (concentración final de 10 nM) son añadidos. Después de la incubación de por lo menos 2 h, el análisis es medido usando un lector de Fusión (Packard Bioscience).

Los conteos resultantes de la malla Alfa (=ASC) son recalculados directamente como producción cAMP usando la curva estándar cAMP.

Cada micro placa de evaluación contiene pocillos con los controles vehiculares (1% DMSO, células no estimuladas) en referencia por la no estimulación (0% CTL; valores bajos) y pocillos estimulados con iso prenalina (1×10^{-5} M concentración final) como controles positivos (100% CTL; valores altos).

La determinación de la actividad intrínseca (IA): el análisis de la información es llevada a cabo por la calculación del porcentaje de cAMP en la presencia del compuesto de prueba comparado al cAMP generado del control positivo:

$$((\text{cAMP (muestra)} - \text{cAMP (valor bajo)}) * 100) / (\text{cAMP (valor alto)} - \text{cAMP (valor bajo)}))$$

Un agonista del receptor beta 1 dará unos valores IA entre 0 % CTL (sin estimulación) y usualmente < 200% ctl (100% correspondientes a la estimulación de referencia por 1×10^{-5} m concentración final de iso prenalina).

La determinación de la concentración efectiva 50 (EC50): es determinada al aplicar el % CTL de información obtenida a varias concentraciones de cada

compuesto para el programa de cuadro grafico de prisma. La información es reportada como nano molar (nM).

CHO β 2

Determinación del agonismo Beta 2 del receptor adrenérgico, por estimulación de la síntesis cAMP en células CHO. Determinación de EC 50 y IA.

Materiales: PBS (Cat.No. #14190-169), DMEM medio (CatNo. #31966-021), Pen/Strep (CatNo. #15140-106), MEM (Cat.No. #11140-035), Geneticin (Cat.No. #10131-027), Trypsin/EDTA (Cat.No. #25300-054) y Versene (Cat.No. #15040-033) fueron de Invitrogen. FBS fue de Bio Whittaker (CatNo. #14-602F). HESS IOx (Cat.No. #14065-049) fue comprador de Gibco BRL. Tween 20 (Cat.No. #37240) fue ordenado de Serva. BSA (Cat.No. #A-7030), DMSO (Cat.No. #D-5879), NaCl (Cat.No. #S-3014), IBMX (Cat.No. #I-7018), Iso prenalina (Cat.No. #1-5627) y cAMP (Cat.No. #A-6885) fueron de Sigma. Las placas planas inferiores de área 96-media fueron compradas en Corning (#3697). La OptiPlate placa de pocillo 384 fue de Packard Bioscience (#6007290). El equipo de detección cAMP AlphaScreen (Cat.-No. 6760600M) fue de BioSignal Packard. Todos los demás materiales fueron del mayor grado disponible comercialmente.

Las células CHO que expresan el receptor adrenérgico humano Beta 2 fueron generadas por técnicas biológicas moleculares estándar.

Método:

Medio de cultura:	DMEM, 10% FBS, 1% Pen/Strep, 1% MEM, 1mg/ml Geneticin
Solución reguladora de estimulación:	0.1%BSA, 0.5 mM IBMX, 5 mM Hepes, 1x HBSS (I Ox)
Solución reguladora de lisis:	0.3% Tween 20, 5 mM Hepes, 0.1% BSA
Solución reguladora de gota:	0.1%BSA, 6% 50mM Hepes, 4% HBSS

Las células CHO son criadas a 70- 80% de confluencia. Después de lavar las células 3x con PBS, las células fueron separadas usando Versene y re suspendidas en 10 ml de solución reguladora de estimulación. Después de centrifugación (5 min 900 rpm), el sobrenadante fue removido y las células fueron re suspendidas en 10 ml de la solución reguladora de estimulación seguida por otro paso de centrifugación. Después las células fueron ajustadas a 0.65×10^6 células/ ml usando la solución reguladora de estimulación usando el sistema Casy.

10 µl de los compuestos de prueba diluidos en 0.9% NaCl (concentración final de compuestos: 0.1 nM a 10 µM; DMSO 1%) fueron añadidos a la placa de pocillo 96 y fueron mezclados con 20 µl de la suspensión celular. Después de la incubación de 30 minutos a RT, 20 µl de la solución reguladora de lisis son añadidos seguidos por una incubación de por lo menos 30 min en hielo 5 µl de la suspensión celular lisada son después transferidos cuádruplicados dentro de una placa de pocillo 384, seguidos por la adición de 10 µl de granos selectores (concentración final de 15 µg/ml en la solución reguladora de granos). Las placas son incubadas en RT por 30 min en la oscuridad ante 10 µl de los granos donantes (concentración final de 20 µg/ml en la solución reguladora de granos) que incluye cAMP biotinizada (concentración final de 10 nM) son añadidos. Después de la incubación de por lo menos 2 h, el análisis es medido usando un lector de Fusión (Packard Bioscience). Los conteos restantes de la maya Alfa (=ASC) son re calculados directamente como producción cAMP usando una curva estándar cAMP.

Cada micro placa de evaluación contiene pocillos con los controles vehiculares (1% DMSO, células no estimuladas) en referencia por la no estimulación (0% CTL; valores bajos) y pocillos estimulados con iso prenalina (1×10^{-5} M concentración final) como controles positivos (100% CTL; valores altos).

La determinación de la actividad intrínseca (IA): el análisis de la información es llevada a cabo por la calculación del porcentaje de cAMP en la presencia del compuesto de prueba comparado al cAMP generado del control positivo:

$$((\text{cAMP (muestra)} - \text{cAMP (valor bajo)}) * 100) / (\text{cAMP (valor alto)} - \text{cAMP (valor bajo)}))$$

Un agonista del receptor beta 1 dará unos valores IA entre 0 % CTL (sin estimulación) y usualmente < 200% CTL (100% correspondientes a la estimulación de referencia por 1×10^{-5} m concentración final de iso prenalina)

La determinación de la concentración efectiva 50 (EC50): es determinada al aplicar el % CTL de información obtenida a varias concentraciones de cada compuesto para el programa de cuadro grafico de prisma. La información es reportada como nano molar (nM).