

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

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

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 700 4814
Fax in U.S.A.: (1-305) 675 7743

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

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-121216- -00015-0000

Fecha: 2012-07-05 16:21:34 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 15

Referencia : Expediente No. **06.121.216**
Asunto : Solicitud de patente para: **COMBINACIÓN QUE
COMPRENDE UN INHIBIDOR DE DPE-4 Y UN
ANTAGONISTA DE LOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS
M3 EL CUAL ES (3R)-2-FENETIL-3-(9H-XANTEN-9-
CARBONILOXI)-1-AZONIABICICLO[2.2.2]OCTANO**
Solicitante : **LABORATORIOS ALMIRALL, S.A.**
Clase : A61K 031/137, A61K 031/167, A61K 031/439,
Fecha de Solicitud : 30 de noviembre de 2006

1. Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, me refiero al oficio No. **2832** notificado por fijación en lista del 24 de febrero de 2012.

2. Mediante memorial radicado el día 11 de mayo de 2012 solicité plazo de treinta (30) días para atender el oficio No. **2832**.

3. Mediante oficio No. **2832** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones realizadas en el oficio son las siguientes:

3.1 Unidad de invención

El Examinador considera que la presente solicitud no cumple con el requerimiento de unidad de invención y afirma que existen dos grupos inventivos, uno correspondiente a la composición con roflumilast y otro correspondiente a la composición con oglemilast.

3.2 Nivel inventivo

Se considera que los documentos D1: WO 0104118 y D2: MXPA03008045 afectan el nivel inventivo de la presente solicitud. El Examinador afirma que la persona del oficio normalmente versada en la materia incluiría el compuesto bromuro de (3R)-2-fenetil-3-(9h-xanten-9-carboniloxi)-1-azoniabicyclo[2.2.2]octano revelado en D1, en las composiciones reveladas en D2 (cambiando el bromuro de tiotropio por el LAS35201) con la expectativa razonable de obtener un efecto sinérgico por cuanto este ya había sido revelado en D2 para llegar así al objeto de la reivindicación 1 de la presente solicitud.

4. Respuesta a las objeciones

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

4.1 Modificación de una solicitud en trámite

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 2 reivindicaciones.

Así siguiendo las amables sugerencias del Examinador y con el fin de presentar un único concepto común inventivo se ha limitado el alcance de la solicitud a la composición farmacéutica que comprende:

- el inhibidor de PDE4 roflumilast y
- el antagonista de los receptores muscarínicos (3R)-2-fenetil-3-(9h-xanten-9-carboniloxi)-1-azoniabicyclo[2.2.2]octano en la forma de una sal que tiene un anión X, que es un anión farmacéuticamente aceptable de un ácido mono- o polivalente

y en la cual la proporción en peso (b) a (a) es 1:5 a 500:1.

Como puede ser establecido por una persona medianamente versada en la materia, el nuevo pliego reivindicatorio cumple tanto con el requerimiento de unidad de invención como con el requerimiento de nivel inventivo como se demostrará a continuación:

4.2 Argumentos a favor del nivel inventivo de la presente solicitud

Teniendo en cuenta el Artículo 18 de la Decisión 486 y el recientemente publicado “Instructivo Examen de Solicitudes de Patentes de Invención y Modelo de utilidad”, es posible establecer que un documento del estado de la técnica o una combinación de ellos no puede afectar el nivel inventivo de una solicitud, cuando no contiene enseñanzas claras que le permitan a una persona medianamente versada en la materia derivar de manera obvia la invención.

Igualmente, dentro de los indicios de nivel inventivo se define un efecto técnico sorprendente contribuido por la invención al arte.

Ahora bien, respetuosamente nos apartamos de la posición del Examinador y consideramos que la presente solicitud sí cumple con el requerimiento de nivel inventivo, según el Artículo 18 de la Decisión 486, como se demuestra a continuación:

En primer lugar, es relevante mencionar que tal como reconoce el Examinador, el documento D2 solamente revela combinaciones de inhibidores de PDE4 con el antagonista M3 específico triotropio.

En el estado del arte existen varios documentos que claramente demuestran que la adición de roflumilast al LAS 35201 incrementa significativamente la broncoprotección, cuando se compara con el efecto observado para el LAS35201 administrado de manera individual.

En particular, se adjunta al presente memorial un documento que reporta resultados experimentales y que demuestra el efecto inesperado aportado por la composición de la presente invención.

Por ejemplo en dicho anexo, el aparte titulado “EFECTOS SOBRE LA BRONCOCONSTRICCIÓN INDUCIDA CON ACETILCOLINA DE BROMURO DE (3R)-2-FENETIL-3-(9H-XANTEN-9-CARBONILOXI)-1-AZONIABICICLO[2.2.2]OCTANO (LAS35201), ROFLUMILAST Y SU COMBINACIÓN ADMINISTRADOS POR INHALACIÓN A CERDOS DE GUINEA” demuestra que el LAS35201 administrado de manera individual logró un 33% de inhibición de la broncoconstricción. Por su parte, el roflumilast administrado de manera individual tuvo un efecto negativo sobre la broncoconstricción. Sin embargo, cuando los dos medicamentos fueron administrados conjuntamente se obtuvo un incremento significativo de 41% para la inhibición de la broncoconstricción.

En contraste, el aparte titulado “EFECTOS SOBRE LA BRONCOCONSTRICCIÓN INDUCIDA CON ACETILCOLINA DEL TIOTROPIO Y SU COMBINACIÓN CON ROFLUMILAST EN CERDOS DE GUINEA”, muestra que cuando el tiotropio es combinado con un inhibidor de PDE4 análogo (roflumilast) existe una reducción en la inhibición de la broncoconstricción, al ser comparado con la administración individual de tiotropio.

Por consiguiente es posible establecer que el roflumilast y el LAS35201 interactúan de manera sinérgica para proveer un efecto broncoprotector mejorado. Dicho efecto no se observa con el tiotropio.

Respecto a las pruebas experimentales adjuntadas al presente escrito, vale la pena mencionar que los cerdos de guinea fueron primeramente sometidos a una broncoconstricción generada con acetilcolina y que los medicamentos fueron administrados por nebulización. Posteriormente se midió la inhibición de la broncoconstricción. En este procedimiento, cualquier reducción en la broncoconstricción seguida de la inducción de la misma con acetilcolina y después de la administración de los medicamentos indica que los medicamentos permiten una actividad broncoprotectora aguda.

El LAS35201 es un antagonista de M3. Los antagonistas de M3 son una clase de medicamento que es conocida por tener eficacia en lograr broncoprotección. Por esta razón, la inhibición de la broncoconstricción se observa cuando el LAS35201 se administra individualmente. En contraste, el roflumilast es un inhibidor de PDE4. Los inhibidores de PDE4 son una clase de medicamento conocida por tener actividad anti-inflamatoria pero no son activos generalmente para lograr broncoprotección. En un caso normal, la administración de un inhibidor de PDE4 no podría inhibir la broncoconstricción generada con acetilcolina. Esto se demuestra con el cambio despreciable en la broncoconstricción observada para la administración individual de roflumilast.

En consecuencia, resulta altamente sorpresivo para la persona medianamente versada en la materia, que la combinación de LAS35201 y roflumilast resulte en una inhibición incrementada de la broncoconstricción sobre la que se observa para la administración individual de roflumilast. Dado que el roflumilast tiene una actividad despreciable cuando es administrado en monoterapia, resulta inesperado y sorpresivo el efecto sinérgico logrado con el roflumilast combinado con LAS35201, potenciando su actividad broncoprotectora.

Debido a que ninguno de los documentos D1 o D2 revela o sugiere la composición farmacéutica como se reivindica en la presente solicitud y tampoco revela el efecto sinérgico

asociado, éstos no resultan anterioridades válidas capaces de afectar el nivel inventivo de la presente solicitud.

De otro lado y en relación con los resultados del documento WO 2004/084896 citado por el Examinador, es relevante mencionar que éste fue publicado el 07 de octubre de 2004, es decir, **después** de la fecha de prioridad de la presente solicitud (31 de mayo de 2004).

El documento WO 2004/084896 **no podría por lo tanto ser tenido en cuenta para evaluar el nivel inventivo de la presente solicitud.**

Adicionalmente, los resultados presentados en dicho documento se relacionan con un experimento que difiere en muchos aspectos de aquellos llevados a cabo para obtener los resultados experimentales anexados. Por ejemplo, el documento WO 2004/084896 emplea metacolina para inducir la broncoconstricción mientras que en las pruebas experimentales reportadas se emplea acetilcolina. Existen otras diferencias técnicas.

Los resultados reportados en WO 2004/084896 claramente no pueden ser comparados directamente con los anexados a este memorial.

En consecuencia, el documento WO 2004/084896 no resulta una anterioridad válida capaz de afectar el nivel inventivo de esta solicitud y no debe ser tenido en cuenta por el Examinador en el momento de evaluar el efecto técnico otorgado por la composición farmacéutica reivindicada.

5. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por el Examinador, se solicita atentamente proceder al otorgamiento de la solicitud de patente. En este sentido, respetuosamente recordamos al Examinador que la patente no podrá ser negada con base en objeciones diferentes a las expuestas en la acción oficial No. 2832, toda vez que al no haber sido trasladadas a mi representada, dicha decisión violaría tanto el tenor literal del artículo 45 de la Decisión 486 como el derecho constitucional al debido proceso. En este evento, y con base en el inciso 2 del artículo 45, respetuosamente solicitamos al Examinador expedir una nueva acción oficial que permita a mi representada contra argumentar las mismas o modificar la solicitud con el fin de cumplir los requisitos de patentabilidad.

6. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 2 reivindicaciones
- Formulario de modificaciones en solicitud pendiente

CAVELIER
ABOGADOS

- Anexo: Resultados Experimentales

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén
T.P.A. No. 23.555



COLO-06734-845-009-8
JMS\JMS\ID-220933\WPCL6734
No. M-2012-220933\JMS

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
MODIFICACIONES Y/O CORRECCIONES

1. Identificación del Trámite

☐ Error material

☒ Modificación a una Solicitud en trámite

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Registro de Diseño Industrial

☐ Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural

☐

Persona Jurídica

☒

LABORATORIOS ALMIRALL, S.A.

Nombre o denominación / Nombre o razón social completa

Nombre representante legal

Tipo de empresa Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra ☐

Documento de identificación: ☐ C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección y domicilio del titular	Ciudad
España	Ronda del General Mitre 151, 08022 Barcelona	Barcelona
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

☐ Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico

3. Datos del apoderado:

Apellidos y Nombre
De Páez Luz Clemencia

Documento de identificación
C.C. 35.456.344

Tarjeta profesional
T.P.A. 23.555

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 4ª No. 72 –35		Bogotá
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
clientes@cavelier.com	2 11 86 50	3 47 36 11

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

4. Datos del trámite

Corrección:

Expediente No 06.121.216

Aparece

Debe ser

Modificación:

- ☒ **Modificación al capítulo reivindicatorio.**
Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 2 reivindicaciones y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.
Respetuosamente manifiesto que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, 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.
- ☐ **Modificación al capítulo descriptivo.**
- ☐ **Modificación al resumen.**
- ☐ **Modificación a los dibujos.**
- ☐ **Modificación al solicitante.**

5. Anexos

- ☐ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- ☐ Poder, si fuere el caso.
- ☒ Documento que contiene las modificaciones o correcciones.
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético.

6. Firma	
Nombre y apellidos LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	Firma 
C.C. 35.456.344 DE Usaquén	Tarjeta Profesional 23.555

 JMSINCAWPCL6734\ID-220936

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica apropiada para administración tópica en el pulmón, caracterizada porque comprende (a) un inhibidor de PDE4 el cual es 3-(ciclopropilmetoxi)-N-(3,5-dicloro-4-piridinil)-4-(difluorometoxi)-benzamida (roflumilast), opcionalmente en la forma de sus racematos, sus enantiómeros, sus diastereoisómeros y mezclas de los mismos, y opcionalmente sus sales por adición de ácido farmacéuticamente aceptables, y (b) un antagonista de los receptores muscarínicos M3 que es el (3R)-1-fenetil-3-(9H-xanten-9-carboniloxi)-1-azoniabicyclo[2.2.2]octano en la forma de una sal que tiene un anión X, que es un anión farmacéuticamente aceptable de un ácido mono- o polivalente y en la cual la proporción en peso (b) a (a) es 1:5 a 500:1.
2. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque el antagonista del receptor muscarínico M3 (b) es bromuro de (3R)-1-fenetil-3-(9H-xanten-9-carboniloxi)-1-azoniabicyclo[2.2.2]octano.

ANEXO: RESULTADOS EXPERIMENTALES

EFFECTOS SOBRE LA BRONCOCONSTRICCIÓN INDUCIDA CON ACETILCOLINA DE BROMURO DE (3R)-2-FENETIL-3-(9H-XANTEN-9-CARBONILOXI)-1-AZONIABICICLO[2.2.2]OCTANO (LAS35201), ROFLUMILAST Y SU COMBINACIÓN ADMINISTRADOS POR INHALACIÓN A CERDOS DE GUINEA

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Cerdos de nueva guinea Dunkin-Hartley machos (400-600g) fueron obtenidos de Harlan (Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, España). Los animales fueron divididos en grupos de cuatro a cinco a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad 40-70% con ciclos de aire (10 por hora) y durante 12 horas de ciclo claro/oscuro. Los animales fueron alimentados con una dieta de mantenimiento para cerdos de guinea, suplementada con vitamina C (SAFE 114, SAFE, Francia) y se les permitió beber *ad libitum*. Se dejó un periodo de aclimatización de 5 días antes de analizar los animales. Todos los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación del Comité de Ética Animal.

Químicos

Los productos empleados en este estudio fueron obtenidos como se indica a continuación:

Acetilcolina clorhidrato (A-6625) obtenida de SIGMA; Ketamina (Imalgène500) de Merial; Xilacina (Rompun 2%) de BAYER; Acepromazina (Calmo Neosan) de PFIZER; Bromuro de (3R)-2-fenetil-3-(9h-xanten-9-carboniloxi)-1-azoniabicciclo[2.2.2]octano (LAS35201) y roflumilast fueron sintetizados en el Departamento de Química Medicinal de Almirall S.A. Debido a la alta higroscopicidad de los compuestos, estos fueron mantenidos en condiciones secas. LAS35201 y roflumilast fueron preparados diariamente. LAS35201 fue preparado en 1M HCl 1N (de Pancreac) en agua destilada y roflumilast fue disuelto en 30% PEG 300 (polietilenglicol 300, de Merck-Schudardt) 2% NaOH 1N (de Pancreac) in agua destilada (pH 10) y mantenido en agua caliente.

Grupos de Animales

Los animales fueron distribuidos de manera aleatoria en dos grupos:

1. Grupo de control: A los animales se les administró un vehículo (1% HCl 1N en agua destilada o 30% PEG 300, 2% NaOH 1N en agua destilada) por inhalación y se indujo la broncoconstricción con acetilcolina intravenosa (Arc, $30\mu\text{g/kg}$, i.v.)

2. Grupo tratado: A los animales se les administró los compuestos por inhalación y se indujo la broncoconstricción con ACh intravenosa, 1 hora después de la exposición.

Método

Los cerdos de guinea fueron ubicados en una caja de metacrilato (17x17x25 cm) durante un periodo de 10 minutos. Al inicio de este periodo y 5 minutos después se realizó una nebulización con compuesto o vehículo durante un minuto por medio de un nebulizador ultrasónico (Devlbiss Ultraneb 2000, Somerset, PA, USA). Esta nebulización fue llevada a cabo con una mezcla de 5% de CO₂, 21%O₂, 74%N₂ y un flujo de 3 L/minuto. Se generaron aerosoles a partir de soluciones acuosas, empleando la concentración seleccionada para cada compuesto (3µg/ml para el LAS35201 y 30 µg/ml para el roflumilast).

Para la administración inhalada de la terapia de combinación, se nebulizó el roflumilast durante el primer periodo de 10 minutos como se mencionó anteriormente. Luego, manteniendo el animal en la misma caja de metacrilato, se administró el LAS35201 durante el periodo de 10 minutos siguiente.

La evaluación de la actividad anti-broncoconstrictoria de los compuestos fue evaluada una hora después del tratamiento.

Los animales fueron anestesiados con una inyección intramuscular de ketamina (43,8 mg/Kg), xilazina (3,5 mg/Kg) y acepromazina (1,1 mg/Kg). Cuando se requirió, se extendió la anestesia con inyecciones intramusculares adicionales de la mezcla anestésica mencionada. Se canuló la traquea con un tubo de polietileno de 0,50/1,00 mm y se preparó para registrar la resistencia de la vía respiratoria (Raw) empleando un neumotacógrafo (Fleisch, Zabona, Suiza) para monitorear el flujo de aire. Un tubo PE-60 fue insertado en el esófago al nivel del tórax para medir la presión transpulmonar. Se canuló la arteria carótida y la vena yugular para monitorear la presión arterial (Stetham P23XL, Spectramed, Oxnard, California, USA) y administración, respectivamente. Se conectaron transductores a un amplificador de puente (Physiological Recorder PR800 MUMED System, Ltd, London, UK). Se midió la presión intrapulmonar con una conexión lateral a la traquea canulada. La resistencia de las vías respiratorias (Raw) fue calculada con el cociente de los cambios en el flujo y la presión entre puntos isovolumétricos en inspiración y expiración. Estas variaciones en el flujo y presión intrapulmonar y presión arterial se registraron con Lfr Record Vers. 7.1 USB software (Mumed Systems Ltd, London, UK). Durante los experimentos los animales fueron ventilados artificialmente con un ventilador roedor pequeño (Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Comerio-Varese, Italia) a una tasa de 60 golpes por minuto y un volumen tidal de 10 ml/Kg. La temperatura se mantuvo a 37°C con una manta homeotérmica.

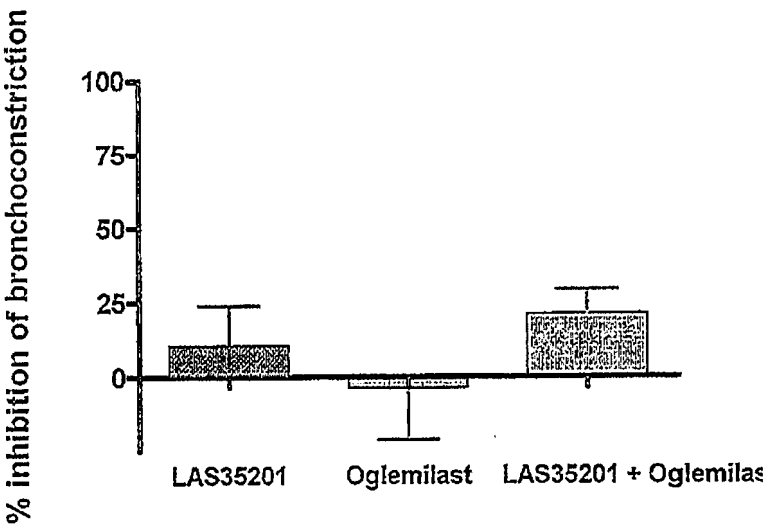
Análisis de Datos

El efecto inhibitorio se determinó para un tratamiento específico, una hora después del tiempo de exposición. Cada animal de los grupos tratados fue referido como la respuesta promedio de su grupo de vehículo correspondiente. Los porcentajes de inhibición broncoconstrictoria se calcularon como un promedio de 4 a 10 animales para cada grupo.

RESULTADOS

La administración simultánea de LAS35201 con roflumilast por nebulización resulta en una inhibición sinérgica de la broncoconstricción generada por Ach en cerdos de guinea.

Compuesto	n	Dosis (µg/ml)	Efecto inhibitorio (promedio ± SEM)
LAS35201	6	0.3	33 ± 5
Roflumilast	6	30	-3 ± 10
LAS35201 + Roflumilast	6	0.3 + 30	41± 9



EFFECTOS SOBRE LA BRONCOCONSTRICCIÓN INDUCIDA CON ACETILCOLINA DEL TIOTROPIO Y SU COMBINACIÓN CON ROFLUMILAST EN CERDOS DE GUINEA

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Cerdos de nueva guinea Dunkin-Hartley machos (400-600g) fueron obtenidos de Harlan (Interfauna Ibérica, Sant Feliu de Codines, España). Los animales fueron divididos en grupos de cuatro a cinco a 22±2°C, humedad 40-70% con ciclos de aire (10 por hora) y durante 12 horas de ciclo claro/oscuro. Los animales fueron alimentados con una dieta de

mantenimiento para cerdos de guinea, suplementada con vitamina C (SAFE 114, SAFE, Francia) y se les permitió beber *ad libitum*. Se dejó un periodo de aclimatización de 5 días antes de analizar los animales. Todos los experimentos se llevaron a cabo con la aprobación del Comité de Ética Animal.

Químicos

Los productos empleados en este estudio fueron obtenidos como se indica a continuación:

Acetilcolina clorhidrato (A-6625) obtenida de SIGMA; Ketamina (Imalgène500) de Merial; Xilacina (Rompun 2%) de BAYER; Acepromazina (Calmo Neosan) de PFIZER; Tiotropio (LAS33693) y roflumilast (LAS36841) sintetizados en el Departamento de Química Medicinal de Almirall S.A. Debido a la alta higroscopicidad de los compuestos, estos fueron mantenidos en condiciones secas. El Tiotropio fue disuelto en agua destilada, mientras que el Roflumilast fue disuelto al 1% de NaOH 1N (de Pancreac) con agua destilada. Ambos compuestos fueron preparados diariamente.

Grupos de Animales

Los animales fueron distribuidos de manera aleatoria en dos grupos:

3. Grupo de control: A los animales se les administró un vehículo (1% NaOH 1N en agua destilada) por inhalación y se indujo la broncoconstricción con acetilcolina intravenosa (Arc, 30µg/kg, i.v.)
4. Grupo tratado: A los animales se les administró los compuestos por inhalación y se indujo la broncoconstricción con ACh intravenosa, 1 hora después de la exposición.

Método

Los cerdos de guinea fueron ubicados en una caja de metacrilato (17x17x25 cm) durante un periodo de 10 minutos. Al inicio de este periodo y 5 minutos después se realizó una nebulización con compuesto o vehículo durante un minuto por medio de un nebulizador ultrasónico (DeVilbiss Ultraneb 2000, Somerset, PA, USA). Esta nebulización fue llevada a cabo con una mezcla de 5% de CO₂, 21%O₂, 74%N₂ y un flujo de 3 L/minuto. Se generaron aerosoles a partir de soluciones acuosas, empleando la concentración seleccionada para cada compuesto (1µg/ml para el tiotropio y 30 µg/ml para el roflumilast).

Para la administración inhalada de la terapia de combinación, se nebulizó el roflumilast durante el primer periodo de 10 minutos como se mencionó anteriormente. Luego, manteniendo el animal en la misma caja de metacrilato, se administró el tiotropio durante el periodo de 10 minutos siguiente.

La evaluación de la actividad anti-broncoconstrictoria de los compuestos fue evaluada una hora después del tratamiento.

Los animales fueron anestesiados con una inyección intramuscular de ketamina (43,8 mg/Kg), xilazina (3,5 mg/Kg) y acepromazina (1,1 mg/Kg). Cuando se requirió, se extendió la anestesia con inyecciones intramusculares adicionales de la mezcla anestésica mencionada. Se canuló la traquea con un tubo de polietileno de 0,50/1,00 mm y se preparó para registrar la resistencia de la vía respiratoria (Raw) empleando un neumotacógrafo (Fleisch, Zabona, Suiza) para monitorear el flujo de aire. Un tubo PE-60 fue insertado en el esófago al nivel del tórax para medir la presión transpulmonar. Se canuló la arteria carótida y la vena yugular para monitorear la presión arterial (Stetham P23XL, Spectramed, Oxnard, California, USA) y administración, respectivamente. Se conectaron transductores a un amplificador de puente (Physiological Recorder PR800 MUMED System, Ltd, London, UK). Se midió la presión intrapulmonar con una conexión lateral a la traquea canulada. La resistencia de las vías respiratorias (Raw) fue calculada con el cociente de los cambios en el flujo y la presión entre puntos isovolumétricos en inspiración y expiración. Estas variaciones en el flujo y presión intrapulmonar y presión arterial se registraron con Lfr Record Vers. 7.1 USB software (Mumed Systems Ltd, London, UK). Durante los experimentos los animales fueron ventilados artificialmente con un ventilador roedor pequeño (Ugo Basile, Biological Research Apparatus, Comerio-Varese, Italia) a una tasa de 60 golpes por minuto y un volumen tidal de 10 ml/Kg. La temperatura se mantuvo a 37°C con una manta homeotérmica.

Análisis de Datos

El efecto inhibitorio se determinó para un tratamiento específico, una hora después del tiempo de exposición. Cada animal de los grupos tratados fue referido como la respuesta promedio de su grupo de vehículo correspondiente. Los porcentajes de inhibición broncoconstrictoria se calcularon como un promedio de 4 a 8 animales para cada grupo.

RESULTADOS

La administración por nebulización de una combinación de tiotropio y roflumilast produce una inhibición de la broncoconstricción inducida por ACh en los cerdos de guinea, la cual no es mayor que la inhibición producida por el tiotropio solo.

Compuesto	n	Dosis (µg/ml)	Efecto inhibitorio (promedio ± SEM)
Tiotropio	6	1	24 ± 5
Tiotropio + Roflumilast	8	1 + 30	16 ± 7