Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

CSA220761

PCT

Organización y Digitalización CSA Lt

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

INVENTARIO

21. **EXPEDIENTE No.** 08-115666

54. **TÍTULO** *COMPUESTOS DE DIALQUILFENILO CON ACTIVIDAD AGONISTA DEL RECEPTOR β2 ADRENERGICO Y ANTAGONISTA DEL RECEPTOR MUSCARINICO.*

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** *C07D 211/46*

71. **SOLICITANTE** *THERAVANCE, INC.*

DOMICILIO *SAN FRANCISCO, CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA*

74. **APODERADO** *DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN*

22. **BOGOTÁ, D. C.,** 202099

(FORMA P-10)

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-115666- -00000-0000
Fecha 2008-10-29 15:00:25 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 227

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1 SOLICITUD DE:

[x] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad

[x] Capitulo I. [ ] Capítulo II.

2 **SOLICITANTE (71)**	**Nombre**: **THERAVANCE, INC.** **Dirección**: 901 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América. **Nacionalidad o domicilio**: San Francisco, California, Estados Unidos de América. **Lugar de Constitución**: California, Estados Unidos de América. **Teléfono:** **Fax:** **E-mail**	**IDENTIFICACIÓN** **C.C.** [ ] **NIT** [ ] **C.E.** [ ] **Otro** [ ] **Número**
3 **REPRESENTANTE O APODERADO (74)**	Nombre: DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D´ALEMAN Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6 Teléfono: 6 181088 Fax: 6350824 E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co	**IDENTIFICACIÓN** C.C. [x] NIT [ ] C.E. [ ] Otro [ ] Número 41.654.882 TP 20824 CSJ
4 **INVENTOR (ES) (72)**	Nombre: **VER ANEXOS** Dirección: Nacionalidad o domicilio:	

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2007/009925** Fecha **24 de abril de 2007**

Publicación Internacional No. **WO 2007/127196 A2.** Fecha **8 de noviembre de 2007**

6 TITULO (54) **COMPUESTOS DE DIALQUILFENILO CON ACTIVIDAD AGONISTA DEL RECEPTOR β_2 ADRENÉRGICO Y ANTAGONISTA DEL RECEPTOR MUSCARÍNICO.**

7 Clasificación Internacional (51) C07D 211/46

8 Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
SI [x] NO [ ]	**Estados Unidos de América**	**25 de abril de 2006**	**60/794,702**

9 Comprobante de pago N . 08 - 83,380 **Fecha** 22 de octubre de 2008

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 inventor 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 de 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 deposito 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 Opinión escrita. * Notificación de un cambio de domicilio del inventor MAMMEN, Mathai.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA

12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA:

C.C. 41.654.882 **T.P. 20824**

As. P-1722

ANEXOS

INVENTORES

1.) **COLSON, Pierre-Jean**
(301 Bryant Street #403, San Francisco, California 94107, Estados Unidos de América);

2.) **HUGHES, Adam**
(1221 Judson Street, Belmont, California 94002, Estados Unidos de América);

3.) **HUSFELD, Craig**
(3811 Farm Hill Boulevard, Redwood City, California 94061, Estados Unidos de América);

4.) **MAMMEN, Mathai**
(1852 Valparaiso Avenue, Menlo Park, California 94025, Estados Unidos de América);

5.) **RAPTA, Miroslav**
(411 E. Duane Avenue, Sunnyvale, California 94085, Estados Unidos de América).

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 83,380
FECHA : OCTUBRE 22 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-115666- -00000-0000
Fecha: 2008-10-29 15:00:25 Dep: 2020 NUEVRELACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 227

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	94343303	21/10/2008	49,440,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL : $	501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

P-1722

3

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 November 2007 (08.11.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/127196 A2

(51) International Patent Classification:
C07D 211/46 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/009925

(22) International Filing Date: 24 April 2007 (24.04.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/794,702 25 April 2006 (25.04.2006) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/794,702 (CIP)
Filed on 25 April 2006 (25.04.2006)

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **THERAVANCE, INC.** [US/US]; 901 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **COLSON, Pierre-Jean** [FR/US]; 301 Bryant Street #403, San Francisco, CA 94107 (US). **HUGHES, Adam** [GB/US]; 1221 Judson Street, Belmont, CA 94002 (US). **HUSFELD, Craig** [US/US]; 3811 Farm Hill Boulevard, Redwood City, CA 94061 (US). **MAMMEN, Mathai** [CA/US]; 5 Barcelona Circle, Redwood City, CA 94065 (US). **RAPTA, Miroslav** [SK/US]; 411 E. Duane Avenue, Sunnyvale, CA 94085 (US).

(74) Agents: **HAGENAH, Jeffrey, A.** et al.; Theravance, Inc., 901 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).

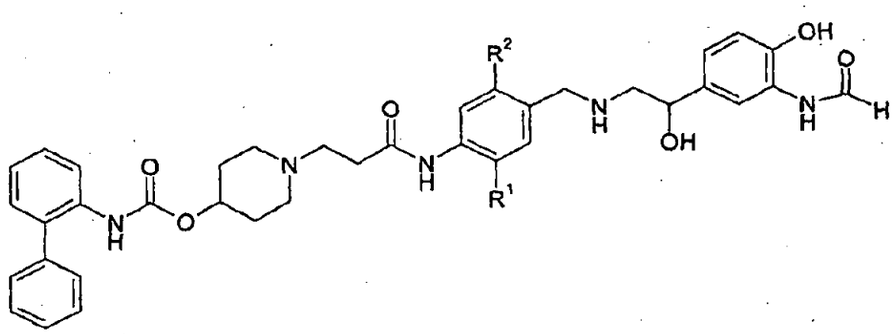
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US (patent), UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

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

(54) Title: DIALKYLPHENYL COMPOUNDS HAVING β_2 ADRENERGIC RECEPTOR AGONIST AND MUSCARINIC RECEPTOR ANTAGONIST ACTIVITY



(I)

(57) Abstract: This invention relates to compounds of formula (I) Wherein R^1 and R^2 are as defined in the specification, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate or stereoisomer thereof. The invention also relates to pharmaceutical compositions and combinations comprising such compounds, processes and intermediates for preparing such compounds, and methods of using such compound to for example, treat pulmonary disorders, such as chronic obstructive pulmonary disease and asthma.

WO 2007/127196 A2

DIALKYLPHENYL COMPOUNDS HAVING β_2 ADRENERGIC RECEPTOR AGONIST AND MUSCARINIC RECEPTOR ANTAGONIST ACTIVITY

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

The present invention relates to novel dialkylphenyl compounds having β_2 adrenergic receptor agonist and muscarinic receptor antagonist activity. This invention also relates to pharmaceutical compositions comprising such compounds, processes and intermediates for preparing such compounds and methods of using such compounds, for example, to treat pulmonary disorders.

State of the Art

Pulmonary disorders, such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), are commonly treated with bronchodilators. One type of bronchodilator used to treat pulmonary disorders consists of β_2 adrenergic receptor (adrenoceptor) agonists, such as albuterol, formoterol and salmeterol. These compounds are generally administered by inhalation. Another type of bronchodilator consists of muscarinic receptor antagonists (anticholinergic compounds), such as ipratropium and tiotropium. These compounds are also typically administered by inhalation.

Pharmaceutical compositions containing a combination of a β_2 adrenergic receptor agonist and a muscarinic receptor antagonist are known in the art for use in treating pulmonary disorders. For example, U.S. Patent No. 6,433,027, issued August 13, 2002, discloses medicament compositions containing a muscarinic receptor antagonist, such as tiotropium bromide, and a β_2 adrenergic receptor agonist, such as formoterol fumarate.

Additionally, compounds having both β_2 adrenergic receptor agonist and muscarinic receptor antagonist activity are known in the art. For example, U.S. Patent No. 7,141,671, issued November 28, 2006, discloses biphenyl compounds having both β_2 adrenergic receptor agonist and muscarinic receptor antagonist activity. Compounds possessing both β_2 adrenergic receptor agonist and muscarinic receptor antagonist activity are highly desirable since such compounds provide bronchodilation through two independent modes of action while having single molecule pharmacokinetics.

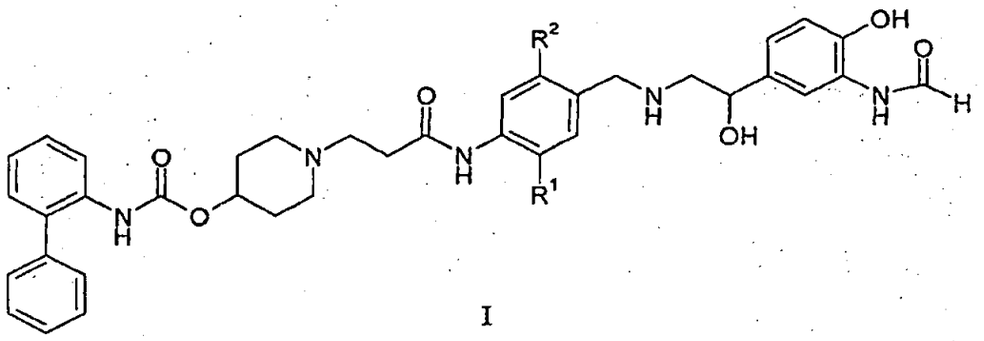
When treating pulmonary disorders, it is particularly useful to provide therapeutic agents that have a long duration of action, i.e., a duration of at least about 24 hours, when administered by inhalation so that patients only need to administer the therapeutic agent once a day or less. Not all dual-acting compounds disclosed previously in the art possess this desirable property.

Accordingly, a need exists for novel compounds having both β_2 adrenergic receptor agonist and muscarinic receptor antagonist activity that possess a long duration of action when administered to a patient by inhalation.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides novel dialkylphenyl compounds having both β_2 adrenergic receptor agonist and muscarinic receptor antagonist activity. Among other properties, a compound of this invention has been found to possess a long duration of action, i.e., a duration of at least about 24 hours, when administered to a mammal by inhalation. Accordingly, the compounds of this invention are expected to be useful and advantageous as therapeutic agents for treating pulmonary disorders.

Accordingly, in one of its composition aspects, the present invention relates to a compound of formula I:



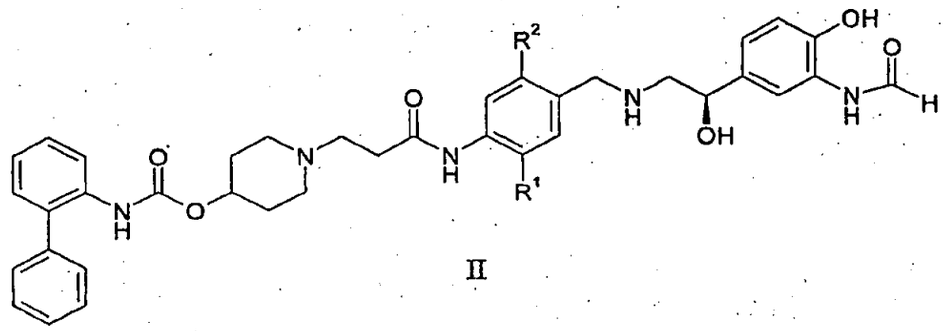
I

6

wherein

R^1 is methyl or ethyl; R^2 is methyl or ethyl; or a pharmaceutically acceptable salt or solvate or stereoisomer thereof.

In a particular aspect of this invention, the compound of formula I is a compound having formula II:



II

wherein R^1 and R^2 are as defined herein (including any specific or preferred embodiments); or a pharmaceutically acceptable salt or solvate thereof.

In another of its composition aspects, this invention relates to a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a compound of formula I.

If desired, the compounds of the present invention can be administered in combination with other therapeutic agents, such as a steroidal anti-inflammatory agent. Accordingly, in another of its composition aspects, this invention relates to a pharmaceutical composition comprising (a) a compound of formula I; and (b) a second therapeutic agent. In yet another of its composition aspects, this invention relates to pharmaceutical composition comprising (a) a compound of formula I; (b) a second therapeutic agent; and (c) a pharmaceutically acceptable carrier.

In still another of its composition aspects, this invention relates to a combination of therapeutic agents, the combination comprising (a) a compound of formula I; and (b) a second therapeutic agent. In another of its composition aspects, this invention relates to a combination of pharmaceutical compositions, the combination comprising (a) a first pharmaceutical composition comprising a compound of formula I and a first pharmaceutically acceptable carrier; and (b) a second pharmaceutical composition comprising a second therapeutic agent and a second pharmaceutically acceptable carrier. This invention also relates to a kit containing such pharmaceutical compositions.

7

Compounds of this invention possess both β_2 adrenergic receptor agonist activity and muscarinic receptor antagonist activity. Accordingly, the compounds of formula I are expected to be useful as therapeutic agents for treating pulmonary disorders, such as asthma and chronic obstructive pulmonary disease.

Accordingly, in one of its method aspects, this invention relates to a method for treating a pulmonary disorder, the method comprising administering to a patient in need of treatment a therapeutically effective amount of a compound of formula I. This invention also relates to a method of treating chronic obstructive pulmonary disease or asthma, the method comprising administering to a patient a therapeutically effective amount of a compound of formula I. Additionally, in another of its method aspects, this invention relates to a method of producing bronchodilation in a mammal, the method comprising administering to a mammal a bronchodilation-producing amount of a compound of formula I. This invention also relates to method of antagonizing a muscarinic receptor and agonizing a β_2 adrenergic receptor in a mammal, the method comprising administering to the mammal a compound of formula I.

Since compounds of this invention possess both β_2 adrenergic receptor agonist activity and muscarinic receptor antagonist activity, such compounds are also useful as research tools. Accordingly, in yet another of its method aspects, this invention relates to a method of using a compound of formula I as a research tool, the method comprising conducting a biological assay using a compound of formula I.

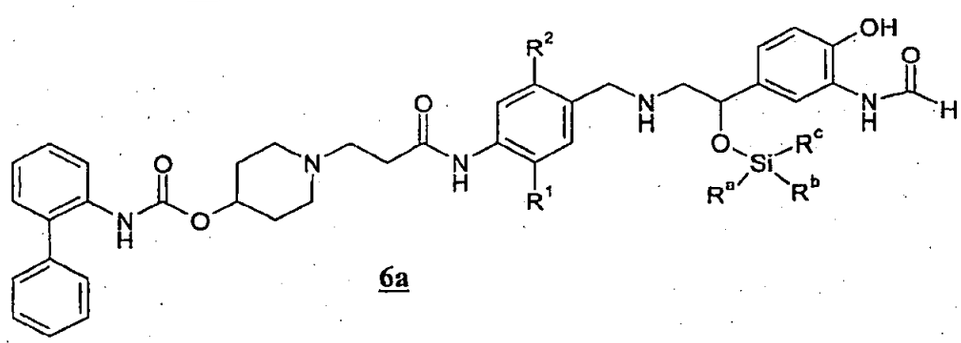
The compounds of this invention can also be used to evaluate new chemical compounds. Accordingly, in another of its method aspects, this invention relates to a method of evaluating a test compound in a biological assay, the method comprising: (a) conducting a biological assay with a test compound to provide a first assay value; (b) conducting the biological assay with a compound of formula I to provide a second assay value; wherein step (a) is conducted either before, after or concurrently with step (b); and (c) comparing the first assay value from step (a) with the second assay value from step (b).

This invention also relates to processes and novel intermediates useful for preparing compounds of formula I. Accordingly, in another of its method aspects, this invention relates to a process of preparing a compound of formula I, the process comprising deprotecting a compound of formula **6** (as defined herein) to provide a compound of formula I.

8

In another of its method aspects, this invention relates to a process of preparing a compound of formula I, the process comprising: (a) reacting a compound of formula 4 with a compound of formula 5 in the presence of a reducing agent to provide a compound of formula 6; and (b) deprotecting the compound of formula 6 to provide a compound of formula I; where compounds 4, 5 and 6 are as defined herein.

In a particular embodiment of this invention, the compounds of formula I are prepared by deprotecting a compound of formula 6, wherein the hydroxyl-protecting group is a silyl group. Accordingly, in yet another of its method aspects, this invention relates to a process of preparing a compound of formula I, the process comprising deprotecting a compound of formula 6a:

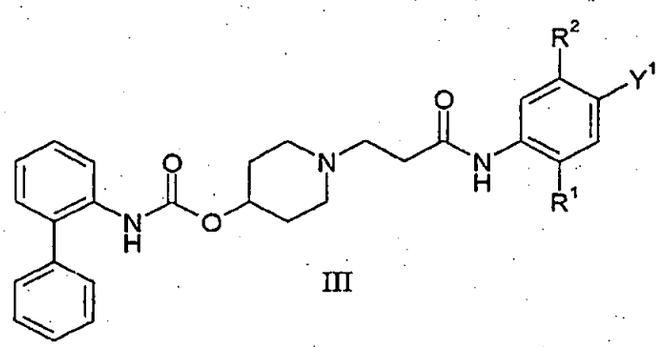


6a

wherein R^a, R^b and R^c are independently selected from C_{1-4} alkyl, phenyl, -C_{1-4} alkyl-(phenyl), or one of R^{1a}, R^{1b} and R^{1c} is –O-(C_{1-4} alkyl); to provide a compound of formula I.

In other embodiments, the processes described herein further comprise the step of forming a pharmaceutically acceptable salt of a compound of formula I. In other embodiments, this invention relates to the other processes described herein; and to the product prepared by any of the processes described herein.

In a particular embodiment, this invention relates to a compound of formula III:



III

9

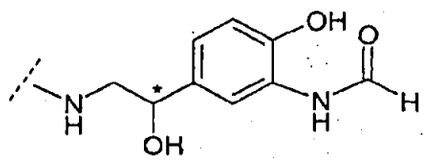
or a salt or stereoisomer thereof, wherein Y^1 is selected from –CHO, -CN, $-CH_2OH$, $-CH(OR^{3a})OR^{3b}$, -C(O)OH, $-C(O)OR^{3c}$, bromo and iodo, where R^{3a} and R^{3b} are selected independently from C_{1-6} alkyl, or R^{3a} and R^{3b} are joined to form C_{2-6} alkylene, R^{3c} is selected from C_{1-6} alkyl; and R^1 and R^2 are as defined herein (including any specific or preferred embodiments), which compounds are useful as intermediates in preparing compounds of formula I. In a particular embodiment of formula III, R^1 and R^2 are methyl. In another particular embodiment of formula III, Y^1 is -CHO. In still another particular embodiment of formula III, R^1 and R^2 are methyl and Y^1 is –CHO.

This invention also relates to the use of a compound of formula I for therapy. Additionally, the invention relates to the use of a compound of formula I for the manufacture of a medicament for the treatment of a pulmonary disorder; and to the use of a compound of formula I as a research tool. Other aspects and embodiments of this invention are disclosed herein.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In one of its composition aspects, this invention relates to novel compounds of formula I. The compounds of formula I contain one or more chiral centers and therefore, this invention is directed to racemic mixtures; pure stereoisomers (i.e., enantiomers or diastereomers); stereoisomer-enriched mixtures and the like unless otherwise indicated. When a particular stereoisomer is shown or named herein, it will be understood by those skilled in the art that minor amounts of other stereoisomers may be present in the compositions of this invention unless otherwise indicated, provided that the utility of the composition as a whole is not eliminated by the presence of such other isomers.

In particular, compounds of formula I contain a chiral center at the carbon atom indicated by the symbol * in the following partial formula:



In a particular embodiment of this invention, the carbon atom identified by the symbol * has the (*R*) configuration. In this embodiment, the compounds of formula I have

10

the (*R*) configuration at the carbon atom identified by the symbol * or are enriched in a stereoisomeric form having the (*R*) configuration at this carbon atom.

The compounds of formula I also contain several basic groups (e.g., amino groups) and therefore, the compounds of formula I can exist as the free base or in various salt forms. All such forms are included within the scope of this invention. Furthermore, solvates of compounds of formula I or salts thereof are included within the scope of this invention.

Accordingly, those skilled in the art will recognize that reference to a compound herein, for example, reference to a compound of formula I or compound **6**, includes reference to salts and stereoisomers and solvates of that compound unless otherwise indicated.

Additionally, as used herein, the singular forms "a," "an" and "the" include the corresponding plural forms unless the context of use clearly dictates otherwise.

The nomenclature used herein to name the compounds of this invention and intermediates thereof has generally been derived using the commercially available AutoNom software (MDL, San Leandro, California). Typically, compounds of formula I have been named as piperidin-4-yl ester derivatives of biphenyl-2-yl carbamic acid.

Representative Embodiments

The following substituents and values are intended to provide representative examples of various aspects and embodiments of this invention. These representative values are intended to further define and illustrate such aspects and embodiments and are not intended to exclude other embodiments or to limit the scope of this invention. In this regard, the representation that a particular value or substituent is preferred is not intended in any way to exclude other values or substituents from this invention unless specifically indicated.

In one embodiment, R^1 is methyl and R^2 is methyl.

In another embodiment, R^1 is ethyl and R^2 is ethyl.

In another embodiment, R^1 is methyl and R^2 is ethyl.

In another embodiment, R^1 is ethyl and R^2 is methyl.

Thus, in one of its composition aspects, the present invention relates to compounds of formula I selected from:

11

biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IIa);

biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-diethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IIb);

biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2-methyl-5-ethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IIc);

biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2-ethyl-5-methylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IId);

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

Definitions

When describing the compounds, compositions, methods and processes of this invention, the following terms have the following meanings unless otherwise indicated.

The term "alkyl" means a monovalent saturated hydrocarbon group which may be linear or branched. Unless otherwise defined, such alkyl groups typically contain from 1 to 10 carbon atoms. Representative alkyl groups include, by way of example, methyl, ethyl, *n*-propyl, isopropyl, *n*-butyl, *sec*-butyl, isobutyl, *tert*-butyl, *n*-pentyl, *n*-hexyl, *n*-heptyl, *n*-octyl, *n*-nonyl, *n*-decyl and the like.

When a specific number of carbon atoms is intended for a particular term used herein, the number of carbon atoms is shown preceding the term. For example, the term "C_{1-3} alkyl" means an alkyl group having from 1 to 3 carbon atoms wherein the carbon atoms are in any chemically-acceptable configuration.

The term "alkylene" means a divalent saturated hydrocarbon group that may be linear or branched. Unless otherwise defined, such alkylene groups typically contain from 1 to 10 carbon atoms. Representative alkylene groups include, by way of example, methylene, ethane-1,2-diyl ("ethylene"), propane-1,2-diyl, propane-1,3-diyl, butane-1,4-diyl, pentane-1,5-diyl and the like.

The term "amino-protecting group" means a protecting group suitable for preventing undesired reactions at an amino group. Representative amino-protecting groups

include, but are not limited to, *tert*-butoxycarbonyl (BOC), trityl (Tr), benzyloxycarbonyl (Cbz), 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc), benzyl, formyl, trimethylsilyl (TMS), *tert*-butyldimethylsilyl (TBS), and the like.

The term "carboxy-protecting group" means a protecting group suitable for preventing undesired reactions at a carboxy group. Representative carboxy-protecting groups include, but are not limited to, esters, such as methyl, ethyl, *tert*-butyl, benzyl (Bn), *p*-methoxybenzyl (PMB), 9-fluorenylmethyl (Fm), trimethylsilyl (TMS), *tert*-butyldimethylsilyl (TBS), diphenylmethyl (benzhydryl, DPM) and the like.

The term "compound of the invention" or "compound of formula I" or "compound of formula II" as used herein means the specified compound(s) or a pharmaceutically acceptable salt or solvate or stereoisomer thereof unless otherwise indicated.

The term "halo" means fluoro, chloro, bromo and iodo.

The term "hydroxyl-protecting group" means a protecting group suitable for preventing undesirable reactions at a hydroxyl group. Representative hydroxyl-protecting groups include, but are not limited to, silyl groups including tri(C_{1-6} alkyl)silyl groups, such as trimethylsilyl (TMS), triethylsilyl (TES), *tert*-butyldimethylsilyl (TBS) and the like; esters (acyl groups) including C_{1-6} alkanoyl groups, such as formyl, acetyl and the like; arylmethyl groups, such as benzyl (Bn), *p*-methoxybenzyl (PMB), 9-fluorenylmethyl (Fm), diphenylmethyl (benzhydryl, DPM) and the like. Additionally, two hydroxyl groups can also be protected as an alkylidene group, such as prop-2-ylidine, formed, for example, by reaction with a ketone, such as acetone.

The term "leaving group" means a functional group or an atom that can be displaced by another functional group or atom in a substitution reaction, such as a nucleophilic substitution reaction. By way of example, representative leaving groups include, but are not limited to, chloro, bromo and iodo groups; sulfonic ester groups, such as mesylate, tosylate, brosylate, nosylate and the like; and acyloxy groups, such as acetoxy, trifluoroacetoxy and the like.

The term "mass median diameter" or "MMD" when used to refer to particles means the diameter such that half the mass of the particles is contained in particles with larger diameter and half is contained in particles with smaller diameter.

The term "micronized" or "in micronized form" means particles in which at least about 90 percent of the particles have a diameter of less than about 10 μm unless otherwise indicated.

The term "or a pharmaceutically acceptable salt or solvate or stereoisomer thereof" as used herein is intended to include all permutations of salts, solvates and stereoisomers, such as a solvate of a pharmaceutically acceptable salt of a stereoisomer of a compound of formula I.

The term "pharmaceutically acceptable salt" means a salt that is acceptable for administration to a patient, such as a mammal (e.g., salts having acceptable mammalian safety for a given dosage regime). Representative pharmaceutically acceptable salts include salts of acetic, ascorbic, benzenesulfonic, benzoic, camphosulfonic, citric, ethanesulfonic, edisylic, fumaric, gentisic, gluconic, glucoronic, glutamic, hippuric, hydrobromic, hydrochloric, isethionic, lactic, lactobionic, maleic, malic, mandelic, methanesulfonic, mucic, naphthalenesulfonic, naphthalene-1,5-disulfonic, naphthalene-2,6-disulfonic, nicotinic, nitric, orotic, pamoic, pantothenic, phosphoric, succinic, sulfuric, tartaric, p-toluenesulfonic and xinafoic acid, and the like.

The term "protected derivatives thereof" means a derivative of the specified compound in which one or more functional groups of the compound are protected or blocked from undergoing undesired reactions with a protecting or blocking group. Functional groups that may be protected include, by way of example, carboxy groups, amino groups, hydroxyl groups, thiol groups, carbonyl groups and the like. Suitable protecting groups for such functional groups are well known to those of ordinary skill in the art as exemplified by the teachings in T. W. Greene and G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York, 1999, and references cited therein.

The term "salt thereof" means a compound formed when the hydrogen of an acid is replaced by a cation, such as a metal cation or an organic cation and the like. In the present invention, the cation typically comprises a protonated form of a compound of formula I, i.e. where one or more amino groups having been protonated by an acid. Preferably, the salt is a pharmaceutically acceptable salt, although this is not required for salts of intermediate compounds that are not intended for administration to a patient.

The term "solvate" means a complex or aggregate formed by one or more molecules of a solute, i.e. a compound of formula I or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and one or more molecules of a solvent. Such solvates are typically crystalline solids having a substantially fixed molar ratio of solute and solvent. Representative

solvents include, by way of example, water, methanol, ethanol, isopropanol, acetic acid and the like. When the solvent is water, the solvate formed is a hydrate.

The term "therapeutically effective amount" means an amount sufficient to effect treatment when administered to a patient in need of treatment.

The term "treating" or "treatment" as used herein means the treating or treatment of a disease or medical condition (such as COPD or asthma) in a patient, such as a mammal (particularly a human) that includes:

(a) preventing the disease or medical condition from occurring, i.e., prophylactic treatment of a patient;

(b) ameliorating the disease or medical condition, i.e., eliminating or causing regression of the disease or medical condition in a patient;

(c) suppressing the disease or medical condition, i.e., slowing or arresting the development of the disease or medical condition in a patient; or

(d) alleviating the symptoms of the disease or medical condition in a patient.

All other terms used herein are intended to have their ordinary meaning as understood by those of ordinary skill in the art to which they pertain.

General Synthetic Procedures

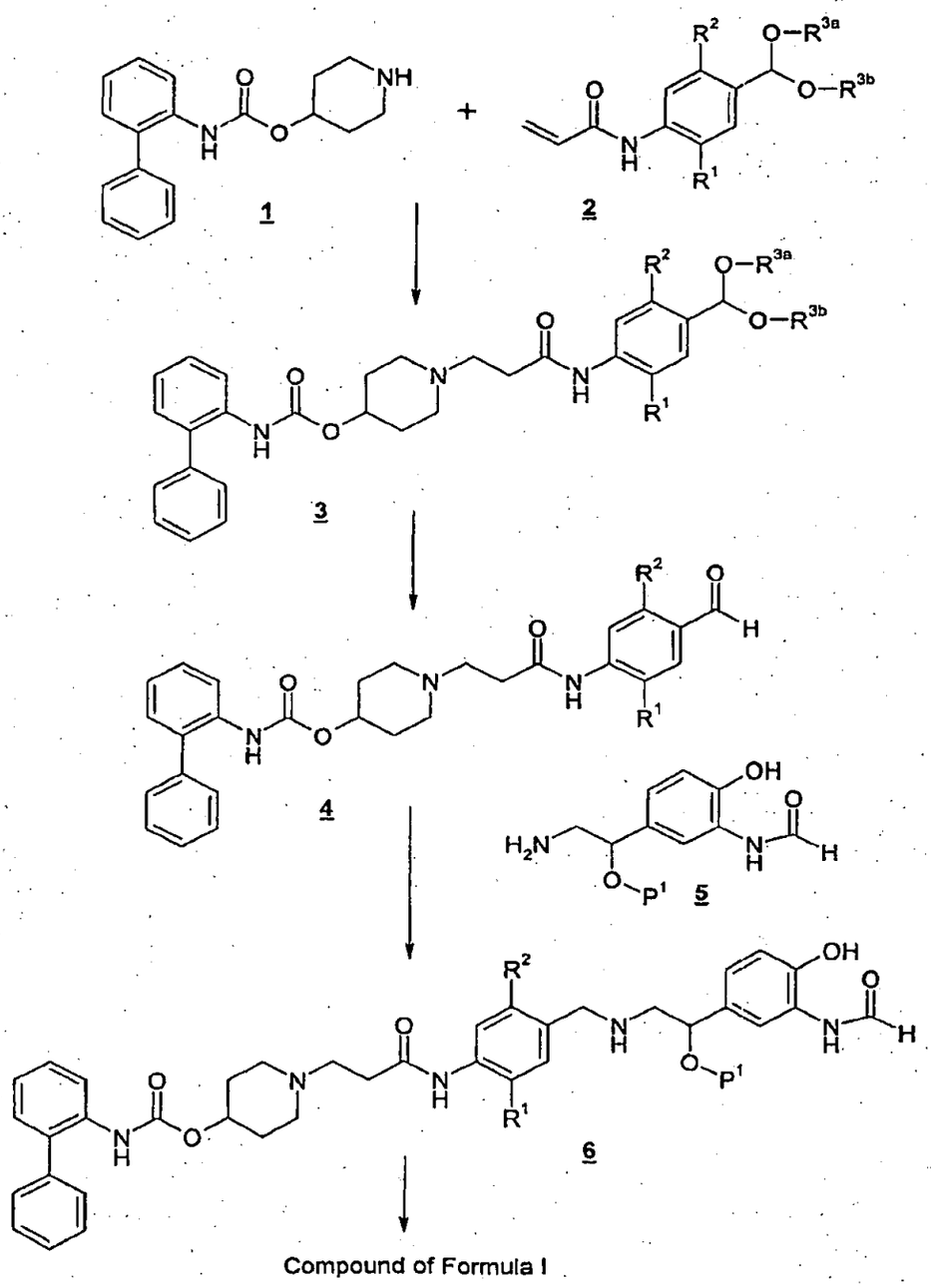
The compounds of this invention can be prepared from readily available starting materials using the following general methods and procedures or by using other information readily available to or known by those of ordinary skill in the art. Although the following procedures may illustrate a particular embodiment or aspect of the present invention, those skilled in the art will recognize that other embodiments or aspects of the present invention can be prepared using the same or similar methods or by using other methods, reagents and starting materials known to those skilled in the art. It will also be appreciated that where typical or preferred process conditions (i.e., reaction temperatures, times, mole ratios of reactants, solvents, pressures, etc.) are given, other process conditions can also be used unless otherwise stated. While optimum reaction conditions will typically vary depending on various reaction parameters such as the reactants, solvents and quantities used, those of ordinary skill in the art can readily determine suitable reaction conditions using routine optimization procedures.

Additionally, as will be apparent to those skilled in the art, conventional protecting groups may be necessary or desired to prevent certain functional groups from undergoing

undesired reactions. The choice of a suitable protecting group for a particular functional group as well as suitable conditions and reagents for protection and deprotection of such functional groups are well known in the art. Protecting groups other than those illustrated in the procedures described herein may be used, if desired.

In one embodiment, the compounds of formula I are synthesized as illustrated in Scheme I:

Scheme I



16

wherein P^1 is a hydroxyl-protecting group; and R^{3a} and R^{3b} are selected independently from C_{1-6} alkyl, or R^{3a} and R^{3b} are joined to form C_{2-6} alkylene.

As shown in Scheme I, compound 1 can be reacted with about 0.95 to about 1.05 molar equivalents of compound 2 to provide compound 3. This Michael reaction is typically conducted at a temperature ranging from about 0 °C to about 75 °C, typically about 40 °C to about 45 °C, for about 8 to about 24 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as dichloromethane or mixtures of dichloromethane and methanol or ethanol, and the like. Upon completion of the reaction, the product is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like. Alternatively, the reaction mixture containing compound 3 can be used directly in the next step of the synthesis.

Compound 3 is then reacted with aqueous acid to hydrolyze the acetal group and provide aldehyde compound 4. Any suitable acid can be employed in this reaction including, by way of example, hydrochloric acid, sulfuric acid, methanesulfonic acid, *p*-toluenesulfonic acid and the like. The hydrolysis reaction is typically conducted at a temperature ranging from about 0 °C to about 30 °C, typically about 20 °C to about 25 °C, for about 1 to about 6 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as methanol, ethanol, isopropanol, dichloromethane/ethanol, acetonitrile and the like. Upon completion of the reaction, the product is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like.

Compound 4 is then reacted with about 0.95 to about 1.5 molar equivalents of compound 5 in the presence of a reducing agent to afford compound 6. Any suitable reducing agent may be used in this reaction including, by way of illustration, a metal hydride reagent, such as sodium borohydride, sodium triacetoxyborohydride, sodium cyanoborohydride and the like, or hydrogen and a metal catalyst, such as palladium on carbon, and the like. This reductive alkylation reaction is typically conducted at a temperature ranging from about –20 °C to about 30 °C, typically about 0 °C to about 5 °C, for about 1 to about 6 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent and a protic solvent, such as dichloroethane and methanol, and the like. Upon completion of the reaction, the product is typically isolated

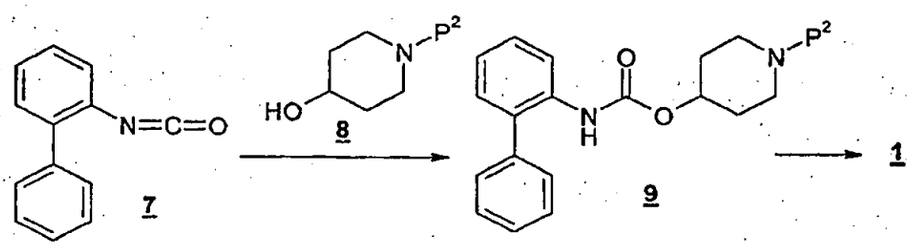
17

using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like.

Compound 6 is then deprotected to provide a compound of formula I. The particular conditions used to deprotect compound 6 will depend on the protecting group employed. For example, when P^1 is a silyl protecting group (i.e., a compound of formula 6a as defined herein), such as *tert*-butyldimethylsilyl, *tert*-butyldiphenylsilyl, diphenylmethylsilyl, di-*tert*-buylmethylsilyl, *tert*-butoxydiphenylsilyl and the like, this deprotection reaction is typically conducted by contacting compound 6a with a source of fluoride ion. In a particular embodiment, the source of fluoride ion is triethylamine trihydrofluoride. Other suitable sources of fluoride ion include tetrabutylammonium fluoride, potassium fluoride with 18-crown-6, hydrogen fluoride, pyridine hydrofluoride, and the like. This reaction is typically conducted at a temperature ranging from about 0 °C to about 50 °C, typically about 10 °C to about 25 °C, for about 24 to about 72 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as dichloroethane and the like. Upon completion of the reaction, the product is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like.

Compound 1 is known in the art or can be prepared from commercially available starting materials and reagents using known procedures. See, for example, U.S. Patent Application Publication No. U.S. 2004/0167167 A1 and R. Naito et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**(8) 1286-1294 (1998). By way of example, compound 1 can be prepared as illustrated in Scheme II:

Scheme II



As shown in Scheme II, biphenyl-2-isocyanate (7) is reacted with an *N*-protected 4-hydroxypiperidine 8, where P^2 is an amino-protecting group such as benzyl, to provide carbamate intermediate 9. This reaction is typically conducted at a temperature ranging from about 20 °C to about 100 °C, typically about 60 °C to about 80 °C, for about 6 to

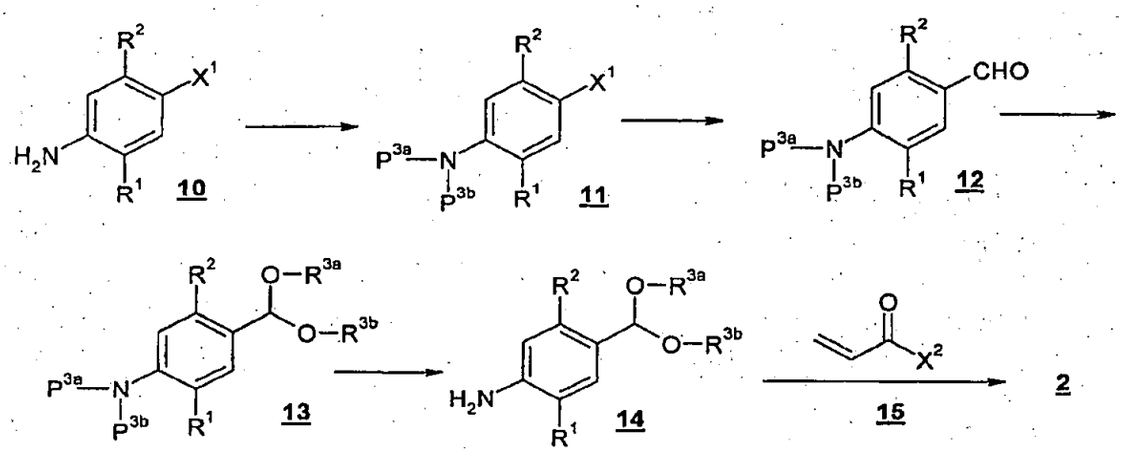
18

about 24 hours or until the reaction is substantially complete. If desired, this reaction can be conducted in a suitable diluent, such as dichloromethane, toluene and the like. Alternatively, this reaction can be conducted in the absence of a diluent. Upon completion of the reaction, the product 9 is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like. Alternatively, the reaction mixture containing compound 9 is used directly in the next step of the synthesis.

The amino-protecting group, P^2, is then removed from compound 9 using conventional procedures to afford compound 1. For example, when P^2 is a benzyl group, compound 9 can be deprotected using hydrogen or ammonium formate, in the presence of a catalyst, such as a palladium catalyst. Representative catalysts include, by way of illustration, palladium on carbon, palladium hydroxide on carbon and the like. This reaction is typically conducted at a temperature ranging from about 20 °C to about 50 °C, typically about 40 °C, for about 6 to about 24 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as methanol, ethanol, isopropanol and the like. Upon completion of the reaction, compound 1 is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like.

Compounds of formula 2 are known in the art or can be prepared from commercially available starting materials and reagents using known procedures. By way of illustration, compounds of formula 2 can be prepared as shown in Scheme III:

Scheme III



19

As shown in Scheme III, an aniline compound of formula **10**, where X^1 is bromo or iodo, is first protected at the amino group to provide a compound of formula **11**, where P^{3a} is an amino-protecting group and P^{3b} is hydrogen or an amino-protecting group. Any suitable amino-protecting group may be used, such as benzyl, 4-methoxybenzyl, trifluoroacetyl and the like. For example, a compound of formula **10** can be reacted with about 2 or more molar equivalents, preferably about 2.5 to about 3.0 molar equivalents, of a benzyl halide, such as benzyl chloride, bromide or iodide, to afford compound **11** where P^{3a} and P^{3b} are both benzyl. This reaction is typically conducted at a temperature ranging from about 0 °C to about 50 °C, typically about 30 °C, for about 18 to about 24 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as methanol, ethanol, isopropanol and the like. Typically, this reaction is also conducted in the presence of a suitable base, such as potassium carbonate, sodium carbonate and the like. Upon completion of the reaction, compound **11** is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like.

Representative compounds of formula **10** that can be employed in this reaction include 2,5-dimethyl-4-iodoaniline, 2,5-diethyl-4-iodoaniline, 2-ethyl-4-iodo-5-methylaniline, 5-ethyl-4-iodo-2-methylaniline, 4-bromo-2,5-dimethylaniline, 4-bromo-2,5-diethylaniline, 4-bromo-2-ethyl-5-methylaniline, 4-bromo-5-ethyl-2-methylaniline and the like. Such compounds are commercially available (for example, from Spectra Group Limited, Inc., Millbury, OH) or can be prepared from commercially available starting materials and reagents using conventional procedures.

Compound **11** is then contacted with about 1 to about 2 molar equivalents of an alkyl lithium reagent, such as *n*-butyllithium or *tert*-butyllithium, to form the corresponding anion in which the X^1 group has been exchanged for lithium. This reaction is typically conducted at a temperature ranging from about -70 °C to about 0 °C, typically about -20 °C, for about 0.25 to about 1 hour or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as toluene, xylene, tetrahydrofuran and the like.

The resulting lithium anion is not isolated, but is reacted *in situ* with a molar excess of *N,N*-dimethylformamide to provide compound **12**. Generally, about 2 to about 4 molar equivalents of *N,N*-dimethylformamide are used. This reaction is typically conducted at a temperature ranging from about -70 °C to about 0 °C, typically about -20 °C to about 0 °C,

20

for about 0.5 to about 2 hours or until the reaction is substantially complete. Upon completion of the reaction, compound **12** is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like.

The aldehyde group of compound **12** is then protected as an acetal by reacting compound **12** with an alcohol or a diol in the presence of an acid catalyst. Any suitable alcohol or diol can be used in this reaction. For example, representative alcohols and diols include methanol, ethanol, *n*-propanol, ethylene glycol, propylene glycol and the like. Generally, a molar excess of the alcohol or diol are employed in this reaction, preferably about 2 to about 4 molar equivalents.

Any suitable acid catalyst may be used in this reaction to facilitate formation of the acetal. Representative acid catalysis include, by way of example, *p*-toluenesulfonic acid, benzenesulfonic acid, hydrochloric acid and the like.

The reaction is typically conducted at a temperature ranging from about 50 °C to about 100 °C, typically about 60 °C to about 80 °C, for about 12 to about 24 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as toluene, xylene and the like. Typically, the reaction is conducted in a manner which allows the water produced to be removed, such as by azeotropic distillation or by the use of molecular sieves. Upon completion of the reaction, compound **13** is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like. Alternatively, the reaction mixture containing compound **13** can be used directly in the next step of the synthesis.

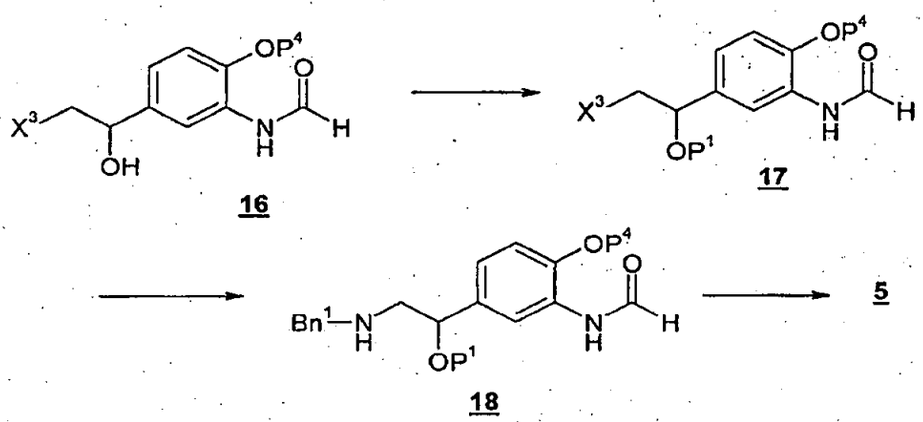
After formation of the acetal, the amino group of compound **13** is deprotected using standard reagents and conditions to form compound **14**. For example, if P^{3a} and P^{3b} are benzyl groups, compound **13** can be deprotected using hydrogen and a catalyst, such as a palladium catalyst. Representative catalysts include, by way of example, palladium on carbon, palladium hydroxide on carbon, and the like. This reaction is typically conducted at a temperature ranging from about 20 °C to about 50 °C, typically about 25 °C to about 30 °C, for about 4 to about 12 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as methanol, ethanol, ethanol/ethyl acetate mixtures and the like. Upon completion of the reaction, compound **14** is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like.

21

Compound 14 is then reacted with an acryloyl halide 15, where X^2 is chloro, bromo or iodo, to form compound 2. This reaction is typically conducted at a temperature ranging from about -20 °C to about 25 °C, typically about 0 °C to about 5 °C, for about 0.5 to about 6 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as dichloromethane and the like, in the presence of a suitable base, such as diisopropylethylamine, triethylamine and the like. Generally, about 1 to 1.2 molar equivalents of the acryloyl halide and about 1 to about 2 molar equivalent of the base are used in this reaction. Upon completion of the reaction, compound 2 is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, recrystallization, chromatography and the like.

Compounds of formula 5 are known in the art or can be prepared from commercially available starting materials and reagents using known procedures. By way of illustration, compounds of formula 5 can be prepared as shown in Scheme IV:

Scheme IV



As illustrated in Scheme IV, compounds of formula 5 can be prepared from compounds of formula 16, where P^4 is a hydroxyl-protecting group, such as benzyl, and X^3 is a leaving group, such as chloro, bromo or iodo. Compounds of formula 16 are known in the art. For example, U.S. Patent No. 6,268,533 B1, issued July 31, 2001; and R. Hett et al., *Organic Process Research & Development* **1998**, *2*, 96-99; describe the preparation of *N*-[2-benzyloxy-5-((*R*)-2-bromo-1-hydroxyethyl)phenyl]formamide (i.e., the (*R*) enantiomer of compound 16, where P^4 is benzyl and X^3 is bromo) starting from 2-bromo-4'-benzyloxy-3'-nitroacetophenone, the synthesis of which is described in K. Murase et al.,

22

Chem. Pharm. Bull., *25*(6) 1368-1377 (1977). If desired, the racemic form of compound **16** can be prepared by using a non-chiral reducing agent, such as borane dimethylsulfide complex, to reduce 2-bromo-4'-benzyloxy-3'-nitroacetophenone.

The hydroxyl group of compound **16** is protected using conventional procedures and reagents to provide compound **17**, where P^1 is a hydroxyl-protecting group. In a particular embodiment, the hydroxyl-protecting group is a silyl protecting group, such as dimethylisopropylsilyl, diethylisopropylsilyl, dimethylhexylsilyl, *tert*-butyldimethylsilyl, *tert*-butyldiphenylsilyl, diphenylmethylsilyl and the like. For example, compound **16** can be reacted with about 0.95 to about 1.2 molar equivalent of *tert*-butyldimethylsilyl chloride in the presence of about 1.1 to about 1.3 molar equivalents of imidazole to provide compound **17** where P^1 is *tert*-butyldimethylsilyl. This reaction is typically conducted at a temperature ranging from about 0 °C to about 50 °C, typically at room temperature, for about 24 to about 48 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as *N,N*-dimethylformamide and the like. Upon completion of the reaction, compound **17** is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, chromatography and the like. By way of further illustration, the synthesis of *N*-{2-benzyloxy-5-[(*R*)-2-bromo-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]phenyl} formamide is described in Example 2 of U.S. Patent Publication No. US 2004/0248985 A1, published December 9, 2004.

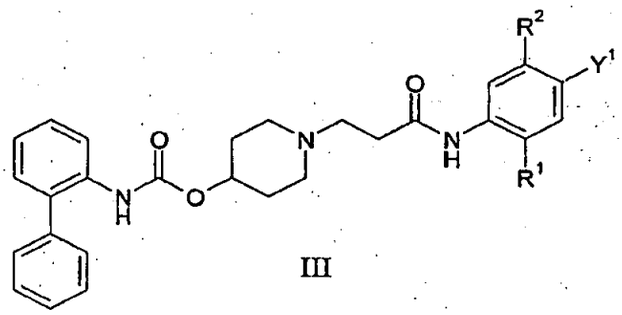
Compound **17** is then reacted with a benzyl amine (i.e., Bn^1-NH_2) to afford compound **18**, where Bn^1 is an unsubstituted benzyl group or a substituted benzyl group having 1 to 3 substituents on the phenyl ring of the benzyl group selected independently from C_{1-4} alkyl or C_{1-4} alkoxy. Representative benzyl amines include, benzylamine, 3,4-dimethoxybenzylamine, 4-methoxybenzylamine, 4-methylbenzylamine and the like. This reaction is typically conducted by contacting compound **17** with about 2 to about 4 molar equivalents of the benzyl amine at a temperature ranging from about 40 °C to about 100 °C, typically from about 80 °C to about 90 °C, for about 5 to about 24 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as *N*-methyl-2-pyrrolidone (NMP) and the like. Upon completion of the reaction, compound **18** is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, chromatography, recrystallization and the like.

Removal of the benzyl group, Bn^1, and P^4 using conventional procedures and reagents then affords compound **5**. In one embodiment, both Bn^1 and P^4 are benzyl groups

23

that are removed in the same reaction mixture. Typically, this reaction is conducted by contacting compound 5 with hydrogen in the presence of a catalyst, such as a palladium catalyst. Representative catalysts include palladium hydroxide on carbon, palladium on carbon, and the like. Generally, this debenzylation reaction is conducted in the presence of an acid, such as acetic acid, formic acid and the like. This reaction is typically conducted at a temperature ranging from about 10 °C to about 50 °C, typically at room temperature, for about 6 to about 24 hours or until the reaction is substantially complete. Generally, this reaction is conducted in a suitable diluent, such as methanol, ethanol and the like. Upon completion of the reaction, compound 5 is typically isolated using conventional procedures, such as extraction, chromatography and the like. In a particular embodiment, compound 5 is isolated as the acetic acid salt.

Those of ordinary skill in the art will recognize that the compounds of formula I can also be prepared by other synthetic procedures. For example, the particular order in which the synthetic steps are conducted can be changed or different intermediates can be employed. By way of illustration, compounds of formula III:



III

where Y^1 is -CN, -C(O)OH or -C(O)OR^{3c} can be reduced using conventional procedures and reagents to provide aldehyde 4 (i.e., where Y^1 is –CHO). Additionally, such compounds can be reduced to the alcohol, i.e., where Y^1 is -CH_2OH, and the alcohol can then be oxidized using standard procedures and reagents to provide aldehyde 4 (i.e., where Y^1 is –CHO).

If desired, pharmaceutically acceptable salts of the compounds of formula I can be prepared by contacting the free base form of a compound of formula I with a pharmaceutically acceptable acid.

Further details regarding specific reaction conditions and other procedures for preparing representative compounds of this invention or intermediates thereof are described in the Examples set forth below.

Pharmaceutical Compositions, Combinations and Formulations

The compounds of this invention are typically administered to a patient in the form of a pharmaceutical composition or formulation. Such pharmaceutical compositions may be administered to the patient by any acceptable route of administration including, but not limited to, inhaled, oral, nasal, topical (including transdermal) and parenteral modes of administration. It will be understood that any form of a compound of this invention, (i.e., free base, pharmaceutically acceptable salt, solvate, etc.) that is suitable for a particular mode of administration can be used in the pharmaceutical compositions discussed herein.

Accordingly, in one of its compositions aspects, this invention relates to a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier or excipient and a compound of formula I. Optionally, such pharmaceutical compositions may contain other therapeutic and/or formulating agents if desired.

The pharmaceutical compositions of this invention typically contain a therapeutically effective amount of a compound of formula I. Those skilled in the art will recognize, however, that a pharmaceutical composition may contain more than a therapeutically effective amount, i.e., bulk compositions, or less than a therapeutically effective amount, i.e., individual unit doses designed for multiple administration to achieve a therapeutically effective amount.

Typically, the pharmaceutical composition will contain from about 0.01 to about 95 percent by weight of the therapeutic agent; including, from about 0.01 to about 30 percent by weight; such as from about 0.01 to about 10 percent by weight of the therapeutic agent.

Any conventional carrier or excipient may be used in the pharmaceutical compositions of this invention. The choice of a particular carrier or excipient, or combinations of carriers or exipients, will depend on the mode of administration being used to treat a particular patient or type of medical condition or disease state. In this regard, the preparation of a suitable pharmaceutical composition for a particular mode of administration is well within the scope of those of ordinary skill in the pharmaceutical arts.

The carriers or excipients used in the pharmaceutical compositions of this invention are commercially available. For example, such materials can be purchased from Sigma (St. Louis, MO). By way of further illustration, conventional formulation techniques are well known to those of ordinary skill in the art as exemplified by the teachings in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); and H.C. Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms*

25

and Drug Delivery Systems, 7th Edition, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Representative examples of materials which can serve as pharmaceutically acceptable carriers include, but are not limited to, the following: (1) sugars, such as lactose, glucose and sucrose; (2) starches, such as corn starch and potato starch; (3) cellulose, and its derivatives, such as sodium carboxymethyl cellulose, ethyl cellulose and cellulose acetate; (4) powdered tragacanth; (5) malt; (6) gelatin; (7) talc; (8) excipients, such as cocoa butter and suppository waxes; (9) oils, such as peanut oil, cottonseed oil, safflower oil, sesame oil, olive oil, corn oil and soybean oil; (10) glycols, such as propylene glycol; (11) polyols, such as glycerin, sorbitol, mannitol and polyethylene glycol; (12) esters, such as ethyl oleate and ethyl laurate; (13) agar; (14) buffering agents, such as magnesium hydroxide and aluminum hydroxide; (15) alginic acid; (16) pyrogen-free water; (17) isotonic saline; (18) Ringer's solution; (19) ethyl alcohol; (20) phosphate buffer solutions; (21) compressed propellant gases, such as chlorofluorocarbons and hydrofluorocarbons; and (22) other non-toxic compatible substances employed in pharmaceutical compositions.

The pharmaceutical compositions of this invention are typically prepared by thoroughly and intimately mixing or blending a compound of the invention with a pharmaceutically acceptable carrier and any optional ingredients. If necessary or desired, the resulting uniformly blended mixture can then be shaped or loaded into tablets, capsules, pills, canisters, cartridges, dispensers and the like using conventional procedures and equipment.

In one embodiment, the pharmaceutical compositions of this invention are suitable for inhaled administration. Suitable pharmaceutical compositions for inhaled administration will typically be in the form of an aerosol or a powder. Such compositions are generally administered using well-known delivery devices, such as a nebulizer inhaler, a metered-dose inhaler (MDI), a dry powder inhaler (DPI) or a similar delivery device.

In a specific embodiment of this invention, the pharmaceutical composition comprising the therapeutic agent is administered by inhalation using a nebulizer inhaler. Such nebulizer devices typically produce a stream of high velocity air that causes the pharmaceutical composition comprising the therapeutic agent to spray as a mist that is carried into the patient's respiratory tract. Accordingly, when formulated for use in a nebulizer inhaler, the therapeutic agent is typically dissolved in a suitable carrier to form a solution. Alternatively, the therapeutic agent can be micronized and combined with a

suitable carrier to form a suspension of micronized particles. Nebulizer devices suitable for administering therapeutic agents by inhalation are well known to those of ordinary skill in the art or such devices are commercially available. For example, representative nebulizer devices or products include the Respimat Softmist Inhalaler (Boehringer Ingelheim); the AERx Pulmonary Delivery System (Aradigm Corp.); the PARI LC Plus Reusable Nebulizer (Pari GmbH); and the like.

A representative pharmaceutical composition for use in a nebulizer inhaler comprises an isotonic aqueous solution comprising from about 0.05 μg/mL to about 10 mg/mL of a compound of formula I. In one embodiment, such a solution has a pH of about 4 to about 6.

In another specific embodiment of this invention, the pharmaceutical composition comprising the therapeutic agent is administered by inhalation using a dry powder inhaler. Such dry powder inhalers typically administer the therapeutic agent as a free-flowing powder that is dispersed in a patient's air-stream during inspiration. In order to achieve a free-flowing powder, the therapeutic agent is typically formulated with a suitable excipient such as lactose, starch, mannitol, dextrose, polylactic acid (PLA), polylactide-co-glycolide (PLGA) or combinations thereof. Typically, the therapeutic agent is micronized and combined with a suitable carrier to form a blend suitable for inhalation. Accordingly, in one embodiment of the invention, the compound of formula I is in micronized form.

A representative pharmaceutical composition for use in a dry powder inhaler comprises dry milled lactose and micronized particles of a compound of formula I.

Such a dry powder formulation can be made, for example, by combining the lactose with the therapeutic agent and then dry blending the components. Alternatively, if desired, the therapeutic agent can be formulated without an excipient. The pharmaceutical composition is then typically loaded into a dry powder dispenser, or into inhalation cartridges or capsules for use with a dry powder delivery device.

Dry powder inhaler delivery devices suitable for administering therapeutic agents by inhalation are well known to those of ordinary skill in the art or such devices are commercially available. For example, representative dry powder inhaler delivery devices or products include Aeolizer (Novartis); Airmax (IVAX); ClickHaler (Innovata Biomed); Diskhaler (GlaxoSmithKline); Diskus/Accuhaler (GlaxoSmithKline); Easyhaler (Orion Pharma); Eclipse (Aventis); FlowCaps (Hovione); Handihaler (Boehringer Ingelheim); Pulvinal (Chiesi); Rotahaler (GlaxoSmithKline); SkyeHaler/Certihaler (SkyePharma);

27

Twisthaler (Schering-Plough); Turbuhaler (AstraZeneca); Ultrahaler (Aventis); and the like.

In yet another specific embodiment of this invention, the pharmaceutical composition comprising the therapeutic agent is administered by inhalation using a metered-dose inhaler. Such metered-dose inhalers typically discharge a measured amount of the therapeutic agent using a compressed propellant gas. Accordingly, pharmaceutical compositions administered using a metered-dose inhaler typically comprise a solution or suspension of the therapeutic agent in a liquefied propellant. Any suitable liquefied propellant may be employed including chlorofluorocarbons, such as CCl_3F, and hydrofluoroalkanes (HFAs), such as 1,1,1,2-tetrafluoroethane (HFA 134a) and 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-*n*-propane, (HFA 227). Due to concerns about chlorofluorocarbons affecting the ozone layer, formulations containing HFAs are generally preferred. Additional optional components of HFA formulations include co-solvents, such as ethanol or pentane, and surfactants, such as sorbitan trioleate, oleic acid, lecithin, and glycerin.

A representative pharmaceutical composition for use in a metered-dose inhaler comprises from about 0.01 % to about 5 % by weight of a compound of formula I; from about 0 % to about 20 % by weight ethanol; and from about 0 % to about 5 % by weight surfactant; with the remainder being an HFA propellant.

Such compositions are typically prepared by adding chilled or pressurized hydrofluoroalkane to a suitable container containing the therapeutic agent, ethanol (if present) and the surfactant (if present). To prepare a suspension, the therapeutic agent is micronized and then combined with the propellant. The formulation is then loaded into an aerosol canister, which forms a portion of a metered-dose inhaler device.

Metered-dose inhaler devices suitable for administering therapeutic agents by inhalation are well known to those of ordinary skill in the art or such devices are commercially available. For example, representative metered-dose inhaler devices or products include AeroBid Inhaler System (Forest Pharmaceuticals); Atrovent Inhalation Aerosol (Boehringer Ingelheim); Flovent (GlaxoSmithKline); Maxair Inhaler (3M); Proventil Inhaler (Schering); Serevent Inhalation Aerosol (GlaxoSmithKline); and the like.

In another embodiment, the pharmaceutical compositions of this invention are suitable for oral administration. Suitable pharmaceutical compositions for oral administration may be in the form of capsules, tablets, pills, lozenges, cachets, dragees,

28

powders, granules; or as a solution or a suspension in an aqueous or non-aqueous liquid; or as an oil-in-water or water-in-oil liquid emulsion; or as an elixir or syrup; and the like; each containing a predetermined amount of a compound of the present invention as an active ingredient.

When intended for oral administration in a solid dosage form (i.e., as capsules, tablets, pills and the like), the pharmaceutical compositions of this invention will typically comprise a compound of the present invention as the active ingredient and one or more pharmaceutically acceptable carriers, such as sodium citrate or dicalcium phosphate. Optionally or alternatively, such solid dosage forms may also comprise: (1) fillers or extenders, such as starches, lactose, sucrose, glucose, mannitol, and/or silicic acid; (2) binders, such as carboxymethylcellulose, alginates, gelatin, polyvinyl pyrrolidone, sucrose and/or acacia; (3) humectants, such as glycerol; (4) disintegrating agents, such as agar-agar, calcium carbonate, potato or tapioca starch, alginic acid, certain silicates, and/or sodium carbonate; (5) solution retarding agents, such as paraffin; (6) absorption accelerators, such as quaternary ammonium compounds; (7) wetting agents, such as cetyl alcohol and/or glycerol monostearate; (8) absorbents, such as kaolin and/or bentonite clay; (9) lubricants, such as talc, calcium stearate, magnesium stearate, solid polyethylene glycols, sodium lauryl sulfate, and/or mixtures thereof; (10) coloring agents; and (11) buffering agents.

Release agents, wetting agents, coating agents, sweetening, flavoring and perfuming agents, preservatives and antioxidants can also be present in the pharmaceutical compositions of this invention. Examples of pharmaceutically acceptable antioxidants include: (1) water-soluble antioxidants, such as ascorbic acid, cysteine hydrochloride, sodium bisulfate, sodium metabisulfate sodium sulfite and the like; (2) oil-soluble antioxidants, such as ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), lecithin, propyl gallate, alpha-tocopherol, and the like; and (3) metal-chelating agents, such as citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sorbitol, tartaric acid, phosphoric acid, and the like. Coating agents for tablets, capsules, pills and like, include those used for enteric coatings, such as cellulose acetate phthalate (CAP), polyvinyl acetate phthalate (PVAP), hydroxypropyl methylcellulose phthalate, methacrylic acid!methacrylic acid ester copolymers, cellulose acetate trimellitate (CAT), carboxymethyl ethyl cellulose (CMEC), hydroxypropyl methyl cellulose acetate succinate (HPMCAS), and the like.

If desired, the pharmaceutical compositions of the present invention may also be formulated to provide slow or controlled release of the active ingredient using, by way of example, hydroxypropyl methyl cellulose in varying proportions; or other polymer matrices, liposomes and/or microspheres.

In addition, the pharmaceutical compositions of the present invention may optionally contain opacifying agents and may be formulated so that they release the active ingredient only, or preferentially, in a certain portion of the gastrointestinal tract, optionally, in a delayed manner. Examples of embedding compositions which can be used include polymeric substances and waxes. The active ingredient can also be in micro-encapsulated form, if appropriate, with one or more of the above-described excipients.

Suitable liquid dosage forms for oral administration include, by way of illustration, pharmaceutically acceptable emulsions, microemulsions, solutions, suspensions, syrups and elixirs. Such liquid dosage forms typically comprise the active ingredient and an inert diluent, such as, for example, water or other solvents, solubilizing agents and emulsifiers, such as ethyl alcohol, isopropyl alcohol, ethyl carbonate, ethyl acetate, benzyl alcohol, benzyl benzoate, propylene glycol, 1,3-butylene glycol, oils (esp., cottonseed, groundnut, corn, germ, olive, castor and sesame oils), glycerol, tetrahydrofuryl alcohol, polyethylene glycols and fatty acid esters of sorbitan, and mixtures thereof. Suspensions, in addition to the active ingredient, may contain suspending agents such as, for example, ethoxylated isostearyl alcohols, polyoxyethylene sorbitol and sorbitan esters, microcrystalline cellulose, aluminium metahydroxide, bentonite, agar-agar and tragacanth, and mixtures thereof.

When intended for oral administration, the pharmaceutical compositions of this invention may be packaged in a unit dosage form. The term "unit dosage form" means a physically discrete unit suitable for dosing a patient, i.e., each unit containing a predetermined quantity of active agent calculated to produce the desired therapeutic effect either alone or in combination with one or more additional units. For example, such unit dosage forms may be capsules, tablets, pills, and the like.

The compounds of this invention can also be administered transdermally using known transdermal delivery systems and excipents. For example, a compound of this invention can be admixed with permeation enhancers, such as propylene glycol, polyethylene glycol monolaurate, azacycloalkan-2-ones and the like, and incorporated into a patch or similar delivery system. Additional excipients including gelling agents, emulsifiers and buffers, may be used in such transdermal compositions if desired.

Additionally, the compounds of this invention can be administered parenterally, i.e., intravenously, subcutaneously or intramuscularly. For parenteral administration, a compound of formula I is typically dissolved in a carrier acceptable for parenteral administration, such as sterile water, saline, vegetable oil and the like. By way of illustration, an intravenous composition typically comprises a sterile aqueous solution of a compound of formula I, wherein the solution has a pH in the range of about 4 to about 7.

If desired, the compounds of this invention may be administered in combination with one or more other therapeutic agents. In this embodiment, a compound of this invention is either physically mixed with the other therapeutic agent to form a composition containing both agents; or each agent is present in separate and distinct compositions which are administered to the patient simultaneously or sequentially.

For example, a compound of formula I can be combined with second therapeutic agent using conventional procedures and equipment to form a composition comprising a compound of formula I and a second therapeutic agent. Additionally, the therapeutic agents may be combined with a pharmaceutically acceptable carrier to form a pharmaceutical composition comprising a compound of formula I, a second therapeutic agent and a pharmaceutically acceptable carrier. In this embodiment, the components of the composition are typically mixed or blended to create a physical mixture. The physical mixture is then administered in a therapeutically effective amount using any of the routes described herein.

Alternatively, the therapeutic agents may remain separate and distinct before administration to the patient. In this embodiment, the therapeutic agents are not physically mixed together before administration but are administered simultaneously or sequentially as separate compositions. For example, a compound of formula I can be administered by inhalation simultaneously or sequentially with another therapeutic agent using an inhalation delivery device that employs separate compartments (e.g. blister packs) for each therapeutic agent. Alternatively, the combination may be administered using separate delivery devices, i.e., one delivery device for each therapeutic agent. Additionally, the therapeutic agents can be delivered by different routes of administration, i.e., one by inhalation and the other by oral administration.

Any therapeutic agent compatible with the compounds of the present invention may be used in combination with such compounds. In a particular embodiment, the second therapeutic agent is one that is effectively administered by inhalation. By way of

illustration, representative types of therapeutic agents that may be used with the compounds of this invention include, but are not limited to, anti-inflammatory agents, such as steroidal anti-inflammatory agents (including corticosteroids and glucocorticoids), non-steroidal anti-inflammatory agents (NSAIDs), and PDE_4 inhibitors; bronchodilators, such as PDE_3 inhibitors, adenosine 2b modulators and β_2 adrenergic receptor agonists; antiinfective agents, such as Gram-positive antibiotics, Gram-negative antibiotics, and antiviral agents; antihistamines; protease inhibitors; afferent blockers, such as D_2 agonists and neurokinin modulators; and muscarinic receptor antagonists (antichlolinergic agents). Numerous examples of such therapeutic agents are well known in the art. Suitable doses for the other therapeutic agents administered in combination with a compound of the invention are typically in the range of about 0.05 μg/day to about 500 mg/day.

In a particular embodiment of this invention, a compound of formula I is administered in combination with a steroidal anti-inflammatory agent. Representative examples of steroidal anti-inflammatory agents that can be used in combination with the compounds of this invention include, but are not limited to, beclomethasone dipropionate; budesonide; butixocort propionate; 20*R*-16α,17α-[butylidenebis(oxy)]-6α,9α-difluoro-11β-hydroxy-17β-(methylthio)androsta-4-en-3-one (RPR-106541); ciclesonide; dexamethasone; 6α,9α-difluoro-17α -[(2-furanylcarbonyl)oxy]-11β-hydroxy-16α-methyl-3-oxoandrosta-1,4-diene-17β-carbothioic acid *S*-fluoromethyl ester; 6α,9α-difluoro-11β-hydroxy-16α-methyl-17α -[(4-methytl-1,3-thiazole-5-carbonyl)oxy]-3-oxoandrosta-1,4-diene-17β-carbothioic acid *S*-fluoromethyl ester; 6α,9α-difluoro-11β-hydroxy-16α-methyl-3-oxo-17α-propionyloxyandrosta-1,4-diene-17β-carbothioic acid (*S*)-(2-oxotetrahydrofuran-3*S*-yl) ester; flunisolide; fluticasone propionate; methyl prednisolone; mometasone furoate; prednisolone; prednisone; rofleponide; ST-126; triamcinolone acetonide; and the like, or pharmaceutically acceptable salts thereof. Such steroidal anti-inflammatory agents are commercially available or can be prepared using conventional procedures and reagents. For example, the preparation and use of steroidal anti-inflammatory agents is described in U.S. Patent No. 6,750,210 B2, issued June 15, 2004; U.S. Patent No. 6,759,398 B2, issued July 6, 2004; U.S. Patent No. 6,537,983, issued March 25, 2003; U.S. Patent Application Publication No. US 2002/0019378 A1, published February 14, 2002; and references cited therein.

When employed, the steroidal anti-inflammatory agent is typically administered in an amount that produces a therapeutically beneficial effect when co-administered with a

compound of the invention. Typically, the steroidal anti-inflammatory agent will be administered in an amount sufficient to provide from about 0.05 μg to about 500 μg per dose.

The following examples illustrate representative pharmaceutical compositions of the present invention:

Example A

Dry Powder Composition

A micronized compound of the invention (100 mg) is blended with milled lactose (25 g) (e.g., lactose in which not greater than about 85% of the particles have a MMD of about 60 μm to about 90 μm and not less than 15% of the particles have a MMD of less then 15 μm). This blended mixture is then loaded into individual blisters of a peelable blister pack in an amount sufficient to provide about 10 μg to about 500 μg of the compound of the invention per dose. The contents of the blisters are administered using a dry powder inhaler.

Example B

Dry Powder Composition

A micronized compound of the invention (1 g) is blended with milled lactose (200 g) to form a bulk composition having a weight ratio of compound to milled lactose of 1:200. The blended composition is packed into a dry powder inhalation device capable of delivering between about 10 μg to about 500 μg of the compound of the invention per dose.

Example C

Dry Powder Composition

A micronized compound of the invention (100 mg) and a micronized steroidal anti-inflammatory agent (500 mg) are blended with milled lactose (30 g). This blended mixture is then loaded into individual blisters of a peelable blister pack in an amount sufficient to provide about 10 μg to about 500 μg of the compound of the invention per dose. The contents of the blisters are administered using a dry powder inhaler.

Example D

Metered-Dose Inhaler Composition

A micronized compound of the invention (10 g) is dispersed in a solution prepared by dissolving lecithin (0.2 g) in demineralized water (200 mL). The resulting suspension is spray dried and then micronized to form a micronized composition comprising particles having a mean diameter less than about 1.5 μm. The micronized composition is then loaded into metered-dose inhaler cartridges containing pressurized 1,1,1,2-tetrafluoroethane in an amount sufficient to provide about 10 μg to about 500 μg of the compound of the invention per dose when administered by the metered dose inhaler.

Example E

Nebulizer Composition

A compound of the invention (25 mg) is dissolved in citrate buffered (pH 5) isotonic saline (125 mL). The mixture is stirred and sonicated until the compound is dissolved. The pH of the solution is checked and adjusted, if necessary, to pH 5 by slowly adding aqueous 1N sodium hydroxide. The solution is administered using a nebulizer device that provides about 10 μg to about 500 μg of the compound of the invention per dose.

Example F

Hard Gelatin Capsules

A compound of the invention (50 g), spray-dried lactose (440 g) and magnesium stearate (10 g) are thoroughly blended. The resulting composition is loaded into a hard gelatin capsule (500 mg of composition per capsule) that are administered orally.

Example G

Oral Suspension

The following ingredients are thoroughly mixed to form a suspension for oral administration:

Ingredients	Amount
Compound of the invention	1.0 g
Fumaric acid	0.5 g
Sodium chloride	2.0 g
Methyl paraben	0.15 g
Propyl paraben	0.05 g
Granulated sugar	25.5 g
Sorbitol (70% solution)	12.85 g
VEEGUM® K (magnesium aluminum silicate)	1.0 g
Flavoring	0.035 mL
Coloring	0.5 mg
Distilled water	q.s. to 100 mL

The resulting suspension contains 100 mg of active ingredient per 10 mL of suspension. The suspension is administered orally.

Example H

Injectable Composition

A compound of the invention (0.2 g) is blended with 0.4 M sodium acetate buffer solution (2.0 mL). The pH of the resulting solution is adjusted to pH 4 using 0.5 N aqueous hydrochloric acid or 0.5 N aqueous sodium hydroxide, as necessary, and then sufficient water for injection is added to provide a total volume of 20 mL. The mixture is then filtered through a sterile filter (0.22 micron) to provide a sterile solution suitable for administration by injection.

35

Utility

The compounds of this invention possess both β_2 adrenergic receptor agonist and muscarinic receptor antagonist activity and therefore, such compounds are expected to be useful as therapeutic agents for treating medical conditions mediated by β_2 adrenergic receptors or muscarinic receptors, i.e., medical conditions that are ameliorated by treatment with a β_2 adrenergic receptor agonist or a muscarinic receptor antagonist. Such medical conditions are well known to those of ordinary skill in the art as exemplified by the teachings of Eglen et al., *Muscarinic Receptor Subtypes: Pharmacology and Therapuetic Potential, DN&P* **10**(8), 462-469 (1997); Emilien et al., *Current Therapeutic Uses and Potential of beta-Adrenoceptor Agonists and Antagonists, European J. Clinical Pharm.*, **53**(6), 389-404 (1998); and references cited therein. Such medical conditions include, by way of example, pulmonary disorders or diseases associated with reversible airway obstruction, such as chronic obstructive pulmonary disease (e.g., chronic and wheezy bronchitis and emphysema), asthma, pulmonary fibrosis and the like. Other conditions include premature labor, depression, congestive heart failure, skin diseases (e.g., inflammatory, allergic, psoriatic and proliferative skin diseases), conditions where lowering peptic acidity is desirable (e.g., peptic and gastric ulceration) and muscle wasting disease.

Accordingly, in one embodiment, this invention relates to a method for treating a pulmonary disorder, the method comprising administering to a patient in need of treatment a therapeutically effective amount of a compound of formula I. When used to treat a pulmonary disorder, the compounds of this invention will typically be administered by inhalation in multiple doses per day, in a single dose per day or a single dose per week. Generally, the dose for treating a pulmonary disorder will range from about 10 μg/day to about 500 μg/day.

In one of its method aspects, this invention relates to a method of treating chronic obstructive pulmonary disease or asthma, the method comprising administering to a patient a therapeutically effective amount of a compound of formula I. Generally, the dose for treating COPD or asthma will range from about 10 μg/day to about 500 μg/day. The term "COPD" is understood by those of ordinary skill in the art to include a variety of respiratory conditions, including chronic obstructive bronchitis and emphysema, as exemplified by the teachings of Barnes, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease, N. Engl. J. Med.*, 2000: 343:269-78, and references cited therein.

When administered by inhalation, the compounds of this invention typically have the effect of producing bronchodilation. Accordingly, in another of its method aspects, this invention relates to a method of producing bronchodilation in a mammal, the method comprising administering to a mammal a bronchodilation-producing amount of a compound of formula I. Generally, the dose for producing bronchodilation will range from about 10 μg/day to about 500 μg/day.

When used as a therapeutic agent, the compounds of this invention are optionally administered in combination with another therapeutic agent or agents. In particular, by administering the compounds of this invention with a steroidal anti-inflammatory agent, triple therapy, i.e., β_2 adrenergic receptor agonist activity, muscarinic receptor antagonist activity and anti-inflammatory activity, can be achieved using only two therapeutic agents. Since pharmaceutical compositions (and combinations) containing two therapeutic agents are typically easier to formulate and/or administer compared to compositions containing three therapeutic agents, such two component compositions provide a significant advantage over compositions containing three therapeutic agents. Accordingly, in a particular embodiment, the pharmaceutical compositions, combinations and methods of this invention further comprise a steroidal anti-inflammatory agent.

Since compounds of this invention possess both β_2 adrenergic agonist activity and muscarinic receptor antagonist activity, such compounds are also useful as research tools for investigating or studying biological systems or samples having β_2 adrenergic receptors or muscarinic receptors. Additionally, such compounds are useful in screening assays to discover, for example, new compounds having both β_2 adrenergic agonist activity and muscarinic receptor antagonist activity. Such biological systems or samples may comprise β_2 adrenergic receptors and/or muscarinic receptors. Any suitable biological system or sample having β_2 adrenergic and/or muscarinic receptors may be employed in such studies which may be conducted either *in vitro* or *in vivo*. Representative biological systems or samples suitable for such studies include, but are not limited to, cells, cellular extracts, plasma membranes, tissue samples, mammals (such as mice, rats, guinea pigs, rabbits, dogs, pigs, etc.), and the like.

When used as a research tool, a biological system or sample comprising a β_2 adrenergic receptor and/or a muscarinic receptor is typically contacted with a β_2 adrenergic receptor-agonizing or muscarinic receptor-antagonizing amount of a compound of this invention. The effects on the biological system or sample caused by the compound

are then determined or measured using conventional procedures and equipment, such as by measuring binding in a radioligand binding assays or ligand-mediated changes in a functional assay or by determining the amount of bronchoprotection provided by the compound in a bronchoprotection assay in a mammal. Representative ligand-mediated changes in a functional assay include ligand-mediated changes in intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP); ligand-mediated changes in activity of the enzyme adenylyl cyclase (which synthesizes cAMP); ligand-mediated changes in incorporation of guanosine 5'-O-(thio)triphosphate ([^{35}S]GTP S) into isolated membranes via receptor catalyzed exchange of [^{35}S]GTP S for GDP; ligand-mediated changes in free intracellular calcium ions (measured, for example, with a fluorescence-linked imaging plate reader or FLIPR® from Molecular Devices, Inc.); and the like. Compounds of this invention are expected to agonize or cause activation of a β_2 adrenergic receptor and antagonize or decrease the activation of muscarinic receptors in the functional assays listed herein or in assays of a similar nature. The compounds of this invention will typically be used in these studies at a concentration ranging from about 0.1 nanomolar to about 100 nanomolar.

Additionally, the compounds of this invention can be used as research tools for evaluating other chemical compounds. In this aspect of the invention, a compound of formula I is used as a standard in an assay to allow comparison of the results obtained with a test compound and the compound of formula I. For example, β_2 adrenergic receptor and/or muscarinic receptor binding data (as determined, for example, by *in vitro* radioligand displacement assays) for a test compound or a group of test compounds is compared to the β_2 adrenergic receptor and/or muscarinic receptor binding data for a compound of formula I to identify those test compounds that have desirable binding, i.e. test compounds having binding about equal or superior to a compound of formula I, if any. Alternatively, for example, bronchoprotective effects can be determined for test compounds and a compound of formula I in a bronchoprotection assay in a mammal and this data compared to identify test compounds providing about equal or superior bronchoprotective effects. This aspect of the invention includes, as separate embodiments, both (i) the generation of comparison data (using the appropriate assays) and (ii) the analysis of the test data to identify test compounds of interest.

The properties and utility of the compounds of this invention can be demonstrated using various *in vitro* and *in vivo* assays well known to those of ordinary skill in the art.

For example, representative assays are described in further detail in the following Examples.

EXAMPLES

The following Preparations and Examples are provided to illustrate specific embodiments and aspects of this invention. The illustration of specific embodiments and aspects, however, is not intended to limit the scope of this invention in any way unless specifically indicated.

All reagents, starting materials and solvents used in the following examples were purchased from commercial suppliers (such as Aldrich, Fluka, Sigma and the like) and were used without further purification unless otherwise indicated.

In the following examples, HPLC analysis was typically conducted using an Agilent (Palo Alto, CA) Series 1100 instrument with Zorbax Bonus RP 2.1 x 50 mm columns, supplied by Agilent, (a C14 column), having a 3.5 micron particle size. Detection was by UV absorbance at 214 nm. Mobile phase "A" was 2 % acetonitrile, 97.9 % water, and 0.1% trifluoroacetic acid (v/v/v); and mobile phase "B" was 89.9 % acetonitrile, 10 % water, and 0.1 % trifluoroacetic acid (v/v/v). HPLC (10-70) data were obtained with a flow rate of 0.5 mL/minute of 10% to 70% mobile phase B gradient over a 6-minute period; HPLC (5-35) data were obtained with a flow rate of 0.5 mL/minute of 5% to 35% mobile phase B gradient over a 5-minute period; and HPLC (10-90) data were obtained with a flow rate of 0.5 mL/minute of 10% to 90% mobile phase B gradient over a 5-minute period.

Liquid chromatography mass spectrometry (LCMS) data typically were obtained with an Applied Biosystems (Foster City, CA) Model API-150EX instrument. LCMS 10-90 data were obtained with a 10% to 90% mobile phase B gradient over a 5-minute period.

Small-scale purifications were typically conducted using an API 150EX Prep Workstation system from Applied Biosystems. The mobile phase "A" was water containing 0.05% trifluoroacetic acid (v/v); and mobile phase "B" was acetonitrile containing 0.05% trifluoroacetic acid (v/v). For small samples (about 3 to 50 mg recovered sample size), the following conditions were typically used: 20 mL/min flow rate; 15 min gradients and a 20 mm x 50 mm Prism RP column with 5 micron particles (Thermo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA). For larger samples (i.e., greater than about 100 mg crude sample), the following conditions were typically used: 60 mL/min flow rate;

30 min gradients and a 41.4 mm x 250 mm Microsorb BDS column with 10 micron particles (Varian, Palo Alto, CA).

Example 1

Biphenyl-2-ylcarbamic Acid Piperidin-4-yl Ester

Biphenyl-2-isocyanate (97.5 g, 521 mmol) and 4-hydroxy-1-benzylpiperidine (105 g, 549 mmol) (both commercially available from Aldrich, Milwaukee, WI) were heated together at 70 °C for 12 h, during which time the formation of biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-benzylpiperidin-4-yl ester was monitored by LCMS. The reaction mixture was then cooled to 50 °C and ethanol (1 L) was added, and then 6M hydrochloric acid (191 mL) was added slowly. The reaction mixture was then cooled to ambient temperature and ammonium formate (98.5 g, 1.56 mol) was added and nitrogen gas was bubbled through the solution vigorously for 20 min. Palladium (10 wt. % (dry basis) on activated carbon) (20 g) was then added. The reaction mixture was heated at 40 °C for 12 h and then filtered through a pad of Celite. The solvent was then removed under reduced pressure and 1M hydrochloric acid (40 mL) was added to the crude residue. Sodium hydroxide (10N) was then added to adjust the pH to 12. The aqueous layer was extracted with ethyl acetate (2 x 150 mL) and dried (magnesium sulfate), and then the solvent was removed under reduced pressure to give biphenyl-2-ylcarbamic acid piperidin-4-yl ester (155 g, 100%). HPLC (10-70) $R_t = 2.52$; MS *m/z*: $[M + H^+]$ calc'd for $C_{18}H_{20}N_2O_2$ 297.15; found 297.3.

Example 2

3-[4-(Biphenyl-2-ylcarbamoyloxy)piperidin-1-yl]propionic Acid

To a solution of biphenyl-2-ylcarbamic acid piperidin-4-yl ester (50 g, 67.6 mmol) in dichloromethane (500 mL) was added acrylic acid (15.05 mL, 100 mmol). The resulting mixture was heated at 50 °C under reflux for 18 hours and then the solvent was removed. Methanol (600 mL) was added and this mixture was heated at 75 °C for 2 hours and then cooled to room temperature to form a thick slurry. The solid was collected by filtration, washed with methanol (50 mL) and air dried to afford 3-[4-(biphenyl-2-ylcarbamoyloxy)piperidin-1-yl]propionic acid (61g, 96% purity) as white powder.

Example 3

***N*-{5-[(*R*)-2-Amino-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]-2-hydroxyphenyl}-formamide Acetic Acid Salt**

Step A – *N*-{5-[(*R*)-2-Benzylamino-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]-2-benzyloxyphenyl}formamide

To a 500 mL three-necked round-bottomed flask was added *N*-{2-benzyloxy-5-[(*R*)-2-bromo-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]phenyl}formamide (100 g, 215 mmol) and *N*-methyl-2-pyrrolidone (300 mL). Benzylamine (69.4 mL, 648 mol) was added and the reaction mixture was flushed with nitrogen. The reaction mixture was then heated to 90 °C and stirred for about 8 hours. The reaction mixture was then cooled to room temperature and water (1.5 L) and ethyl acetate (1.5 L) were added. The layers were separated and the organic layer was washed with water (500 mL), a 1:1 mixture of water and saturated brine (500 mL total), and then again with water (500 mL). The organic layer was then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to provide crude *N*-{5-[(*R*)-2-benzylamino-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]-2-benzyloxyphenyl}formamide (100 g, 90% yield, 75-80% purity) as an orange-brown thick oil.

Step B – *N*-{5-[(*R*)-2-Amino-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]-2-hydroxyphenyl}-formamide Acetic Acid Salt

Crude *N*-{5-[(*R*)-2-benzylamino-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]-2-benzyloxyphenyl}formamide (100 g, 194 mmol) was dissolved in methanol (1 L) and acetic acid (25 mL, 291 mmol). The resulting mixture was purged with dry nitrogen and then palladium hydroxide on carbon (20 g, 20 wt. %, about 50% water) was added. Hydrogen was bubbled through the reaction mixture with stirring at room temperature for about 10 hours. The mixture was then purged with dry nitrogen and the mixture was filtered through Celite. The filtrate was concentrated on a rotary evaporator and ethyl acetate (600 mL) was added to the residue. This mixture was stirred for about 2 hours at which time a thick yellow slurry had developed. The slurry was filtered and the precipitate was air dried to provide *N*-{5-[(*R*)-2-amino-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]-2-hydroxyphenyl}formamide acetic acid salt (48 g, 98% purity) as a yellow-white solid. LCMS (10-70) $R_t = 3.62$; $[M + H^+]$ found 311.3.

41

Example 4

Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-Formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

Step A – Methyl 2,5-Dimethyl-4-nitrobenzoate

To a stirred solution of 2,5-dimethyl-4-nitrobenzoic acid (480 mg, 2.4 mmol) in dry methanol (8.2 mL) at 0 °C under dry nitrogen was added thionyl chloride (0.538 mL, 7.38 mmol). The resulting mixture as allowed to warm to room temperature and stirred for about 7 hours. Additional thionyl chloride (0.300 mL) was added and stirring was continued at room temperature overnight. The solvent was removed under reduced pressure and the residue was dissolved in ethyl acetate. This solution was washed with saturated aqueous sodium bicarbonate, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure to provide methyl 2,5-dimethyl-4-nitrobenzoate (578 mg) as a pale yellow solid. HPLC (10-70) $R_t = 4.61$; ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.57 (3H, s), 2.61 (3H, s), 3.94 (3H, s), 7.82 (1H, s), 7.87 (1H, s).

Step B – Methyl 4-Amino-2,5-dimethylbenzoate

To a stirred solution of methyl 2,5-dimethyl-4-nitrobenzoate (523 mg, 2.5 mmol) in a 9:1 mixture of methanol and water (25 mL total) at 0 °C was added ammonium chloride (401 mg, 7.5 mmol). Zinc (1.63 g, 25 mmol) was added portionwise and the resulting mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was then filtered through Celite and the Celite pad was washed with methanol. The filtrate was concentrated under reduced pressure and the resulting residue was dissolved in ethyl acetate. This solution was washed with saturated aqueous sodium bicarbonate, dried over anhydrous sodium sulfate and concentrated under reduced pressure to provide methyl 4-amino-2,5-dimethylbenzoate (450 mg) as a yellow oil. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.14 (3H, s), 2.53 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.85 (2H, br s), 6.48 (1H, s), 7.72 (1H, s).

Step C – Methyl 4-{3-[4-(Biphenyl-2-ylcarbamoyloxy)piperidin-1-yl]propionylamino}-2,5-dimethylbenzoate

To a stirred solution of 3-[4-(biphenyl-2-ylcarbamoyloxy)piperidin-1-yl]propionic acid (670 mg, 1.82 mmol) and methyl 4-amino-2,5-dimethylbenzoate (390 mg, 2.18 mmol) in dichloromethane (3.6 mL) and diisopropylethylamine (0.413 mL) was added *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) (829 mg,

2.18 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. The mixture was then washed with saturated aqueous sodium bicarbonate, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography eluting with dichloromethane containing from 3% to 5% methanol to provide methyl 4-{3-[4-(biphenyl-2-ylcarbamoyloxy)piperidin-1-yl]propionylamino}-2,5-dimethylbenzoate (568 mg, 59% yield). LCMS (10-70) $R_t = 4.55$; $[M + H^+]$ found 530.4.

Step D – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-Hydroxymethyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a stirred solution of 1M lithium aluminum hydride in THF (1.52 mL, 1.52 mmol) at 0 °C was added methyl 4-{3-[4-(biphenyl-2-ylcarbamoyloxy)piperidin-1-yl]propionylamino}-2,5-dimethylbenzoate (400 mg, 0.76 mmol). The resulting mixture was stirred at 0 °C for 30 minutes and then a 1:1 mixture of 1M aqueous sodium hydroxide (5 mL) and water (5 mL) was added and stirring was continued for 2 hours. Dichloromethane was added and the organic layer was separated, dried over sodium sulfate and the solvent removed under reduced pressure. The residue was purified by silica gel chromatography eluting with dichloromethane containing 5% methanol to provide biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-hydroxymethyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)-ethyl]piperidin-4-yl ester. LCMS (10-70) $R_t = 3.94$; $[M + H^+]$ found 502.5.

Step E – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-Formyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a solution of biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-hydroxymethyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (151 mg, 0.3 mmol) in dichloromethane (3 mL) at 0 °C was added dimethyl sulfoxide (128 μL, 1.8 mmol) and diisopropylethylamine (157 μL, 0.9 mmol). After 15 minutes, sulfur trioxide pyridine complex (143 mg, 0.9 mmol) was added and stirring at 0 °C was continued for 1 hour. Water was added to quench the reaction and the layers were separated. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and the solvent removed under reduced pressure to give biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-formyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (150 mg, 100% yield), which was used without further purification. $[M + H^+]$ found 500.4.

Step F – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

A solution of biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-formyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (150 mg, 0.30 mmol) and *N*-{5-[(*R*)-2-amino-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]-2-hydroxyphenyl}formamide (112 mg, 0.36 mmol) in a 1:1 mixture of dichloromethane and methanol (3.0 mL total) was stirred at room temperature for 30 minutes. Sodium triacetoxyborohydride (191 mg, 0.9 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at room temperature overnight. Acetic acid was added to quench the reaction and the mixture was concentrated under reduced pressure to give biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)-ethyl]piperidin-4-yl ester, which was used without further purification. LCMS (10-70) R_t = 4.55; [M + H^+] found 794.6.

Step G – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-Formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a suspension of biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)-ethyl]piperidin-4-yl ester (238 mg, 0.30 mmol) in dichloromethane (3.0 mL) was added triethylamine trihydrofluoride (147 μL, 0.90 mmol). This mixture was stirred at room temperature overnight and then the mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was purified by prep-RP-HPLC (gradient: 2 to 50% acetonitrile in water with 0.05% TFA). The appropriate fractions were collected and combined and lyophilized to give biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester as the ditrifluoroacetate salt (50 mg, 97% purity). LPLC (2-90) R_t = 2.76; [M + H^+] found 680.8.

Example 5

Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-Formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

Step A – Dibenzyl-(4-iodo-2,5-dimethylphenyl)amine

To a 2-liter round-bottomed flask equipped with an overhead stirrer, temperature control and an addition funnel was added 4-iodo-2,5-dimethylaniline (100.0 g, 0.405 mol) (from Spectra Group Limited, Inc., Millbury, OH). Ethanol (1 L) and solid potassium carbonate (160 g, 1.159 mol) were added and then neat benzyl bromide (140 mL, 1.179 mol) was added in one portion. The resulting mixture was stirred at 30 °C for about 18 hours at which time HPLC shows greater than 98 % conversion. The mixture was then cooled to room temperature and hexanes (1 L) were added. This mixture was stirred for 15 minutes and then filtered through a paper filter to removed solids and the filter cake was washed with hexanes (200 mL). Using a rotoevaporator, the volume of the filtrate was reduced to about 500 mL and concentrated hydrochloric acid (30 mL) was added. The remaining solvent was then removed using a rotoevaporator. To the resulting residue was added hexanes (500 mL) and this mixture was stirred for about 30 minutes as which time a free-flowing slurry had formed. The slurry was filtered and the filter cake was washed with hexanes (200 mL) and dried to provide dibenzyl-(4-iodo-2,5-dimethylphenyl)amine hydrochloride (115 g, 62% yield, 97.5% purity) as a greenish colored solid.

The dibenzyl-(4-iodo-2,5-dimethylphenyl)amine hydrochloride was transferred to a 3 L flask and toluene (1 L) and 1 M aqueous sodium hydroxide (1 L) were added. The resulting mixture was stirred for 1 hour and then the layers were separated. The organic layer was washed with dilute brine (500 mL) and the solvent was removed by rotoevaporation to provide dibenzyl-(4-iodo-2,5-dimethylphenyl)amine (80 g) as a semi-solid thick oil. (Alternatively, dichloromethane can be used in place of toluene in this step). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 2.05 (3H, s), 2.19 (3H, s), 3.90 (4H, s), 6.91 (1H, s), 7.05-7.20 (10H, m), 7.42 (1H, s); MS [M + H$^+$] found 428.

Step B – 4-Dibenzylamino-2,5-dimethylbenzaldehyde Hydrochloride

To a 1-liter 3-necked round-bottomed flask equipped with an overhead stirrer, temperature control and an addition funnel was added dibenzyl-(4-iodo-2,5-dimethylphenyl)amine (15 g, 35 mmol). Toluene (300 mL) was added and the resulting mixture was stirred for about 15 minutes. The reaction flask was purged with dry nitrogen and cooled to about –20 °C

45

and 1.6 M *n*-butyllithium in hexanes (33 mL, 53 mmol) was added dropwise via the addition funnel. During the addition, the internal temperature of the reaction mixture was maintained below –10 °C.. When the addition was complete, the resulting mixture was stirred at about –15 °C for 15 minutes. *N,N*-Dimethylformamide (10 mL, 129 mmol) was then added dropwise while maintaining the internal reaction temperature below 0 °C. The resulting mixture was then stirred at –20 °C to 0 °C for about 1 hour. Aqueous 1 M hydrochloric acid (200 mL) was then added over a 5 minute period and the resulting mixture was stirred for 15 minutes. The layers were then separated and the organic layer was washed with dilute brine (100 mL). The organic layer was then dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and the solvent removed under reduced pressure to provide 4-dibenzylamino-2,5-dimethylbenzaldehyde hydrochloride (11.5 g, 90% yield, 95% purity) as thick oil that solidified upon standing. The product contained about 3 to 5 % of the des-iodo by-product. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2.42 (3H, s), 2.50 (3H, s), 4.25 (4H, s), 6.82 (1H, s), 7.10-7.30 (10H, m), 7.62 (1H, s), 10.15 (1H, s); MS [M + H$^+$] found 330.3.

Step C – 4-[1,3]Dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenylamine

To a 500 mL round-bottomed flask was added 4-dibenzylamino-2,5-dimethylbenzaldehyde hydrochloride (11.5 g, 31.4 mmol) and toluene (150 mL) and the resulting mixture was stirred until the salt completely dissolved. The reaction flask was then purged with dry nitrogen for 5 minutes. Ethylene glycol (5.25 mL, 94.2 mmol) and p-toluenesulfonic acid (760 mg, 6.2 mmol) were added and the resulting mixture was heated at 60 °C to 80 °C for about 20 hours. The solvent was then removed slowly (over about 40 minutes) at 40 °C on a rotary evaporator. Toluene (100 mL) was added to the residue and the solvent was again removed slowly at 40 °C on a rotary evaporator. This process was repeated using another aliquot of toluene (100 mL) and the mixture was evaporated to dryness. Ethyl acetate (150 mL) and saturated aqueous sodium bicarbonate (100 mL) were added to the residue and the layers were separated. The organic layer was washed with brine (50 mL) and then dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to provide crude dibenzyl-(4-[1,3]dioxolan-2-yl-2,5-dimethyl-phenyl)amine (11.4 g).

The crude dibenzyl-(4-[1,3]dioxolan-2-yl-2,5-dimethyl-phenyl)amine was dissolved in a 2:1 mixture of ethanol and water (150 mL total) and the resulting mixture was purged with dry nitrogen for 5 minutes. Palladium on carbon (2.3 g, 10 wt. %

containing about 50% water) and solid sodium bicarbonate (1.0 g) were added and the resulting mixture was hydrogenated at about 1 atm of hydrogen at 25 °C to 30 °C for about 8 hours. The mixture was then filtered through Celite and the filtrate was concentrated on a rotary evaporator to provide crude 4-[1,3]dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenylamine (5.6 g, 92% yield) as a thick oil. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 2.05 (3H, s), 2.22 (3H, s), 3.7-3.9 (4H, m), 3.95 (4H, s), 5.59 (1H, s), 6.72 (1H, s), 7.0-7.25 (11H, m).

Step D – *N*-(4-[1,3]Dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenyl)acrylamide

To a 500 mL round-bottom flask was added crude 4-[1,3]dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenylamine (5.6 g, 29 mmol), dichloromethane (100 mL) and diisopropylethylamine (7.6 mL, 43.5 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature until the ingredients dissolved and then the mixture was cooled to 0 °C. Acryloyl chloride (2.35 mL, 29 mmol) was then added dropwise over a 5 minute period. The reaction mixture was stirred at 0 °C to 5 °C for 1 hour and then water (50 mL) was added and stirring was continued for about 30 minutes at which time fine solids had formed. The mixture was filtered to collect the solids. The layers of the filtrate were then separated and the organic layer was concentrated under reduced pressure to dryness. Dichloromethane (50 mL) was added to the residue and this mixture was stirred until a free-flowing slurry developed. The slurry was filtered (using the same funnel used to collect the fine solids above) and the filter cake was washed with dichloromethane (10 mL) and dried to provide *N*-(4-[1,3]dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenyl)acrylamide (3.1 g, 97% purity) as a white to off-white solid.

The filtrate from above was then evaporated to dryness and methanol (10 mL) was added to the residue. This mixture was stirred for 15 minutes and then the precipitate was collected by filtration, washed with methanol (5 mL) and dried to give a second crop of *N*-(4-[1,3]dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenyl)acrylamide (0.8 g, 95% purity). ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 2.10 (3H, s), 2.23 (3H, s), 3.85-4.10 (4H, m), 5.60-6.40 (3H, m), 5.59 (1H, s), 7.18 (1H, s), 7.23 (1H, s).

Step E – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-Formyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester Hydrochloride

To a 50 mL round-bottom flask was added biphenyl-2-ylcarbamic acid piperidin-4-yl ester (1.2 g, 4.04 mmol) and *N*-(4-[1,3]dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenyl)acrylamide

(1.0 g, 4.04 mmol). Ethanol (10 mL) and dichloromethane (10 mL) were added to form a slurry. The reaction mixture was heated at 45 °C to 50 °C for about 18 hours and then cooled to room temperature. Aqueous 1M hydrochloric acid (10 mL) was added and the resulting mixture was stirred vigorously for about 3 hours. Dichloromethane (10 mL) was added and the resulting mixture was stirred for about 5 minutes. The layers were then separated and the organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated on a rotary evaporator to provide crude biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-formyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester hydrochloride (1.9 g). ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 1.2-1.4 (2H, m), 1.58-1.75 (2H, m), 2.0-2.17 (2H, m), 2.19 (3H, s), 2.38 (3H, s), 2.41-2.50 (4H, m), 2.5-2.75 (2H, m), 4.31-4.42 (1H, m), 7.10-7.35 (9H, m), 7.55 (1H, s), 7.75 (1H, s), 8.59 (1H, s), 9.82 (1H, s), 9.98 (1H, s); MS [M + H$^+$] found 500.2.

Step F – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenyl-carbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a 2 L three-necked round-bottom flask was added biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-formyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester hydrochloride (38 g, 70 mmol) and *N*-{5-[(*R*)-2-amino-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]-2-hydroxyphenyl}formamide acetic acid salt (33.6 g, 91 mmol). Dichloromethane (500 mL) and methanol (500 mL) were added and the resulting mixture was stirred at room temperature under dry nitrogen for about 3 hours. The reaction mixture was then cooled to 0 °C to 5 °C and solid sodium triacetoxyborohydride (44.5 g, 381 mmol) was added in portions over a 10 minute period. The reaction mixture was slowly warmed from 0 °C to room temperature over a period of about 2 hours and then cooled to 0 °C. Saturated aqueous sodium bicarbonate (500 mL) and dichloromethane (500 mL) were added. This mixture was stirred thoroughly and then the layers were separated. The organic layer was washed with brine (500 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under reduced pressure to give crude biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)-ethyl]piperidin-4-yl ester (55 g, 86% purity) as a yellow solid.

48

The crude product (30 g) was dissolved in dichloromethane containing 2% methanol (150 mL total) and loaded onto a silica gel column (300 g) that had been packed and equilibrated with dichloromethane containing 2% methanol and 0.5% ammonium hydroxide. The product was eluted from the column using dichloromethane containing 2% methanol and 0.5% ammonium hydroxide (1 L); dichloromethane containing 4% methanol and 0.5% ammonium hydroxide (1 L) and dichloromethane containing 5% methanol and 0.5% ammonium hydroxide (about 3 L). Fractions (200 mL) were collected and those fractions having a purity greater than 90% were combined and concentrated under reduced pressure to provide biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)-ethyl]piperidin-4-yl ester (21.6 g, 96.5% purity) as a yellowish solid. MS [M + H^+] found 794.6.

Step G – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-Formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester Hydrofluoride Salt

To a 1 L round-bottom flask was added biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (21.5 g, 27.1 mmol) and dichloromethane (200 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature until the ingredients dissolved and then triethylamine trihydrofluoride (8.85 mL, 54.2 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at 25 °C for about 48 hours. The solvent was removed on a rotary evaporator to provide a thick paste. Dichloromethane (100 mL) and ethyl acetate (200 mL) were added to the paste and the resulting mixture was stirred for 30 minutes. The resulting slurry was slowly filtered under dry nitrogen and the filter cake was washed with a 1:2 mixture of dichloromethane and ethyl acetate (100 mL total), dried under nitrogen for 2 hours and then dried under vacuum overnight to provide biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester as a hydrofluoride salt (25 g, 96.9% purity) which was a hard clay-like solid. MS [M + H^+] found 680.8.

Step H -- Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-Formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)-ethyl]piperidin-4-yl Ester

Biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester hydrofluoride salt (25 g) was purified on a 6-inch reverse-phase column (Microsorb solid phase) in three equal batches using a 10 % to 50 % mixture of acetonitrile in water containing 1% trifluoroacetic acid as the mobile phase. Fractions with greater than 99% purity were combined and then diluted with one volume of water. The resulting mixture was cooled to 0 °C and solid sodium bicarbonate was added until the pH of the mixture was about 7.5 to 8.0. Within about 5 minutes, a white slurry developed. The slurry was stirred for 30 minutes and then filtered. The filter cake was washed with water (500 mL), air dried for about 4 hours and then dried in vacuum overnight to provide biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenyl-carbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (12 g,, 99+% purity), as a semi-crystalline free base.

Example 6

Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-Formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

Step A – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-[1,3]Dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a 500 mL round-bottom flask was added biphenyl-2-ylcarbamic acid piperidin-4-yl ester (17.0 g, 58 mmol) and *N*-(4-[1,3]dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenyl)acrylamide (13.1 g, 52.9 mmol). Ethanol (150 mL) and dicloromethane (150 mL) were added to form a slurry. The reaction mixture was heated at 50 °C to 55 °C for about 24 hours and then cooled to room temperature. Most of the solvent was removed on a rotary evaporator, resulting in a thick slurry. Ethanol (reagent grade) was added to form a total volume of about 200 mL and the resulting mixture was heated to 80 °C and then cooled slowly to room temperature. The resulting thick white slurry was filtered, washed with ethanol (20 mL) and dried in vacuum to provide biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-[1,3]dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (23.8 g, about 98% purity) as a white solid.

50

Step B – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-Formyl-2,5-dimethylphenyl-carbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a 500 mL round-bottom flask was added biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-[1,3]dioxolan-2-yl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (15 g, 27.6 mmol) and acetonitrile (150 mL) to form a slurry. Aqueous 2 M hydrochloric acid (75 mL) was added and the resulting mixture was stirred at 30 °C for 1 hour. The mixture was then cooled to room temperature and ethyl acetate (150 mL) was added. Aqueous 2 M sodium hydroxide (75 mL) was added, the pH was checked and then additional 2 M sodium hydroxide was added until the pH of the solution was in the range of 9 to 10. The layers were separated and the organic layer was washed with diluted brine (75 mL; 1:1 brine/water), dried over anhydrous sodium sulfate and the solvent removed on a rotary evaporator to give biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-formyl-2,5-dimethylphenyl-carbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (12.5 g, about 98% purity). If desired, the purity of this intermediate can be increased by forming a slurry with ethanol (3 volumes of ethanol), heating the slurry to 80 °C, and then cooling slowly to room temperature and isolating by filtration.

Step C – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylimino]methyl}-2,5-dimethyl-phenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a 250 mL round-bottom flask was added biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-formyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (7.1 g, 14.2 mmol) and *N*-{5-[(*R*)-2-amino-1-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)ethyl]-2-hydroxyphenyl}formamide acetic acid salt (5.8 g, 15.6 mmol). Methanol (100 mL) was added to form a slurry and this mixture was stirred at 45 °C to 50 °C under nitrogen for 1 hour. The mixture was then cooled to room temperature and toluene (50 mL) was added and the solvent was removed on a rotary evaporator at temperature ranging from 35 °C to 45 °C. Toluene (50 mL) was added to the residue and the solvent was removed to provide biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylimino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (12 g) as a yellow-orange solid.

81

Step D – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-Butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a hydrogenation flask was added biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylimino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (4.6 g) and 2-methyltetrahydrofuran (50 mL). The resulting mixture was stirred until the solid dissolved (about 5 min.) and then the mixture was purged with nitrogen. Platinum on carbon (920 mg, 5 wt. %, support activated carbon) was added and the mixture was hydrogenated at 50 psi (Parr shaker) for 6 hours. The mixture was then filtered through Celite and the Celite was washed with 2-methyltetrahyrofuran (10 mL). To the filtrate was added a thiopropyl-modified silica gel (20% of weight of solution, Silicycle) and this mixture was stirred at 25 °C to 30 °C for 3 hours. The mixture was then filtered through Celite and concentrated to remove the solvent. The residue was dissolved in methanol (5 mL per gram of residue) and then the resulting solution was added slowly to a vigorously stirred 1:1 mixture of saturated aqueous sodium bicarbonate and water (40 mL per gram of residue). The resulting off-white slurry was stirred for 20 minutes and then filtered. The filter cake was washed with water (20 volumes), air dried for 3 hours and then dried in vacuum at room temperature overnight to provide biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (80% recovery, about 96% purity).

Step E – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-Formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester L-Tartrate Salt

To a 200 mL round-bottom flask was added biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(*tert*-butyldimethylsilanyloxy)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)ethylamino]-methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (3.8 g, 4.8 mmol) and 2-methyltetrahydrofuran (40 mL). The resulting mixture was stirred at room temperature until the ingredients dissolved (about 15 min.) and then triethylamine trihydrofluoride (0.94 mL, 5.76 mmol) was added and the resulting mixture was stirred at 25 °C for about 24 hours. To this mixture was added a 1:1 mixture of saturated aqueous sodium bicarbonate and water (40 mL) and 2-methyltetrahydrofuran and the resulting mixture was

52

stirred until the solid dissolved (solution pH about 8). The layers were separated and the organic layer was washed with brine (30 mL), dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated on a rotary evaporator. The residue was dissolved in 2-methyltetrahydrofuran (50 mL) and solid L-tartaric acid (650 mg) was added. The resulting mixture was stirred at 25 °C to 30 °C for 18 hours and then filtered through filter paper. The filter cake was washed with 2-methyltetrahydrofuran (10 mL), isopropanol (10 mL) and immediately put under vacuum to provide biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenyl-carbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester L-tartaric acid salt (3.7 g, >97 % purity).

Step F – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-Formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)-ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a 250 mL round-bottom flask was added biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester L-tartaric acid salt (3.5 g) and methanol (35 mL) and the resulting mixture was stirred for 15 min. A 1:1 mixture of saturated aqueous sodium bicarbonate and water (70 mL) was added over a 5 min. period and stirring was continued for 2 hours. The resulting off-white slurry was filtered and the filter cake was washed with water (20 mL), air dried for 2 hours and then dried in a vacuum overnight to provide biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)-ethyl]piperidin-4-yl ester (2.3 g) as a semi-crystalline free base.

^{1}H and ^{13}C NMR spectra were obtained for a sample of biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)-ethyl]piperidin-4-yl ester (22.2 mg in about 0.75 mL of DMSO-d_6) at ambient temperature using a JEOL ECX-400 NMR spectrometer:

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6), major isomer, δ 9.64 (br, 1H), 9.54 (br s, 1H), 9.43 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.03 (d, J = 1.9, 1H), 7.25-7.45 (m, 9H), ~7.3 (nd, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.88 (dd, J = 8.2, 1.9, 1H), 6.79 (d, J = 8.2, 1H), 5.15 (br, 1H), 4.53 (dd, J = 7.3, 4.7, 1H), 4.47 (m, 1H), ~3.65 and ~3.60 (AB pair, 2H), 2.68 (br m, 2H), ~2.59 (nd,

53

4H), 2.44 (br t, J = 6.5, 2H), 2.20 (s, 3H), ~2.17 (br m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.73 (br, 2H), 1.44 (br q, J = ~9.0, 2H).

^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6), minor isomer, δ 9.64 (br, 1H), 9.43 (s 1H), 9.26 (br d, J = ~7.0, 1H), 8.67 (s, 1H), 8.50 (br d, J = ~7.0, 1H), 7.25-7.45 (m, 9H), ~7.3 (nd, 1H), 7.07 (s, 1H), ~7.07 (nd, 1H), 6.95 (dd, J = 8.3, 1.8, 1H), 6.83 (d, J =8.3, 1H), 5.15 (br, 1H), 4.47 (m, 1H), ~3.65 and ~3.60 (AB pair, 2H), 2.68 (br m, 2H), ~2.59 (nd, 2H), 2.44 (br t, J = 6.5, 2H), 2.20 (s, 3H), ~2.17 (br m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.73 (br, 2H), 1.44 (br q, J = ~9.0, 2H).

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6), major isomer, δ 170.0, 159.9, 153.9, 145.5, 139.3, 137.6, 135.2, 135.0, 134.8, 133.4, 133.4, 130.2, 130.2, 128.6, 128.2, 127.8, 127.4, 127.2, 127.0, 126.1, 125.7, 125.6, 121.7, 118.6, 114.5, 71.4, 70.0, 57.4, 53.9, 50.3, 50.1, 33.7, 30.7, 18.2, 17.5.

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6), minor isomer, δ 170.0, 163.4, 153.9, 147.8, 139.3, 137,6, 135.7, 135.2, 135.0, 134.8, 133.4, 133.4, 130.2, 130.2, 128.6, 128.2, 127.8, 127.4, 127.2, 127.0, 126.1, 125.7, 123.0, 119.6, 115.6, 71.0, 70.0, 57.3, 53.9, 50.3, 50.1, 33.7, 30.7, 18.2, 17.5.

The ^{1}H and ^{13}C NMR spectra showed the presence of a major isomer (about 82 mole percent) and a minor isomer (about 18 mole percent) believed to be rotational isomers resulting from hindered rotation about the -NH-C(O)H bond. The phenyl group is believed to be *syn* to the carbonyl oxygen in the major isomer and *anti* in the minor isomer.

Example 7

Seed Crystals of Form II of Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-Formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

Semi-crystalline biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenyl-carbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (500 mg) was dissolved in methanol (50 mL) and water was added until the cloud point was reached. The resulting mixture was stirred at 25 °C for 3 hours and the resulting crystalline material was isolated by filtration to provide crystalline biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (420 mg). This crystalline free base was determined to have a differential scanning

54

calorimetry (DSC) trace that exhibit a peak in endothermic heat flow at about 142 °C to about 150 °C; and a powder x-ray diffraction (PXRD) pattern having significant diffraction peaks, among other peaks, at 2θ values of about 20.7±0.3, 21.6±0.3, 22.5±0.3 and 23.2±0.3. This crystalline free base form is designated as Form II. Additional information on Form II and other crystalline free base forms of this compound is disclosed in commonly-assigned U.S. Application No. _____, filed on even date herewith (Attorney Docket No. P-222-US1) and U.S. Provisional Application No. 60/794,709, filed April 25, 2006; the disclosures of which are incorporated herein by reference in their entirety.

Example 8

Crystallization of Form II of Biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-Formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a 3 L three-necked round-bottomed flask equipped with an over-head stirrer, temperature control and addition funnel was added semi-crystalline biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (14 g) and methanol (1.4 L). Water (500 mL) was added in one portion and then additional water (200 mL) was added slowly until the cloud point was reached. Seed crystals of biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenyl-carbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester Form II (50 mg) were added and the resulting mixture was stirred at 25 °C for 3 hours at which time a free-flowing slurry had developed. Water (300 mL) was added over a 15-minute period and the resulting mixture was stirred at 25 °C overnight. The mixture was then filtered and the filter cake was washed with water (100 mL), air dried for about 2 hours and then dried under vacuum at room temperature for 48 hours to provide crystalline biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (12.5 g, 99.6% purity). This crystalline salt was determined to be Form II.

55

Example 9

Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-Formyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]-piperidin-4-yl Ester

Step A – 4-Iodo-2,5-dimethylphenylamine

To a solution of 2,5-dimethylaniline (20g, 165 mmol) in a 1:1 mixture of dichloromethane and methanol (400 mL) was added sodium bicarbonate (20.8g, 250 mmol) and tetramethylammonium dichloroiodate(I) (44.7g, 165 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 hour and then water was added (500 mL). The organic layer was removed and washed with 5% aqueous sodium thiosulfate (500 mL) and brine (500 mL). The organic layer was then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and concentrated under vacuum to provide 4-iodo-2,5-dimethylphenylamine (39.6 g, 98% yield). The product was used without further purification.

Step B – *N*-(4-Iodo-2,5-dimethylphenyl)acrylamide

To a solution of 4-iodo-2,5-dimethylphenylamine (37.2 g, 151 mmol) in dichloromethane (500 mL) was added sodium bicarbonate (25.4 g, 302 mmol). The resulting mixture was cooled to 0 °C and acryolyl chloride (12.3 mL, 151 mmol) was added slowly over a period of 25 minutes. The resulting mixture was stirred at room temperature overnight and then filtered. The volume of the filtrate was reduced to about 100 mL and a precipitate formed. The precipitate was filtered, dried, washed with water (1 L) and then dried again to afford *N*-(4-iodo-2,5-dimethylphenyl)acrylamide (42.98g, 95% purity, 90 % yield). The product was used without further purification.

Step C – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-Iodo-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)-ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a solution of *N*-(4-iodo-2,5-dimethylphenyl)acrylamide (32.2 g, 107 mmol) in a 6:1 v/v mixture of *N,N*-dimethylformamide and isopropanol (700 mL) was added biphenyl-2-ylcarbamic acid piperidin-4-yl ester (36.3 g, 123 mmol). The resulting mixture was heated at 50 °C for 24 hours and then at 80 °C for 24 hours. The reaction mixture was then cooled to room temperature and concentrated under vacuum. The residue was dissolved in dichloromethane (1 L) and this solution was washed with 1N aqueous hydrochloric acid (500 mL), water (500 mL), brine (500 mL) and saturated aqueous sodium bicarbonate solution (500 mL). The organic layer was then dried over anhydrous magnesium sulfate

56

and filtered. Ethanol (400 mL) was added and the resulting mixture was concentrated under vacuum to a volume of about 400 mL, at which time a precipitate had formed. The precipitate was filtered and dried to afford biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-iodo-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (59.6g, 84% purity, 79% yield). *m/z*: [M + H^+] calcd for $C_{29}H_{32}IN_3O_3$ 598.49; found 598.5.

Step D – 4-{3-[4-(Biphenyl-2-ylcarbamoyloxy)piperidin-1-yl]propionylamino}-2,5-dimethylbenzoic Acid Methyl Ester

To a solution of biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-iodo-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (56 g, 94 mmol) in a 5:1 v/v mixture of *N,N*-dimethylformamide and methanol (600 mL) were added diispropylethylamine (49 mL, 281 mmol), 1,3-bis(diphenylphosphino)propane (3.9 g, 9.4 mmol) and palladium(II) acetate (2.1 g, 9.4 mmol). The resulting mixture was purged with carbon monoxide and then stirred overnight at 70 °C to 80 °C under a carbon monoxide atmosphere (balloon pressure). The reaction mixture was concentrated under vacuum and the residue was dissolved in dichloromethane (500 mL). This mixture was washed with 1N aqueous hydrochloric acid (500 mL), water (500 mL) and then brine (500 mL). The organic layer was then dried over anhydrous magnesium sulfate, filtered and then concentrated under vacuum. The residue was mixed with ethanol (about 5:1 v/w ethanol to residue) and the mixture was heated until all solid material dissolved. This solution was allowed to slowly cool to room temperature and the resulting precipitate was isolated by filtration to afford 4-{3-[4-(biphenyl-2-ylcarbamoyloxy)piperidin-1-yl]propionylamino}-2,5-dimethylbenzoic acid methyl ester (47.3 g, 97% purity, 92% yield). *m/z*: [M + H^+] calcd for $C_{31}H_{35}N_3O_5$ 530.63; found 530.4.

Step E – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-Hydroxymethyl-2,5-dimethyl-phenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a solution of 4-{3-[4-(biphenyl-2-ylcarbamoyloxy)piperidin-1-yl]propionylamino}-2,5-dimethylbenzoic acid methyl ester (49.8 g, 93.9 mmol) in tetrahydrofuran (200 mL) was cooled to 0 °C and lithium aluminum hydride (10.7 g, 281.7 mmol) added portion-wise (10 x 1.07 g). The resulting mixture was stirred for 3 hours and then water (10.7 mL) was added, followed by 1N aqueous sodium hydroxide (10.7 mL) and additional water (32.1 mL). This mixture was stirred overnight and then filtered. The

57

organic layer was concentrated under vacuum and the residue was mixed with ethyl acetate (about 5:1 v/w ethyl acetate to residue). This mixture was heated until all the solid material dissolved and then the solution was allowed to cool to room temperature. The resulting precipitate was filtered and dried to afford biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-hydroxymethyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (24.6 g, 95% purity, 47.5% yield). This material was used without further purification. *m/z*: [M + H^+] calcd for $C_{30}H_{35}N_3O_4$ 502.62; found 502.5.

Step F – Biphenyl-2-ylcarbamic Acid 1-[2-(4-Formyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl Ester

To a solution of biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-hydroxymethyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (5.0 g, 10 mmol) in dichloromethane (200 mL) was added diisopropylethylamine (8.7 mL, 50 mmol) and dimethylsulfoxide (5.6 mL, 100 mmol). The resulting mixture was cooled to 0 °C and sulfur trioxide pyridine complex (8.0 g, 50 mmol) was added. The reaction mixture was stirred for 1 hour at 0 °C and then water (300 mL) was added. The organic layer was removed and washed with 1N aqueous hydrochloric acid (300 mL) and brine (300 mL). The organic layer was then dried over anhydrous magnesium sulfate and filtered. The resulting solution containing biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-formyl-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester was used without further purification. *m/z*: [M + H^+] calcd for $C_{30}H_{33}N_3O_4$ 500.60; found 500.4.

Example 10

Cell Culture and Membrane Preparation From Cells Expressing Human M_1, M_2, M_3 and M_4 Muscarinic Receptors

CHO cell lines stably expressing cloned human hM_1, hM_2, hM_3 and hM_4 muscarinic receptor subtypes, respectively, were grown to near confluency in Hams F-12 media supplemented with 10% FBS and 250 μg/mL Geneticin. The cells were grown in a 5% CO_2, 37 °C incubator and lifted with 2 mM EDTA in dPBS. Cells were collected by 5 minute centrifugation at 650 x g, and cell pellets were either stored frozen at –80 EC or membranes were prepared immediately for use. For membrane preparation, cell pellets were resuspended in lysis buffer and homogenized with a Polytron PT-2100 tissue disrupter (Kinematica AG; 20 seconds x 2 bursts). Crude membranes were centrifuged at

58

40,000 x g for 15 minutes at 4 °C. The membrane pellet was then resuspended with re-suspension buffer and homogenized again with the Polytron tissue disrupter. The protein concentration of the membrane suspension was determined by the method described in Lowry et al., **1951**, *Journal of Biochemistry, 193*, 265. All membranes were stored frozen in aliquots at –80 °C or used immediately. Aliquots of prepared hM_5 receptor membranes were purchased directly from PerkinElmer, Inc. (Wellesley, MA) and stored at –80 °C until use.

Example 11

Radioligand Binding Assay for Muscarinic Receptors

Radioligand binding assays for cloned muscarinic receptors were performed in 96-well microtiter plates in a total assay volume of 100 μL. CHO cell membranes stably expressing either the hM_1, hM_2, hM_3, hM_4 or hM_5 muscarinic subtype were diluted in assay buffer to the following specific target protein concentrations (μg/well): 10 μg for hM_1, 10-15 μg for hM_2, 10-20 μg for hM_3, 10-20 μg for hM_4, and 10-12 μg for hM_5 to get similar signals (cpm). The membranes were briefly homogenized using a Polytron tissue disruptor (10 seconds) prior to assay plate addition. Saturation binding studies for determining K_D values of the radioligand were performed using L-[*N*-methyl-^{3}*H*]scopolamine methyl chloride ([^{3}H]-NMS) (TRK666, 84.0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, England) at concentrations ranging from 0.001 nM to 20 nM. Displacement assays for determination of K_i values of test compounds were performed with [^{3}H]-NMS at 1 nM and eleven different test compound concentrations. The test compounds were initially dissolved to a concentration of 400 μM in dilution buffer and then serially diluted 5x with dilution buffer to final concentrations ranging from 10 pM to 100 μM. The addition order and volumes to the assay plates were as follows: 25 μL radioligand, 25 μL diluted test compound, and 50 μL membranes. Assay plates were incubated for 60 minutes at 37 °C. Binding reactions were terminated by rapid filtration over GF/B glass fiber filter plates (PerkinElmer, Inc.) pre-treated in 1% BSA. Filter plates were rinsed three times with wash buffer (10 mM HEPES) to remove unbound radioactivity. The plates were then air-dried and 50 μL Microscint-20 liquid scintillation fluid (PerkinElmer, Inc.) were added to each well. The plates were then counted in a PerkinElmer Topcount liquid scintillation counter (PerkinElmer, Inc.). Binding data were

59

analyzed by nonlinear regression analysis with the GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) using the one-site competition model. K_i values for test compounds were calculated from observed IC_{50} values and the K_D value of the radioligand using the Cheng-Prusoff equation (Cheng Y; Prusoff WH. (1973) *Biochemical Pharmacology*, 22(23):3099-108). K_i values were converted to pK_i values to determine the geometric mean and 95% confidence intervals. These summary statistics were then converted back to K_i values for data reporting.

In this assay, a lower K_i value indicates that the test compound has a higher binding affinity for the receptor tested. Biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IIa) was found to have a K_i value of less than 10 nM for the M_1, M_2, M_3, M_4 and M_5 muscarinic receptor subtypes.

Example 12

Cell Culture and Membrane Preparation From Cells Expressing Human β_1, β_2 or β_3 Adrenergic Receptors

Human embryonic kidney (HEK-293) cell lines stably expressing cloned human β_1 and β_2 adrenergic receptors or Chinese hamster ovarian (CHO) cell lines stably expressing cloned human β_3 adrenergic receptors were grown to near confluency in DMEM or Hams F-12 media with 10% FBS in the presence of 500 μg/mL Geneticin. The cell monolayer was lifted with 2 mM EDTA in PBS. Cells were pelleted by centrifugation at 1,000 rpm, and cell pellets were either stored frozen at –80 °C or membranes were prepared immediately for use. For preparation of β_1 and β_2 receptor expressing membranes, cell pellets were re-suspended in lysis buffer (10 mM HEPES/HCl, 10 mM EDTA, pH 7.4 at 4 °C) and homogenized using a tight-fitting Dounce glass homogenizer (30 strokes) on ice. For the more protease-sensitive β_3 receptor expressing membranes, cell pellets were homogenated in lysis buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.4) supplemented with one tablet of "Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets with 2 mM EDTA" per 50 mL buffer (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). The homogenate was centrifuged at 20,000 x g, and the resulting pellet was washed once with lysis buffer by re-suspension and centrifugation as above. The final pellet was then re-suspended in ice-cold binding assay buffer (75 mM Tris/HCl pH 7.4, 12.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA). The protein concentration of the membrane suspension was determined by the methods described in

Lowry et al., **1951**, *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265; and Bradford, *Analytical Biochemistry*, **1976**, *72*, 248-54. All membranes were stored frozen in aliquots at –80 °C or used immediately.

Example 13

Radioligand Binding Assay for Human β_1, β_2 and β_3 Adrenergic Receptors

Binding assays were performed in 96-well microtiter plates in a total assay volume of 100 μL with 10-15 μg of membrane protein containing the human β_1, β_2 or β_3 adrenergic receptors in assay buffer (75 mM Tris/HCl pH 7.4 at 25 °C, 12.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0.2% BSA). Saturation binding studies for determining K_d values of the radioligand were done using [^{3}H]-dihydroalprenolol (NET-720, 100 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) for the β_1 and β_2 receptors and [^{125}I]-(-)-iodocyanopindolol (NEX-189, 220 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) at 10 or 11 different concentrations ranging from 0.01 nM to 20 nM. Displacement assays for determination of K_i values of test compounds were done with [^{3}H]-dihydroalprenolol at 1 nM and [^{125}I]-(-)-iodocyanopindolol at 0.5 nM for 10 or 11 different concentrations of test compound ranging from 10 pM to 10 μM. Non-specific binding was determined in the presence of 10 μM propranolol. Assays were incubated for 1 hour at 37 °C, and then binding reactions were terminated by rapid filtration over GF/B for the β_1 and β_2 receptors or GF/C glass fiber filter plates for the β_3 receptors (Packard BioScience Co., Meriden, CT) presoaked in 0.3% polyethyleneimine. Filter plates were washed three times with filtration buffer (75 mM Tris/HCl pH 7.4 at 4 °C, 12.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA) to remove unbound radioactivity. The plates were then dried and 50 μL of Microscint-20 liquid scintillation fluid (Packard BioScience Co., Meriden, CT) was added and plates were counted in a Packard Topcount liquid scintillation counter (Packard BioScience Co., Meriden, CT). Binding data were analyzed by nonlinear regression analysis with the GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) using the 3-parameter model for one-site competition. The curve minimum was fixed to the value for nonspecific binding, as determined in the presence of 10 μM propranolol. K_i values for test compounds were calculated from observed IC_{50} values and the K_d value of the radioligand using the Cheng-Prusoff equation (Cheng Y, and Prusoff WH., *Biochemical Pharmacology*, **1973**, *22*, 23, 3099-108).

In this assay, a lower K_i value indicates that a test compound has a higher binding affinity for the receptor tested. Biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IIa) was found to have a K_i value of less than 10 nM for the β_2 adrenergic receptor and K_i values greater than 1000 nM for the β_1 and β_3 adrenergic receptors.

Example 14

Functional Assays of Antagonism for Muscarinic Receptor Subtypes

Assay A – Blockade of Agonist-Mediated Inhibition of cAMP Accumulation

In this assay, the functional potency of a test compound as an antagonist for the hM_2 receptor was determined by measuring the ability of the test compound to block oxotremorine-inhibition of forskolin-mediated cAMP accumulation in CHO-K1 cells expressing the hM_2 receptor. cAMP assays were performed in a radioimmunoassay format using the Flashplate Adenylyl Cyclase Activation Assay System with ^{125}I-cAMP (NEN SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), according to the manufacturer's instructions. Cells were rinsed once with dPBS and lifted with Trypsin-EDTA solution (0.05% trypsin/0.53 mM EDTA) as described in the Cell Culture and Membrane Preparation section above. The detached cells were washed twice by centrifugation at 650 x g for five minutes in 50 mL dPBS. The cell pellet was then re-suspended in 10 mL dPBS, and the cells were counted with a Coulter Z1 Dual Particle Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA). The cells were centrifuged again at 650 x g for five minutes and re-suspended in stimulation buffer to an assay concentration of 1.6×10^6 to 2.8×10^6 cells/mL.

The test compound was initially dissolved to a concentration of 400 μM in dilution buffer (dPBS supplemented with 1 mg/mL BSA (0.1%)), and then serially diluted with dilution buffer to final molar concentrations ranging from 100 μM to 0.1 nM. Oxotremorine was diluted in a similar manner.

To measure oxotremorine inhibition of adenylyl cyclase activity, 25 μL forskolin (25 μM final concentration diluted in dPBS), 25 μL diluted oxotremorine, and 50 μL cells were added to agonist assay wells. To measure the ability of a test compound to block oxotremorine-inhibited adenylyl cyclase activity, 25 μL forskolin and oxotremorine (25

μM and 5 μM final concentrations, respectively, diluted in dPBS), 25 μL diluted test compound, and 50 μL cells were added to remaining assay wells.

Reactions were incubated for 10 minutes at 37 °C and stopped by addition of 100 μL ice-cold detection buffer. Plates were sealed, incubated overnight at room temperature and counted the next morning on a PerkinElmer TopCount liquid scintillation counter (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA). The amount of cAMP produced (pmol/well) was calculated based on the counts observed for the samples and cAMP standards, as described in the manufacturer's user manual. Data was analyzed by nonlinear regression analysis with the GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) using the non-linear regression, one-site competition equation. The Cheng-Prusoff equation was used to calculate the K_{obs}, using the EC_{50} of the oxotremorine concentration-response curve and the oxotremorine assay concentration as the K_D and [L], respectively.

In this assay, a lower K_{obs} value indicates that the test compound has a higher functional activity at the receptor tested. Biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IIa) was found to have a K_{obs} value of less than about 10 nM for blockade of oxotremorine-inhibition of forskolin-mediated cAMP accumulation in CHO-K1 cells expressing the hM_2 receptor.

Assay B – Blockade of Agonist-Mediated [^{35}S]GTPγS Binding

In this functional assay, the functional potency of a test compound as an antagonist of the hM_2 receptor was determined by measuring the ability of the test compound to block oxotremorine-stimulated [^{35}S]GTPγS binding in CHO-K1 cells expressing the hM_2 receptor.

At the time of use, frozen membranes were thawed and then diluted in assay buffer with a final target tissue concentration of 5 to 10 μg protein per well. The membranes were briefly homogenized using a Polytron PT-2100 tissue disrupter and then added to the assay plates.

The EC_{90} value (effective concentration for 90% maximal response) for stimulation of [^{35}S]GTPγS binding by the agonist oxotremorine was determined in each experiment.

To determine the ability of a test compound to inhibit oxotremorine-stimulated [^{35}S]GTPγS binding, the following was added to each well of 96 well plates: 25 μL of

assay buffer with [^{35}S]GTPγS (0.4nM), 25 μL of oxotremorine(EC_{90}) and GDP (3uM), 25 μL of diluted test compound and 25 μL CHO cell membranes expressing the hM_2 receptor. The assay plates were then incubated at 37 °C for 60 minutes. The assay plates were filtered over 1% BSA-pretreated GF/B filters using a PerkinElmer 96-well harvester. The plates were rinsed with ice-cold wash buffer for 3 x 3 seconds and then air or vacuum dried. Microscint-20 scintillation liquid (50 μL) was added to each well, and each plate was sealed and radioactivity counted on a Topcounter (PerkinElmer). Data were analyzed by nonlinear regression analysis with the GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) using the non-linear regression, one-site competition equation. The Cheng-Prusoff equation was used to calculate the K_{obs}, using the IC_{50} values of the concentration-response curve for the test compound and the oxotremorine concentration in the assay as the K_D and [L], ligand concentration, respectively.

In this assay, a lower K_{obs} value indicates that the test compound has a higher functional activity at the receptor tested. Biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IIa) was found to have a K_{obs} value of less than about 10 nM for blockade of oxotremorine-stimulated [^{35}S]GTPγS binding in CHO-K1 cells expressing the hM_2 receptor.

Assay C – Blockade of Agonist-Mediated Calcium Release via FLIPR Assays

In this functional assay, the functional potency of a test compound as an antagonist of hM_1, hM_3 and cM_5 receptors was determined by measuring the ability of the test compound to inhibit agonist-mediated increases in intracellular calcium.

CHO cells stably expressing the receptors were seeded into 96-well FLIPR plates the night before the assay was done. Seeded cells were washed twice with FLIPR buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 2 mM calcium chloride, 2.5 mM probenecid in Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) without calcium and magnesium) using Cellwash (MTX Labsystems, Inc.) to remove growth media. After washing, each well contained 50 μL of FLIPR buffer. The cells were then incubated with 50 μL/well of 4 μM FLUO-4AM (a 2X solution was made) for 40 minutes at 37 °C, 5% carbon dioxide. Following the dye incubation period, cells were washed two times with FLIPR buffer, leaving a final volume of 50 μL in each well.

The dose-dependent stimulation of intracellular Ca^{2+} release for oxotremorine was determined so that the test compound could be measured against oxotremorine stimulation at an EC_{90} concentration. Cells were first incubated with compound dilution buffer for 20 minutes and then oxotremorine was added. An EC_{90} value for oxotremorine was generated according to the method detailed in the FLIPR measurement and data reduction section below, in conjunction with the formula $EC_F = ((F/100-F)\text{^}1/H) * EC_{50}$. An oxotremorine concentration of 3 x EC_F was prepared in stimulation plates such that an EC_{90} concentration of oxotremorine was added to each well in test assay plates.

The parameters used for the FLIPR were: exposure length of 0.4 seconds, laser strength of 0.5 watts, excitation wavelength of 488 nm, and emission wavelength of 550 nm. Baseline was determined by measuring the change in fluorescence for 10 seconds prior to addition of oxotremorine. Following oxotremorine stimulation, the FLIPR continuously measured the change of fluorescence every 0.5 to 1 second for 1.5 minutes to capture the maximum fluorescence change.

The change of fluorescence was expressed as maximum fluorescence minus baseline fluorescence for each well. The raw data was analyzed against the logarithm of test compound concentration by nonlinear regression with GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) using the built-in model for sigmoidal dose-response. Antagonist K_{obs} values were determined by Prism using the oxotremorine EC_{50} value as the K_D and the oxotremorine EC_{90} for the ligand concentration according to the Cheng-Prusoff equation (Cheng & Prusoff, 1973).

In this assay, a lower K_{obs} value indicates that the test compound has a higher functional activity at the receptor tested. Biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IIa) was found to have a K_{obs} value of less than about 10 nM for blockade of agonist-mediated calcium release in CHO cells stably expressing the hM_1, hM_3 and cM_5 receptors.

Example 15

Whole-cell cAMP Flashplate Assay in HEK-293 and CHO Cell Lines Heterologously Expressing Human β_1, β_2 or β_3 Adrenergic Receptors

cAMP assays were performed in a radioimmunoassay format using the Flashplate Adenylyl Cyclase Activation Assay System with [^{125}I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), according to the manufacturers instructions. For the determination of β_1 and β_2 receptor agonist potency (EC_{50}), HEK-293 cell lines stably expressing cloned human β_1 and β_2 receptors were grown to near confluency in DMEM supplemented with 10% FBS and Geneticin (500 μg/mL). For the determination β_3 receptor agonist potency (EC_{50}), CHO-K1 cell line stably expressing cloned human or β_3 adrenergic receptors was grown to near confluency in Hams F-12 media supplemented with 10% FBS and Geneticin (250 μg/mL). Cells were rinsed with PBS and detached in dPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, without $CaCl_2$and $MgCl_2$) containing 2 mM EDTA or Trypsin-EDTA solution (0.05% trypsin/0.53 mM EDTA). After counting cells in Coulter cell counter, cells were pelleted by centrifugation at 1,000 rpm and re-suspended in stimulation buffer containing IBMX (PerkinElmer Kit) pre-warmed to room temperature to a concentration of 1.6×10^6 to 2.8×10^6 cells/mL. About 40,000 to 80,000 cells per well were used in this assay. Test compounds (10 mM in DMSO) were diluted into PBS containing 0.1% BSA in Beckman Biomek-2000 and tested at 11 different concentrations ranging from 100 μM to 1 pM. Reactions were incubated for 10 min at 37 °C and stopped by adding 100 μL of cold detection buffer containing [^{125}I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). The amount of cAMP produced (pmol/well) was calculated based on the counts observed for the samples and cAMP standards as described in the manufacturer's user manual. Data were analyzed by nonlinear regression analysis with the GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) with the sigmoidal equation. The Cheng-Prusoff equation (Cheng Y, and Prusoff WH., *Biochemical Pharmacology*, **1973**, *22*, 23, 3099-108) was used to calculate the EC_{50} values.

In this assay, a lower EC_{50} value indicates that the test compound has a higher functional activity at the receptor tested. Biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenyl-carbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IIa) was found to have an EC_{50} value less

66

than about 10 nM for the β_2 adrenergic receptor; an EC_{50} value of about 30 nM for the β_1 adrenergic receptor; and an EC_{50} value greater than 700 nM for the β_3 adrenergic receptor.

Example 16

Whole-cell cAMP Flashplate Assay With a Lung Epithelial Cell Line Endogenously Expressing Human β_2 Adrenergic Receptor

In this assay, the agonist potency and intrinsic activity of a test compound were determined using a cell line expressing endogenous levels of the β_2 adrenergic receptor. Cells from a human lung epithelial cell line (BEAS-2B) (ATCC CRL-9609, American Type Culture Collection, Manassas, VA) (January B, et al., *British Journal of Pharmacology*, 1998, *123*, 4, 701-11) were grown to 75-90% confluency in complete, serum-free medium (LHC-9 medium containing epinephrine and retinoic acid, Biosource International, Camarillo, CA). The day before the assay, the medium was switched to LHC-8 (no epinephrine or retinoic acid, Biosource International, Camarillo, CA). cAMP assays were performed in a radioimmunoassay format using the Flashplate Adenylyl Cyclase Activation Assay System with [^{125}I]-cAMP (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), according to the manufacturers instructions.

On the day of the assay, cells were rinsed with PBS, lifted by scraping with 5mM EDTA in PBS, and counted. Cells were pelleted by centrifugation at 1,000 rpm and re-suspended in stimulation buffer pre-warmed to 37 °C at a final concentration of 600,000 cells/mL. Cells were used at a final concentration of 100,000 to 120,000 cells/well in this assay. Test compounds were serially diluted into assay buffer (75 mM Tris/HCl pH 7.4 at 25 °C, 12.5 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 0.2% BSA) in Beckman Biomek-2000. Test compounds were tested in the assay at 11 different concentrations, ranging from 10 μM to 10 pM. Reactions were incubated for 10 min at 37 °C and stopped by addition of 100 μL of ice-cold detection buffer. Plates were sealed, incubated over night at 4 °C and counted the next morning in a Topcount scintillation counter (Packard BioScience Co., Meriden, CT). The amount of cAMP produced per mL of reaction was calculated based on the counts observed for samples and cAMP standards, as described in the manufacturer's user manual. Data were analyzed by nonlinear regression analysis with the GraphPad Prism Software package (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) using the 4-parameter model for sigmoidal dose-response.

In this assay, a lower EC_{50} value indicates that the test compound has a higher functional activity at the receptor tested. Biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenyl-carbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (compound IIa) was found to have an EC_{50} value of less than 10 nM with intrinsic activity value of greater than 0.3 compared with a full β_2 agonist isoproterenol (1.0).

Example 17

Einthoven Assay for Determining Bronchoprotective Efficacy and Duration

In this assay, the bronchoprotective efficacy and duration of test compounds were determined using guinea pigs. This assay was derived from the procedures described in Einthoven (1892) *Pfugers Arch. 51*: 367 – 445; and Mohammed et al. (2000) *Pulm Pharmacol Ther. 13(6)*:287-92. In this assay, changes in ventilation pressure serve as a surrogate measure of airway resistance. Following pre-treatment with a test compound, muscarinic antagonist potency was determined using bronchoconstrictor dose-response curves to intravenous methacholine in the presence of propranolol. Similarly, β_2 agonist bronchoprotective potency was determined using histamine. Combined bronchoprotective potency was determined using methacholine in the absence of propranolol.

The assay was conducted using male Duncan-Hartley guinea pigs (Harlan, Indianapolis, IN), weighing between 250 and 400 g. A test compound or vehicle (i.e., sterile water) was dosed by inhalation (IH) over a 10 minute time period in a whole body exposure dosing chamber (R+S Molds, San Carlos, CA) using 5 mL of dosing solution. Animals were exposed to an aerosol generated from an LC Star Nebulizer Set (Model 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA) driven by Bioblend (a mixture of 5% CO_2; 21% O_2; and 74% N_2) at a pressure of 22 psi. Pulmonary function was evaluated at various time points after inhalation dosing.

Seventy-five minutes prior to the start of the assay, the guinea pigs were anesthetized with an intramuscular (IM) injection of a mixture of ketamine (43.7 mg/kg/xylazine (3.5 mg/kg)/acepromazine (1.05 mg/kg). A supplemental dose of this mixture (50% of initial dose) was administered as needed. The jugular vein and carotid artery were isolated and cannulated with saline-filled polyethylene catheters (micro-renathane and PE-50, respectively, Beckton Dickinson, Sparks, MD). The carotid artery was connected to a pressure transducer to allow the measurement of blood pressure and the

jugular vein cannula was used for IV injection of either methacholine or histamine. The trachea was then dissected free and cannulated with a 14G needle (#NE-014, Small Parts, Miami Lakes, FL). Once the cannulations were complete, the guinea pigs were ventilated using a respirator (Model 683, Harvard Apparatus, Inc., MA) set at a stroke volume of 1mL/100 g body weight but not exceeding 2.5 mL volume, and at a rate of 100 strokes per minute. Ventilation pressure (VP) was measured in the tracheal cannula using a Biopac transducer connected to a Biopac (TSD 137C) pre-amplifier. Body temperature was maintained at 37 °C using a heating pad. Prior to initiating data collection, pentobarbital (25 mg/kg) was administered intraperitoneally (IP) to suppress spontaneous breathing and obtain a stable baseline. The changes in VP were recorded on a Biopac Windows data collection interface. Baseline values were collected for at least 5 minutes, after which time guinea pigs were challenged IV non-cumulatively with 2-fold incremental doses of the bronchoconstrictor (methacholine or histamine). When methacholine was used as the bronchoconstrictor agent, animals were pre-treated with propranolol (5 mg/kg, IV) to isolate the antimuscarinic effects of the test compound. The propranolol was administered 30 minutes prior to construction of the dose-response curve to methacholine or histamine. Changes in VP were recorded using the Acknowledge Data Collection Software (Santa Barbara, CA). After the completion of study, the animals were euthanized.

Change in VP was measured in cm of water. Change in VP (cm H_2O) = peak pressure (after bronchoconstrictor challenge) - peak baseline pressure. The dose-response curve to methacholine or histamine was fitted to a four parameter logistic equation using GraphPad Prism, version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California). The following equation was used:

$$Y = Min + (Max–Min)/(1 + 10^{((\log ID50–X)* Hillslope)})$$

where X is the logarithm of dose, Y is the response. Y starts at Min and approaches asymptotically to Max with a sigmoidal shape.

The percent inhibition of the bronchoconstrictor response to a submaximal dose of methacholine or histamine was calculated at each dose of the test compound using the following equation: % Inhibition of response = 100-((peak pressure (after bronchoconstrictor challenge, treated) - peak baseline pressure (treated) *100% / (peak pressure (after bronchoconstrictor challenge, water) - peak baseline pressure (water) x

100). Inhibition curves were fitted using the four parameter logistic equation from GraphPad software. ID_{50} (dose required to produce 50% inhibition of the bronchoconstrictor response) and Emax (maximal inhibition) were also estimated wherever appropriate.

The magnitude of bronchoprotection at different time-points after inhalation of the test compound was used to estimate the pharmacodynamic half-life (PD $T_{1/2}$). PD $T_{1/2}$ was determined using a non-linear regression fit using a one-phase exponential decay equation (GraphPad Prism, Version 4.00): Y=Span*exp(-K*X) + Plateau; Starts at Span+Plateau and decays to Plateau with a rate constant K. The PD $T_{1/2} = 0.69/K$.. Plateau was constrained to 0.

At 1.5 hours post-dose, biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenylcarbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester (IIa) was found to have an ID_{50} of less than about 50 μg/mL for both methacholine-induced bronchoconstriction and histamine-induced bronchoconstriction.

Additionally, this compound produced significant bronchoprotection for up to about 72 hours when administered as a single sub-maximal dose (100 μg/mL). In this assay, salmeterol (3 μg/mL) (a β_2 adrenergic receptor agonist) exhibited significant bronchoprotection for 6 to 14 hours; and tiotropium (10 μg/mL) (a muscarinic receptor antagonist) exhibited significant bronchoprotection for greater than 72 hours.

Example 18

Plethysmograph Guinea Pig Assay for Determining Bronchoprotective Efficacy and Duration

In this assay, the bronchoprotective efficacy and duration of test compounds was determined using a guinea pig assay.

Groups of 6 male guinea pigs (Duncan-Hartley (HsdPoc:DH) Harlan, Madison, WI) weighing between 250 and 350 g were individually identified by cage cards. Throughout the study, animals were allowed access to food and water *ad libitum*. Test compounds were administered via inhalation over 10 minutes in a whole-body exposure dosing chamber (R&S Molds, San Carlos, CA). The dosing chambers were arranged so that an aerosol was simultaneously delivered to 6 individual chambers from a central manifold. Guinea pigs were exposed to an aerosol of a test compound or vehicle (WFI).

The aerosols were generated from aqueous solutions using an LC Star Nebulizer Set (Model 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA) driven by a mixture of gases (CO_2 = 5%, O_2 = 21% and N_2 = 74%) at a pressure of 22 psi. The gas flow through the nebulizer at this operating pressure was approximately 3 L per minute. The generated aerosols were driven into the chambers by positive pressure. No dilution air was used during the delivery of aerosolized solutions. During the 10 minute nebulization, approximately 1.8 mL of solution was nebulized. This value was measured gravimetrically by comparing pre-and post-nebulization weights of the filled nebulizer.

The bronchoprotective effects of test compounds administered via inhalation were evaluated using whole body plethysmography at 1.5, 24, 48 and 72 hours post-dose. Forty-five minutes prior to the start of the pulmonary evaluation, each guinea pig was anesthetized with an intramuscular injection of ketamine (43.75 mg/kg), xylazine (3.50 mg/kg) and acepromazine (1.05 mg/kg). The surgical site was shaved and cleaned with 70% alcohol and a 2 to 3 cm midline incision of the ventral aspect of the neck was made. The jugular vein was isolated and cannulated with a saline-filled polyethylene catheter (PE-50, Becton Dickinson, Sparks, MD) to allow for intravenous infusions of acetylcholine or histamine in saline. The trachea was then dissected free and cannulated with a 14G teflon tube (#NE- 014, Small Parts, Miami Lakes, FL). If required, anesthesia was maintained by additional intramuscular injections of the anesthetic mixture. The depth of anesthesia was monitored and adjusted if the animal responded to pinching of its paw or if the respiration rate was greater than 100 breaths per minute.

Once the cannulations were completed, the animal was placed into a plethysmograph (#PLY3114, Buxco Electronics, Inc., Sharon, CT) and an esophageal pressure cannula (PE-160, Becton Dickinson, Sparks, MD) was inserted to measure pulmonary driving pressure. The teflon tracheal tube was attached to the opening of the plethysmograph to allow the guinea pig to breathe room air from outside the chamber. The chamber was then sealed. A heating lamp was used to maintain body temperature and the guinea pig's lungs were inflated three times with 4 mL of air using a 10 mL calibration syringe (#5520 Series, Hans Rudolph, Kansas City, MO) to ensure that the lower airways had not collapsed and that the animal did not suffer from hyperventilation.

The pulmonary evaluation was initiated after determining that baseline values were within the range of 0.3 to 0.9 mL per cm H_2O for compliance and within the range of 0.1 to 0.199 cm H_2O per mL per second for resistance. A Buxco pulmonary measurement

computer progam was used for the collection and derivation of pulmonary values. Starting the program initiated the experimental protocol and data collection. The changes in volume over time that occurred within the plethysmograph with each breath were measured via a Buxco pressure transducer. By integrating this signal over time, a measurement of flow was calculated for each breth. This signal and the pulmonary driving pressure changes, collected using a Sensym pressure transducer (TRD4100), were connected via a Buxco (MAX 2270) preamplifier to a data collection interface (SFT3400 and SFT3813). All other pulmonary parameters are derived from these two inputs.

Baseline values were collected for 5 minutes, after which time the guinea pigs were challenged with either acetylcholine or histamine. When evaluating the muscarinic antagonist effects of a test compound, propanolol (5 mg/Kg, iv) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was administered 15 minutes prior to challenge with acetylcholine. Acetylcholine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (0.1 mg/mL) was infused intravenously for 1 minute from a syringe pump (sp210iw, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) at the following doses and prescribed times from the start of the experiment: 1.9 μg/minute at 5 minutes, 3.8 μg/minute at 10 minutes, 7.5 μg/minute at 15 minutes, 15.0 μg/minute at 20 minutes, 30 μg/minute at 25 minutes and 60 μg/minute at 30 minutes. Alternatively, bronchoprotective effects of the test compound was assessed in the acetylcholine challenge model without pretreatment with propanolol.

When evaluating the β_2 adrenergic receptor agonist effects of the test compound, histamine (25 μg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was infused intravenously for 1 minute from a syringe pump at the following doses and prescribed times from the start of the experiment: 0.5 μg/minute at 5 minutes, 0.9 μg/minute at 10 minutes, 1.9 μg/minute at 15 minutes, 3.8 μg/minute at 20 minutes, 7.5 μg/minute at 25 minutes and 15 μg/minute at 30 minutes. If resistance or compliance did not returned to baseline values at 3 minutes following each acetylcholine or histamine dose, the guinea pig's lungs were inflated 3 times with 4 mL of air from a 10 mL calibration syringe. The pulmonary parameters recorded included respiration frequency (breaths per minute), compliance (mL per cm H_2O) and pulmonary resistance (cm H_2O per mL per second). Once the pulmonary function measurements were completed at minute 35 of this protocol, the guinea pig was removed from the plethysmograph and euthanized by carbon dioxide asphyxiation.

The data were evaluated in one of two ways:

(a) Pulmonary resistance (R_L) (cm H_2O per mL per second) was calculated from the ratio of change in pressure to the change in flow. The R_L response to acetylcholine (60 μg/min, IH) was computed for the vehicle and the test compound. The mean acetylcholine response in vehicle-treated animals, at each pre-treatment time, was calculated and used to compute percent inhibition of acetylcholine response, at the corresponding pre-treatment time, at each test compound dose. Inhibition dose-response curves for 'R_L' were fitted with a four parameter logistic equation using GraphPad Prism, version 3.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California) to estimate bronchoprotective ID_{50} (dose required to inhibit the acetylcholine (60 μg/min) bronchoconstriction response by 50%). The following equation was used:

$$Y = Min + (Max - Min)/(1 + 10^{((\log ID50 - X) * Hillslope)})$$

where X is the logarithm of dose, Y is the response (percent inhibition of acetylcholine-induced increase in R_L). Y starts at Min and approaches asymptotically to Max with a sigmoidal shape.

(b) The quantity PD_2, which is defined as the amount of acetylcholine or histamine needed to cause a doubling of the baseline pulmonary resistance, was calculated using the pulmonary resistance values derived from the flow and the pressure over a range of acetylcholine or histamine challenges using the following equation (which was derived from an equation used to calculate PC_{20} values described in American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing - 1999. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 309-329):

$$PD_2 = \text{antilog}\left[\log C_1 + \frac{(\log C_2 - \log C_1)(2R_0 - R_1)}{R_2 - R_1}\right]$$

where:

C_1 = concentration of acetylcholine or histamine preceding C_2

C_2 = concentration of acetylcholine or histamine resulting in at least a 2-fold increase in pulmonary resistance (R_L)

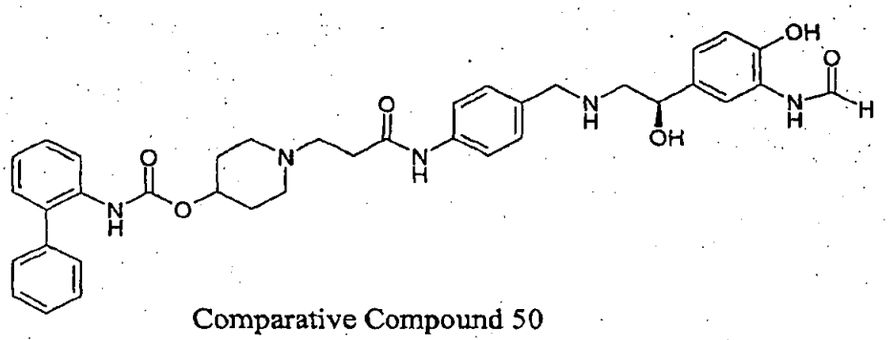
R_0 = Baseline R_L value

R_1 = R_L value after C_1

$R_2 = R_L$ value after C_2

Statistical analysis of the data was performed using a two tailed Students t-test. A *P*-value <0.05 was considered significant.

Compound 50 described in U.S. Patent Publication No. US 2004/0167167A1, published August 24, 2004, was tested in this assay. The chemical structure of compound 50 is as follows:



Comparative Compound 50

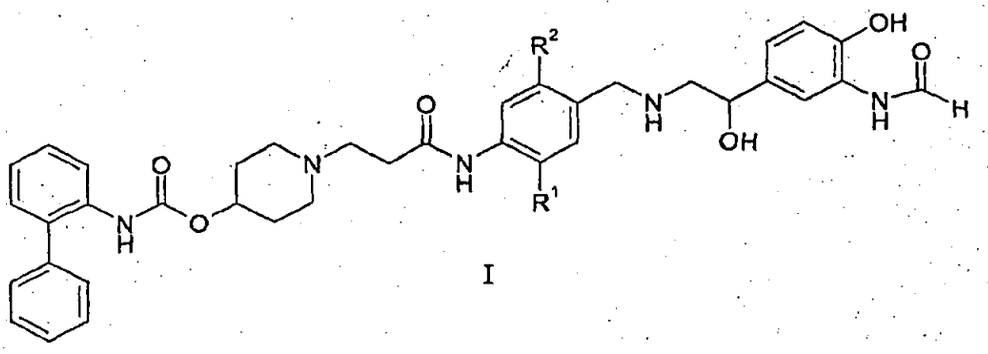
This compound lacks the alkyl groups present on phenyl ring of the compounds of the present invention. In this assay, compound 50 showed no significant bronchoprotection at 24 hours post-dose for doses ranging from 3 μg/mL to 300 μg/mL. The PD2x valves for compound 50 at 24 hours were similar to the vehicle (water) group.

In this assay, salmeterol (100 μg/mL) (a β_2 adrenergic receptor agonist) exhibited significant bronchoprotection for at least 24 hours; and tiotropium (10 μg/mL) (a muscarinic receptor antagonist) exhibited significant bronchoprotection for at least 24 hours.

While the present invention has been described with reference to specific aspects or embodiments thereof, it will be understood by those of ordinary skilled in the art that various changes can be made or equivalents can be substituted without departing from the true spirit and scope of the invention. Additionally, to the extent permitted by applicable patent statutes and regulations, all publications, patents and patent applications cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety to the same extent as if each document had been individually incorporated by reference herein.

CLAIMS:

1. A compound of formula I:



I

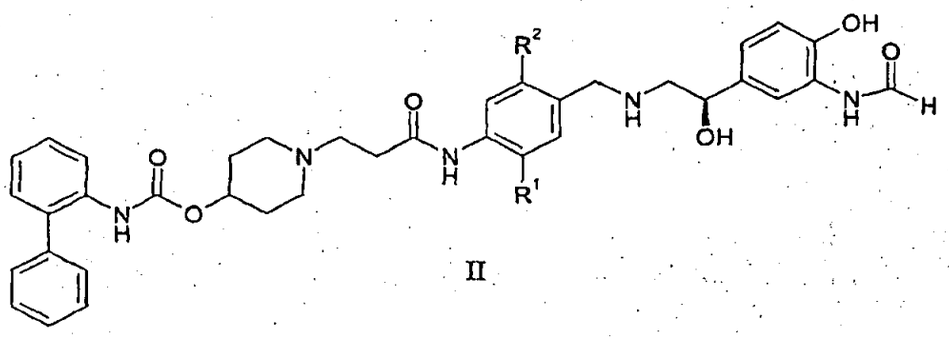
wherein

R^1 is methyl or ethyl;

R^2 is methyl or ethyl;

or a pharmaceutically acceptable salt or solvate or stereoisomer thereof.

2. A compound of Claim 1 having formula II:



II

wherein

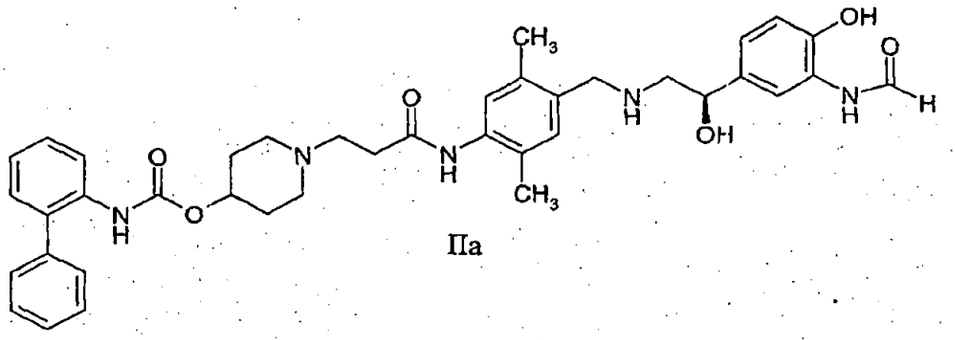
R^1 is methyl or ethyl;

R^2 is methyl or ethyl;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

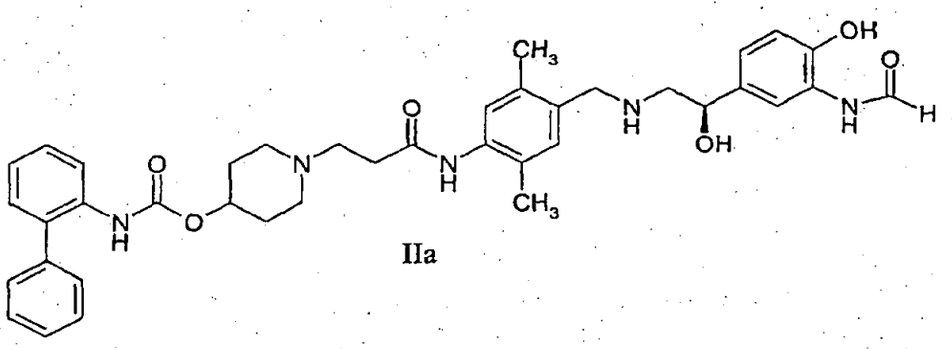
75

3. A compound of Claim 1 having formula IIa:



IIa

4. A compound of Claim 1, wherein the compound is a pharmaceutically acceptable salt of a compound of formula IIa:



IIa

5. A pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a compound of any one of Claims 1 to 4.

6. A pharmaceutical composition comprising:
(a) a compound of any one of Claims 1 to 4;
(b) a steroidal anti-inflammatory agent; and
(c) a pharmaceutically acceptable carrier.

7. A combination of therapeutic agents, comprising:
(a) a compound of any one of Claims 1 to 4; and
(b) a steroidal anti-inflammatory agent.

76

8. A kit comprising:

(a) a first pharmaceutical composition comprising a compound of any one of Claims 1 to 4 and a first pharmaceutically acceptable carrier; and

(b) a second pharmaceutical composition comprising a steroidal anti-inflammatory agent and a second pharmaceutically acceptable carrier;

wherein the first and second pharmaceutical compositions are separate pharmaceutical compositions.

9. A method of treating a pulmonary disorder, the method comprising administering to a patient in need of treatment a therapeutically effective amount of a compound of any one of Claims 1 to 4.

10. A method of treating chronic obstructive pulmonary disease or asthma, the method comprising administering to a patient a therapeutically effective amount of a compound of any one of Claims 1 to 4.

11. A method of producing bronchodilation in a mammal, the method comprising administering to a mammal a bronchodilation-producing amount of a compound of any one of Claims 1 to 4.

12. A method of antagonizing a muscarinic receptor and agonizing a β_2 adrenergic receptor in a mammal, the method comprising administering to the mammal a compound of any one of Claims 1 to 4.

13. A method of using a compound of any one of Claims 1 to 4 as a research tool, the method comprising conducting a biological assay using a compound of any one of Claims 1 to 4.

14. A method of evaluating a test compound in a biological assay, the method comprising:

(a) conducting a biological assay with a test compound to provide a first assay value;

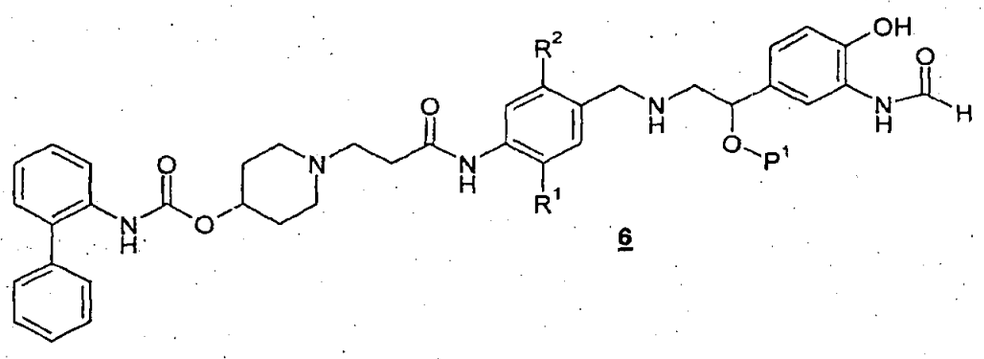
(b) conducting the biological assay with a compound of any one of Claims 1 to 4 to provide a second assay value; wherein step (a) is conducted either before, after or concurrently with step (b); and

(c) comparing the first assay value from step (a) with the second assay value from step (b).

15. The method of Claim 14, wherein the biological assay is a muscarinc receptor binding assay or a β_2 adrenergic receptor binding assay.

16. The method of Claim 14, wherein the biological assay is a bronchoprotection assay in a mammal.

17. A process of preparing the compound of Claim 1, the process comprising deprotecting a compound of formula 6:

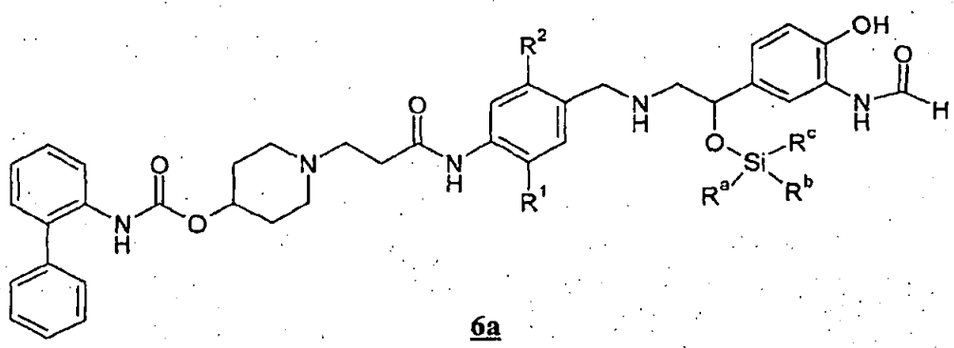


6

wherein P^1 is a hydroxyl-protecting group, to provide a compound of formula I.

78

18. A process of preparing the compound of Claim 1, the process comprising deprotecting a compound of formula 6a:

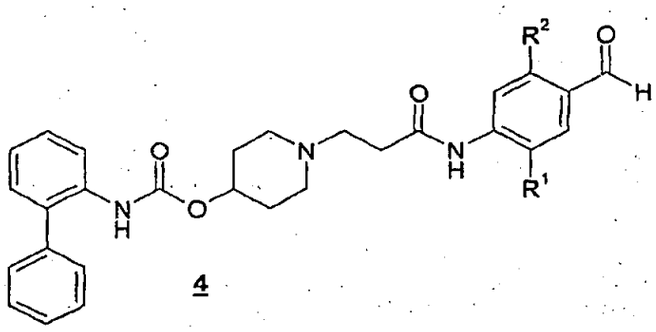


6a

wherein R^a, R^b and R^c are independently selected from C_{1-4} alkyl, phenyl, -C_{1-4} alkyl-(phenyl), or one of R^{1a}, R^{1b} and R^{1c} is –O-(C_{1-4} alkyl); to provide a compound of formula I.

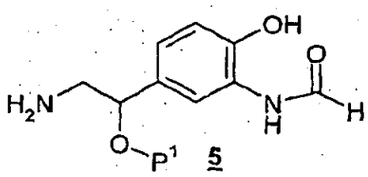
19. A process of preparing the compound of Claim 1, the process comprising:

(a) reacting a compound of formula 4:



4

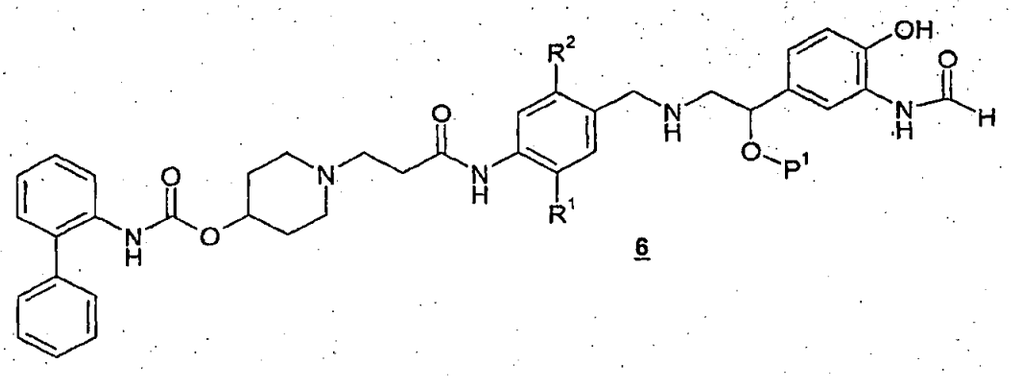
with a compound of formula 5:



5

wherein P^1 is a hydroxyl-protecting group, in the presence of a reducing agent to provide a compound of formula 6:

79



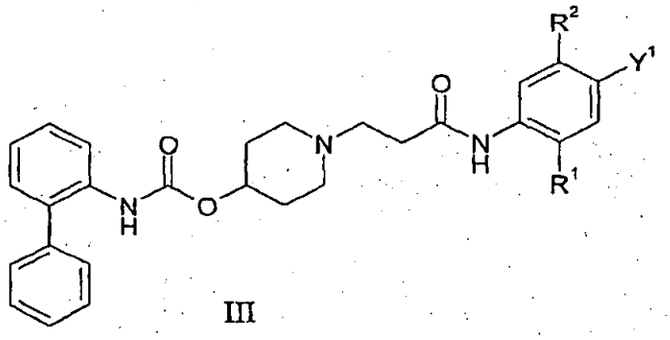
6

and

(b) deprotecting the compound of formula **6** to provide a compound of formula I.

20. A process of preparing a pharmaceutically acceptable salt of the compound of Claim 1, the process comprising contacting a compound of formula I in free base form with a pharmaceutically acceptable acid.

21. An intermediate for preparing a compound of any one of Claims 1 to 4, wherein the intermediate is a compound of formula III:



III

wherein

Y^1 is selected from –CHO, -CN, $-CH_2OH$, $-CH(OR^{3a})OR^{3b}$, -C(O)OH, $-C(O)OR^{3c}$, bromo and iodo, where R^{3a} and R^{3b} are selected independently from C_{1-6} alkyl, or R^{3a} and R^{3b} are joined to form C_{2-6} alkylene, R^{3c} is selected from C_{1-6} alkyl;

R^1 is methyl or ethyl;

R^2 is methyl or ethyl;

or a salt or stereoisomer thereof.

22. The compound of Claim 21, wherein R^1 and R^2 are methyl.

23. The compound of Claim 21, wherein Y^1 is –CHO.

24. The compound of Claim 21, wherein Y^1 is –CHO; and R^1 and R^2 are methyl.

25. A compound of Claim 4, wherein the compound is biphenyl-2-ylcarbamic acid 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formylamino-4-hydroxyphenyl)-2-hydroxyethylamino]methyl}-2,5-dimethylphenyl-carbamoyl)ethyl]piperidin-4-yl ester L-tartaric acid salt.

26. A compound of any one of Claims 1 to 4 for use in therapy.

27. Use of a compound of any one of Claims 1 to 4 for the manufacture of a medicament for treating a pulmonary disorder.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
8 November 2007 (08.11.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/127196 A3

(51) International Patent Classification:
C07D 211/46 (2006.01) *A61P 11/00* (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2007/009925

(22) International Filing Date: 24 April 2007 (24.04.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/794,702 25 April 2006 (25.04.2006) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/794,702 (CIP)
Filed on 25 April 2006 (25.04.2006)

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **THERAVANCE, INC.** [US/US]; 901 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **COLSON, Pierre-Jean** [FR/US]; 301 Bryant Street #403, San Francisco, CA 94107 (US). **HUGHES, Adam** [GB/US]; 1221 Judson Street, Belmont, CA 94002 (US). **HUSFELD, Craig** [US/US]; 3811 Farm Hill Boulevard, Redwood City, CA 94061 (US). **MAMMEN, Mathai** [CA/US]; 5 Barcelona Circle, Redwood City, CA 94065 (US). **RAPTA, Miroslav** [SK/US]; 411 E. Duane Avenue, Sunnyvale, CA 94085 (US).

(74) Agents: **HAGENAH, Jeffrey, A.** et al.; Theravance, Inc., 901 Gateway Boulevard, South San Francisco, CA 94080 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US (patent), UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

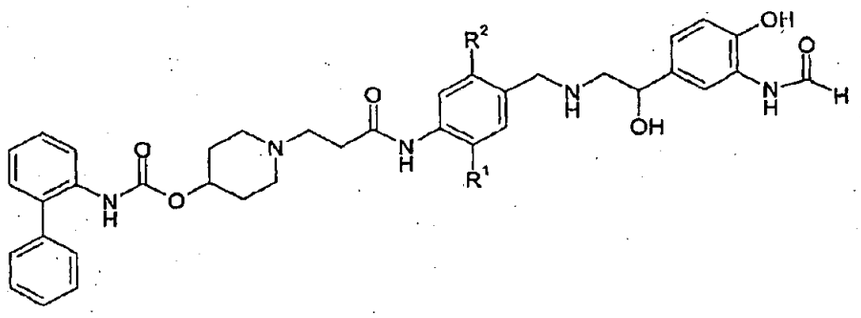
(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
21 December 2007

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

(54) Title: DIALKYLPHENYL COMPOUNDS HAVING β_2 ADRENERGIC RECEPTOR AGONIST AND MUSCARINIC RECEPTOR ANTAGONIST ACTIVITY



(I)

(57) Abstract: This invention relates to compounds of formula (I) Wherein R^1 and R^2 are as defined in the specification, or a pharmaceutically acceptable salt or solvate or stereoisomer thereof. The invention also relates to pharmaceutical compositions and combinations comprising such compounds, processes and intermediates for preparing such compounds, and methods of using such compound to for example, treat pulmonary disorders, such as chronic obstructive pulmonary disease and asthma.

WO 2007/127196 A3

82

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/009925

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07D211/46 A61K31/445 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)
C07D A61K A61P

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, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/051946 A (THERAVANCE INC [US]; MAMMEN MATHAI [US]; DUNHAM SARAH [AU]) 9 June 2005 (2005-06-09) claims 1,35	1-27
A	US 2004/167167 A1 (MAMMEN MATHAI [US] ET AL MAMMEN MATHAI [US] ET AL) 26 August 2004 (2004-08-26) cited in the application claims 1,14-16	1-27
A	WO 2005/087735 A (THERAVANCE INC [US]; MAMMEN MATHAI [US]; JI YU-HUA [US]; MU YONGQI [US) 22 September 2005 (2005-09-22) claims 1,19	1-27

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family 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.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 October 2007	29/10/2007

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Wolf, Claudia

4

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

83

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/009925

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02/076933 A (GLAXO GROUP LTD [GB]; BIGGADIKE KEITH [GB]; FIELD RITA [GB]; GUNTRIP S) 3 October 2002 (2002-10-03) claim 1	1-27

4

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

84

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.1

Although claims 9-12 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.

Although claims 13-16 are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Continuation of Box II.1

Claims Nos.: 9-16 in respect of industrial applicability

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/009925

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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. [X] Claims Nos.: 9-16 in respect of industrial applicability
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:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2007/009925

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 2005051946	A	09-06-2005	CA	2543858	A1	09-06-2005
			CN	1882556	A	20-12-2006
			EP	1685118	A2	02-08-2006
			JP	2007514662	T	07-06-2007
			US	2005113417	A1	26-05-2005
US 2004167167	A1	26-08-2004	US	2006223858	A1	05-10-2006
			US	2006223859	A1	05-10-2006
			US	2006223860	A1	05-10-2006
			US	2006229334	A1	12-10-2006
			US	2007037984	A1	15-02-2007
			US	2007088054	A1	19-04-2007
WO 2005087735	A	22-09-2005	EP	1723110	A1	22-11-2006
WO 02076933	A	03-10-2002	EP	1370521	A1	17-12-2003
			JP	2004538259	T	24-12-2004
			US	2004157830	A1	12-08-2004

(1) P. 937

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 01/224 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del traductor al tiempo con la presente. Esta traducción ha sido preparada por Juan Pablo Piedrahita Aguilera, Traductor e Intérprete Oficial debidamente reconocido de conformidad con el Certificado de Idoneidad Profesional No. 0045 expedido por la Universidad Nacional de Colombia.

(Se traducen un Certificado Notarial y Apostilla No. 125836 escritos en inglés, adjuntos a un Poder otorgado por la compañía THERAVANCE INC., con fecha Mayo 7, 2002, escrito en inglés y español.)

CALIFORNIA RECONOCIMIENTO PARA TODOS LOS FINES

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO de San Mateo } S.S.

En Mayo 7, 2002 , ante mi, Joyce Cohen, Notario Público, (Nombre y Cargo del Funcionario (p.ej. "Jane Doe, Notario Público"), compareció personalmente Jeffrey A. Hagenah, (Nombre(s) de el (los) firmante(s)),

x	a quien(es) conozco personalmente o
(en blanco)	quien presentó pruebas basadas en evidencia suficiente quien es ~~(son)~~ la~~(s)~~ persona~~(s)~~ cuyo~~(s)~~ nombre~~(s)~~ está~~(n)~~ suscrito~~(s)~~ en el instrumento adjunto y reconoció ~~(eron)~~ ante mí que él~~(ellos)~~ suscribió~~(eron)~~ el mismo en su~~(s)~~ lealdad~~(es)~~ de ALVARADO autorizado~~(s)~~ y que por su~~(s)~~ firma~~(s)~~ sobre el instrumento la~~(s)~~

Ele. DEL DUA... DE ALVARADO
Notaría Treinta y Seis de Bogotá
03 DIC 2007
La suscrita Notaría Treinta y Seis del Círculo de Bogotá, Hace constar que esta fotocopia coincide en su contenido con un documento igual que su original ha tenido a la vista
(Art. 74 Decreto 960 de 1970)

TRADUCCIÓN JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA TRADUCTOR OFICIAL UNIVERSIDAD NACIONAL COLOMBIA

88

persona~~(s)~~ o la entidad a nombre de quien la~~(s)~~ persona~~(s)~~ actúa~~(n)~~ suscribió~~(eron)~~ el instrumento.

DA FE mi firma y sello oficial.

Firma: (Firmado) Joyce Cohen

Firma del Notario Público,

(Sello a Tinta: Joyce Cohen, Comisión # 1223928, NOTARIO PÚBLICO - CALIFORNIA, Condado de San Mateo, mi comisión vence Junio 11, 2003).

Estampe el Sello Oficial Arriba

———————————————*OPCIONAL*

Aunque la información a continuación no se requiere por ley, puede ser valiosa para quienes se basen en el documento y podrían evitar que fraudulentamente se desprendan y se vuelvan a adjuntar otros documentos a este formulario.

Descripción del Documento Adjunto

Título o Tipo de Documento: Poder – Clarke modet & Co Colombia

Fecha del Documento: Mayo 7, 2002 Número de Páginas 1

Firmante(s) distintos a los arriba mencionados: (en blanco)

Facultad(es) Reivindicadas por el Firmante

Nombre del Firmante: J. Hagenah

en blanco	INDIVIDUO
X	FUNCIONARIO EMPRESARIAL-CARGO(S): Secretario Asistente
en blanco	SOCIO-- en blanco LIMITADO en blanco
en blanco	APODERADO

Ma. DEL PILAR HURTADO
La Notaria Treinta y Seis de Bogotá
03 DIC 2007
El suscrito Notario Treinta y Seis del Círculo de Bogotá, Hace constar que esta fotocopia coincide con el documento que tuve a la vista igual cuyo original ha tenido o la vista
(Art. 74 Decreto 960 de 1970)

89

en blanco	SÍNDICO
en blanco	CUSTODIO
en blanco	OTRO: (EN BLANCO)

EL FIRMANTE REPRESENTA:

THERAVANCE INC.

(Sello Redondo en Relieve)

HUELLA DACTILAR DEL PULGAR DERECHO DEL FIRMANTE

Parte Superior del Pulgar Aquí

1997 Asociación Nacional de Notarios 9350 De Soto Ave, P.O. Box 2402, Chatsworth, CA 91313-2402 Prod. No. 5907 Pedido: Llamar a Linea Gratuita 1-800-876-6827.

Estado de California

(Sello Pre-Impreso)

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLA

(Convención de La Haya de Octubre 5 1961)

1. *País: Estados Unidos de América*

   Este documento público

2. *Ha sido firmado por Joyce Cohen*

3. *Actuando en calidad de Notario Público, Estado de California*

4. *Lleva el sello/estampilla de Joyce Cohen, Notario Público, Estado de California*

CERTIFICADO

5. *En Sacramento, California*

Ma. DEL PILAR DEL ALVARADO
La Notaria Treinta y Seis de Bogotá
03 DIC 2007
La suscrita Notaria Treinta y Seis del Círculo de Bogotá, Hace constar que esta fotocopia coincide en su contenido con un documento igual cuyo original ha tenido a la vista (Art. 74 Decreto 960 de 1970)

TRADUCCION O
JUAN PABLO PIEDRA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFIC
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

90

6.	*El 6 de Junio del 2002*
7.	*Por el Sub-Secretario de Estado, Estado de California*
8.	*No. 125836*
9.	*Sello/Estamplilla*

(Sello de Oblea del Estado de California, Sello a tinta del Secretario de Estado)
(Sello Redondo a Tinta del Secretario de Estado)

10. Firma (Firmado)
Bill Jones
Secretario de Estado
Por (Firmado) CWasley

NP-24 A (Rev 1-96) osp 99 21639

ES TRADUCCIÓN FIEL Y COMPLETA de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación y a la cual me remito.

Bogotá, Agosto 8 de 2002.

02/224
TRADUCCION OFICIAL No. _____
JUAN PABLO PIEDRAHITA AGUILERA
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
C. IDONEIDAD 045
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Ma. DEL PILAR M. DE ALVARADO
La Notaria Treinta y Seis de Bogotá
03 DIC 2007
La suscrita Notaria Treinta y Seis del Círculo de Bogotá, hace constar que esta fotocopia coincide en su contenido con un documento igual cuyo original ha tenido a la vista
(Art. 74 Decreto 960 de 1970)

91

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

495631

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2002 AUG 15 A 9:56

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

NO. DEL PILAR M. DE ALVARADO
La Notaria Treinta y Seis de Bogotá

03 DIC 2007

Lo suscrito secretario [illegible] Treinta y Seis del Círculo de Bogotá, Hace constar que la presente fotostática coincide en su contenido con un documento igual cuyo original ha tenido a la vista (Art. 74 Decreto 960 de 1970)

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document

2. *has been signed by JOYCE COHEN*

3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*

4. *bears the seal/stamp of JOYCE COHEN, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*

6. *the 6th day of June 2002*

7. *by Deputy Secretary of State, State of California*

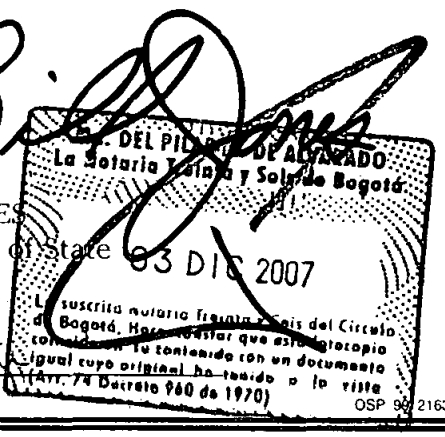
8. *No. 125836*

9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*

BILL JONES
Secretary of State

BY _____



NP-24 A (Rev. 1-96)

OSP 98 21639

92

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

On May 7, 2002 (Date), before me, Joyce Cohen, Notary Public (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public")),
personally appeared Jeffrey A. Hagenah (Name(s) of Signer(s)),

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(~~s~~) whose name(~~s~~) is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/~~she/they~~ executed the same in his~~/her/their~~ authorized capacity(ie~~s~~), and that by his/~~her/their~~ signature(~~s~~) on the instrument the person(~~s~~), or the entity upon behalf of which the person(~~s~~) acted, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Joyce Cohen
Signature of Notary Public

ESI1 JOYCE COHEN
COMM. #1223928
Notary Public-California
SAN MATEO COUNTY
My Comm. Exp. June 11, 2003 ESI1

Place Notary Seal Above

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document
Title or Type of Document: Power of Attorney - Clarke Modet & Co. Colombia
Document Date: May 7th, 2002 Number of Pages: -1-
Signer(s) Other Than Named Above:

Capacity(ies) Claimed by Signer
Signer's Name: J. Hagenah
☐ Individual
☒ Corporate Officer — Title(s): Asst. Secty
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other:

Signer Is Representing: Theravance, Inc.

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

Ma. DEL PILAR B. DE ALVARADO
La Notaria Treinta y Seis de Bogotá

03 DIC 2007

La suscrita Notaria Treinta y Seis del Círculo de Bogotá, hace constar que esta fotocopia coincide en su contenido con un documento igual cuyo original he tenido a la vista (Art. 74 Decreto 960 de 1970)

© 1997 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

TRADUCCIÓN
JUAN PA...

UNIV... COLOMBIA

93

X61575
Colombia

Clarke, Modet & Co.

COLOMBIA
E-MAIL: clarkemodet@clarkemodet.com.co
SANTAFÉ DE BOGOTA, A.A. 92397

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) caracter de representante(s) legales de

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Santa Fé de Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; marcas, lemas, nombres y enseñas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. Tambien podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policia; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella) .
5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciaoles, sustituir el presente poder y revocar las sustitucio-nes que hicieren.

Dado y firmado en

a los dias de

To be signed in the presence of a Notary

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned
THERAVANCE Inc

legal representative(s) of

an organization existing under the laws of the State of Delaware.

and in present execution of its business activity, domiciled at 901 Gateway Boulevard, South San Francisco, California 94080, United States of America

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Santa Fé de Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

1) To apply, process, obtain and/or regisier any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Desings, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, extensions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or extentions, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above- mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtention or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
5) To register domain names before the competent entity.
6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
7) To ratify or not the agency oficious.
8) I (we) hereby appoint the above mentioned attorneys with powers to receive notifications and designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such sustitutions.

Granted and signed at South San Francisco, Californi

on this 3 day of May, 2002

Jeffrey M. Hagenah
Assistant Secretary
THERAVANCE, INC.

Firma / signature

Dr. DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN
La Notaria Treinta y Seis de Bogotá
03 DIC 2007
La firma de Notaría Treinta y Seis del Círculo de Bogotá, Hace Y/o Hacer Que Esta Fotocopia Coincida en su contenido con un documento igual cuyo original he tenido a la vista. (Art. 1, Decreto 960 de 1970).

COMPUESTOS DE DIALQUILFENILO CON ACTIVIDAD AGONISTA DEL RECEPTOR β_2 ADRENÉRGICO Y ANTAGONISTA DEL RECEPTOR MUSCARÍNICO

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Campo de la invención

La presente invención se refiere a novedosos compuestos de dialquilfenilo con actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico y antagonista del receptor muscarínico. Esta invención también se relaciona con composiciones farmacéuticas que comprenden dichos compuestos, con procesos y con intermediarios para preparar dichos compuestos y con métodos para usar dichos compuestos, por ejemplo, para tratar afecciones pulmonares.

Estado de la técnica

Los trastornos pulmonares, como por ejemplo asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), se tratan comúnmente con broncodilatadores. Un tipo de broncodilatador que se utiliza para tratar trastornos pulmonares consiste en los agonistas del receptor β_2 adrenérgico (adrenoceptor), como por ejemplo albuterol, formoterol y salmeterol. Dichos compuestos en general se administran por inhalación. Otro tipo de broncodilatadores consiste en los antagonistas del receptor muscarínico (compuestos anticolinérgicos), como por ejemplo ipratropio y tiotropio. Dichos compuestos típicamente también se administran por inhalación.

El uso de composiciones farmacéuticas que contienen una combinación de un agonista del receptor β_2 adrenérgico y un antagonista del receptor muscarínico es conocido en el arte en el tratamiento de trastornos pulmonares. Por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 6.433.027, otorgada el 13 de Agosto

de 2002, revela composiciones de medicamentos que contienen un antagonista del receptor muscarínico, como por ejemplo bromuro de tiotropio, y un agonista del receptor β_2 adrenérgico, como por ejemplo fumarato de formoterol.

Además, los compuestos con actividad tanto agonista del receptor β_2 adrenérgico como actividad antagonista del receptor muscarínico son conocidos en el arte. Por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 7.141.671, otorgada el 28 de Noviembre de 2006, revela compuestos de bifenilo con actividad tanto agonista del receptor β_2 adrenérgico como actividad antagonista del receptor muscarínico. Los compuestos que poseen tanto actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico como actividad antagonista del receptor muscarínico son muy deseables porque dichos compuestos proveen broncodilatación a través de dos modos de acción independientes a la vez que tienen una farmacocinética molecular única.

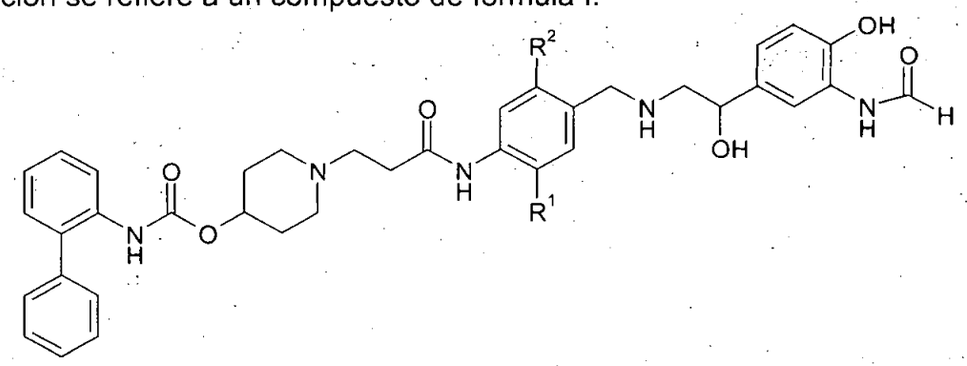
Cuando se tratan trastornos pulmonares, es particularmente útil suministrar agentes terapéuticos que tengan una prolongada duración de acción, es decir, una duración de por lo menos aproximadamente 24 horas, cuando se administran por inhalación, de tal manera que los pacientes solo necesiten administrar el agente terapéutico una vez al día o menos. No todos los compuestos de doble acción revelados anteriormente en el arte poseen esta propiedad deseable.

Por lo tanto, existe la necesidad de tener novedosos compuestos con actividad tanto agonista del receptor β_2 adrenérgico como actividad antagonista del receptor muscarínico que posean una prolongada duración de acción cuando se administran a un paciente por inhalación.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona novedosos compuestos de dialquilfenilo con actividad tanto agonista del receptor β_2 adrenérgico como actividad antagonista del receptor muscarínico. Se ha descubierto que, entre otras propiedades, un compuesto de la presente invención posee una prolongada duración de acción, es decir, una duración de por lo menos aproximadamente 24 horas, cuando se administra a un mamífero por inhalación. Por lo tanto, se espera que los compuestos de la presente invención sean útiles y ventajosos como agentes terapéuticos para tratar trastornos pulmonares.

Por lo tanto, en uno de sus aspectos como composición, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula I:

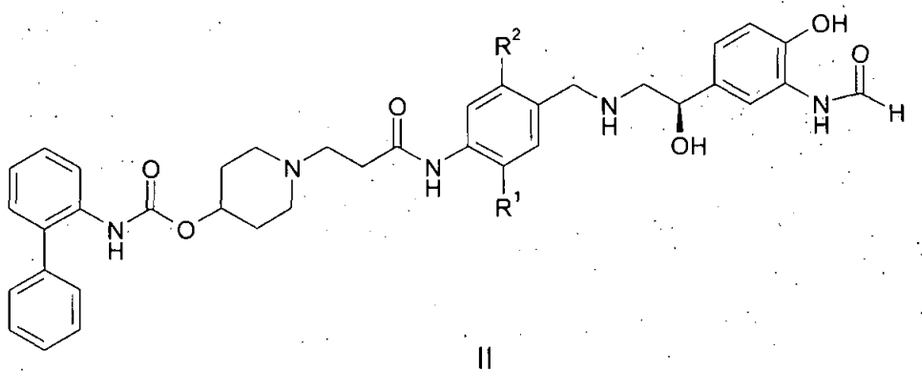


I

donde

R^1 es metilo o etilo; R^2 es metilo o etilo; o una sal o solvato o estereoisómero del mismo aceptable para uso farmacéutico.

En un aspecto en particular de la presente invención, el compuesto de fórmula I es un compuesto de fórmula II:



II

donde R^1 y R^2 son según se definió aquí (incluyendo cualquier forma de realización específica o preferida); o una sal o solvato del mismo aceptable para uso farmacéutico.

En otro de sus aspectos como composición, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo aceptable para uso farmacéutico y un compuesto de fórmula I.

Si se desea, los compuestos de la presente invención se pueden administrar en combinación con otros agentes terapéuticos, como por ejemplo un agente antiinflamatorio esteroide. Por lo tanto, en otro de sus aspectos como composición, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (a) un compuesto de fórmula I; y (b) un segundo agente terapéutico. En aún otro de sus aspectos como composición, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (a) un compuesto de fórmula I; (b) un segundo agente terapéutico; y (c) un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

En aún otro de sus aspectos como composición, la presente invención se refiere a una combinación de agentes terapéuticos, donde dicha

combinación comprende (a) un compuesto de fórmula I; y (b) un segundo agente terapéutico. En otro de sus aspectos como composición, la presente invención se refiere a una combinación de composiciones farmacéuticas, donde dicha combinación comprende (a) una primera composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I y un primer vehículo aceptable para uso farmacéutico; y (b) una segunda composición farmacéutica que comprende un segundo agente terapéutico y un segundo vehículo aceptable para uso farmacéutico. La presente invención también se refiere a un conjunto de elementos que contienen dichas composiciones farmacéuticas.

Los compuestos de la presente invención poseen tanto actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico como actividad antagonista del receptor muscarínico. Por lo tanto, se espera que los compuestos de fórmula I sean útiles como agentes terapéuticos para tratar trastornos pulmonares, como por ejemplo asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Por lo tanto, en uno de sus aspectos como método, la presente invención se refiere a un método para tratar un trastorno pulmonar, donde dicho método comprende administrar a un paciente que necesita tratamiento una cantidad efectiva para uso terapéutico de un compuesto de fórmula I. La presente invención también se refiere a un método para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma, donde dicho método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva para uso terapéutico de un compuesto de fórmula I. Además, en otro de sus aspectos como método, la presente invención se refiere a un método para producir broncodilatación en un mamífero, donde dicho método comprende administrar a un mamífero una cantidad que produce broncodilatación de un compuesto de fórmula I. La

presente invención también se refiere a un método para causar un efecto antagonista sobre un receptor muscarínico y causar un efecto agonista sobre un receptor β_2 adrenérgico en un mamífero, donde dicho método comprende administrar al mamífero un compuesto de fórmula I.

Como los compuestos de la presente invención poseen tanto actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico como actividad antagonista del receptor muscarínico, dichos compuestos también son útiles como herramientas de investigación. Por lo tanto, en aún otro de sus aspectos como método, la presente invención se refiere a un método para usar un compuesto de fórmula I como una herramienta para la investigación, donde dicho método comprende realizar un ensayo biológico usando un compuesto de fórmula I.

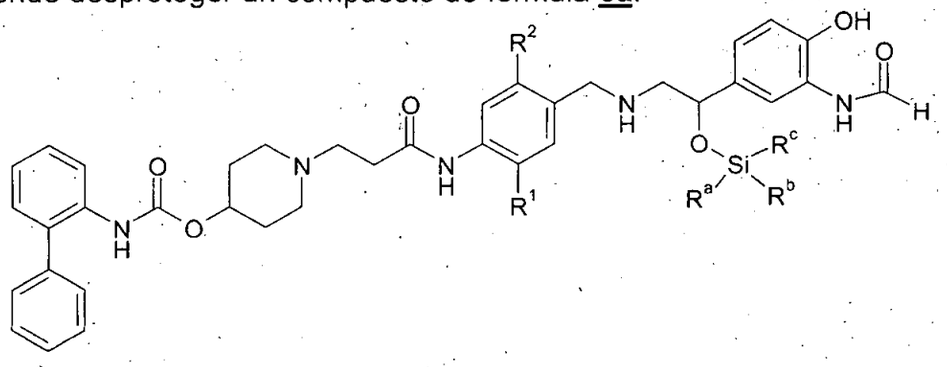
Los compuestos de la presente invención también se pueden utilizar para evaluar nuevos compuestos químicos. Por lo tanto, en otro de sus aspectos como método, la presente invención se refiere a un método para evaluar un compuesto de prueba en un ensayo biológico, donde dicho método comprende: (a) realizar un ensayo biológico con un compuesto de prueba para dar un primer valor del ensayo; (b) realizar el ensayo biológico con un compuesto de fórmula I para dar un segundo valor del ensayo; donde paso (a) se lleva a cabo ya sea antes, después o en forma concurrente con el paso (b); y (c) comparar el primer valor del ensayo que se obtuvo en el paso (a) con el segundo valor del ensayo que se obtuvo en el paso (b).

La presente invención también se refiere a procesos e intermediarios novedosos útiles para preparar compuestos de fórmula I. Por lo tanto, en otro de sus aspectos como método, la presente invención se refiere a un proceso para preparar un compuesto de fórmula I, donde dicho proceso comprende

desproteger un compuesto de fórmula **6** (según se definió aquí) para dar un compuesto de fórmula I.

En otro de sus aspectos como método, la presente invención se refiere a un proceso para preparar un compuesto de fórmula I, donde dicho proceso comprende: (a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula **4** con un compuesto de fórmula **5** en presencia de un agente reductor para dar un compuesto de fórmula **6**; y (b) desproteger el compuesto de fórmula **6** para dar un compuesto de fórmula I; donde los compuestos **4**, **5** y **6** son según se definió aquí.

En una forma de realización en particular de la presente invención, los compuestos de fórmula I se preparan desprotegiendo un compuesto de fórmula **6**, donde el grupo protector de hidroxilo es un grupo sililo. Por lo tanto, en aún otro de sus aspectos como método, la presente invención se refiere a un proceso para preparar un compuesto de fórmula I, donde dicho proceso comprende desproteger un compuesto de fórmula **6a**:



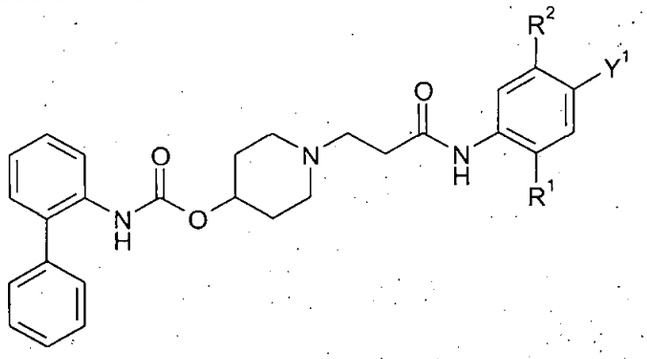
6a

donde R^a, R^b y R^c se seleccionan independientemente entre Alquilo C_{1-4}, fenilo, -alquil C_{1-4}-(fenilo), o un de R^{1a}, R^{1b} y R^{1c} es -O-(alquilo C_{1-4}); para dar un compuesto de fórmula I.

101

En otras formas de realización, los procesos que se describen aquí además comprenden el paso de formar una sal de un compuesto de fórmula I aceptable para uso farmacéutico. En otras formas de realización, la presente invención se refiere a los otros procesos que se describen aquí; y al producto que se prepara mediante cualquiera de los procesos que se describen aquí.

En una forma de realización en particular, la presente invención se refiere a un compuesto de fórmula III:



III

o una sal o estereoisómero de los mismos, donde Y^1 se selecciona entre -CHO, -CN, $-CH_2OH$, $-CH(OR^{3a})OR^{3b}$, -C(O)OH, $-C(O)OR^{3c}$, bromo y yodo, donde R^{3a} y R^{3b} se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-6}, o R^{3a} y R^{3b} están unidos para formar un alquileno C_{2-6}, R^{3c} se selecciona entre alquilo C_{1-6}; y R^1 y R^2 son según se definió aquí (incluyendo cualquier forma de realización específica o preferida), donde dichos compuestos son útiles como intermediarios para preparar compuestos de fórmula I. En una forma de realización en particular de la fórmula III, R^1 y R^2 son metilo. En otra forma de realización en particular de la fórmula III, Y^1 es -CHO. En aún otra forma de realización en particular de la fórmula III, R^1 y R^2 son metilo y Y^1 es -CHO.

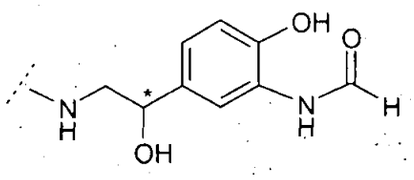
La presente invención también se refiere al uso de un compuesto de

fórmula I para terapia. Además, la invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula I para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno pulmonar; y al uso de un compuesto de fórmula I como herramienta para la investigación. Aquí se revelan otros aspectos y formas de realización de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En uno de sus aspectos como composición, la presente invención se refiere a novedosos compuestos de fórmula I. Los compuestos de fórmula I contienen uno o más centros quirales y por lo tanto, a no ser que se indique otra cosa, la presente invención se refiere a mezclas racémicas; estereoisómeros puros (es decir, enantiómeros o diasterómeros); mezclas enriquecidas con estereoisómeros, etcétera. Aquellos entrenados en la técnica comprenderán que cuando en la presente documentación se representa o nombra un estereoisómero en particular, a menos que se indique lo contrario, en las composiciones de esta invención pueden haber cantidades menores de otros estereoisómeros, teniendo en cuenta que la utilidad de la composición como un todo no se vea alterada por la presencia de dichos otros isómeros.

En particular, los compuestos de fórmula I contienen un centro quiral en el átomo de carbono indicado por el símbolo * en la siguiente fórmula parcial:



En una forma de realización en particular de la presente invención, el

átomo de carbono identificado por el símbolo * tiene la configuración (*R*). En esta forma de realización, los compuestos de fórmula I tienen la configuración (*R*) en el átomo de carbono identificado por el símbolo * o están enriquecidos en una forma estereoisomérica con la configuración (*R*) en dicho átomo de carbono.

Los compuestos de fórmula I también contienen varios grupos básicos (por ejemplo, grupos amino), y por consiguiente, los compuestos de fórmula I pueden existir como bases libres o en varias formas de sal. Todas estas formas están incluidas dentro del alcance de esta invención. Además, se incluyen solvatos de los compuestos de fórmula I, o sales de éstos, en el alcance de esta invención.

Por lo tanto, aquellos con experiencia en el arte reconocerán que aquí, a no ser que se indique otra cosa, la referencia a un compuesto, por ejemplo, la referencia a un compuesto de fórmula I o compuesto **6**, incluye referencia a las sales y estereoisómeros y solvatos de dicho compuesto.

Además, según se usa aquí, las formas en singular "un" "una", "la" y "el" incluyen las correspondientes formas en plural a no ser que el contexto del uso indique claramente otra cosa.

La nomenclatura que se utiliza aquí para nombrar los compuestos de la presente invención y sus intermediarios se ha derivado en general usando el software AutoNom que se puede obtener comercialmente (MDL, San Leandro, California). Típicamente, los compuestos de fórmula I se han nombrado como derivados éster piperidin-4-ílico de ácido bifenil-2-ilcarbámico.

Realizaciones representativas

Los siguientes sustituyentes y valores proporcionan ejemplos

representativos de varios aspectos y realizaciones de esta invención. Estos valores representativos definen e ilustran adicionalmente dichos y realizaciones, y no pretenden excluir otras realizaciones o limitar el alcance de esta invención. Respecto de esto, se prefiere la representación de un valor o sustituyente particular que no excluya de modo alguno otros valores o sustituyentes de esta invención, a menos que se lo indique en forma específica.

En una forma de realización, R^1 es metilo y R^2 es metilo.

En otra forma de realización, R^1 es etilo y R^2 es etilo.

En otra forma de realización, R^1 es metilo y R^2 es etilo.

En otra forma de realización, R^1 es etilo y R^2 es metilo.

Por lo tanto, en uno de sus aspectos como composición, la presente invención se refiere a compuestos de fórmula I que se seleccionan entre:

éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa);

éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dietilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIb);

éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2-metil-5-etilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIc);

éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2-etil-5-metilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IId);

o una sal de los mismos aceptable para uso farmacéutico.

Definiciones

Cuando se describen los compuestos, las composiciones, los métodos y los procesos de esta invención, los siguientes términos tienen los significados que se indican a continuación, a menos que se indique lo contrario.

El término "alquilo" hace referencia a un grupo hidrocarburo monovalente saturado que puede ser lineal o ramificado. Salvo que se defina lo contrario, dichos grupos alquilo contienen típicamente entre 1 y 10 átomos de carbono. Los grupos alquilo representativos incluyen, a modo de ejemplo, metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, *sec*-butilo, isobutilo, *ter*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo, *n*-octilo, *n*-nonilo, *n*-decilo y similares.

Cuando se menciona una cantidad específica de átomos de carbono para un término particular en la presente documentación, se indica la cantidad de átomos de carbono antes del término. Por ejemplo, el término "alquilo C_{1-3}" significa un grupo alquilo con entre 1 y 3 átomos de carbono donde los átomos de carbono están en cualquier configuración aceptable desde el punto de vista químico.

El término "alquileno" hace referencia a un grupo hidrocarburo divalente saturado que puede ser lineal o ramificado. A menos que se los defina de otro modo, dichos grupos alquileno típicamente contienen entre 1 y 10 átomos de carbono. Los grupos alquileno representativos incluyen, a modo de ejemplo, metileno, etan-1,2-diilo ("etileno"), propan-1,2-diilo, propan-1,3-diilo, butan-1,4-diilo, pentan-1,5-diilo y similares.

El término "grupo protector de amino" hace referencia a un grupo protector adecuado para evitar reacciones indeseadas en un grupo amino. Los

grupos protectores de amino representativos incluyen, sin limitaciones, *ter*-butoxicarbonilo (BOC), tritilo (Tr), benciloxicarbonilo (Cbz), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), bencilo, formilo, trimetilsililo (TMS), *ter*-butildimetilsililo (TBS) y similares.

El término "grupo protector de carboxilo" hace referencia a un grupo protector adecuado para evitar reacciones indeseadas en un grupo carboxilo. Los grupos protectores de carboxilo representativos incluyen, sin limitaciones, ésteres, tales como metilo, etilo, *ter*-butilo, bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo (PMB), 9-fluroenilmetilo (Fm), trimetilsililo (TMS), *ter*-butildimetilsililo (TBS), difenilmetilo (benzhidrilo, DPM) y similares.

A no ser que se indique otra cosa, el término "compuesto de la invención" o "compuesto de fórmula I" o "compuesto de fórmula II" según se usa aquí significa el(los) compuesto(s) especificado(s) o una sal o solvato o estereoisómero de los mismos que son aceptables para uso farmacéutico.

El término "halo" hace referencia a fluoro, cloro, bromo e yodo.

El término "grupo protector de hidroxilo" hace referencia a un grupo protector apropiado para prevenir reacciones indeseables en un grupo hidroxilo. Los grupos protectores de hidroxilo representativos incluyen, sin limitaciones, grupos sililo, incluyendo grupos tri(C1-6)alquil)sililo, como por ejemplo trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), *ter*-butildimetilsililo (TBS) y semejantes; ésteres (grupos acilo) incluyendo grupos C1-6alcanoilo, tales como formilo, acetilo y semejantes; grupos arilmetilo, tales como bencilo (Bn), *p*-metoxibencilo (PMB), 9-fluorenilmetilo (Fm), difenilmetilo (benzhidrilo, DPM) y similares. Además, pueden protegerse también dos grupos hidroxilo como un grupo alquilideno, como por ejemplo prop-2-ilidina, formado, por ejemplo, a

través de una reacción con una cetona, como por ejemplo acetona.

El término "grupo saliente" hace referencia a un grupo funcional o un átomo que puede ser desplazado por otro grupo funcional o átomo en una reacción de sustitución, como por ejemplo una reacción de sustitución nucleofílica. A modo de ejemplo, los grupos salientes representativos incluyen, pero sin limitarse un grupos cloro, bromo e yodo; grupos del éster sulfónico, tales como mesilato, tosilato, brosilato, nosilato y semejantes; y grupos aciloxilo, tales como acetoxilo, trifluoroacetoxilo y similares.

Cuando el término "diámetro de la media de masa" o "MMD" se utiliza con referencia a partículas significa un diámetro tal que la mitad de la masa de las partículas está contenida en partículas de mayor diámetro y la mitad está contenida en partículas de menor diámetro.

El término "micronizada" o "en forma micronizada" significa partículas en las cuales por lo menos aproximadamente un 90 por ciento de las partículas tiene un diámetro menor de aproximadamente 10μm a no ser que se indique otra cosa.

El término "o una sal, un solvato o un estereoisómero del mismo aceptable para el uso farmacéutico", como por ejemplo se lo utiliza en la presente, incluye todas las permutaciones de sales, solvatos y estereoisómeros, como por ejemplo un solvato de una sal aceptable para el uso farmacéutico de un estereoisómero de un compuesto de fórmula I.

El término "sal aceptable para el uso farmacéutico" hace referencia a una sal que es aceptable para administrar a un paciente, como por ejemplo un mamífero (por ejemplo, sales que presentan una seguridad aceptable en un régimen de dosificación para mamíferos). Las sales representativas aceptables

para el uso farmacéutico incluyen sales de ácido acético, ascórbico, bencensulfónico, benzoico, alcanforsulfónico, cítrico, etansulfínico, edisílico, fumárico, gentísico, glucónico, glucurónico, glutámico, hipúrico, bromhídrico, clorhídrico, isetiónico, láctico, lactobiónico, maleico, málico, mandélico, metansulfónico, múcico, naftalensulfónico, naftalen-1,5-disulfónico, naftalen-2,6-disulfónico, nicotínico, nítrico, orótico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, p-toluensulfónico, xinafoico y similares.

El término "derivados protegidos de los mismos" significa un derivado del compuesto que se especifica donde uno o más grupos funcionales del compuesto están protegidos o bloqueados para impedir que sufran reacciones no deseadas con un grupo protector o bloqueante. Los grupos funcionales que pueden protegerse incluyen, a modo de ejemplo, grupos carboxi, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos tiol, grupos carbonilo y similares. Aquellos con una experiencia normal en el arte conocen bien los grupos protectores apropiados para dichos grupos funcionales, según se puede ver por ejemplo en las descripciones en T. W. Greene y G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Síntesis*, tercera edición, Wiley, New York, 1999, y las referencias que se citan allí.

El término "sal del mismo" hace referencia a un compuesto formado cuando se reemplaza el hidrógeno de un ácido por un catión, como por ejemplo un catión metálico o un catión orgánico, y similares. En la presente invención, el catión típicamente comprende una forma protonada de un compuesto de fórmula I, es decir donde uno o más grupos amino han sido protonados por un ácido. Preferiblemente, la sal es una sal aceptable para el uso farmacéutico, aunque no se requiere esto para las sales de los

compuestos intermediarios que no están dirigidos a la administración a pacientes.

El término "solvato" hace referencia a un complejo o un agregado formado por una o más moléculas de un soluto, es decir, un compuesto de fórmula I o una sal del mismo aceptable para el uso farmacéutico, y una o más moléculas de un solvente. Dichos solvatos son típicamente sólidos cristalinos con una relación molar de soluto y solvente sustancialmente fija. Algunos solventes representativos son, a modo de ejemplo, agua, metanol, etanol, isopropanol, ácido acético y similares. Cuando el solvente es agua, el solvato formado es un hidrato.

El término "cantidad eficaz para terapia" significa una cantidad suficiente para efectuar un tratamiento cuando se administra a un paciente que necesite tratamiento.

El término "tratar" o "tratamiento", como se lo usa en la presente documentación, hace referencia a tratar o al tratamiento de una enfermedad o una condición médica (como por ejemplo la COPD o asma) en un paciente, como por ejemplo un mamífero (particularmente un humano), que incluye:

(a) prevenir la ocurrencia de la enfermedad o la condición médica, es decir, el tratamiento profiláctico de un paciente;

(b) mejorar la enfermedad o la condición médica, es decir, eliminar o causar la regresión de la enfermedad o la condición médica en un paciente;

(c) suprimir la enfermedad o la condición médica, es decir, hacer más lento o detener el desarrollo de la enfermedad o la condición médica en un paciente; o

(d) aliviar los síntomas de la enfermedad o la condición médica en un paciente.

Todos los otros términos que se utilizan aquí se dan con la intención de que tengan sus significados normales según lo entienden aquellos con una experiencia normal en el arte que les concierne.

Procedimientos Generales de Síntesis

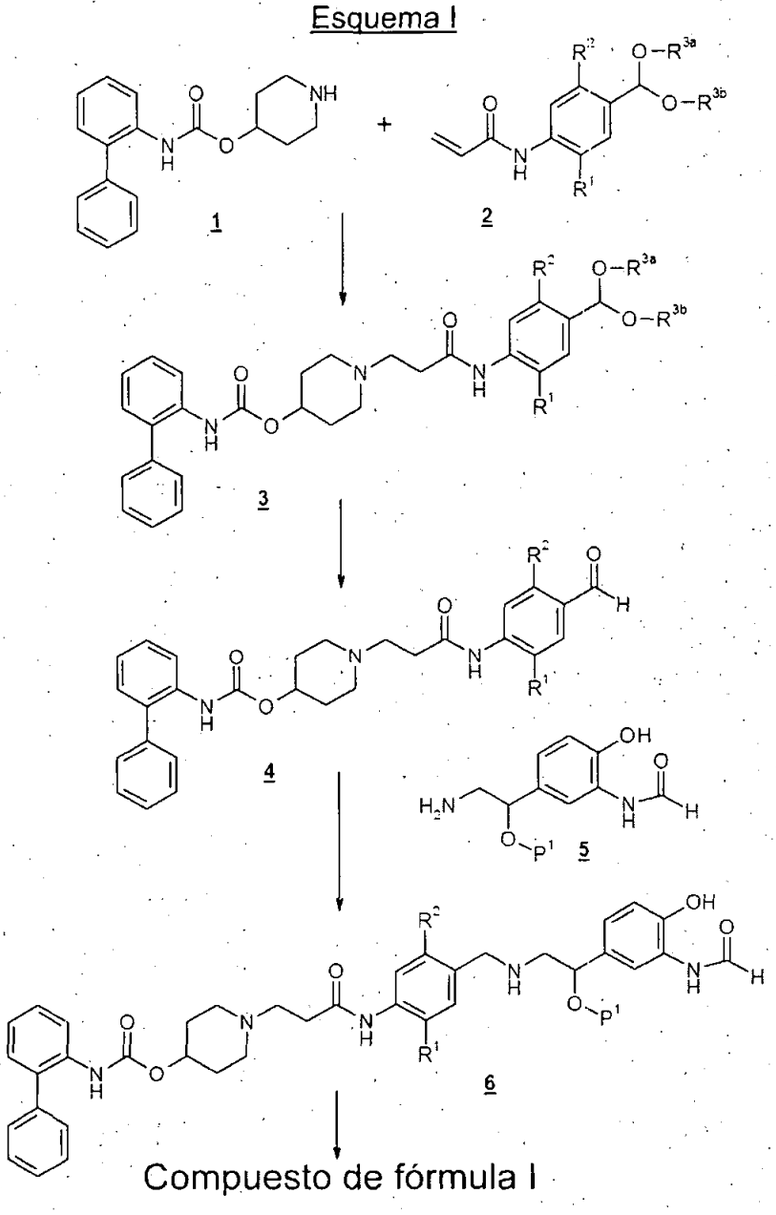
Los compuestos de la presente invención se pueden preparar a partir de materias primas que se pueden obtener fácilmente usando los siguientes métodos y procedimientos generales o usando otra información que aquellos con una experiencia normal en el arte pueden obtener fácilmente o conocen. Aunque los siguientes procedimientos pueden ilustrar una forma de realización o aspecto en particular de la presente invención, aquellos con experiencia en el arte reconocerán que se pueden preparar otras formas de realización o aspectos de la presente invención usando el mismo método o métodos similares o usando otros métodos, reactivos y materias primas que conocen aquellos con experiencia en el arte. También se apreciará que se dan donde condiciones de proceso típicas o preferidas (es decir, temperaturas de reacción, tiempos, proporciones molares de reactivos, solventes, presiones, etc.), a no ser que se especifique otra cosa también se pueden utilizar otras condiciones de proceso. Aunque las condiciones de reacción óptimas típicamente variarán dependiendo de diversos parámetros de reacción como por ejemplo los reactivos, solventes y cantidades que se usen, aquellos con una experiencia normal en el arte pueden determinar fácilmente las condiciones de reacción apropiadas usando procedimientos rutinarios de optimización.

(l)

Además, como será evidente para aquellos entrenados en la técnica, pueden ser necesarios grupos protectores convencionales para evitar que determinados grupos funcionales sufran reacciones indeseadas. La selección de un grupo protector apropiado para un grupo funcional en particular así como las condiciones y reactivos apropiados para la protección y desprotección de dichos grupos funcionales son bien conocidos en el arte. Si se desea, se pueden utilizar grupos protectores diferentes de aquellos que se ilustran en los procedimientos que se describen aquí.

En una forma de realización, los compuestos de fórmula I se sintetizan según se ilustra en el Esquema I:

Esquema I



donde P^1 es un grupo protector de hidroxilo; y R^{3a} y R^{3b} se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-6}, o R^{3a} y R^{3b} están unidos para formar un alquileno C_{2-6}.

Según se muestra en el Esquema I, el compuesto **1** se puede hacer reaccionar con entre aproximadamente 0,95 y aproximadamente 1,05

equivalentes molares del compuesto **2** para dar el compuesto **3**. Esta reacción de Michael se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 75°C, típicamente entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 45°C, durante entre aproximadamente 8 y aproximadamente 24 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo diclorometano o mezclas de diclorometano y metanol o etanol, etcétera. Al completar la reacción, el producto típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía, etcétera. Como alternativa, la mezcla de reacción que contiene el compuesto **3** se puede utilizar directamente en el próximo paso de la síntesis.

Luego, el compuesto **3** se hace reaccionar con ácido acuoso para hidrolizar el grupo acetal y dar el compuesto aldehído **4**. En esta reacción se puede emplear cualquier ácido apropiado incluyendo, a modo de ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido metansulfónico, ácido p-toluensulfónico, etcétera. La reacción de hidrólisis se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 30°C, típicamente entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 25°C, durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo metanol, etanol, isopropanol, diclorometano/etanol, acetonitrilo, etcétera. Al completar la reacción, el producto típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía,

etcétera.

Luego se hace reaccionar el compuesto **4** con entre aproximadamente 0,95 y aproximadamente 1,5 equivalentes molares del compuesto **5** en presencia de un agente reductor para dar el compuesto **6**. En esta reacción se puede utilizar cualquier apropiada agente reductor incluyendo, como ilustración, un reactivo hidruro de metal, como por ejemplo borohidruro de sodio, triacetoxiborohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, etcétera, o hidrógeno y un metal catalizador, como por ejemplo paladio sobre carbono, etcétera. Esta reacción de alquilación reductiva se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 30°C, típicamente entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 5°C, durante entre aproximadamente 1 y aproximadamente 6 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado y un solvente prótico, como por ejemplo dicloroetano y metanol, etcétera. Al completar la reacción, el producto típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía, etcétera.

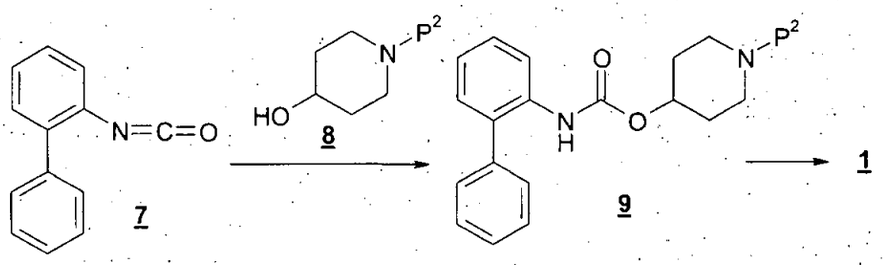
Luego se desprotege el compuesto **6** para dar un compuesto de fórmula I. Las condiciones en particular que se utilizan para desproteger el compuesto **6** dependerán del grupo protector que se emplee. Por ejemplo, cuando P^1 es un grupo protector sililo (es decir, un compuesto de fórmula **6a** según se definió aquí), como por ejemplo *ter*-butildimetilsililo, *ter*-butildifenilsililo, difenilmetilsililo, di-*ter*-butilmetilsililo, *ter*-butoxidifenilsililo, etcétera, esta reacción de desprotección se lleva a cabo típicamente poniendo en contacto el compuesto **6a** con una fuente de ion fluoruro. En una forma de realización en

115

particular, la fuente de ion fluoruro es trifluorhidrato de trietilamina. Otras fuentes apropiadas de ion fluoruro incluyen fluoruro de tetrabutilamonio, fluoruro de potasio con 18-corona-6, fluoruro de hidrógeno, fluorhidrato de piridina, etcétera. Esta reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 50°C, típicamente entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 25°C, durante entre aproximadamente 24 y aproximadamente 72 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo dicloroetano, etcétera. Al completar la reacción, el producto típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía, etcétera.

El compuesto 1 es conocido en el arte o se puede preparar a partir de materias primas y reactivos que se pueden obtener comercialmente usando procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de los EE.UU. Publicación No. U.S. 2004/0167167 A1 y R. Naito et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**(8) 1286-1294 (1998). A modo de ejemplo, el compuesto 1 se puede preparar según se ilustra en el Esquema II:

Esquema II



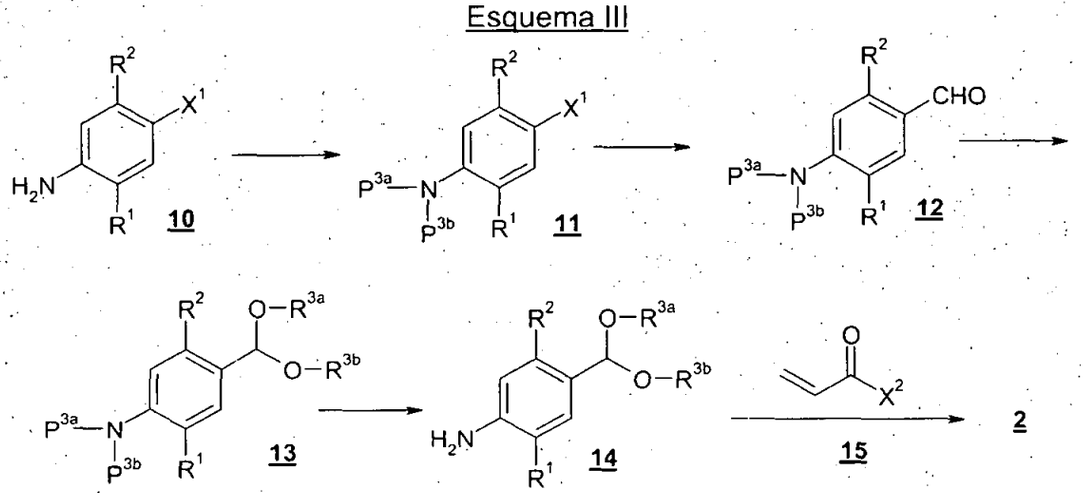
Según se muestra en el Esquema II, se hace reaccionar bifenil-2-isocianato (**7**) con una 4-hidroxipiperidina con el *N* protegido **8**, donde P^2 es un grupo protector de amino como por ejemplo un bencilo, para dar el intermediario carbamato **9**. Esta reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 100°C, típicamente entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 80°C, durante entre aproximadamente 6 y aproximadamente 24 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. Si se desea, esta reacción se puede realizar en un diluyente apropiado, como por ejemplo diclorometano, tolueno, etcétera. Como alternativa, esta reacción se puede realizar en ausencia de un diluyente. Al completar la reacción, el producto **9** típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía, etcétera. Como alternativa, la mezcla de reacción que contiene el compuesto **9** se utiliza directamente en el próximo paso de la síntesis.

Luego se elimina el grupo protector de amino, P^2, del compuesto **9** usando procedimientos convencionales para dar el compuesto **1**. Por ejemplo, cuando P^2 es un grupo bencilo, el compuesto **9** se puede desproteger usando hidrógeno o formiato de amonio, en presencia de un catalizador, como por ejemplo un catalizador de paladio. Los catalizadores que sirven como ejemplo incluyen, como ilustración, paladio sobre carbono, hidróxido de paladio sobre carbono, etcétera. Esta reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 50°C, típicamente aproximadamente 40°C, durante entre aproximadamente 6 y aproximadamente 24 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En

general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo metanol, etanol, isopropanol, etcétera. Al completar la reacción, el compuesto **1** típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía, etcétera.

Los compuestos de fórmula **2** son conocidas en el arte o se pueden preparar a partir de materias primas y reactivos que se pueden obtener comercialmente usando procedimientos conocidos. Como ilustración, los compuestos de fórmula **2** se pueden preparar según se muestra en el Esquema III:

Esquema III



Según se muestra en el Esquema III, primero, un compuesto anilina de fórmula **10**, donde X^1 es bromo o yodo, se protege en el grupo amino para dar un compuesto de fórmula **11**, donde P^{3a} es un grupo protector de amino y P^{3b} es hidrógeno o un grupo protector de amino. Se puede utilizar cualquier grupo protector de amino apropiado, como por ejemplo bencilo, 4-metoxibencilo,

trifluoroacetilo, etcétera. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar un compuesto de fórmula **10** con aproximadamente 2 o más equivalentes molares, preferiblemente entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 3,0 equivalentes molares, de un halogenuro de bencilo, como por ejemplo cloruro, bromuro o yoduro de bencilo, para dar el compuesto **11** donde P^{3a} y P^{3b} son ambos bencilo. Esta reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 50°C, típicamente aproximadamente 30°C, durante entre aproximadamente 18 y aproximadamente 24 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo metanol, etanol, isopropanol, etcétera. Típicamente, esta reacción también se lleva a cabo en presencia de una base apropiada, como por ejemplo carbonato de potasio, carbonato de sodio, etcétera. Al completar la reacción, el compuesto **11** típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía, etcétera.

Los compuestos representativos de fórmula **10** que se pueden emplear en esta reacción incluyen 2,5-dimetil-4-yodoanilina, 2,5-dietil-4-yodoanilina, 2-etil-4-yodo-5-metilanilina, 5-etil-4-yodo-2-metilanilina, 4-bromo-2,5-dimetilanilina, 4-bromo-2,5-dietilanilina, 4-bromo-2-etil-5-metilanilina, 4-bromo-5-etil-2-metilanilina, etcétera. Dichos compuestos se pueden obtener comercialmente (por ejemplo, de Spectra Group Limited, Inc., Millbury, OH) o se pueden preparar a partir de materias primas y reactivos que se pueden obtener comercialmente usando procedimientos convencionales.

Luego, el compuesto **11** se pone en contacto con entre

aproximadamente 1 y aproximadamente 2 equivalentes molares de un reactivo de alquil litio, como por ejemplo *n*-butil-litio o *ter*-butil-litio, para formar el correspondiente anión donde se ha intercambiado el grupo X^1 por litio. Esta reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente -70°C y aproximadamente 0°C, típicamente aproximadamente -20°C, durante entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 1 hora o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo tolueno, xileno, tetrahidrofurano, etcétera.

El anión de litio que se obtiene como resultado no se aísla, sino que se hace reaccionar *in situ con* un exceso molar de *N,N*-dimetilformamida para dar el compuesto **12**. En general, se utilizan entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 equivalentes molares de *N,N*-dimetilformamida. Esta reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente -70°C y aproximadamente 0°C, típicamente entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 0°C, durante entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. Al completar la reacción, el compuesto **12** típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía, etcétera.

Luego se protege el grupo aldehído del compuesto **12** como un acetal haciendo reaccionar el compuesto **12** con un alcohol o un diol en presencia de un catalizador ácido. En esta reacción se puede utilizar cualquier alcohol o diol apropiado. Por ejemplo, los alcoholes y dioles que sirven como ejemplo incluyen metanol, etanol, *n*-propanol, etilenglicol, propilenglicol, etcétera. En

general, en esta reacción se emplean un exceso molar del alcohol o diol, preferiblemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 equivalentes molares.

En esta reacción se puede utilizar cualquier catalizador ácido apropiado para facilitar la formación del acetal. Los catalizadores ácidos que sirven como ejemplo incluyen, a modo de ejemplo, ácido p-toluensulfónico, ácido bencensulfónico, ácido clorhídrico, etcétera.

La reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 100°C, típicamente entre aproximadamente 60°C y aproximadamente 80°C, durante entre aproximadamente 12 y aproximadamente 24 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo tolueno, xileno, etcétera. Típicamente, la reacción se lleva a cabo de una manera que permite extraer el agua que se produce, como por ejemplo por destilación azeotrópica o mediante el uso de tamices moleculares. Al completar la reacción, el compuesto **13** típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía, etcétera. Como alternativa, la mezcla de reacción que contiene el compuesto **13** se puede utilizar directamente en el próximo paso de la síntesis.

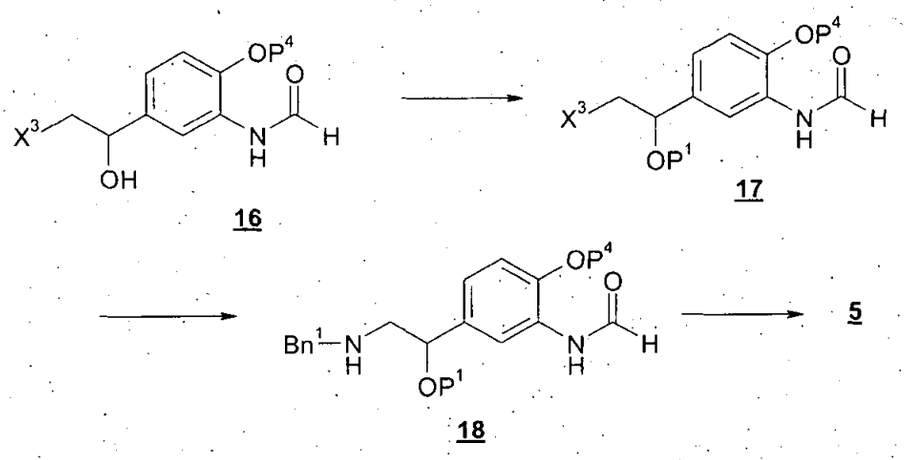
Después de la formación del acetal, el grupo amino del compuesto **13** se desprotege usando reactivos y condiciones estándar para formar el compuesto **14**. Por ejemplo, si P^{3a} y P^{3b} son grupos bencilo, el compuesto **13** se puede desproteger usando hidrógeno y un catalizador, como por ejemplo un catalizador de paladio. Los catalizadores que sirven como ejemplo incluyen, a

modo de ejemplo, paladio sobre carbono, hidróxido de paladio sobre carbono, etcétera. Esta reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 50°C, típicamente entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 30°C, durante entre aproximadamente 4 y aproximadamente 12 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo metanol, etanol, mezclas etanol/acetato de etilo, etcétera. Al completar la reacción, el compuesto **14** típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía, etcétera.

Luego se hace reaccionar el compuesto **14** con un halogenuro de acriloílo **15**, donde X^2 es cloro, bromo o yodo, para formar el compuesto **2**. Esta reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente -20°C y aproximadamente 25°C, típicamente entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 5°C, durante entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 6 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo diclorometano, etcétera, en presencia de una base apropiada, como por ejemplo diisopropiletilamina, trietilamina, etcétera. En general, en esta reacción se utilizan entre aproximadamente 1 y 1,2 equivalentes molares del halogenuro de acriloílo y entre aproximadamente 1 y aproximadamente 2 equivalentes molares de la base. Al completar la reacción, el compuesto **2** típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, recristalización, cromatografía, etcétera.

Los compuestos de fórmula **5** son conocidas en el arte o se pueden preparar a partir de materias primas y reactivos que se pueden obtener comercialmente usando procedimientos conocidos. Como ilustración, los compuestos de fórmula **5** se pueden preparar según se muestra en el Esquema IV:

Esquema IV



Según se ilustra en el Esquema IV, los compuestos de fórmula **5** se pueden preparar a partir de compuestos de fórmula **16**, donde P^4 es un grupo protector de hidroxilo, como por ejemplo bencilo, y X^3 es un grupo saliente, como por ejemplo cloro, bromo o yodo. Los compuestos de fórmula **16** son conocidas en el arte. Por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 6.268.533 B1, otorgada el 31 de Julio de 2001; y R. Hett et al., *Organic Process Research & Development* **1998**, *2*, 96-99; describen la preparación de *N*-[2-benciloxi-5-((*R*)-2-bromo-1-hidroxietil)fenil]formamida (es decir, el enantiómero (*R*) del compuesto **16**, donde P^4 es bencilo y X^3 es bromo) a partir de 2-bromo-4'-benciloxi-3'-nitroacetofenona, cuya síntesis se describe en K. Murase et al., *Chem. Pharm. Bull.*, ***25***(6) 1368-1377 (1977). Si se desea, la forma racémica

del compuesto **16** se puede preparar usando un agente reductor no quiral, como por ejemplo complejo dimetilsulfuro-borano, para reducir la 2-bromo-4'-benciloxi-3'-nitroacetofenona.

El grupo hidroxilo del compuesto **16** se protege usando procedimientos y reactivos convencionales para dar el compuesto **17**, donde P^1 es un grupo protector de hidroxilo. En una forma de realización en particular, el grupo protector de hidroxilo es un grupo protector sililo, como por ejemplo dimetilisopropilsililo, dietilisopropilsililo, dimetilhexilsililo, *ter*-butildimetilsililo, *ter*-butildifenilsililo, difenilmetilsililo, etcétera. Por ejemplo, el compuesto **16** se puede hacer reaccionar con entre aproximadamente 0,95 y aproximadamente 1,2 equivalentes molares de cloruro de ter-butildimetilsililo en presencia de entre aproximadamente 1,1 y aproximadamente 1,3 equivalentes molares de imidazol para dar el compuesto **17** donde P^1 es *ter*-butildimetilsililo. Esta reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 0°C y aproximadamente 50°C, típicamente a temperatura ambiente, durante entre aproximadamente 24 y aproximadamente 48 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo *N,N*-dimetilformamida, etcétera. Al completar la reacción, el compuesto **17** típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, cromatografía, etcétera. A modo de ilustración adicional, la síntesis de *N*-{2-benciloxi-5-[(*R*)-2-bromo-1-(*ter*-butildimetilsilaniloxi)etil]fenil}formamida se describe en el Ejemplo 2 de la Patente de los EE.UU. Publicación No. US 2004/0248985 A1, publicada el 9 de Diciembre de 2004.

Luego se hace reaccionar el compuesto **17** con una bencil amina (es

124

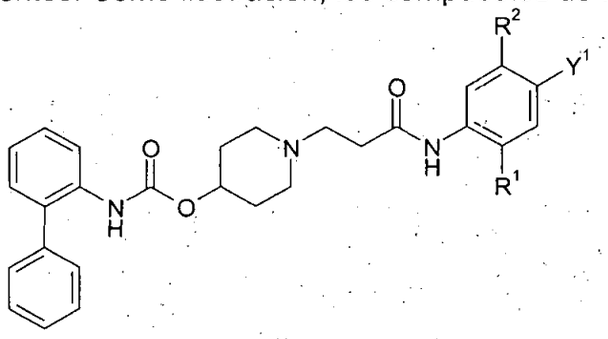
decir, Bn^1-NH_2) para dar el compuesto **18**, donde Bn^1 es un grupo bencilo no sustituido o un grupo bencilo sustituido con entre 1 y 3 sustituyentes sobre el anillo fenílico del grupo bencilo que se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-4} o alcoxi C_{1-4}. Las bencil aminas que sirven como ejemplo incluyen, bencilamina, 3,4-dimetoxibencilamina, 4-metoxibencilamina, 4-metilbencilamina, etcétera. Esta reacción se lleva a cabo típicamente poniendo en contacto el compuesto **17** con entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 equivalentes molares de la bencil amina a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 40°C y aproximadamente 100°C, típicamente entre aproximadamente 80°C y aproximadamente 90°C, durante entre aproximadamente 5 y aproximadamente 24 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo *N*-metil-2-pirrolidona (NMP), etcétera. Al completar la reacción, el compuesto **18** típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, cromatografía, recristalización, etcétera.

La eliminación del grupo bencilo, Bn^1, y P^4 usando procedimientos y reactivos convencionales da luego el compuesto **5**. En una forma de realización, tanto Bn^1 como P^4 son grupos bencilo que se eliminan en la misma mezcla de reacción. Típicamente, esta reacción se lleva a cabo poniendo en contacto el compuesto **5** con hidrógeno en presencia de un catalizador, como por ejemplo un catalizador de paladio. Los catalizadores que sirven como ejemplo incluyen hidróxido de paladio sobre carbono, paladio sobre carbono, etcétera. En general, esta reacción de desbencilación se lleva a cabo en presencia de un ácido, como por ejemplo ácido acético, ácido fórmico,

125

etcétera. Esta reacción se lleva a cabo típicamente a una temperatura que varía dentro del rango entre aproximadamente 10°C y aproximadamente 50°C, típicamente a temperatura ambiente, durante entre aproximadamente 6 y aproximadamente 24 horas o hasta completar sustancialmente la reacción. En general, esta reacción se lleva a cabo en un diluyente apropiado, como por ejemplo metanol, etanol, etcétera. Al completar la reacción, el compuesto **5** típicamente se aísla usando procedimientos convencionales, como por ejemplo extracción, cromatografía, etcétera. En una forma de realización en particular, el compuesto **5** se aísla como la sal con ácido acético.

Aquellos con una experiencia normal en el arte reconocerán que los compuestos de fórmula I también se pueden preparar mediante otros procedimientos de síntesis. Por ejemplo, se puede cambiar el orden en particular en que se realizan los pasos de síntesis o se pueden emplear intermediarios diferentes. Como ilustración, los compuestos de fórmula III:



III

donde Y^1 es -CN, -C(O)OH o $-C(O)OR^{3c}$ se pueden reducir usando procedimientos y reactivos convencionales para dar el aldehído **4** (es decir, donde Y^1 es -CHO). Además, dichos compuestos se pueden reducir al alcohol, es decir, donde Y^1 es $-CH_2OH$, y el alcohol se puede oxidar luego usando procedimientos y reactivos estándar para dar el aldehído **4** (es decir, donde Y^1

126

es -CHO).

Si se desea, se pueden preparar sales aceptables para uso farmacéutico de los compuestos de fórmula I poniendo en contacto la forma de base libre de un compuesto de fórmula I con un ácido aceptable para uso farmacéutico.

Detalles adicionales con respecto a condiciones de reacción específicas y otros procedimientos para preparar compuestos representativos de esta invención o intermediarios de los mismos se describen en los Ejemplos que se presentan más adelante.

Composiciones, combinaciones y formulaciones farmacéuticas

Los compuestos de esta invención se administran típicamente a un paciente bajo la forma de una composición o formulación farmacéutica. Dichas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al paciente por cualquier ruta de administración aceptable, incluyendo, sin limitaciones, los modos de administración por inhalación, oral, nasal, tópico (que incluye transdérmico) y parenteral. Se comprenderá que podrá usarse cualquier forma de un compuesto de esta invención, (es decir, base libre, sal aceptable para el uso farmacéutico, solvato, etcétera) que sea apropiada para un modo de administración particular, en las composiciones farmacéuticas, según se describe en la presente documentación.

Por lo tanto, en uno de sus aspectos como composición, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un vehículo o excipiente aceptable para uso farmacéutico y un compuesto de fórmula I. Opcionalmente, si se desea, dichas composiciones farmacéuticas pueden contener otros agentes terapéuticos y/o de formulación.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención típicamente contienen una cantidad efectiva para uso terapéutico de un compuesto de fórmula I. Sin embargo, aquellos con experiencia en el arte reconocerán que una composición farmacéutica puede contener más de una cantidad efectiva para uso terapéutico, es decir, composiciones globales, o menos de una cantidad efectiva para uso terapéutico, es decir, unidades de dosificación individuales diseñadas para administración múltiple para conseguir una cantidad efectiva para uso terapéutico.

Típicamente, la composición farmacéutica contendrá entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 95 por ciento en peso del agente terapéutico; incluyendo, entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 30 por ciento en peso; como por ejemplo entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 por ciento en peso del agente terapéutico.

Puede usarse cualquier vehículo o excipiente convencional en las composiciones farmacéuticas de esta invención. La selección de un vehículo o excipiente particular, o de combinaciones de vehículos o excipientes, dependerá del modo de administración usado para tratar un paciente, o del tipo de trastorno médico o estado de enfermedad particular. Respecto de esto, la preparación de una composición farmacéutica adecuada para un modo de administración particular está dentro del alcance de los especialistas en la técnica farmacéutica.

Los vehículos o excipientes usados en las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden adquirir en el comercio. Por ejemplo, dichos materiales se pueden adquirir en Sigma (St. Louis, MO). A modo de ilustración adicional, aquellos con una experiencia normal en el arte conocen bien las

técnicas de formulación convencionales según se puede ver por ejemplo en las descripciones de Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (2000); y H.C. Ansel et al., *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 7ª edición, Lippincott Williams & White, Baltimore, Maryland (1999).

Los ejemplos representativos de materiales que pueden servir como vehículos aceptables para el uso farmacéutico incluyen, sin limitaciones, los siguientes: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de papa; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetil celulosa de sodio, etil celulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de maní, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones amortiguadoras de fosfato; (21) gases propelentes comprimidos, tales como clorofluorocarburos y fluorohidrocarburos; y (22) otras sustancias no tóxicas compatibles empleadas en composiciones farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención se preparan típicamente mezclando o combinando de forma exhaustiva e íntima un

compuesto de la invención con un vehículo aceptable para el uso farmacéutico y cualquier ingrediente opcional. Si resulta necesario o se lo desea, luego puede moldearse la mezcla uniformemente combinada resultante, o puede cargársela en tabletas, cápsulas, píldoras, recipientes, cartuchos, dosificadores y semejantes, usando procedimientos y equipos convencionales.

En una realización, las composiciones farmacéuticas de esta invención son apropiadas para una administración por inhalación. Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administrar por inhalación típicamente tomarán la forma de un aerosol o un polvo. Dichas composiciones se administran generalmente usando dispositivos de administración bien conocidos, tales como un nebulizador de inhalación, un inhalador de dosis medidas (MDI), un inhalador de polvo seco (DPI) o un dispositivo de administración similar.

En una realización específica de esta invención, la composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico se administra por inhalación usando un nebulizador de inhalación. Dichos dispositivos nebulizadores producen típicamente una corriente de aire a alta velocidad que hace que la composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico se vaporice como una niebla que se lleva dentro del tracto respiratorio del paciente. Por lo tanto, cuando se fórmula para utilizar en un inhalador nebulizador, el agente terapéutico se disuelve típicamente en un vehículo apropiado para formar una solución. Como alternativa, el agente terapéutico se puede micronizar y combinar con un vehículo apropiado para formar una suspensión de partículas micronizadas. Los dispositivos nebulizadores apropiados para administrar agentes terapéuticos por inhalación son bien conocidas por aquellos con una experiencia normal en el arte o dichos

dispositivos se pueden obtener comercialmente. Por ejemplo, los dispositivos o productos nebulizadores que sirven como ejemplo incluyen el Inhalador Respimat Softmist (Boehringer Ingelheim); el Sistema de Administración Pulmonar AERx (Aradigm Corp.); el Nebulizador Reutilizable PARI LC Plus (Pari GmbH); etcétera.

Una composición farmacéutica para utilizar en un inhalador nebulizador que sirve como ejemplo comprende una solución acuosa isotónica que comprende entre aproximadamente 0,05 µg/ml y aproximadamente 10mg/ml de un compuesto de fórmula I. En una forma de realización, una solución con dichas características tiene un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6.

En otra realización específica de esta invención, la composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico se administra por inhalación usando un inhalador de polvo seco. Dichos inhaladores de polvo seco típicamente administran el agente terapéutico como un polvo de flujo libre que se dispersa en la corriente de aire que inspira el paciente. Para conseguir un polvo que fluye libremente, típicamente el agente terapéutico se fórmula con un excipiente apropiado como por ejemplo lactosa, almidón, manitol, dextrosa, ácido poliláctico (PLA), co-glucólido de polilactida (PLGA) o combinaciones de los mismos. Típicamente, el agente terapéutico se microniza y combina con un vehículo apropiado para formar una mezcla apropiada para inhalación. Por lo tanto, en una forma de realización de la invención, el compuesto de fórmula I está en forma micronizada.

Una composición farmacéutica para utilizar en un inhalador de polvo seco que sirve como ejemplo comprende lactosa molida seca y partículas

micronizadas de un compuesto de fórmula I.

Dicha formulación de polvo seco puede prepararse, por ejemplo, combinando la lactosa con el agente terapéutico, y luego mezclando los componentes en seco. Como alternativa, si se lo desea, puede formularse el agente terapéutico sin un excipiente. Luego se carga típicamente la composición farmacéutica en un dispositivo de administración de polvos secos, o en recipientes o cápsulas de inhalación para usar con un dispositivo de administración de polvos secos.

Los dispositivos inhaladores para administración de polvo seco que son apropiados para administrar agentes terapéuticos por inhalación son bien conocidos por aquellos con una experiencia normal en el arte o dichos dispositivos se pueden obtener comercialmente. Por ejemplo, los dispositivos o productos inhaladores para administración de polvo seco que sirven como ejemplo incluyen Aeolizer (Novartis); Airmax (IVAX); ClickHaler (Innovata Biomed); Diskhaler (GlaxoSmithKline); Diskus/Accuhaler (GlaxoSmithKline); Easyhaler (Orion Pharma); Eclipse (Aventis); FlowCaps (Hovione); Handihaler (Boehringer Ingelheim); Pulvinal (Chiesi); Rotahaler (GlaxoSmithKline); SkyeHaler/Certihaler (SkyePharma); Twisthaler (Schering-Plough); Turbuhaler (AstraZeneca); Ultrahaler (Aventis); etcétera.

En aún otra realización específica de esta invención, la composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico se administra por inhalación usando un inhalador de dosis medidas. Dichos inhaladores de dosis medida típicamente descarga una cantidad medida del agente terapéutico usando un gas propelente comprimido. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas administradas usando un inhalador de dosis medidas

típicamente comprenden una solución o suspensión de agente terapéutico en un propelente licuado. Puede emplearse cualquier propelente licuado apropiado, incluyendo clorofluorocarburos, tales como CCl_3F, y fluorohidroalcanos (HFA), tales como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134a) y 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoro-*n*-propano, (HFA 227). Debido a los peligros que representan los clorofluorocarburos sobre la capa de ozono, en general se prefieren las formulaciones que contienen HFA. Los componentes adicionales de las formulaciones de HFA incluyen co-solventes, tales como etanol o pentano, y agentes tensioactivos, tales como trioleato de sorbitan, ácido oleico, lecitina y glicerina.

Una composición farmacéutica representativa para utilizar en un inhalador de dosis medida comprende entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 5% en peso de un compuesto de la fórmula I; entre aproximadamente 0% y aproximadamente 20% en peso de etanol; y entre aproximadamente 0% y aproximadamente 5% en peso de tensioactivo; donde el resto es un propelente de HFA.

Dichas composiciones típicamente se preparan agregando un fluorohidroalcano enfriado o presurizado a un recipiente apropiado que contiene el agente terapéutico, etanol (si está presente) y agente tensioactivo (si está presente). Para preparar una suspensión, el agente terapéutico se microniza y luego se combina con el propelente. Luego se carga la formulación en un recipiente metálico de aerosol, que forma una porción de un dispositivo inhalador de dosis medida.

Los dispositivos inhaladores de dosis medida que son apropiados para administrar agentes terapéuticos por inhalación son bien conocidas por

aquellos con una experiencia normal en el arte o dichos dispositivos se pueden obtener comercialmente. Por ejemplo, los dispositivos o productos inhaladores de dosis medida que sirven como ejemplo incluyen: Sistema Inhalador AeroBid (Forest Pharmaceuticals); Aerosol para Inhalación Atrovent (Boehringer Ingelheim); Flovent (GlaxoSmithKline); Inhalador Maxair (3M); Inhalador Proventil (Schering); Aerosol para Inhalación Serevent (GlaxoSmithKline); etcétera.

En otra realización, las composiciones farmacéuticas de esta invención son adecuadas para administración oral. Las composiciones farmacéuticas apropiadas para administración oral pueden tomar la forma de cápsulas, tabletas, píldoras, pastillas, sachets, grageas, polvos, gránulos; o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso; o como emulsiones líquidas de aceite en agua o agua en aceite; o como elíxires o jarabes; y semejantes; donde cada uno contiene una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como ingrediente activo.

Cuando se desee una administración oral en una forma de dosificación sólida (es decir, como cápsulas, tabletas, píldoras y semejantes), las composiciones farmacéuticas de esta invención comprenderán típicamente un compuesto de la presente invención, como ingrediente activo, y uno o más vehículos aceptables para el uso farmacéutico, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio. Opcionalmente o como alternativa, dichas formas de dosificación sólidas pueden comprender también: (1) rellenos o extensores, tales como almidonas, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4)

agentes desintegradores, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, y/o carbonato de sodio; (5) agentes que demoran la solubilización, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y/o monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y/o arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y/o mezclas de los mismos; (10) agentes colorantes; y (11) agentes amortiguadores.

También puede haber agentes de liberación, agentes humectantes, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes saborizantes y aromas, conservantes y antioxidantes presentes en las composiciones farmacéuticas de esta invención. Los ejemplos de antioxidantes aceptables para el uso farmacéutico incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y semejantes; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y semejantes; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y semejantes. Los agentes de recubrimiento para tabletas, cápsulas, píldoras y semejantes incluyen aquellos usados para recubrimientos entéricos, tales como ftalato de acetato de celulosa (CAP), ftalato de acetato de polivinilo (PVAP), ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, copolímeros del éster de ácido metacrílico, trimelitato de acetato de celulosa (CAT), carboximetiletilcelulosa (CMEC), succinato de acetato de

hidroxipropil metil celulosa (HPMCAS), y semejantes.

Si se lo desea, las composiciones farmacéuticas de la presente invención también pueden formularse para obtener la liberación lenta o controlada del ingrediente activo usando, a modo de ejemplo, hidroxipropil metil celulosa en proporciones variables; u otras matrices de polímeros, liposomas y/o microesferas.

Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden contener opcionalmente agentes opacantes y pueden formularse de modo que liberen el ingrediente activo solamente, o con preferencia, en una determinada porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente de una manera demorada. Los ejemplos de composiciones de embebido que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo también puede estar en una forma micro-encapsulada, si resulta apropiado, con uno o más de los excipientes descriptos previamente.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, a modo de ilustración, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elíxires aceptables para el uso farmacéutico. Dichas formas de dosificación líquidas comprenden típicamente el ingrediente activo y un diluyente inerte, tal como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (especialmente aceite de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, castor y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Las suspensiones, además del ingrediente activo,

pueden contener agentes de suspensión, tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitan, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

Cuando se desea una administración oral, las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden envasar en una forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria" hace referencia a una unidad física discreta adecuada para dosificar a un paciente, es decir, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de agente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, ya sea solo o en combinación con una o más unidades adicionales. Por ejemplo, dichas formas de dosificación unitaria pueden ser cápsulas, comprimidos, píldoras y similares.

Los compuestos de esta invención también pueden administrarse por vía transdérmica, usando sistemas de administración transdérmica y excipientes conocidos. Por ejemplo, puede mezclarse un compuesto de esta invención con potenciadores de la permeabilidad, tales como propilenglicol, monolaurato de polietilenglicol, azacicloalcan-2-onas y semejantes, e incorporarse en un parche o un sistema de administración similar. Pueden usarse excipientes adicionales, incluyendo agentes gelatinizantes, emulsionantes y amortiguadores, en dichas composiciones transdérmicas, si se lo desea.

Además, los compuestos de esta invención se pueden administrar por vía parenteral, es decir, endovenosa, subcutánea o intramuscular. Para administración parenteral, un compuesto de fórmula I típicamente se disuelve en un vehículo aceptable para administración parenteral, como por ejemplo

agua estéril, solución salina, aceite vegetal, etcétera. A modo ilustrativo, una composición endovenosa típicamente comprende una solución acuosa estéril de un compuesto de fórmula I, en el cual la solución tiene un pH dentro del rango entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7.

Si se desea, los compuestos de la presente invención se pueden se pueden administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes. En esta forma de realización, un compuesto de la presente invención ya sea se mezcla físicamente con el otro agente terapéutico para formar una composición que contiene ambos agentes; o bien cada agente está presente en composiciones separadas y distintas que se administran al paciente simultáneamente o en forma consecutiva.

Por ejemplo, se puede combinar un compuesto de fórmula I con un segundo agente terapéutico usando procedimientos y equipo convencionales para formar una composición que comprende un compuesto de fórmula I y un segundo agente terapéutico. Además, los agentes terapéuticos se pueden combinar con un vehículo aceptable para uso farmacéutico para formar una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I, un segundo agente terapéutico y un vehículo aceptable para uso farmacéutico. En esta forma de realización, los componentes de la composición típicamente se mezclan para crear una mezcla física. Luego, la mezcla física se administra en una cantidad efectiva para uso terapéutico usando cualquiera de las rutas descritas aquí.

Como alternativa, los agentes terapéuticos pueden permanecer por separado y como sustancias distintas antes de administrarlos al paciente. En esta forma de realización, los agentes terapéuticos no se mezclan físicamente

entre sí antes de la administración pero se administran simultáneamente o en forma consecutiva como composiciones por separado. Por ejemplo, un compuesto de fórmula I se puede administrar por inhalación simultáneamente o en forma consecutiva con otro agente terapéutico usando un dispositivo de administración por inhalación que emplea compartimientos separados (por ejemplo envases de tipo blister) para cada agente terapéutico. Como alternativa, la combinación se puede administrar usando dispositivos de administración separados, es decir, un dispositivo de administración para cada agente terapéutico. Además, los agentes terapéuticos se pueden suministrar por diferentes rutas de administración, es decir, uno por inhalación y el otro por administración oral.

En combinación con dichos compuestos se puede utilizar cualquier agente terapéutico compatible con los compuestos de la presente invención. En una forma de realización en particular, the segundo agente terapéutico es uno que se puede administrar efectivamente por inhalación. Como ilustración, los tipos de agentes terapéuticos que se pueden utilizar con los compuestos de la presente invención que sirven como ejemplo incluyen, pero no como limitación, agentes antiinflamatorios, como por ejemplo agentes antiinflamatorios esteroides (incluyendo corticoesteroides y glucocorticoides), agentes antiinflamatorios no esteroides (NSAIDs), e inhibidores de PDE_4; broncodilatadores, como por ejemplo inhibidores de PDE_3, moduladores de adenosina 2b y agonistas del receptor β_2 adrenérgico; agentes antiinfecciosos, como por ejemplo antibióticos para Gram-positivas, antibióticos para Gram-negativas, y agentes antivirales; antihistamínicos; inhibidores de proteasa; bloqueantes aferentes, como por ejemplo D_2 agonistas y moduladores de

neuroquinina; y antagonistas del receptor muscarínico (agentes anticolinérgicos). Hay numerosos ejemplos de dichos agentes terapéuticos que son bien conocidos en el arte. Las dosis apropiadas para los otros agentes terapéuticos que se administran en combinación con un compuesto de la invención están típicamente dentro del rango entre aproximadamente 0,05 µg/día y aproximadamente 500mg/día.

En una forma de realización en particular de la presente invención, un compuesto de fórmula I se administra en combinación con un agente antiinflamatorio esteroide. Los ejemplos representativos de agentes antiinflamatorios esteroides que se pueden utilizar en combinación con los compuestos de la presente invención incluyen, pero no como limitación, dipropionato de beclometasona; budesonide; butixocort como propionato; 20*R*-16α,17α-[butilidenobis(oxi)]-6α,9α-difluoro-11β-hidroxi-17β-(metiltio)androsta-4-en-3-ona (RPR-106541); ciclesonide; dexametasona; éster S-fluorometílico del ácido 6α,9α-difluoro-17α-[(2-furanilcarbonil)oxi]-11β-hidroxi-16α-metil-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17β-carbotioico; éster S-fluorometílico del ácido 6α,9α-difluoro-11β-hidroxi-16α-metil-17α-[(4-metil-1,3-tiazol-5-carbonil)oxi]-3-oxoandrosta-1,4-dieno-17β-carbotioico; éster (S)-(2-oxotetrahidrofuran-3S-ílico) del ácido 6α,9α-difluoro-11β-hidroxi-16α-metil-3-oxo-17α-propioniloxiandrosta-1,4-dieno-17β-carbotioico; flunisolide; propionato de fluticasona; metil prednisolona; furoato de mometasona; prednisolona; prednisona; rofleponide; ST-126; triamcinolona acetonida; etcétera, o sales de los mismos aceptables para uso farmacéutico. Dichos agentes antiinflamatorios esteroides se pueden obtener comercialmente o se pueden preparar usando procedimientos y reactivos convencionales. Por ejemplo, la preparación y uso de agentes

antiinflamatorios esteroides se describe en la Patente de los EE.UU. No. 6.750.210 B2, otorgada el 15 de Junio de 2004; Patente de los EE.UU. No. 6.759.398 B2, otorgada el 6 de Julio de 2004; Patente de los EE.UU. No. 6.537.983, otorgada el 25 de Marzo de 2003; la Solicitud de Patente de los EE.UU. Publicación No. US 2002/0019378 A1, publicado el 14 de Febrero de 2002; y las referencias que se citan allí.

Cuando se emplea, el agente antiinflamatorio esteroide se administra típicamente en una cantidad que produce un efecto terapéutico benéfico cuando se administra en conjunto con un compuesto de la invención. Típicamente, el agente antiinflamatorio esteroide se administrará en una cantidad suficiente para obtener entre aproximadamente 0,05 µg y aproximadamente 500 µg por dosis.

Los siguientes ejemplos ilustran composiciones farmacéuticas representativas de la presente invención:

Ejemplo A

Composición de polvo seco

Un compuesto micronizado de la invención (100mg) con lactosa molida (25 g) (por ejemplo, lactosa donde no más de aproximadamente 85% de las partículas tienen una MMD de entre aproximadamente 60 µm y aproximadamente 90 µm y no menos del 15% de las partículas tienen una MMD menor de 15 µm). Luego se carga esta mezcla en blisters individuales de un paquete de tipo blister pelable en una cantidad suficiente como para proveer entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 500 µg del compuesto de la invención por dosis. Los contenidos de los blisters se administran usando un inhalador de polvo seco.

Ejemplo B

Composición de polvo seco

Se mezcla un compuesto micronizado de la invención (1 g) con lactosa molida (200 g) para formar una composición suelta con una proporción en peso de forma de base libre cristalina a lactosa molida de 1:200. La composición mezclada se envasa dentro de un dispositivo para inhalación de polvo seco capaz de suministrar entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 500 µg del compuesto de la invención por dosis.

Ejemplo C

Composición de polvo seco

Se mezclan un compuesto micronizado de la invención (100mg) y un agente antiinflamatorio esteroide micronizado (500mg) con lactosa molida (30 g). Luego se carga esta mezcla dentro de blisters individuales de un paquete de tipo blister pelable en una cantidad suficiente como para proveer entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 500 µg del compuesto de la invención por dosis. Los contenidos de los blisters se administran usando un inhalador de polvo seco.

Ejemplo D

Composición para inhalador de dosis medida

Se dispersa un compuesto micronizado de la invención (10 g) en una solución que se prepara disolviendo lecitina (0,2 g) en agua desmineralizada (200 ml). La suspensión que se obtiene como resultado se seca por aspersión y luego se microniza para formar una composición micronizada que comprende partículas con una medios del diámetro menor de aproximadamente 1,5µm. Luego se carga la composición micronizada dentro de cartuchos para inhalador

de dosis medida que contienen 1,1,1,2-tetrafluoroetano presurizado en una cantidad suficiente como para proveer entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 500 µg del compuesto de la invención por dosis cuando se administra mediante el inhalador de dosis medida.

Ejemplo E

Composición para nebulizador

Se disuelve un compuesto de la invención (25mg) en solución salina isotónica de pH amortiguado al citrato (pH 5) (125 ml). La mezcla se agita y sonica hasta que el compuesto se disuelve. El pH de la solución se controla y ajusta, de ser necesario, a pH 5 agregando lentamente hidróxido de sodio acuoso 1N. La solución se administra usando un dispositivo nebulizador que suministra entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 500 µg del compuesto de la invención por dosis.

Ejemplo F

Cápsulas de gelatina dura

Se mezclan íntimamente un compuesto de la invención (50 g), lactosa secada por aspersión (440 g) y estearato de magnesio (10 g). La composición que se obtiene como resultado se carga en una cápsula de gelatina dura (500mg de composición por cápsula) que se administra en forma oral.

Ejemplo G

Suspensión oral

Los siguientes ingredientes se mezclan íntimamente para formar una suspensión para administración oral:

Ingredientes	Cantidad
Compuesto de la invención	1,0 g

Ácido fumárico	0,5 g
Cloruro de sodio	2,0 g
Metil parabeno	0,15 g
Propil parabeno	0,05 g
Azúcar granulado	25,5 g
Sorbitol (solución al 70%)	12,85 g
VEEGUM® K (silicato de magnesio y aluminio)	1,0 g
Sabor	0,035 ml
Colorante	0,5mg
Agua destilada	c.s.p. 100 ml

La suspensión que se obtiene como resultado contiene 100mg de ingrediente activo por 10 ml de suspensión. La suspensión se administra en forma oral.

Ejemplo H

Composición inyectable

Se mezcla un compuesto de la invención (0,2 g) con solución amortiguadora de pH al acetato de sodio 0,4 M (2,0 ml). El pH de la solución que se obtiene como resultado se ajusta a pH 4 usando ácido clorhídrico acuoso 0,5 N o hidróxido de sodio acuoso 0,5 N, según sea necesario, y luego se agrega suficiente agua para inyección como para dar un volumen total de 20 ml. Luego se filtra la mezcla a través de un filtro estéril (0,22 micrón) para dar una solución estéril apropiada para administrar por inyección.

Utilidad

Los compuestos de la presente invención poseen tanto actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico como actividad antagonista del receptor

muscarínico y por lo tanto, se espera que dichos compuestos sean útiles como agentes terapéuticos para tratar condiciones médicas mediadas por receptores β_2 adrenérgicos o receptores muscarínicos, es decir, condiciones médicas que mejoran por tratamiento con un agonista del receptor β_2 adrenérgico o un antagonista del receptor muscarínico. Aquellos con una experiencia normal en el arte conocen bien dichas condiciones médicas según se puede ver por ejemplo en las descripciones de Eglen et al., *Muscarinic Receptor Subtypes: Pharmacology and Therapeutic Potential*, *DN&P* **10**(8), 462-469 (1997); Emilien et al., *Current Therapeutic Uses and Potential of beta-Adrenoceptor Agonists and Antagonists*, *European J. Clinical Pharm.*, **53**(6), 389-404 (1998); y las referencias que se citan allí. Dichas condiciones médicas incluyen, a modo de ejemplo, trastornos pulmonares o enfermedades asociadas con obstrucción reversible de las vías respiratorias, como por ejemplo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (por ejemplo, bronquitis crónica y sibilante y enfisema), asma, fibrosis pulmonar, etcétera. Otras condiciones incluyen el parto prematuro, la depresión, la deficiencia cardiaca congestiva, las enfermedades de la piel (por ejemplo, enfermedades inflamatorias, alérgicas, psoriásicas y proliferativas, condiciones en las cuales es deseable disminuir la acidez péptica (por ejemplo, úlcera peptídica y gástrica) y enfermedad de desgaste muscular.

Por lo tanto, en una forma de realización, la presente invención se refiere a un método para tratar un trastorno pulmonar, donde dicho método comprende administrar a un paciente que necesita tratamiento una cantidad efectiva para uso terapéutico de un compuesto de fórmula I. Cuando se utilizan para tratar un trastorno pulmonar, los compuestos de la presente invención típicamente se administrarán por inhalación en varias dosis por día, en una

única dosis por día o una única dosis por semana. En general, la dosis para tratar una afección pulmonar variará entre aproximadamente 10 µg/día y aproximadamente 500 µg/día.

En uno de sus aspectos como método, la presente invención se refiere a un método para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma, donde dicho método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva para uso terapéutico de un compuesto de fórmula I. En general, la dosis para tratar COPD o asma variará dentro del rango entre aproximadamente 10 µg/día y aproximadamente 500 µg/día. Aquellos con una experiencia normal en el arte entienden que el término "COPD" incluye una variedad de condiciones respiratorias, que incluyen bronquitis obstructiva crónica y enfisema, según se puede ver por ejemplo en las descripciones de Barnes, *Chronic Obstructive Pulmonary Disease, N. Engl. J. Med.*, 2000: 343:269-78, y las referencias que se citan allí.

Cuando se los administra por inhalación, los compuestos de esta invención típicamente tienen el efecto de producir broncodilatación. Por lo tanto, en otro de sus aspectos como método, la presente invención se refiere a un método para producir broncodilatación en un mamífero, donde dicho método comprende administrar a un mamífero una cantidad que produce broncodilatación de un compuesto de fórmula I. En general, la dosis para producir broncodilatación variará dentro del rango entre aproximadamente 10 µg/día y aproximadamente 500 µg/día.

Cuando se utilizan como agentes terapéuticos, los compuestos de la presente invención se administran opcionalmente en combinación con otro agente o agentes terapéuticos. En particular, mediante la administración de los

compuestos de la presente invención con un agente antiinflamatorio esteroide, se puede conseguir una terapia triple, es decir, actividad agonista del receptor β_2 adrenérgico, actividad antagonista del receptor muscarínico y actividad antiinflamatorio, usando solo dos agentes terapéuticos. Como las composiciones farmacéuticas (y sus combinaciones) que contienen dos agentes terapéuticos son típicamente más fáciles de formular y/o administrar en comparación con las composiciones que contienen tres agentes terapéuticos, dichas composiciones de dos componente proveen una ventaja significativa con respecto a las composiciones que contienen tres agentes terapéuticos. Por lo tanto, en una forma de realización en particular, las composiciones farmacéuticas, combinaciones y métodos de la presente invención además comprenden un agente antiinflamatorio esteroide.

Como los compuestos de la presente invención poseen tanto actividad de agonista β_2 adrenérgico como actividad antagonista del receptor muscarínico, dichos compuestos también son útiles como herramientas de investigación para investigar o estudiar sistemas biológicos o muestras con receptores β_2 adrenérgicos o receptores muscarínicos. Además, dichos compuestos son útiles en ensayos de clasificación para descubrir, por ejemplo, nuevos compuestos tanto con actividad de agonista β_2 adrenérgico como actividad antagonista del receptor muscarínico. Dichos sistemas biológicos o muestras pueden comprender receptores β_2 adrenérgicos y/o receptores muscarínicos. En dichos estudios, que se pueden llevar a cabo ya sea *in vitro* o *in vivo,* se puede emplear cualquier sistema biológico o muestra apropiados con receptores β_2 adrenérgicos y/o muscarínicos. Los sistemas o las muestras biológicas representativas apropiadas para dichos estudios incluyen, sin

limitaciones, células, extractos celulares, membranas plasmáticas, muestras de tejido, mamíferos (tales como ratones, ratas, cerdos de guinea, conejos, perros, cerdos, etcétera) y semejantes.

Cuando se utiliza como herramienta para la investigación, un sistema biológico o muestra que comprende un receptor β_2 adrenérgico y/o un receptor muscarínico que típicamente se pone en contacto con una cantidad de un compuesto de la presente invención que causa un efecto agonista sobre un receptor β_2 adrenérgico o una cantidad de un compuesto de la presente invención que causa un efecto antagonista sobre un receptor muscarínico. Luego se determinan o miden los efectos sobre el sistema biológico o muestra que causa el compuesto usando procedimientos convencionales y equipo, como por ejemplo midiendo la unión en un ensayo de unión a un radioligando o cambios mediados por un ligando en un ensayo funcional o determinando la magnitud de la broncoprotección provista por el compuesto en un ensayo de broncoprotección en un mamífero. Los cambios mediados por un ligando en un ensayo funcional que sirven como ejemplo incluyen cambios mediados por un ligando en el adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular; cambios mediados por un ligando en la actividad de la enzima adenilato ciclasa (que sintetiza el AMPc); cambios mediados por un ligando en la incorporación de guanosina 5'-O-(tio)trifosfato ([^{35}S]GTP S) en membranas aisladas a través del intercambio catalizado por receptores del [^{35}S]GTP S por GDP; cambios mediados por un ligando en los iones calcio intracelulares libres (medidas, por ejemplo, con un lector de imágenes ligadas a la fluorescencia en placas o FLIPR® de Molecular Devices, Inc.); etcétera. Se espera que los compuestos de la presente invención causen un efecto agonista o causen la activación de

un receptor β_2 adrenérgico y antagonicen o disminuyan la activación de receptores muscarínicos en los ensayos funcionales de la lista que se da aquí o en ensayos de una naturaleza similar. Los compuestos de la presente invención se utilizarán típicamente en dichos estudios en una concentración que varía dentro del rango entre aproximadamente 0,1 nanomolar y aproximadamente 100 nanomolar.

Además, los compuestos de la presente invención se pueden utilizar como herramientas de investigación para evaluar otros compuestos químicos. En este aspecto de la invención, un compuesto de fórmula I se utiliza como estándar en un ensayo para permitir la comparación de los resultados que se obtienen con un compuesto de prueba y el compuesto de fórmula I. Por ejemplo, los datos de unión del receptor β_2 adrenérgico y/o receptor muscarínico (según se determinan, por ejemplo, mediante ensayos *in vitro* de desplazamiento de radioligando) para un compuesto de prueba o un grupo del compuestos de prueba se comparan con los datos de unión del receptor β_2 adrenérgico y/o receptor muscarínico para un compuesto de fórmula I para identificar aquellos compuestos de prueba que tienen un efecto ligante deseable, es decir compuestos de prueba con un efecto ligante aproximadamente igual o superior al de un compuesto de fórmula I, si es que tienen alguno. Como alternativa, por ejemplo, se pueden determinar los efectos broncoprotectores para los compuestos de prueba y un compuesto de fórmula I en un ensayo de broncoprotección en un mamífero y estos datos se pueden comparar para identificar compuestos de prueba que proporcionen efectos broncoprotectores aproximadamente iguales o superiores. Dicho aspecto de la invención incluye, como formas de realización separadas, tanto (i) la

generación de datos de comparación (usando los ensayos apropiados) y (ii) el análisis de los datos de prueba para identificar compuestos de prueba de interés.

Las propiedades y la utilidad de los compuestos de la presente invención se pueden demostrar usando diversos ensayos *in vitro* e *in vivo* bien conocidos por aquellos con una experiencia normal en el arte. Por ejemplo, en los siguientes Ejemplos se describen con mayor detalle ensayos que sirven como ejemplo.

EJEMPLOS

Las siguientes Preparaciones y Ejemplos se proveen para ilustrar realizaciones y aspectos específicos de esta invención. Sin embargo, la ilustración de formas de realización y aspectos específicos, no se da para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera a no ser que se indique específicamente.

Todos los reactivos, materias primas y solventes que se utilizan en los siguientes ejemplos se adquirieron de proveedores comerciales (como por ejemplo Aldrich, Fluka, Sigma, etcétera) y, a no ser que se indique otra cosa, se utilizaron sin más purificación.

En los siguientes ejemplos, el análisis por HPLC se llevó a cabo típicamente usando un instrumento Agilent (Palo Alto, CA) Serie 1100 con columnas Zorbax Bonus RP 2,1 x 50 mm, provisto por Agilent, (una columna C14), con un tamaño de partícula de 3,5 micrones. La detección se realizó por absorbancia UV a 214 nm. La fase móvil "A" consistía en acetonitrilo al 2 %, 97,9 % de agua, y 0,1% de ácido trifluoroacético (v/v/v); y la fase móvil "B" consistía en 89,9 % de acetonitrilo, 10 % de agua, y 0,1 % de ácido

trifluoroacético (v/v/v). Los datos de HPLC (10-70) se obtuvieron con una velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto de gradiente de 10% a 70% de fase móvil B durante un período de 6 minutos. Los datos de HPLC (5-35) se obtuvieron con una velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto de gradiente de 5% a 35% de fase móvil B durante un período de 5 minutos; y Los datos de HPLC (10-90) se obtuvieron con una velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto de gradiente de 10% a 90% de fase móvil B durante un período de 5 minutos.

Los datos de cromatografía líquida con espectrometría de masas (LCMS) se obtuvieron típicamente con un instrumento Applied Biosystems (Foster City, CA) Modelo API-150EX. Los datos de LCMS 10-90 se obtuvieron con un gradiente de 10% a 90% de fase móvil B durante un período de 5 minutos.

Las purificaciones a pequeña escala típicamente se llevaron a cabo usando un sistema API 150EX Prep Workstation de Applied Biosystems. La fase móvil "A" consistía en agua que contenía 0,05% de ácido trifluoroacético (v/v); y la fase móvil "B" consistía en acetonitrilo que contenía 0,05% de ácido trifluoroacético (v/v). Para pequeñas muestras (tamaño de muestra recuperada de entre aproximadamente 3 y 50mg), típicamente se utilizaron las siguientes condiciones: velocidad de flujo 20 ml/min; gradientes de 15 min y una columna 20 mm x 50 mm Prism RP con partículas de 5 micrones (Termo Hypersil-Keystone, Bellefonte, PA, EEUU). Para muestras más grandes (es decir, muestra sin tratar mayor de aproximadamente 100mg), típicamente se utilizaron las siguientes condiciones: velocidad de flujo 60 ml/min; gradientes de 30 min y una columna 41,4 mm x 250 mm Microsorb BDS con partículas de 10 micrones (Varian, Palo Alto, CA, EEUU).

Ejemplo 1

Éster piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Se calentaron juntos bifenil-2-isocianato (97,5 g, 521 mmol) y 4-hidroxi-1-bencilpiperidina (105 g, 549 mmol) (ambos se pueden obtener comercialmente de Aldrich, Milwaukee, WI) a 70°C durante 12 h, durante cuyo tiempo se monitoreó la formación de éster 1-bencilpiperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico por LCMS. Luego se enfrió la mezcla de reacción a 50°C y se agregó etanol (1 L), y luego se agregó ácido clorhídrico 6M (191 ml) lentamente. Luego se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agregó formiato de amonio (98,5 g, 1,56 mol) y se burbujeó gas nitrógeno a través de la solución vigorosamente durante 20 min. Luego se agregó paladio (10 % peso en peso (seco) sobre carbón activado) (20 g). La mezcla de reacción se calentó hasta 40°C durante 12 h y luego se filtró a través de un lecho de Celite. Luego se eliminó el solvente bajo presión reducida y se agregó ácido clorhídrico 1M (40 ml) al residuo sin tratar. Luego se agregó hidróxido de sodio (10N) para ajustar el pH a 12. La capa acuosa se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 ml) y se secó (sulfato de magnesio), y luego se eliminó el solvente bajo presión reducida para dar el éster piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (155 g, 100%). HPLC (10-70) R_t = 2,52; MS *m/z*: $[M + H^+]$ calculado para $C_{18}H_{20}N_2O_2$ 297,15; encontrado 297,3.

Ejemplo 2

Ácido 3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propiónico

A una solución de éster piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (50 g, 67,6 mmol) en diclorometano (500 ml) se le agregó ácido acrílico (15,05 ml, 100 mmol). La mezcla resultante se calentó hasta 50°C bajo reflujo durante

18 horas y luego se eliminó el solvente. Se agregó metanol (600 ml) y esta mezcla se calentó hasta 75°C durante 2 horas y luego se enfrió a la temperatura ambiente para formar una suspensión espesa. El sólido se recolectó por filtración, se lavó con metanol (50 ml) y se secó al aire para dar ácido 3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propiónico (61g, 96% de pureza) como un polvo blanco.

Ejemplo 3

Sal con ácido acético de la *N*-{5-[(*R*)-2-Amino-1-(*ter*-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida

Paso A - *N*-{5-[(*R*)-2-Bencilamino-1-(*ter*-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benciloxifenil}formamida

A un matraz de fondo redondo con tres bocas de 500 ml se agregó *N*-{2-benciloxi-5-[(*R*)-2-bromo-1-(*ter*-butildimetilsilaniloxi)etil]fenil}formamida (100 g, 215 mmol) y *N*-metil-2-pirrolidona (300 ml). Se agregó bencilamina (69,4 ml, 648 mol) y la mezcla de reacción se desgaseó con nitrógeno. Luego se calentó la mezcla de reacción hasta 90°C y se agitó durante aproximadamente 8 horas. Luego se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se agregaron agua (1,5 L) y acetato de etilo (1,5 L). Se separaron las capas y la fase orgánica se lavó con agua (500 ml), una mezcla 1:1 de agua y salmuera saturada (500 ml en total), y luego nuevamente con agua (500 ml). Luego se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y concentró bajo presión reducida para dar *N*-{5-[(*R*)-2-bencilamino-1-(*ter*-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benciloxifenil}formamida en bruto (100 g, 90% de rendimiento, 75-80% de pureza) como un aceite espeso anaranjado-marrón.

Paso B - Sal con ácido acético de la *N*-{5-[(*R*)-2-Amino-1-(*ter*-

butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida

Se disolvió *N*-{5-[(*R*)-2-bencilamino-1-(*ter*-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-benciloxifenil}formamida en bruto (100 g, 194 mmol) en metanol (1 L) y ácido acético (25 ml, 291 mmol). La mezcla resultante se purgó con nitrógeno seco y luego se agregó hidróxido de paladio sobre carbono (20 g, 20 % peso en peso, aproximadamente 50% de agua). Se burbujeó hidrógeno a través de la mezcla de reacción agitando a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 horas. Luego se purgó la mezcla con nitrógeno seco y la mezcla se filtró a través de Celite. El filtrado se concentró en un evaporador rotatorio y se agregó acetato de etilo (600 ml) al residuo. Esta mezcla se agitó durante aproximadamente 2 horas, después de cuyo tiempo se desarrolló una suspensión amarilla espesa. La suspensión se filtró y el precipitado se secó al aire para dar la sal con ácido acético de la *N*-{5-[(*R*)-2-Amino-1-(*ter*-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida (48 g, 98% de pureza) como un sólido amarillo-blancuzco. LCMS (10-70) R_t = 3,62; [M + H^+] encontrado 311,3.

Ejemplo 4

Éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Paso A - 2,5-dimetil-4-nitrobenzoato de metilo

A una solución agitada de ácido 2,5-dimetil-4-nitrobenzoico (480mg, 2,4 mmol) en metanol seco (8,2 ml) a 0°C bajo nitrógeno seco se le agregó cloruro de tionilo (0,538 ml, 7,38 mmol). La mezcla resultante se dejó entibiar hasta la temperatura ambiente y se agitó durante aproximadamente 7 horas. Se agregó

más cloruro de tionilo (0,300 ml) y se siguió agitando a temperatura ambiente durante toda la noche. El solvente se eliminó bajo presión reducida y el residuo se disolvió en acetato de etilo. Esta solución se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para dar 2,5-dimetil-4-nitrobenzoato de metilo (578 mg) como un sólido amarillo pálido. HPLC (10-70) R_t = 4,61; ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,57 (s, 3H), 2,61 (s, 3H), 3,94 (s, 3H), 7,82 (s, 1H), 7,87 (s, 1H).

Paso B - 4-amino-2,5-dimetilbenzoato de metilo

A una solución agitada de 2,5-dimetil-4-nitrobenzoato de metilo (523 mg, 2,5 mmol) en una mezcla 9:1 de metanol y agua (25 ml en total) a 0°C se le agregó cloruro de amonio (401 mg, 7,5 mmol). Se agregó cinc (1,63 g, 25 mmol) en porciones y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. La mezcla de reacción luego se filtró a través de Celite y el lecho de Celite se lavó con metanol. El filtrado se concentró bajo presión reducida y el residuo que se obtuvo como resultado se disolvió en acetato de etilo. Esta solución se lavó con bicarbonato de sodio acuoso saturado, se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró bajo presión reducida para dar 4-amino-2,5-dimetilbenzoato de metilo (450mg) como un aceite amarillo. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,14 (s, 3H), 2,53 (s, 3H), 3,83 (s, 3H), 3,85 (br s, 2H), 6,48 (s, 1H), 7,72 (s, 1H).

Paso C - 4-{3-[4-(Bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metilo

A una solución agitada de ácido 3-[4-(bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propiónico (670mg, 1,82 mmol) y 4-amino-2,5-dimetilbenzoato de metilo (390mg, 2,18 mmol) en diclorometano (3,6 ml) y diisopropiletilamina (0,413 ml)

se le agregó hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) (829 mg, 2,18 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Luego se lavó la mezcla con bicarbonato de sodio acuoso saturado, se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con diclorometano que contenía entre 3% y 5% de metanol para dar 4-{3-[4-(Bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metilo (568 mg, 59% de rendimiento). LCMS (10-70) R_t = 4,55; [M + H^+] encontrado 530,4.

Paso D - Éster 1-[2-(4-Hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A una solución agitada de hidruro de aluminio y litio 1M en THF (1,52 ml, 1,52 mmol) a 0°C se le agregó 4-{3-[4-(Bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoato de metilo (400mg, 0,76 mmol). La mezcla resultante se agitó a 0°C durante 30 minutos y luego se agregó una mezcla 1:1 de hidróxido de sodio acuoso 1M (5 ml) y agua (5 ml) y se siguió agitando durante 2 horas. Se agregó diclorometano y se separó la fase orgánica, se secó sobre sulfato de sodio y el solvente se eliminó bajo presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice eluyendo con diclorometano que contenía 5% de metanol para dar el éster 1-[2-(4-Hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico. LCMS (10-70) R_t = 3,94; [M + H^+] encontrado 502,5.

Paso E - éster 1-[2-(4-Formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A una solución de éster 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-

dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (151 mg, 0,3 mmol) en diclorometano (3 ml) a 0°C se le agregó dimetil sulfóxido (128 µL, 1,8 mmol) y diisopropiletilamina (157 µL, 0,9 mmol). Después de 15 minutos, se agregó complejo de trióxido de azufre y piridina (143 mg, 0,9 mmol) y se continuó agitando a 0°C durante 1 hora. Se agregó agua para detener la reacción y se separaron las capas. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y el solvente se eliminó bajo presión reducida para dar el éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (150mg, 100% de rendimiento), que se utilizó sin más purificación. [M + H^+] encontrado 500,4.

Paso F - éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(ter-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Se agitó una solución de éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (150mg, 0,30 mmol) y *N*-{5-[(*R*)-2-amino-1-(*ter*-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida (112 mg, 0,36 mmol) en una mezcla 1:1 de diclorometano y metanol (3,0 ml en total) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se agregó triacetoxiborohidruro de sodio (191 mg, 0,9 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se agregó ácido acético para detener la reacción y la mezcla se concentró bajo presión reducida para dar el éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(ter-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico, que se utilizó sin más purificación. LCMS (10-70) R_t = 4,55; [M + H^+] encontrado 794,6.

Paso G - éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A una suspensión de éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(ter-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (238 mg, 0,30 mmol) en diclorometano (3,0 ml) se le agregó trifluorhidrato de trietilamina (147 µL, 0,90 mmol). Esta mezcla se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego la mezcla se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó por prep-RP-HPLC (gradiente: 2 a 50% de acetonitrilo en agua con 0,05% de TFA). Se recogieron las fracciones apropiadas y se combinaron y liofilizaron para dar el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico como la sal ditrifluoroacetato (50mg, 97% de pureza). LPLC (2-90) R_t = 2,76; $[M + H^+]$ encontrado 680,8.

Ejemplo 5

Éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Paso A - Dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina

A un matraz de fondo redondo de 2 litros equipado con un agitador superior, control de temperatura y un embudo para adiciones se le agregó 4-yodo-2,5-dimetilanilina (100,0 g, 0,405 mol) (de Spectra Group Limited, Inc., Millbury, OH). Se agregaron etanol (1 L) y carbonato de potasio sólido (160 g, 1,159 mol) y luego se agregó bromuro de bencilo puro (140 ml, 1,179 mol) en

una porción. La mezcla resultante se agitó a 30°C durante aproximadamente 18 horas, después de cuyo tiempo la HPLC mostró una conversión mayor del 98%. Luego se enfrió la mezcla hasta la temperatura ambiente y se agregaron hexanos (1 L). Esta mezcla se agitó durante 15 minutos y luego se filtró a través de un filtro de papel para eliminar sólidos y la torta del filtro se lavó con hexanos (200 ml). Se redujo el volumen del filtrado usando un rotoevaporador hasta aproximadamente 500 ml y se agregó ácido clorhídrico concentrado (30 ml). Luego se eliminó el solvente restante usando un rotoevaporador. Al residuo que se obtuvo como resultado se le agregaron hexanos (500 ml) y esta mezcla se agitó durante aproximadamente 30 minutos tras cuyo tiempo se formó una suspensión que fluía libremente. La suspensión se filtró y la torta del filtro se lavó con hexanos (200 ml) y se secó para dar clorhidrato de dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina (115 g, 62% de rendimiento, 97,5% de pureza) como un sólido de color verdoso.

El clorhidrato de dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina se transfirió a un matraz de 3 L y se agregaron tolueno (1 L) e hidróxido de sodio acuoso 1 M (1 L). La mezcla resultante se agitó durante 1 hora y luego se separaron las capas. La fase orgánica se lavó con salmuera diluida (500 ml) y el solvente se eliminó por rotoevaporación para dar dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina (80 g) como un aceite espeso semisólido. (Como alternativa, en este paso se puede utilizar diclorometano en vez de tolueno). ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ 2,05 (s, 3H), 2,19 (s, 3H), 3,90 (s, 4H), 6,91 (s, 1H), 7,05-7,20 (m, 10H), 7,42 (s, 1H); MS [M + H$^+$] encontrado 428.

Paso B - clorhidrato de 4-dibencilamino-2,5-dimetilbenzaldehído

A un matraz de fondo redondo de 1 litro de 3 bocas equipado con un

agitador superior, control de temperatura y un embudo para adiciones se le agregó dibencil-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)amina (15 g, 35 mmol). Se agregó tolueno (300 ml) y la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 15 minutos. El matraz de reacción se purgó con nitrógeno seco y se enfrió hasta aproximadamente -20°C y se agregó gota a gota n-butil-litio 1,6 M en hexanos (33 ml, 53 mmol) mediante el embudo para adiciones. Durante la adición, la temperatura interna de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de los -10°C. Cuando se completó la adición, la mezcla resultante se agitó a aproximadamente -15°C durante 15 minutos. Luego se agregó *N,N*-Dimetilformamida (10 ml, 129 mmol) gota a gota mientras se mantenía la temperatura interna de la mezcla de reacción por debajo de 0°C. Luego se agitó la mezcla resultante a entre -20°C y 0°C durante aproximadamente 1 hora. Luego se agregó ácido clorhídrico acuoso 1 M (200 ml) durante un período de 5 minutos y la mezcla resultante se agitó durante 15 minutos. Luego se separaron las capas y la fase orgánica se lavó con salmuera diluida (100 ml). Luego se secó la fase orgánica sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y el solvente se eliminó bajo presión reducida para dar clorhidrato de 4-dibencilamino-2,5-dimetilbenzaldehído (11,5 g, 90% de rendimiento, 95% de pureza) como un aceite espeso que solidificó al quedar en reposo. El producto contenía entre aproximadamente 3 y 5 % del subproducto des-yodado. ^{1}H RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 2,42 (s, 3H), 2,50 (s, 3H), 4,25 (s, 4H), 6,82 (s, 1H), 7,10-7,30 (10H, m), 7,62 (1H, s), 10,15 (1H, s); MS [M + H^+] encontrado 330,3.

Paso C - 4-[1,3]Dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilamina

A un matraz de fondo redondo de 500 ml se le agregó clorhidrato de 4-dibencilamino-2,5-dimetilbenzaldehído (11,5 g, 31,4 mmol) y tolueno (150 ml) y

la mezcla resultante se agitó hasta que la sal se disolvió completamente. Luego se purgó el matraz de reacción con nitrógeno seco durante 5 minutos. Se agregaron etilenglicol (5,25 ml, 94,2 mmol) y ácido p-toluensulfónico (760mg, 6,2 mmol) y la mezcla resultante se calentó hasta 60°C entre 80°C durante aproximadamente 20 horas. Luego se eliminó el solvente lentamente (durante aproximadamente 40 minutos) a 40°C en un evaporador rotatorio. Se agregó tolueno (100 ml) al residuo y se volvió a eliminar lentamente el solvente a 40°C en un evaporador rotatorio. Este proceso se repitió usando otra alícuota de tolueno (100 ml) y la mezcla se evaporó a sequedad. Se agregaron acetato de etilo (150 ml) y bicarbonato de sodio acuoso saturado (100 ml) al residuo y se separaron las capas. La fase orgánica se lavó con salmuera (50 ml) y luego se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para dar dibencil-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)amina en bruto (11,4 g).

La dibencil-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)amina en bruto se disolvió en una mezcla 2:1 de etanol y agua (150 ml en total) y la mezcla resultante se purgó con nitrógeno seco durante 5 minutos. Se agregaron paladio sobre carbono (2,3 g, 10 % peso en peso que contenía aproximadamente 50% de agua) y bicarbonato de sodio sólido (1,0 g) y la mezcla resultante se hidrogenó a aproximadamente 1 atm de hidrógeno a entre 25°C y 30°C durante aproximadamente 8 horas. Luego se filtró la mezcla a través de Celite y el filtrado se concentró en un evaporador rotatorio para dar 4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilamina en bruto (5,6 g, 92% de rendimiento) como un aceite espeso. ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ 2,05 (s, 3H), 2,22 (s, 3H), 3,7-3,9 (m, 4H), 3,95 (s, 4H), 5,59 (s, 1H), 6,72 (s, 1H), 7,0-7,25 (m, 11H).

Paso D - *N*-(4-[1,3]Dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida

A un matraz de 500 ml de fondo redondo se le agregó 4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilamina en bruto (5,6 g, 29 mmol), diclorometano (100 ml) y diisopropiletilamina (7,6 ml, 43,5 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que se disolvieron los ingredientes y luego la mezcla se enfrió a 0°C. Luego se agregó cloruro de acriloílo (2,35 ml, 29 mmol) gota a gota durante un período de 5 minutos. La mezcla de reacción se agitó a entre 0°C y 5°C durante 1 hora y luego se agregó agua (50 ml) y se siguió agitando durante aproximadamente 30 minutos tras cuyo tiempo se formó un sólido fino. La mezcla se filtró para recoger los sólidos. Luego se separaron las capas del filtrado y la fase orgánica se concentró bajo presión reducida a sequedad. Se agregó diclorometano (50 ml) al residuo y esta mezcla se agitó hasta que se desarrolló una suspensión que fluía libremente. La suspensión se filtró (usando el mismo embudo que se utilizó para recoger los sólidos finos que se acaban de mencionar) y la torta del filtro se lavó con diclorometano (10 ml) y se secó para dar *N*-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (3,1 g, 97% de pureza) como un sólido blanco a blancuzco.

Luego se evaporó a sequedad el filtrado anterior y se agregó metanol (10 ml) al residuo. Esta mezcla se agitó durante 15 minutos y luego el precipitado se recolectó por filtración, se lavó con metanol (5 ml) y se secó para dar una segunda cosecha de *N*-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (0,8 g, 95% de pureza). ^{1}H RMN (300 MHz, CD_3OD) δ 2,10 (s, 3H), 2,23 (s, 3H), 3,85-4,10 (m, 4H), 5,60-6,40 (m, 3H), 5,59 (s, 1H), 7,18 (s, 1H), 7,23 (s, 1H).

Paso E - éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-

4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico como clorhidrato

A un matraz de 50 ml de fondo redondo se le agregó éster piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (1,2 g, 4,04 mmol) y *N*-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (1,0 g, 4,04 mmol). Se agregaron etanol (10 ml) y diclorometano (10 ml) para formar una suspensión. La mezcla de reacción se calentó hasta entre 45°C y 50°C durante aproximadamente 18 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. Se agregó ácido clorhídrico 1M acuoso (10 ml) y la mezcla resultante se agitó vigorosamente durante aproximadamente 3 horas. Se agregó diclorometano (10 ml) y la mezcla resultante se agitó durante aproximadamente 5 minutos. Luego se separaron las capas y la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio para dar el éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico como clorhidrato en bruto (1,9 g). ^{1}H RMN (300 MHz, DMSO-d_6) δ 1,2-1,4 (m, 2H), 1,58-1,75 (m, 2H), 2,0-2,17 (m, 2H), 2,19 (s, 3H), 2,38 (s, 3H), 2,41-2,50 (m, 4H), 2,5-2,75 (m, 2H), 4,31-4,42 (m, 1H), 7,10-7,35 (m, 9H), 7,55 (s, 1H), 7,75 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 9,82 (s, 1H), 9,98 (s, 1H); MS [M + H$^+$] encontrado 500,2.

Paso F - éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(*ter*-Butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A un matraz de 2 L de fondo redondo con tres bocas se agregó éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico como clorhidrato (38 g, 70 mmol) y sal con ácido acético de la *N*-{5-[(*R*)-2-Amino-1-(*ter*-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida (33,6 g, 91 mmol). Se agregaron diclorometano (500 ml) y metanol (500 ml) y la mezcla

resultante se agitó a temperatura ambiente bajo nitrógeno seco durante aproximadamente 3 horas. Luego se enfrió la mezcla de reacción hasta entre 0°C a 5°C y se agregó triacetoxiborohidruro de sodio sólido (44,5 g, 381 mmol) en porciones durante un período de 10 minutos. La mezcla de reacción se calentó lentamente desde 0°C hasta la temperatura ambiente durante un período de aproximadamente 2 horas y luego se enfrió a 0°C. Se agregaron bicarbonato de sodio acuoso saturado (500 ml) y diclorometano (500 ml). Esta mezcla se agitó intensamente y luego se separaron las capas. La fase orgánica se lavó con salmuera (500 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró bajo presión reducida para dar el éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(ter-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico en bruto (55 g, 86% de pureza) como un sólido amarillo.

El producto sin tratar (30 g) se disolvió en diclorometano que contenía 2% de metanol (150 ml en total) y se cargó en la parte superior de una columna de gel de sílice (300 g) previamente empacada y equilibrada con diclorometano que contenía 2% de metanol y 0,5% de hidróxido de amonio. El producto se eluyó de la columna usando diclorometano que contenía 2% de metanol y 0,5% de hidróxido de amonio (1 L); diclorometano que contenía 4% de metanol y 0,5% de hidróxido de amonio (1 L) y diclorometano que contenía 5% de metanol y 0,5% de hidróxido de amonio (aproximadamente 3 L). Se recogieron fracciones (200 ml) y se combinaron aquellas fracciones con una pureza mayor que 90% y se concentraron bajo presión reducida para dar el éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(ter-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del

ácido bifenil-2-ilcarbámico (21,6 g, 96,5% de pureza) como un sólido amarillento. MS [M + H^+] encontrado 794,6.

Paso G - Sal fluorhidrato del éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A un matraz de 1 L de fondo redondo se le agregó éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(ter-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (21,5 g, 27,1 mmol) y diclorometano (200 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que se disolvieron los ingredientes y luego se agregó trifluorhidrato de trietilamina (8,85 ml, 54,2 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 25°C durante aproximadamente 48 horas. El solvente se eliminó en un evaporador rotatorio para dar una pasta espesa. Se agregaron diclorometano (100 ml) y acetato de etilo (200 ml) a la pasta y la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos. La suspensión que se obtuvo como resultado se filtró lentamente bajo nitrógeno seco y la torta del filtro se lavó con una mezcla 1:2 de diclorometano y acetato de etilo (100 ml en total), se secó bajo nitrógeno durante 2 horas y luego se secó al vacío durante toda la noche para dar el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico como una sal fluorhidrato (25 g, 96,9% de pureza) que era un sólido duro similar a una arcilla. MS [M + H^+] encontrado 680,8.

Paso H - éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Se purificó la sal fluorhidrato del éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (25 g) on a de 6 pulgadas columna de fase inversa (fase sólida Microsorb) en tres lotes iguales usando una mezcla entre 10 % y 50 % de acetonitrilo en agua que contenía 1% de ácido trifluoroacético como fase móvil. Se combinaron las fracciones con más del 99% de pureza y luego se diluyeron con un volumen de agua. La mezcla resultante se enfrió a 0°C y se agregó bicarbonato de sodio sólido hasta que el pH de la mezcla fue de entre aproximadamente 7,5 y 8,0. Dentro de un tiempo de aproximadamente 5 minutos, se desarrolló una suspensión blanca. La suspensión se agitó durante 30 minutos y luego se filtró. La torta del filtro se lavó con agua (500 ml), se secó al aire durante aproximadamente 4 horas y luego se secó al vacío durante toda la noche para dar el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (12 g, 99+% de pureza), como una base libre semi-cristalina.

Ejemplo 6

Éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Paso A - éster 1-[2-(4-[1,3]Dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A un matraz de 500 ml de fondo redondo se le agregaron éster piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (17,0 g, 58 mmol) y *N*-(4-[1,3]dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenil)acrilamida (13,1 g, 52,9 mmol). Se agregaron etanol (150 ml) y

diclorometano (150 ml) para formar una suspensión. La mezcla de reacción se calentó hasta entre 50°C y 55°C durante aproximadamente 24 horas y luego se enfrió a temperatura ambiente. La mayor parte del solvente se eliminó en un evaporador rotatorio, obteniendo como resultado una suspensión espesa. Se agregó etanol (grado reactivo) para formar un volumen total de aproximadamente 200 ml y la mezcla resultante se calentó hasta 80°C y luego se enfrió lentamente a temperatura ambiente. La suspensión blanca espesa que se obtuvo como resultado se filtró, se lavó con etanol (20 ml) y se secó al vacío para dar el éster 1-[2-(4-[1,3]Dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (23,8 g, aproximadamente 98% de pureza) como un blanco sólido.

Paso B - Éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A un matraz de 500 ml de fondo redondo se le agregó éster 1-[2-(4-[1,3]Dioxolan-2-il-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (15 g, 27,6 mmol) y acetonitrilo (150 ml) para formar una suspensión. Se agregó ácido clorhídrico acuoso 2 M (75 ml) y la mezcla resultante se agitó a 30°C durante 1 hora. Luego se enfrió la mezcla hasta la temperatura ambiente y se agregó acetato de etilo (150 ml). Se agregó hidróxido de sodio acuoso 2 M (75 ml), se controló el pH y se agregó más hidróxido de sodio 2 M hasta que el pH de la solución estuvo dentro del rango entre 9 y 10. Se separaron las capas y la fase orgánica se lavó con salmuera diluida (75 ml; salmuera/agua 1:1), se secó sobre sulfato de sodio anhidro y el solvente se eliminó en un evaporador rotatorio para dar el éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

(12,5 g, aproximadamente 98% de pureza). Si se desea, se puede aumentar la pureza de este intermediario formando una suspensión con etanol (3 volúmenes de etanol), calentando la suspensión a 80°C, y luego enfriando lentamente a temperatura ambiente y aislando por filtración.

Paso C - éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(*ter*-Butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilimino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A un matraz de 250 ml de fondo redondo se le agregó éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (7,1 g, 14,2 mmol) y sal con ácido acético de la *N*-{5-[(*R*)-2-Amino-1-(*ter*-butildimetilsilaniloxi)etil]-2-hidroxifenil}formamida (5,8 g, 15,6 mmol). Se agregó metanol (100 ml) para formar una suspensión y esta mezcla se agitó a entre 45°C y 50°C bajo nitrógeno durante 1 hora. Luego se enfrió la mezcla hasta la temperatura ambiente y se le agregó tolueno (50 ml) y el solvente se eliminó en un evaporador rotatorio a una temperatura dentro del rango entre 35°C y 45°C. Se agregó tolueno (50 ml) al residuo y se eliminó el solvente para dar el éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(*ter*-Butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilimino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (12 g) como un sólido amarillo-anaranjado.

Paso D - éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(*ter*-Butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A un matraz para hidrogenación se le agregó éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(*ter*-Butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilimino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (4,6 g) y

2-metiltetrahidrofurano (50 ml). La mezcla resultante se agitó hasta que se disolvió el sólido (aproximadamente 5 min) y luego se purgó la mezcla con nitrógeno. Se agregó platino sobre carbono (920mg, 5 % peso en peso, sobre un soporte de carbón activado) y la mezcla se hidrogenó a 50 psi (Agitador Parr) durante 6 horas. Luego se filtró la mezcla a través de Celite y se lavó el Celite con 2-metiltetrahidrofurano (10 ml). Al filtrado se le agregó un gel de sílice modificado con tiopropilo (20% en peso de solución, Silicycle) y esta mezcla se agitó a entre 25°C y 30°C durante 3 horas. Luego se filtró la mezcla a través de Celite y se concentró para eliminar el solvente. El residuo se disolvió en metanol (5 ml por gramo de residuo) y luego la solución que se obtuvo como resultado se agregó lentamente a una mezcla 1:1 agitada vigorosamente de bicarbonato de sodio acuoso saturado y agua (40 ml por gramo de residuo). La suspensión blancuzca que se obtuvo como resultado se agitó durante 20 minutos y luego se filtró. La torta del filtro se lavó con agua (20 volúmenes), se secó al aire durante 3 horas y luego se secó al vacío a temperatura ambiente durante toda la noche para dar el éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(ter-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (recuperación del 80%, aproximadamente 96% de pureza).

Paso E - Éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico como sal L-tartrato

A un matraz de 200 ml de fondo redondo se le agregó éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(ter-butildimetilsilaniloxi)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)etilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (3,8

g, 4,8 mmol) y 2-metiltetrahidrofurano (40 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta que se disolvieron los ingredientes (aproximadamente 15 min) y luego se agregó trifluorhidrato de trietilamina (0,94 ml, 5,76 mmol) y la mezcla resultante se agitó a 25°C durante aproximadamente 24 horas. A esta mezcla se le agregó una mezcla 1:1 de bicarbonato de sodio acuoso saturado y agua (40 ml) y 2-metiltetrahidrofurano y la mezcla resultante se agitó hasta que se disolvió el sólido (solución pH aproximadamente 8). Se separaron las capas y la fase orgánica se lavó con salmuera (30 ml), se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se disolvió en 2-metiltetrahidrofurano (50 ml) y se agregó ácido L-tartárico sólido (650mg). La mezcla resultante se agitó a entre 25°C y 30°C durante 18 horas y luego se filtró a través de papel de filtro. La torta del filtro se lavó con 2-metiltetrahidrofurano (10 ml), isopropanol (10 ml) y se puso inmediatamente al vacío para dar el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico como sal del ácido L-tartárico (3,7 g, >97 % de pureza).

Paso F - éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A un matraz de 250 ml de fondo redondo se le agregó éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico como sal del ácido L-tartárico (3,5 g) y metanol (35 ml) y la mezcla resultante se agitó durante 15 min. Se le agregó una mezcla 1:1 de bicarbonato de sodio acuoso

saturado y agua (70 ml) durante el transcurso de un período de 5 min y se siguió agitando durante 2 horas. La suspensión blancuzca que se obtuvo como resultado se filtró y la torta del filtro se lavó con agua (20 ml), se secó al aire durante 2 horas y luego se secó al vacío durante toda la noche para dar el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (2,3 g) como una base libre semi-cristalina.

Se obtuvieron espectros de ^{1}H y ^{13}C RMN para una muestra del éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (22,2 mg en aproximadamente 0,75 ml de DMSO-d_6) a temperatura ambiente usando un espectrómetro RMN JEOL ECX-400 :

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6), isómero mayoritario, δ 9,64 (br, 1H), 9,54 (br s, 1H), 9,43 (s, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,26 (s, 1H), 8,03 (d, J = 1,9, 1H), 7,25-7,45 (m, 9H), ~7,3 (nd, 1H), 7,07 (s, 1H), 6,88 (dd, J = 8,2, 1,9, 1H), 6,79 (d, J = 8,2, 1H), 5,15 (br, 1H), 4,53 (dd, J = 7,3, 4,7, 1H), 4,47 (m, 1H), ~3,65 y ~3,60 (par AB, 2H), 2,68 (br m, 2H), ~2,59 (nd, 4H), 2,44 (br t, J = 6,5, 2H), 2,20 (s, 3H), ~2,17 (br m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,73 (br, 2H), 1,44 (br q, J = ~9,0, 2H).

^{1}H RMN (400 MHz, DMSO-d_6), isómero minoritario, δ 9,64 (br, 1H), 9,43 (s 1H), 9,26 (br d, J = ~7,0, 1H), 8,67 (s, 1H), 8,50 (br d, J = ~7,0, 1H), 7,25-7,45 (m, 9H), ~7,3 (nd, 1H), 7,07 (s, 1H), ~7,07 (nd, 1H), 6,95 (dd, J = 8,3, 1,8, 1H), 6,83 (d, J = 8,3, 1H), 5,15 (br, 1H), 4,47 (m, 1H), ~3,65 y ~3,60 (par AB, 2H), 2,68 (br m, 2H), ~2,59 (nd, 2H), 2,44 (br t, J = 6,5, 2H), 2,20 (s, 3H), ~2,17 (br m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,73 (br, 2H), 1,44 (br q, J = ~9,0, 2H).

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6), isómero mayoritario, δ 170,0, 159,9,

153,9, 145,5, 139,3, 137,6, 135,2, 135,0, 134,8, 133,4, 133,4, 130,2, 130,2, 128,6, 128,2, 127,8, 127,4, 127,2, 127,0, 126,1, 125,7, 125,6, 121,7, 118,6, 114,5, 71,4, 70,0, 57,4, 53,9, 50,3, 50,1, 33,7, 30,7, 18,2, 17,5.

^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-d_6), isómero minoritario, δ 170,0, 163,4, 153,9, 147,8, 139,3, 137,6, 135,7, 135,2, 135,0, 134,8, 133,4, 133,4, 130,2, 130,2, 128,6, 128,2, 127,8, 127,4, 127,2, 127,0, 126,1, 125,7, 123,0, 119,6, 115,6, 71,0, 70,0, 57,3, 53,9, 50,3, 50,1, 33,7, 30,7, 18,2, 17,5.

Los espectros ^{1}H y ^{13}C RMN mostraron la presencia de un isómero mayoritario (aproximadamente 82 por ciento en moles) y un isómero minoritario (aproximadamente 18 por ciento en moles) que se cree que son isómeros rotacionales que se obtuvieron como resultado de la rotación impedida alrededor de la unión -NH-C(O)H. Se cree que el grupo fenilo está en *syn* con respecto al oxígeno del carbonilo en el isómero mayoritario y *anti* en el isómero minoritario.

Ejemplo 7

Cristales de siembra de la Forma II del éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Se disolvió éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico semicristalino (500mg) en metanol (50 ml) y se agregó agua hasta alcanzar el punto de turbidez. La mezcla resultante se agitó a 25°C durante 3 horas y el material cristalino que se obtuvo como resultado se aisló por filtración para dar el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido

bifenil-2-ilcarbámico cristalino (420mg). Se determinó que esta base libre cristalina tenía una gráfica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) que mostró un pico en el flujo de calor endotérmico a entre aproximadamente 142°C y aproximadamente 150°C; y un patrón de difracción de rayos X sobre polvo (PXRD) con picos de difracción significativos, entre otros picos, en valores 2θ de aproximadamente 20,7 ± 0,3, 21,6 ± 0,3, 22,5 ± 0,3 y 23,2 ± 0,3. Esta forma de base libre cristalina se denominó la Forma II. Se revela información adicional sobre la Forma II y otras formas de base libre cristalina de este compuesto en la Solicitud de los EE.UU. No. _____, asignada en forma conjunta, presentada en cada fecha con la misma (N° de caso P-222-US1) y en la Solicitud Provisoria de los EE.UU. No. 60/794.709, presentada el 25 de Abril 2006; cuyo contenido se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

Ejemplo 8

Cristalización de la Forma II del éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil] piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A un matraz de 3 L de fondo redondo con tres bocas equipado con un agitador superior, control de temperatura y embudo para adiciones se le agregó éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico semicristalino (14 g) y metanol (1,4 L). Se agregó agua (500 ml) en una porción y se agregó más agua (200 ml) lentamente hasta alcanzar el punto de turbidez. Se agregaron cristales de siembra de éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-

carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico de la Forma II (50mg) y la mezcla resultante se agitó a 25°C durante 3 horas, después de cuyo tiempo se desarrolló una suspensión que fluía libremente. Se agregó agua (300 ml) durante un período de 15 minutos y la mezcla resultante se agitó a 25°C durante toda la noche. Luego se filtró la mezcla y la torta del filtro se lavó con agua (100 ml), se secó al aire durante aproximadamente 2 horas y luego se secó al vacío a temperatura ambiente durante 48 horas para dar el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico cristalino (12,5 g, 99,6% de pureza). Se determinó que esta sal cristalina era de la Forma II.

Ejemplo 9

Éster 1-[2-(4-Formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Paso A - 4-yodo-2,5-dimetilfenilamina

A una solución de 2,5-dimetilanilina (20g, 165 mmol) en una mezcla 1:1 de diclorometano y metanol (400 ml) se le agregó bicarbonato de sodio (20,8g, 250 mmol) y dicloroyodato(I) de tetrametilamonio (44,7g, 165 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se agregó agua (500 ml). La fase orgánica se eliminó y se lavó con tiosulfato de sodio acuoso al 5% (500 ml) y salmuera (500 ml). Luego se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y concentró al vacío para dar 4-yodo-2,5-dimetilfenilamina (39,6 g, 98% de rendimiento). El producto se utilizó sin más purificación.

Paso B - *N*-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida

A una solución de 4-yodo-2,5-dimetilfenilamina (37,2 g, 151 mmol) en diclorometano (500 ml) se le agregó bicarbonato de sodio (25,4 g, 302 mmol). La mezcla resultante se enfrió a 0°C y se agregó lentamente cloruro de acriloílo (12,3 ml, 151 mmol) durante un período de 25 minutos. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche y luego se filtró. Se redujo el volumen del filtrado hasta aproximadamente 100 ml y se formó un precipitado. El precipitado se filtró, se secó, se lavó con agua (1 L) y luego se secó nuevamente para dar *N*-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida (42,98g, 95% de pureza, 90 % de rendimiento). El producto se utilizó sin más purificación.

Paso C - éster 1-[2-(4-yodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A una solución de *N*-(4-yodo-2,5-dimetilfenil)acrilamida (32,2 g, 107 mmol) en una mezcla 6:1 v/v de *N,N*-dimetilformamida e isopropanol (700 ml) se le agregó éster piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (36,3 g, 123 mmol). La mezcla resultante se calentó hasta 50°C durante 24 horas y luego a 80°C durante 24 horas. Luego se enfrió la mezcla de reacción a temperatura ambiente y se concentró al vacío. El residuo se disolvió en diclorometano (1 L) y esta solución se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1N (500 ml), agua (500 ml), salmuera (500 ml) y solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (500 ml). Luego se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. Se agregó etanol (400 ml) y la mezcla resultante se concentró al vacío hasta un volumen de aproximadamente 400 ml, después de cuyo tiempo se formó un precipitado. El precipitado se filtró y se secó para dar el éster 1-[2-(4-yodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (59,6g, 84% de pureza, 79% de rendimiento). M/z: $[M + H^+]$

calculado para $C_{29}H_{32}IN_3O_3$ 598,49; encontrado: 598,5.

Paso D - éster metílico del ácido 4-{3-[4-(Bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoico

A una solución de éster 1-[2-(4-yodo-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil] piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (56 g, 94 mmol) en una mezcla 5:1 v/v de *N,N*-dimetilformamida y metanol (600 ml) se le agregaron diispropiletilamina (49 ml, 281 mmol), 1,3-bis(difenilfosfino)propano (3,9 g, 9,4 mmol) y acetato de paladio(II) (2,1 g, 9,4 mmol). La mezcla resultante se purgó con monóxido de carbono y luego se agitó durante toda la noche a entre 70°C y 80°C bajo una atmósfera de monóxido de carbono (presión con globo). La mezcla de reacción se concentró al vacío y el residuo se disolvió en diclorometano (500 ml). Esta mezcla se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1N (500 ml), agua (500 ml) y luego salmuera (500 ml). Luego se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y luego se concentró al vacío. El residuo se mezcló con etanol (aproximadamente 5:1 volumen en peso etanol a residuo) y la mezcla se calentó hasta que se disolvió todo el material sólido. Esta solución se dejó enfriar lentamente hasta la temperatura ambiente y el precipitado que se obtuvo como resultado se aisló por filtración para dar el éster metílico del ácido 4-{3-[4-(Bifenil-2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoico (47,3 g, 97% de pureza, 92% de rendimiento). M/z: $[M + H^+]$ calculado para $C_{31}H_{35}N_3O_5$ 530,63; encontrado: 530,4.

Paso E - Éster 1-[2-(4-Hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

Se enfrió a 0°C una solución de éster metílico del ácido 4-{3-[4-(Bifenil-

2-ilcarbamoiloxi)piperidin-1-il]propionilamino}-2,5-dimetilbenzoico (49,8 g, 93,9 mmol) en tetrahidrofurano (200 ml) y se agregó hidruro de aluminio y litio (10,7 g, 281,7 mmol) por porciones (10 x 1,07 g). La mezcla resultante se agitó durante 3 horas y luego se agregó agua (10,7 ml), seguida de hidróxido de sodio acuoso 1N (10,7 ml) y más agua (32,1 ml). Esta mezcla se agitó durante toda la noche y luego se filtró. La fase orgánica se concentró al vacío y el residuo se mezcló con acetato de etilo (aproximadamente 5:1 volumen en peso de acetato de etilo a residuo). Esta mezcla se calentó hasta que se disolvió todo el material sólido y luego se dejó enfriar la solución hasta la temperatura ambiente. El precipitado que se obtuvo como resultado se filtró y se secó para dar el éster 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (24,6 g, 95% de pureza, 47,5% de rendimiento). Este material se utilizó sin más purificación. M/z: $[M + H^+]$ calculado para $C_{30}H_{35}N_3O_4$ 502,62; encontrado: 502,5.

Paso F - éster 1-[2-(4-Formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico

A una solución de éster 1-[2-(4-hidroximetil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil] piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (5,0 g, 10 mmol) en diclorometano (200 ml) se le agregó diisopropiletilamina (8,7 ml, 50 mmol) y dimetilsulfóxido (5,6 ml, 100 mmol). La mezcla resultante se enfrió a 0°C y se agregaron complejo de trióxido de azufre y piridina (8,0 g, 50 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a 0°C y luego se agregó agua (300 ml). La fase orgánica se eliminó y se lavó con ácido clorhídrico acuoso 1N (300 ml) y salmuera (300 ml). Luego se secó la fase orgánica sobre sulfato de magnesio anhidro y se filtró. La solución que se obtuvo como resultado que contenía

éster 1-[2-(4-formil-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico se utilizó sin más purificación. M/z: [M + H^+] calculado para $C_{30}H_{33}N_3O_4$ 500,60; encontrado: 500,4.

Ejemplo 10

Cultivo Celular y Preparación de Membranas a partir de Células que Expresaban receptores Muscarínicos Humanos M_1, M_2, M_3 y M_4

Se cultivaron líneas celulares CHO que expresaban respectivamente y en forma estable los subtipos hM_1, hM_2, hM_3 y hM_4 del receptor muscarínico humano clonado, hasta casi confluencia en medio F-12 de HAM suplementado con FBS 10% y Geneticina 250 µg/ml. Las células se cultivaron en una incubadora con CO_2 5%, a 37 °C y se levantaron con EDTA 2 mM en dPBS. Las células se recogieron mediante centrifugación a 650 x g durante 5 minutos y los pélets de células se almacenaron congelados a -80°C o bien las membranas se prepararon de inmediato para ser utilizadas. Para la preparación de las membranas, los precipitados de células se suspendieron nuevamente en solución amortiguadora de lisis y se homogenizaron con un homogenizador de tejidos Politron PT-2100 (Kinematica AG; 20 segundos x 2 pulsos). Las membranas sin tratar se centrifugaron a 40.000 x g durante 15 minutos a 4°C. Luego se resuspendió el gránulo de membrana con solución amortiguadora de pH de re-suspensión y se volvió a homogeneizar con el destructor de tejidos Politron. La concentración de proteínas de la suspensión de membrana se determinó mediante el método descrito por Lowry et al., **1951**, *Journal of Biochemistry*, *193*, 265. Todas las membranas se almacenaron congeladas en alícuotas a -80°C o bien se usaron de inmediato. Se adquirieron alícuotas de preparado de membranas con receptor hM_5 directamente de

PerkinElmer, Inc. (Wellesley, MA) y se almacenaron a -80°C hasta que se utilizaron.

Ejemplo 11

Ensayo de Unión al Radioligando para receptores Muscarínicos

Se realizaron ensayos de unión al radioligando para receptores muscarínicos clonados en placas para microtitulación de 96 cavidades con un volumen de ensayo total de 100 µl. Las membranas de las células CHO que expresaban de forma estable uno de los subtipos muscarínicos hM_1, hM_2, hM_3, hM_4 o hM_5 se diluyeron con solución amortiguadora de ensayo hasta las siguientes concentraciones de proteínas blanco específicas (µg/cavidad): 10 µ10 µg para hM_1, 10-15 µg para hM_2, 10-20 µg para hM_3, 10-20 µg para hM_4 y 10-12 µg para hM_5, para obtener señales similares (cpm). Las membranas se homogenizaron brevemente usando un homogenizador de tejidos Politron (10 segundos) antes de colocarlas en la placa de ensayo. Se realizaron estudios de unión a saturación para determinar los valores de K_D del radioligando usando clorometil L-[*N*-metil-^{3}H]escopolamina ([^{3}H]-NMS) (TRK666, 84,0 Ci/mmol, Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Inglaterra), bajo concentraciones que variaban en un rango de entre 0,001 nM y 20 nM. Los ensayos de desplazamiento para determinar los valores de K_i de los compuestos de prueba se llevaron a cabo con [^{3}H]-NMS en 1 nM y una vez concentraciones del compuesto de prueba diferentes. Los compuestos de prueba se disolvieron inicialmente hasta una concentración de 400 µM en solución amortiguadora de dilución y luego se realizaron diluciones seriadas de 5x con solución amortiguadora de dilución hasta concentraciones finales que variaban en un rango entre 10 pM y 100 µM. El orden y los volúmenes de

adición a las placas de ensayo fueron los siguientes: 25 µL del radioligando, 25 µL del compuesto de prueba diluido y 50 µL de membranas. Las placas de ensayo se incubaron durante 60 minutos a 37 ℃. Las reacciones de unión se terminaron con una filtración rápida por placas filtrantes de fibra de vidrio GF/B (PerkinElmer Inc.) pretratadas en BSA 1%. Las placas filtrantes se lavaron tres veces con solución amortiguadora de lavado (HEPES 10 mM) para eliminar la radioactividad no unida. Después las placas se secaron al aire y se agregaron 50 µL de fluido líquido de centelleo Microscint-20 (PerkinElmer Inc.) a cada cavidad. A continuación se contaron las placas con un contador de centelleo líquido PerkinElmer Topcount (PerkinElmer Inc.). Los datos de unión se analizaron con un análisis de regresión no lineal con el conjunto de software GraphPad Prism (Software GraphPad, Inc., San Diego, CA), usando el modelo de competencia de un sitio. Los valores de K_i para los compuestos de prueba se calcularon a partir de los valores observados de IC_{50} y el valor de K_D del radioligando usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y; Prusoff WH. (1973) *Biochemical Pharmacology*, 22(23):3099-108). Los valores de K_i fueron convertidos en valores de pK_i para determinar la media geométrica y los intervalos de confianza del 95%. Estos valores estadísticos resumidos fueron convertidos a continuación nuevamente en valores de K_i para poder informar los datos.

En este ensayo, un valor bajo de K_i indica que el compuesto de prueba tiene una mayor afinidad de unión por el receptor evaluado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa) tiene un valor de K_i menor de 10 nM para los subtipos M_1, M_2,

M_3, M_4 y M_5 de receptor muscarínico.

Ejemplo 12

Cultivo Celular y Preparación de Membranas a partir de Células que Expresaban receptores Adrenérgicos Humanos β1, β2 o β3

Se cultivaron casi hasta confluencia líneas celulares de riñón de embrión humano (HEK-293) que expresaban de manera estable receptores β_1 y β_2 adrenérgicos humanos clonados o líneas celulares de ovario de hámster chino (CHO) que expresaban de manera estable receptores β_3 adrenérgicos humanos clonados en medios DMEM o Hams F-12 con 10% de FBS en presencia de 500 µg/ml de Geneticina. La monocapa celular se levantó con EDTA 2mM en PBS. Las células se recogieron mediante centrifugación a 1000 rpm, y los pélets de células se almacenaron congelados a -80ºC, o bien, las membranas se prepararon de inmediato para ser utilizadas. Para la preparación de las membranas que expresaban los receptores β_1 y β_2, los pélets de células se resuspendieron en solución amortiguadora de lisis (HEPES/HCl 10 mM, EDTA 10mM, pH 7,4 a 4 ℃) y se ho mogeneizaron con un homogeneizador de vidrio de calce ajustado Dounce (30 golpes) en hielo. Para las membranas más sensibles a proteasas que expresaban el receptor β_3, los pélets de células se homogeneizaron en solución amortiguadora de lisis (Tris/HCl 10mM, pH 7,4) suplementado con una tableta de "Tabletas de Cóctel Completo de Inhibidores de Proteasas con EDTA 2 mM" por cada 50 ml de solución amortiguadora (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN). El homogenato se centrifugó a 20.000 x g, y el gránulo resultante se lavó una vez con solución amortiguadora de lisis mediante resuspensión y centrifugación como se describió anteriormente. El gránulo final fue entonces resuspendido

en solución amortiguadora del ensayo de unión, enfriada en hielo (Tris/HCl 75 mM pH 7,4, $MgCl_2$ 12,5,5mM, EDTA 1 mM). La concentración de proteínas de la suspensión de membranas se determinó mediante los métodos descriptos en Lowry et al., **1951**, *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265; y Bradford, *Analytical Biochemistry*, **1976**, *72*, 248-54. Todas las membranas se almacenaron congeladas en alícuotas a -80°C o bien se usaron de inmediato.

Ejemplo 13

Ensayo de Unión al Radioligando con los receptores Adrenérgicos Humanos β_1, β_2 y β_3

Se realizaron ensayos de unión en placas para microtitulación de 96 cavidades con un volumen de ensayo total de 100 µL con 10-15 µg de proteínas de membrana que contenían los receptores adrenérgicos humanos μ_1, μ_2 o β_3 en solución amortiguadora de ensayo (Tris/HCl 75 mM pH 7,4 a 25°C, $MgCl_2$ 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA 0,2%). Se realizaron estudios de unión a saturación para determinar los valores de K_d del radioligando usando [^{3}H]-dihidroalprenolol (NET-720, 100 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) para los receptores β_1 y β_2 y [^{125}I]-(-)-yodocianopindolol (NEX-189, 220 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) en 10 u 11 concentraciones diferentes que variaban en un rango entre 0,01 nM y 20 nM. Los ensayos de desplazamiento para determinar los valores de K_i de los compuestos de prueba se llevaron a cabo con [^{3}H]-dihidroalprenolol en 1 nM y [^{125}I]-(-)-yodocianopindolol en 0,5 nM para 10 u 11 concentraciones diferentes del compuesto de prueba que variaban en un rango entre 10 pM y 10 µM. La unión no específica se determinó en presencia de propranolol 10 µM. Los ensayos se incubaron durante 1 hora a 37 °C, y luego las reacciones de unión

fueron terminadas mediante una filtración rápida por GF/B, para los receptores β_1 y β_2 o para los receptores β_3 por placas filtrantes de fibra de vidrio GF/C (Packard BioScience Co., Meriden, CT) prerremojadas en polietilenimina 0,3%. Las placas filtrantes se lavaron tres veces con solución amortiguadora de filtrado (Tris/HCl 75 mM pH 7,4 a 4°C, $MgCl_2$ 12,5 mM, EDTA 1 mM) para remover la radioactividad no unida. Después las placas se secaron y se agregaron 50 µL de fluido líquido de centelleo Microscint-20 (Packard BioScience Co., Meriden, CT) y las placas se contaron con un contador de centelleo líquido Packard Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT). Se analizaron los datos de unión empleando análisis de regresión no lineal con el conjunto de software GraphPad Prism (Software GraphPad, Inc., San Diego, CA), usando el modelo de 3 parámetros para competición por un sitio. Se fijó el mínimo de la curva en el valor de la unión no específica, según se determinó en presencia de propranolol 10 µM. Los valores de K_i para los compuestos de prueba se calcularon a partir de los valores observados de IC_{50} y el valor de K_d del radioligando, usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y y Prusoff WH., *Biochemical Pharmacology*, **1973**, *22*, 23, 3099-108).

En este ensayo, un valor bajo de K_i indica que el compuesto de prueba tiene una mayor afinidad de unión por el receptor evaluado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa) tiene un valor de K_i menor de 10 nM para el receptor β_2 adrenérgico y un valor de K_i mayor de 1000 nM para los receptores β_1 y β_3 adrenérgicos.

Ejemplo 14

Ensayos Funcionales de Antagonismo para los Subtipos de receptores Muscarínicos

Ensayo A - Bloqueo de la inhibición de la acumulación de AMPc mediada por agonistas

En este ensayo, se determinó la potencia funcional de un compuesto de prueba como antagonista para el receptor hM_2 midiendo la capacidad del compuesto de prueba de bloquear la inhibición por oxotremorina de la acumulación de AMPc mediada por forskolina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2. Los ensayos con AMPc se llevaron a cabo en un formato de radioinmunoensayo usando el sistema FlashPlate® para ensayo de activación de adenilato ciclasa con ^{125}I-AMPc (NEN SMP004B, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células se lavaron una vez con dPBS y se tomaron con una solución de Tripsina-EDTA (0,05% de tripsina/EDTA 0,53 mM), como por ejemplo se describió en la sección anterior de preparación de cultivos celulares y membranas. Las células separadas se lavaron dos veces por centrifugación a 650 x G durante 5 minutos en 50 ml de dPBS. Luego se suspendió nuevamente el precipitado en 10 ml de dPBS, y se contaron las células en un contador de partículas doble Coulter Z1 (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Las células se centrifugaron nuevamente a 650 x G durante 5 minutos, y se las suspendió nuevamente en amortiguador de estimulación hasta una concentración de ensayo de $1,6 \times 10^6$ a $2,8 \times 10^6$ células/ml.

El compuesto de prueba se disolvió inicialmente hasta una concentración de 400 µM en amortiguador de dilución (dPBS suplementado con 1 mg/ml de BSA (0,1%)), y luego se realizó una dilución en serie con

amortiguador de dilución para obtener concentraciones molares finales que variaron entre 100 μM y 0,1 nM. La oxotremorina se diluyó de forma similar.

Para medir la inhibición por oxotremorina de actividad de adenilato ciclasa, se agregaron 25 μL de forskolina (25 μM concentración final diluida en dPBS), 25 μL de oxotremorina diluida, y 50 μL de células a las cavidades de ensayo con agonista. Para medir la capacidad de un compuesto de prueba de bloquear la actividad de la adenilato ciclasa inhibida por oxotremorina, se agregaron 25 μL de forskolina y oxotremorina (25 μM y 5 μM concentraciones finales, respectivamente, diluida en dPBS), 25 μL del compuesto de prueba diluido, y 50 μL de células a las restantes cavidades de ensayo.

Se incubaron las reacciones durante 10 min a 37°C y se detuvieron mediante la adición de 100 μL de solución amortiguadora de detección helada. Las placas se sellaron, se incubaron durante la noche a temperatura ambiente y se contaron a la mañana siguiente en un contador de centelleo líquido Topcount de PerkinElmer (PerkinElmer Inc., Wellesley, MA). La cantidad de AMPc producido (pmol/cavidad) se calculó sobre la base de las cuentas observadas para las muestras y las referencias de AMPc, del modo en que se describe en el manual del usuario que brinda el fabricante. Los datos se analizaron con un análisis de regresión no lineal con el conjunto de software GraphPad Prism (Software GraphPad, Inc., San Diego, CA), usando la ecuación de regresión no lineal para competencia por un sitio. Se usó la ecuación de Cheng-Prusoff para calcular la K_{obs}, con la curva de respuesta a la concentración de EC_{50} de la oxotremorina y la concentración de ensayo de oxotremorina como K_D y [L], respectivamente.

En este ensayo, un valor bajo de K_{obs} indica que el compuesto de

prueba tiene una mayor actividad funcional en el receptor evaluado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa) tiene un valor de K_{obs} menor de aproximadamente 10 nM para el bloqueo de inhibición por oxotremorina de la acumulación de AMPc mediada por forskolina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2.

Ensayo B - Bloqueo de la Unión de [^{35}S]GTPγS Mediada por agonistas

En este ensayo funcional, se determinó la potencia funcional de un compuesto de prueba como un antagonista del receptor hM_2 midiendo la capacidad del compuesto de prueba de bloquear la unión a [^{35}S]GTPγS estimulada por oxotremorina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2.

En el momento del uso, las membranas congeladas se descongelaron y se diluyeron luego en solución amortiguadora de ensayo con una concentración final del tejido blanco de 510 µg de proteínas por cavidad. Las membranas se homogenizaron brevemente usando un homogenizador de tejidos Politron PT-2100, y luego se las agregó a las placas de ensayo.

Se determinó el valor de EC_{90} (concentración efectiva para obtener un 90% de la respuesta máxima) para la estimulación de la unión de [^{35}S]GTPγS por el agonista oxotremorina en cada experimento.

Para determinar la capacidad de un compuesto de prueba de inhibir la unión de [^{35}S]GTPγS estimulada por oxotremorina, se agregó lo siguiente a cada cavidad de las placas 96 cavidades: 25 µL de solución amortiguadora de ensayo con [^{35}S]GTPγS (0,4 nM), 25 µL de oxotremorina (EC_{90}) y GDP (3 µM),

25 µL del compuesto de prueba diluido y 25 µL de membranas de células CHO que expresaban el receptor hM_2. Las placas de ensayo se incubaron a continuación a 37°C durante 60 minutos. Las placas de ensayo se filtraron sobre filtros GF/B tratados previamente con BSA 1%, usando un cosechador de 96 cavidades PerkinElmer. Las placas se lavaron con solución amortiguadora de lavado helada tres veces durante 3 segundos, y luego se secaron al aire o en vacío. Se agregó líquido de centelleo Microscint-20 (50 µl) a cada cavidad y se selló cada placa, después de lo cual se efectuó un recuento de la radioactividad con un equipo Topcounter (Perkin Elmer). Los datos se analizaron con un análisis de regresión no lineal con el conjunto de software GraphPad Prism (Software GraphPad, Inc., San Diego, CA), usando la ecuación de regresión no lineal para competencia por un sitio. Se usó la ecuación de Cheng-Prusoff para calcular el valor de K_{obs}, usando los valores de IC_{50} de la curva de concentración-respuesta para el compuesto de prueba y la concentración de oxotremorina en el ensayo como valores de K_D y [L], concentración de ligando, respectivamente.

En este ensayo, un valor bajo de K_{obs} indica que el compuesto de prueba tiene una mayor actividad funcional en el receptor evaluado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa) tiene un valor de K_{obs} menor de aproximadamente 10 nM para el bloqueo de la unión a [^{35}S]GTPγS estimulada por oxotremorina en células CHO-K1 que expresan el receptor hM_2.

Ensayo C - Bloqueo de la Liberación de calcio mediado por agonistas mediante ensayos FLIPR

En este ensayo funcional, se determinó la potencia funcional de un compuesto de prueba como un antagonista de receptores hM_1, hM_3 y cM_5 midiendo la capacidad del compuesto de prueba de inhibir los aumentos del calcio intracelular mediados por agonistas.

Se sembraron células CHO que expresaban de manera estable los receptores en placas FLIPR de 96 cavidades la noche anterior a la realización del ensayo. Las células sembradas se lavaron dos veces con Solución amortiguadora de pH para FLIPR (HEPES 10 mM, pH 7,4, cloruro de calcio 2 mM, probenecid 2,5 mM en solución salina de Hank con pH amortiguado (HBSS) sin calcio ni magnesio) usando Cellwash (MTX Labsystems, Inc.) para eliminar los medios de cultivo. Después del lavado, cada cavidad contenía 50 µL de solución amortiguadora de pH para FLIPR. Las células se incubaron luego con FLUO-4AM 4 µM (se preparó una solución 2X) a razón de 50 µl/cavidad, durante 40 minutos a 37 ℃, dióxido de carbono 5%. Después del período de incubación con el colorante, las células se lavaron dos veces con solución amortiguadora FLIPR, dejando un volumen final de 50 µl en cada cavidad.

Se determinó la estimulación dependiente de la dosis de la liberación de Ca^{2+} intracelular para oxotremorina de tal manera que se pudiese medir el compuesto de prueba contra la estimulación por oxotremorina a una concentración EC_{90}. Las células se incubaron primero con solución amortiguadora de pH para dilución del compuesto durante 20 minutos y luego se agregó oxotremorina. Se generó un valor de EC_{90} para oxotremorina de acuerdo con el método detallado que se describe más adelante en la sección de medición de FLIPR y reducción de datos, junto con la fórmula EC_F =

((F/100-F)^1/H) * EC_{50}. Se preparó una concentración de oxotremorina de 3 x EC_F en placas de estimulación de tal manera que se agregó una concentración EC_{90} de oxotremorina a cada cavidad en placas de ensayo de prueba.

Los parámetros usados para el FLIPR fueron: exposición de 0,4 segundos, intensidad del láser de 0,5 watts, longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión de 550 nm. Se determinó la línea de base midiendo el cambio de la fluorescencia durante 10 segundos antes de la adición de oxotremorina. Después de la estimulación con oxotremorina, el FLIPR midió de manera continua el cambio de fluorescencia cada entre 0,5 y 1 segundo durante 1,5 minutos para capturar el máximo cambio de fluorescencia.

El cambio de fluorescencia se expresó como la fluorescencia máxima menos la fluorescencia basal para cada cavidad. Los datos sin procesar se analizaron contra el logaritmo de la concentración del compuesto de prueba por regresión no lineal con GraphPad Prism (Software GraphPad, Inc., San Diego, CA) usando el modelo sigmoidal para respuesta a la dosis incluido de fábrica. Los valores de K_{obs} del antagonista fueron determinados por Prism usando el valor de EC_{50} de oxotremorina como K_D y el valor de EC_{90} de oxotremorina para la concentración del ligando de acuerdo con la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng & Prusoff, 1973).

En este ensayo, un valor bajo de K_{obs} indica que el compuesto de prueba tiene una mayor actividad funcional en el receptor evaluado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa) tiene un valor de K_{obs} menor de

aproximadamente 10 nM para el bloqueo de la liberación de calcio mediada por agonista en células CHO que expresan de manera estable los receptores hM_1, hM_3 y cM_5.

Ejemplo 15

Ensayo FlashPlate® para AMPc en células completas en líneas celulares HEK-293 y CHO que expresan de manera heteróloga a los receptores β_1, β_2 o β_3 adrenérgicos humanos

Los ensayos de AMPc se realizaron en un formato de radioinmunoensayo usando el Sistema de Ensayo FlashPlate® de Activación de la Adenilato ciclasa con [^{125}I]-AMPc (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la determinación de la potencia como agonista de los receptores β_1 y β_2 (EC_{50}), se cultivaron líneas celulares HEK-293 que expresan de manera estable receptores β_1 y β_2 clonados humanos casi hasta confluencia en DMEM suplementado con 10% de FBS y Geneticina (500 µg/ml). Para la determinación de la potencia como agonista del receptor β_3 (EC_{50}), se cultivó la línea de células CHO-K1 que expresan de manera estable receptores β_3 adrenérgicos clonados humanos casi a confluencia en medios Hams F-12 suplementados con 10% de FBS y Geneticina (250 µg/ml). Las células se lavaron con PBS y se separaron en dPBS (solución salina de fosfatos amortiguadora de Dulbecco, sin $CaCl_2$ ni $MgCl_2$) con EDTA 2 mM o una solución de Tripsina-EDTA (tripsina 0,05%/EDTA 0,53 mM). Después de contar las células en un contador de células Coulter, las células fueron precipitadas por centrifugación a 1.000 rpm y resuspendidas en solución amortiguadora de estimulación con IBMX (Conjunto de Elementos PerkinElmer) precalentada

hasta temperatura ambiente en una concentración de entre 1,6 x 10^6 y 2,8 x 10^6 células/ml. Se usaron aproximadamente entre 40.000 y 80.000 células por cavidad en este ensayo. Los compuestos de prueba (10 mM en DMSO) se diluyeron en PBS con BSA 0,1% en Beckman Biomek-2000 y se evaluaron en 11 concentraciones diferentes que variaban dentro del rango entre 100 µM y 1 pM. Se incubaron las reacciones durante 10 min a 37°C y se detuvieron mediante la adición de 100 µL de solución amortiguadora de detección fría que contenía [^{125}I]-AMPc (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA). La cantidad de AMPc producida (pmol/cavidad) se calculó en base a las cuentas observadas para las muestras y los estándares de AMPc del modo en que se describe en el manual del usuario que brinda el fabricante. Los datos fueron analizados mediante el análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism (Software GraphPad, Inc., San Diego, CA) usando la ecuación sigmoidea. Se usó la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng Y, y Prusoff WH., *Biochemical Pharmacology*, **1973**, 22, 23, 3099-108) para calcular los valores de EC_{50}.

En este ensayo, un valor bajo de EC_{50} indica que el compuesto de prueba tiene una mayor actividad funcional en el receptor evaluado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa) tiene un valor de EC_{50} menor de aproximadamente 10 nM para el receptor β_2 adrenérgico; un valor de EC_{50} de aproximadamente 30 nM para el receptor β_1 adrenérgico; y un valor de EC_{50} mayor que 700 nM para el receptor β_3 adrenérgico.

Ejemplo 16

Ensayo FlashPlate® de AMPc de Células Enteras con una Línea Celular Epitelial de Pulmón con Expresión Endógena del Receptor Adrenérgico Humano β_2

En este ensayo, se determinaron la potencia como agonista y la actividad intrínseca de un compuesto de prueba usando una línea de células que expresan niveles endógenos del receptor β_2 adrenérgico. Se cultivaron células de una línea de células del epitelio pulmonar humano (BEAS-2B) (ATCC CRL-9609, American Type Culture Collection, Manassas, VA) (January B, et al., *British Journal of Pharmacology*, 1998, *123*, 4, 701-11) a 75-90% de la confluencia en medio completo, libre de suero (Medio LHC-9 que contiene epinefrina y ácido retinoico, Biosource Internacional, Camarillo, CA). El día antes del ensayo, el medio se cambió a LHC-8 (sin epinefrina ni ácido retinoico, Biosource International, Camarillo, CA). Los ensayos con AMPc se llevaron a cabo en un formato de radioinmunoensayo usando el sistema FlashPlate® para ensayo de activación de adenilato ciclasa con [^{125}I]-AMPc (NEN SMP004, PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Durante el día del ensayo, las células se lavaron con PBS, se levantaron por rayado con EDTA 5 mM en PBS, y se contaron. Las células fueron precipitadas por centrifugación a 1.000 rpm y resuspendidas en solución amortiguadora de estimulación precalentada a 37°C en una concentración final de 60.000 células/ml. Las células se utilizaron en una concentración final de entre 100.000 y 120.000 células/cavidad en este ensayo. Se realizaron diluciones seriadas de los compuestos de prueba en solución amortiguadora de ensayo (Tris/HCl 75 mM pH 7,4 a 25°C, $MgCl_2$ 12,5 mM, EDTA 1 mM, BSA

0,2%) en Beckman Biomek-2000. Los compuestos de prueba se evaluaron en el ensayo en 11 concentraciones diferentes que variaban dentro del rango entre 10 μM y 10 pM. Se incubaron las reacciones durante 10 min a 37°C y se detuvieron mediante la adición de 100 μL de solución amortiguadora de detección helada. Las placas se sellaron, se incubaron durante la noche a 4°C y se contaron a la mañana siguiente en un contador de centelleo Topcount (Packard BioScience Co., Meriden, CT). La cantidad de AMPc producida por ml de reacción se calculó en base a las cuentas observadas para las muestras y los estándares de AMPc del modo en que se describe en el manual del usuario que brinda el fabricante. Los datos fueron analizados mediante un análisis de regresión no lineal con el paquete de software GraphPad Prism (Software GraphPad, Inc., San Diego, CA) usando el modelo de 4 parámetros para la curva de dosis-respuesta sigmoidea.

En este ensayo, un valor bajo de EC_{50} indica que el compuesto de prueba tiene una mayor actividad funcional en el receptor evaluado. Se descubrió que el éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (compuesto IIa) tiene un valor de EC_{50} menor de 10 nM con actividad intrínseca valor de mayor que 0,3 en comparación con un β_2 agonista completo: isoproterenol (1,0).

Ejemplo 17

Ensayo de Einthoven para determinar la eficacia como broncoprotector y su duración

En este ensayo, se determinaron la eficacia como broncoprotector del compuesto de prueba y su duración usando cobayos. Este ensayo se derivó de

los procedimientos descritos en Einthoven (1892) *Pfugers Arch. 51*: 367 - 445; y Mohammed et al. (2000) *Pulm Pharmacol Ther. 13(6)*:287-92. En este ensayo, los cambios en la presión de ventilación sirven como una medida indirecta de resistencia de las vías respiratorias. Después del pre-tratamiento con un compuesto de prueba, se determinó la potencia del antagonista muscarínico usando curvas de respuesta a la dosis de broncoconstrictor para metacolina intravenosa en presencia de propranolol. De manera similar, se determinó la potencia como broncoprotector del β_2 agonista usando histamina. Se determinó la potencia combinada como broncoprotector usando metacolina en ausencia de propranolol.

El ensayo se llevó a cabo usando cobayos Duncan-Hartley machos (Harlan, Indianapolis, IN), que pesaban entre 250 y 400 g. Se dosificó un compuesto de prueba o vehículo (es decir, agua estéril) por inhalación (IH) durante un período de tiempo de 10 minutos en una cámara de dosificación por exposición del cuerpo completo (R+S Molds, San Carlos, CA) usando 5 ml de solución de dosificación. Los animales se expusieron a un aerosol generado con un Conjunto Nebulizador LC Star (Modelo 22F51, PARI Respiratory Equipment, Inc. Midlothian, VA) impulsado por Bioblend (una mezcla de 5% de CO_2; 21% de O_2; y 74% de N_2) a una presión de 22 psi. Se evaluó la función pulmonar a diversos puntos de tiempo después de la dosificación por inhalación.

Setenta y cinco minutos antes de comenzar el ensayo, los cobayos se anestesiaron con una inyección intramuscular (IM) de una mezcla de ketamina (43,7 mg/kg/xilazina (3,5mg/kg)/acepromazina (1,05mg/kg). Cuando fue necesario se administró una dosis suplementaria de esta mezcla (50% de la

dosis inicial). La vena yugular y la arteria carótida se aislaron y encanularon catéteres de polietileno rellenos con solución salina (micro-renathane y PE-50, respectivamente, Beckton Dickinson, Sparks, MD). La arteria carótida se conectó a un transductor de presión para permitir la medición de la presión sanguínea y la cánula en la vena yugular se utilizó para la inyección IV ya sea de metacolina o de histamina. Luego se disecó la tráquea para dejarla libre y se encanuló con una aguja 14G (#NE-014, Small Parts, Miami Lakes, FL). Cuando se terminó de encanular, los cobayos se ventilaron usando un respirador (Modelo 683, Harvard Apparatus, Inc., MA) regulado a un volumen de bombeo de 1ml/100 g de peso corporal pero sin exceder un volumen de 2,5 ml, y con una velocidad de 100 bombeos por minuto. La presión de ventilación (VP) se midió en la cánula traqueal usando un transductor Biopac conectado a un pre-amplificador Biopac (TSD 137C). La temperatura corporal se mantuvo a 37°C usando una manta calefactora. Antes de iniciar la recolección de datos, se administró pentobarbital (25mg/kg) por vía intraperitoneal (IP) para suprimir la respiración espontánea y obtener una línea de base estable. Los cambios de la VP se registraron en una interfaz para recolección de datos Biopac para Windows. Los valores de la línea de base se recogieron durante por lo menos 5 minutos, después de cuyo tiempo los cobayos se expusieron por vía IV de manera no acumulativa una dosis con incrementos al doble del broncoconstrictor (metacolina o histamina). Cuando se utilizó metacolina como agente broncoconstrictor, los animales se pre-trataron con propranolol (5mg/kg, IV) para aislar los efectos antimuscarínicos del compuesto de prueba. El propranolol se administró 30 minutos antes de construir la curva de respuesta a la dosis para metacolina o histamina. Los cambios de la VP se registraron

usando el software Acknowledge para recolección de datos (Santa Barbara, CA). Después de completar el estudio, los animales se sometieron a eutanasia.

El cambio de la VP se midió en cm de agua. El cambio de la VP (cm de H_2O) = pico de presión (después de la exposición al broncoconstrictor) - línea de base del pico de presión. La curva de respuesta a la dosis para metacolina o histamina se ajustó a una ecuación logística de cuatro parámetros usando GraphPad Prism, versión 3.00 para Windows (Software GraphPad, San Diego, California). Se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y = Min + (Max-Min)/(1 + 10^{((\log ID50-X)^{*}\ Pendiente)})$$

donde X es el logaritmo de la dosis, Y es la respuesta. Y comienza en el Mín y se acerca asintóticamente al Máx con un perfil sigmoideo.

Se calculó la inhibición porcentual de la respuesta broncoconstrictora a una dosis submáxima de metacolina o histamina para cada dosis del compuesto de prueba usando la siguiente ecuación: % Inhibición de respuesta = 100-((pico de presión (después de la exposición al broncoconstrictor, tratado) - línea de base del pico de presión (tratado) *100% / (pico de presión (después de la exposición al broncoconstrictor, agua) - línea de base del pico de presión (agua) x 100). Las curvas de de inhibición se ajustaron usando la ecuación logística de cuatro parámetros del software GraphPad. También se estimaron las ID_{50} (dosis necesaria para producir una inhibición del 50% de la respuesta broncoconstrictora) y Emax (máxima inhibición) siempre que fuese apropiado.

Se utilizó la magnitud de la broncoprotección en diferentes puntos de tiempo después de inhalación del compuesto de prueba para estimar la vida media farmacodinámica (PD $T_{1/2}$). Se determinó la PD $T_{1/2}$ mediante un ajuste por regresión no lineal usando a una ecuación con fase de decaimiento

exponencial (GraphPad Prism, Versión 4.00): Y= duración * exp(-K*X) + Meseta [*Y= Span * exp(-K*X) + Plateau*]; Inicio en: duración + meseta y decaimientos hasta meseta con una proporción constante K. El PD $T_{1/2}$ = 0,69/K. La meseta se restringió a 0.

Se descubrió que una hora y media después de la dosis, el éster 1-[2-(4-{[(R)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenilcarbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico (IIa) tiene una ID_{50} menor de aproximadamente 50 µg/ml tanto para la broncoconstricción inducida por metacolina como para la broncoconstricción inducida por histamina.

Además, este compuesto produjo una broncoprotección significativa durante hasta aproximadamente 72 horas cuando se administró como una única dosis sub-máxima (100 µg/ml). En este ensayo, el salmeterol (3 µg/ml) (un agonista del receptor β_2 adrenérgico) mostró una broncoprotección significativa durante entre 6 y 14 horas; y el tiotropio (10 µg/ml) (un antagonista del receptor muscarínico) mostró una broncoprotección significativa durante más de 72 horas.

Ejemplo 18

Ensayo con pletismógrafo sobre cobayos para determinar la eficacia como broncoprotector y su duración

En este ensayo, se determinó la eficacia como broncoprotector del compuesto de prueba y su duración usando un ensayo con cobayos.

Se identificaron individualmente grupos de 6 cobayos machos (Duncan-Hartley (HsdPoc:DH) Harlan, Madison, WI) que pesaban entre 250 y 350 g utilizando tarjetas en las jaulas. Durante todo el estudio los animales tenían

libre acceso a alimentos y agua *ad libitum*. Se administraron los compuestos a evaluar a través de la inhalación durante 10 minutos en una exposición de cuerpo entero en una cámara de dosificación (R&S Molds, San Carlos, CA). Las cámaras de dosificación fueron acomodadas de modo que un aerosol fuera simultáneamente entregado a 6 cámaras individuales a partir de un colector central. Los cobayos fueron expuestos a un aerosol de un compuesto a evaluar o de un vehículo (WFI). Los aerosoles fueron generados a partir de soluciones acuosas utilizando un Conjunto de Nebulización LC Star (Modelo 22F51, PARI Respiradory Equipment, Inc. Midlothian, VA) conducido por una mezcla de gases (CO_2 = 5%, O_2 = 21% y N_2 = 74%) a una presión de 22 psi. El flujo de gas a través del nebulizador a esta presión operativa fue de aproximadamente 3 L/minuto. Los aerosoles generados fueron conducidos hacia dentro de las cámaras por presión positiva. No se utilizó ningún aire de dilución durante la entrega de las soluciones en forma de aerosol. Durante la nebulización de 10 minutos, aproximadamente 1,8 ml de solución fue nebulizada. Este valor se midió gravimétricamente por comparación del peso anterior y posterior a la nebulización del nebulizador cargado.

Los efectos broncoprotectores de los compuestos a evaluar administrados a través de la inhalación fueron evaluados utilizando una pletismografía de cuerpo entero a las 1,5, 24, 48 y 72 horas luego de la dosis. Cuarenta y cinco minutos antes del comienzo de la evaluación pulmonar cada cobayo fue anestesiado con una inyección intramuscular de ketamina, (43,75mg/kg), xilacina (3,50mg/kg) y acepromacina (1,05mg/kg).

El sitio quirúrgico se afeitó y se limpió con alcohol al 70% y se realizó una incisión de entre 2 a 3 cm en la línea central del aspecto ventral del cuello.

Se aisló la vena yugular y se la encanuló con un catéter de polietileno que contenía solución salina (PE-50, Becton Dickinson, Sparks, MD) para poder efectuar infusiones intravenosas de acetilcolina (Ach) o histamina en solución salina. A continuación se diseccionó la tráquea para liberarla y se la encanuló con un tubo de teflón 14G (#NE-014, Small Parts, Miami Lakes, FL). Siempre que fue requerido, la anestesia se mantuvo mediante inyecciones intramusculares adicionales de la mezcla anestésica. La profundidad de la anestesia fue monitoreada y ajustada cuando el animal respondía al pellizco de su pata o cuando su tasa respiratoria era mayor que 100 respiraciones/minuto.

Una vez completadas las encanulaciones, el animal fue colocado en un pletismógrafo (Nº PLY3114, Buxco Electronics, Inc., Sharon, CT) y se insertó una cánula de presión esofágica (PE-160, Becton Dickinson, Sparks, MD) para medir la presión impulsora pulmonar. El tubo de teflón de la tráquea fue sujetado a la apertura del pletismograma para permitir al cobayo respirar aire de la habitación de fuera de la cámara. Entonces se selló la cámara. Se utilizó una lámpara de calentamiento para mantener la temperatura corporal y se inflaron los pulmones de los cobayos 3 veces con 4 ml de aire usando una jeringa de calibración de 10 ml ($_5$520 Series, Hans Rudolph, Kansas City, MO) para asegurar que las vías respiratorias bajas no hubieran colapsado y que el animal no sufriera una hiperventilación.

La evaluación pulmonar se inició después de determinar que los valores de la línea de base estaban dentro del rango entre 0,3 y 0,9 ml por cm de H_2O para la compresibilidad y dentro del rango entre 0,1 y 0,199 cm de H_2O por ml por segundo para la resistencia. Un programa de computación para medición pulmonar de Buxco se utilizó para recolectar y derivar los valores pulmonares.

El comienzo del programa inició el protocolo experimental y la recolección de los datos. Se midieron los cambios en el volumen a través del tiempo que ocurrieron dentro del pletismograma con cada respiración a través de un transductor de presión Buxco. Se calculó una medida de *flujo* para cada respiración mediante la integración de esta señal en el tiempo. Esta señal y los cambios de la presión que mueve el pulmón, se recogieron usando un transductor de presión Sensym (TRD4100), se conectaron mediante un preamplificador Buxco (MAX 2270) a una interfaz para recolección de datos (SFT3400 y SFT3813). Los demás parámetros pulmonares se derivan a partir de estas dos entradas.

Se recogieron los valores de la línea de base durante 5 minutos, después de cuyo tiempo los cobayos se expusieron ya sea con acetilcolina o histamina. Cuando se evaluaron los efectos de antagonista muscarínico de un compuesto de prueba, se administró propanolol (5mg/Kg, iv) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 15 minutos antes de la exposición a la acetilcolina. La acetilcolina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) (0,1 mg/ml) se infundió por vía intravenosa durante 1 minuto desde una bomba de jeringa (sp210iw, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL) con las siguientes dosis y tiempos prescritos desde el comienzo del experimento: 1,9 µg/minuto a los 5 minutos, 3,8 µg/minuto a los 10 minutos, 7,5 µg/minuto a los 15 minutos, 15,0 µg/minuto a los 20 minutos, 30 µg/minuto a los 25 minutos y 60 µg/minuto a los 30 minutos. Como alternativa, se evaluaron los efectos broncoprotectores del compuesto de prueba en el modelo de exposición a la acetilcolina sin pretratamiento con propanolol.

Cuando se evaluaron los efectos agonistas del receptor β_2 adrenérgico

del compuesto de prueba, se infundió histamina (25 µg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) por vía intravenosa durante 1 minuto desde una bomba de jeringa a las siguientes dosis y tiempos prescritos desde el comienzo del experimento: 0,5 µg/minuto a los 5 minutos, 0,9 µg/minuto a los 10 minutos, 1,9 µg/minuto a los 15 minutos, 3,8 µg/minuto a los 20 minutos, 7,5 µg/minuto a los 25 minutos y 15 µg/minuto a los 30 minutos. Si la resistencia o la compresibilidad no retornaron a los valores de la línea de base a los 3 minutos siguientes a cada dosis de acetilcolina o histamina, los pulmones del cobayo se inflaron 3 veces con 4 ml de aire de una jeringa calibrada de 10 ml. Los parámetros pulmonares registrados incluyeron frecuencia respiratoria (respiraciones por minuto), compresibilidad (ml por cm de H_2O) y resistencia pulmonar (cm de H_2O por ml por segundo). Una vez que las medidas de las funciones pulmonares fueron completadas en el minuto 35 de este protocolo, el cobayo fue removido del pletismograma y se le practicó la eutanasia mediante asfixia por dióxido de carbono.

Los datos fueron evaluados de una de las siguientes maneras:

(a) La resistencia pulmonar (R_L) (cm de H_2O por ml por segundo) se calculó a partir de la proporción entre el cambio de presión y el cambio de flujo. La respuesta R_L a la acetilcolina (60 µg/min, IH) se calculó para el vehículo y el compuesto de prueba. Se calculó la respuesta media a la acetilcolina en los animales tratados con vehículo, para cada tiempo de pre-tratamiento, y se utilizó para calcular la inhibición porcentual de la respuesta a la acetilcolina, para el correspondiente tiempo de pre-tratamiento, para cada dosis del compuesto de prueba. Las curvas de inhibición de la respuesta a la dosis para 'R_L' se ajustaron con una ecuación logística de cuatro parámetros usando

GraphPad Prism, versión 3.00 para Windows (Software GraphPad, San Diego, California) para estimar la ID_{50} broncoprotectora (dosis necesaria para inhibir la respuesta de broncoconstricción a la acetilcolina (60 µg/min) en un 50%). Se utilizó la siguiente ecuación:

$$Y = Min + (Max-Min)/(1 + 10^{((\log ID50-X)^{*}\ Pendiente)})$$

donde X es el logaritmo de la dosis, Y es la respuesta (inhibición porcentual del aumento de R_L inducido por acetilcolina). Y comienza en el Mín y se acerca asintóticamente al Máx con un perfil sigmoideo.

(b) La cantidad PD_2, que se define como la cantidad de acetilcolina o histamina que es necesaria para duplicar el valor de la línea de base de resistencia pulmonar, se calculó usando los valores de resistencia pulmonar derivados del flujo y la presión sobre un rango de exposiciones a acetilcolina o histamina usando la siguiente ecuación (que se derivó de una ecuación que se utiliza para calcular los valores PC_{20} que se describe en American Thoracic Society. Guidelines for methacholine and exercise challenge testing - 1999. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; 161: 309-329):

$$PD_2 = \text{antilog}\left[\log C_1 + \frac{(\log C_2 - \log C_1)(2R_0 -}{R_2 - R_1}\right.$$

donde:

C_1 = concentración de acetilcolina o histamina anterior a C_2

C_2 = concentración de acetilcolina o histamina que se obtiene como resultado en por lo menos un aumento al doble de la resistencia pulmonar (R_L)

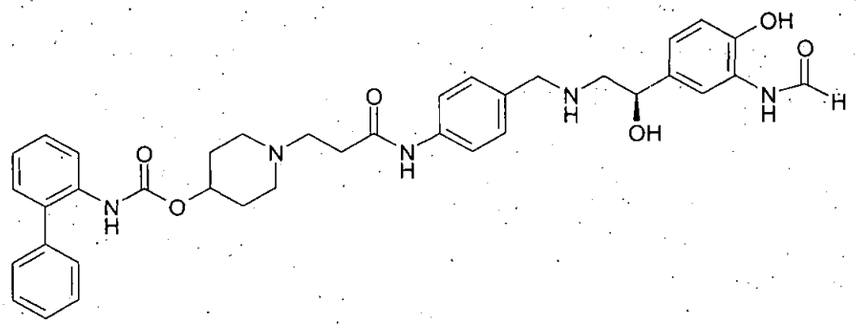
R_0 = valor R_L de la línea de base

R_1 = valor R_L después de C_1

R_2 = valor R_L después de C_2

El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo usando una prueba t de Student de dos colas. Se consideró significativo un valor P <0,05.

En este ensayo se probó el compuesto 50 descrito en la Patente de los EE.UU. Publicación No. US 2004/0167167A1, publicada el 24 de Agosto de 2004. La estructura química del compuesto 50 es la siguiente:



Compuesto 50 para comparación

Este compuesto carece de los grupos alquilo presentes en el anillo fenilo de los compuestos de la presente invención. En este ensayo, el compuesto 50 no mostró una broncoprotección significativa a las 24 horas después de la dosis para dosis dentro del rango entre 3 µg/ml y 300 µg/ml. Los valores PD2x para el compuesto 50 a las 24 horas fueron similares a los del grupo del vehículo (agua).

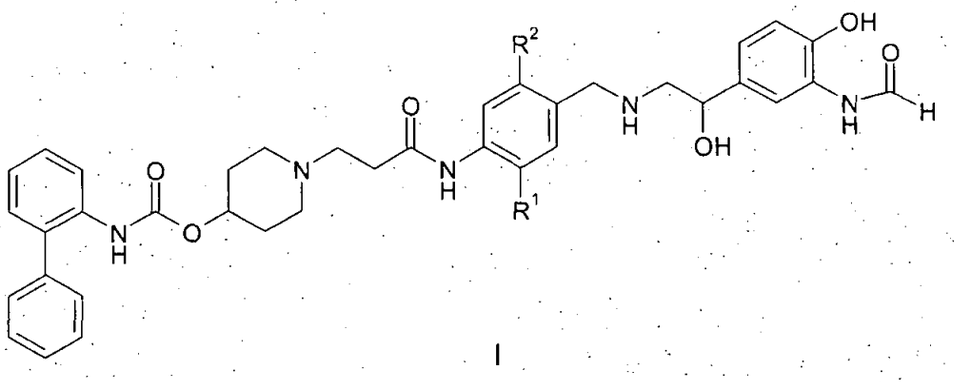
En este ensayo, el salmeterol (100 µg/ml) (un agonista del receptor β_2 adrenérgico) mostró una broncoprotección significativa durante por lo menos 24 horas; y el tiotropio (10 µg/ml) (un antagonista del receptor muscarínico) mostró una broncoprotección significativa durante por lo menos 24 horas.

Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a aspectos

específicos o realizaciones de ésta, aquellos entrenados en la técnica comprenderán que es posible efectuar diversos cambios o sustituir equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Además, hasta el grado permitido por las leyes y las normas aplicables a patentes, todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en la presente se incorporan por completo a modo de referencia en la misma extensión que si cada documento se hubiera incorporado individualmente a modo de referencia en este documento.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



I

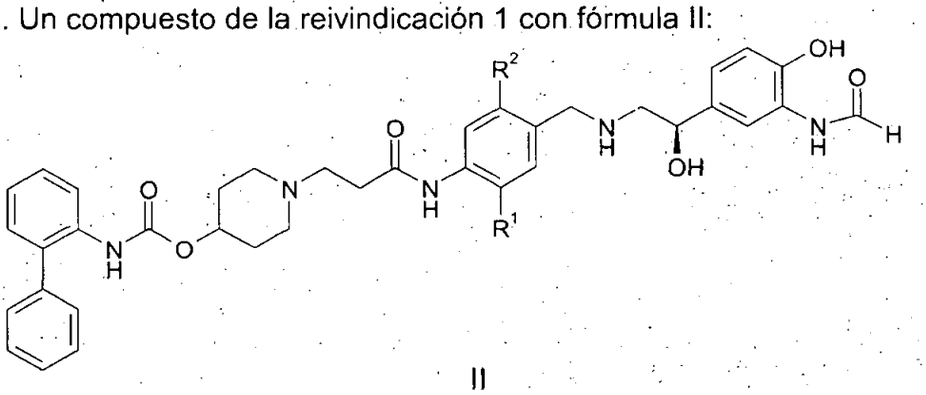
CARACTERIZADO PORQUE

R^1 es metilo o etilo;

R^2 es metilo o etilo;

o una sal o solvato o estereoisómero del mismo aceptable para uso farmacéutico.

2. Un compuesto de la reivindicación 1 con fórmula II:



II

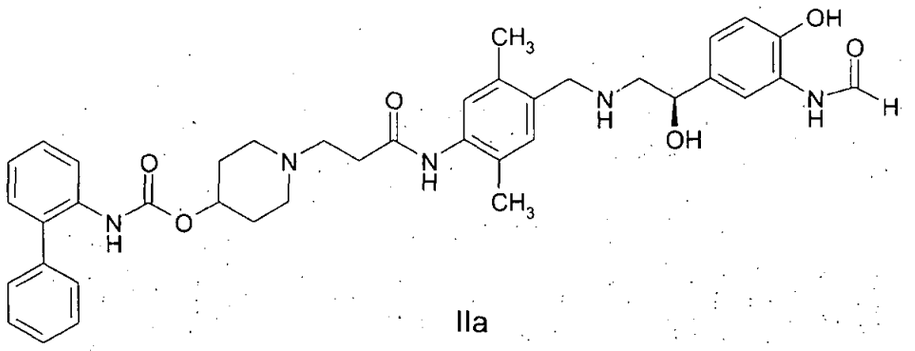
CARACTERIZADO PORQUE

R^1 es metilo o etilo;

R^2 es metilo o etilo;

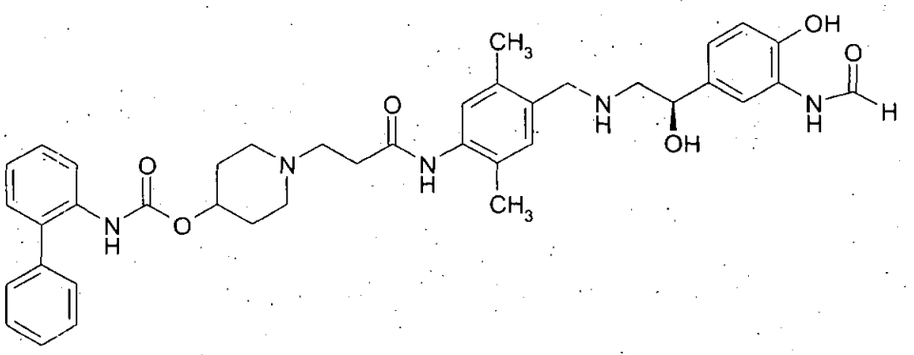
o una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico.

3. Un compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE tiene la fórmula IIa:



IIa

4. Un compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE el compuesto es una sal de un compuesto de fórmula I aceptable para uso farmacéutico Ia:



IIa

5. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende un vehículo aceptable para uso farmacéutico y un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Una composición farmacéutica CARACTERIZADA PORQUE comprende:

(a) un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;

(b) un agente antiinflamatorio esteroide; y

(c) un vehículo aceptable para uso farmacéutico.

7. Una combinación de agentes terapéuticos, CARACTERIZADA PORQUE comprende:

(a) un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y

(b) un agente antiinflamatorio esteroide.

8. un conjunto de elementos que comprende:

(a) una primera composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y un primer vehículo aceptable para uso farmacéutico; y

(b) una segunda composición farmacéutica que comprende un agente antiinflamatorio esteroide y un segundo vehículo aceptable para uso farmacéutico;

CARACTERIZADO PORQUE las primera y segunda composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas separadas.

9. Un método para tratar un trastorno pulmonar, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende administrar a un paciente que necesita tratamiento una cantidad efectiva para uso terapéutico de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

10. Un método para tratar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o asma, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende administrar a un paciente una cantidad efectiva para uso terapéutico de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

11. Un método para producir broncodilatación en un mamífero, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende administrar a un mamífero una cantidad que produce broncodilatación de un compuesto de

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

12. Un método para causar un efecto antagonista sobre un receptor muscarínico y causar un efecto agonista sobre un receptor β_2 adrenérgico en un mamífero, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende administrar al mamífero un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

13. Un método para usar un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 como una herramienta para la investigación, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende realizar un ensayo biológico usando un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

14. Un método para evaluar un compuesto de prueba en un ensayo biológico, CARACTERIZADO PORQUE dicho método comprende:

(a) realizar un ensayo biológico con un compuesto de prueba para dar un primer valor del ensayo;

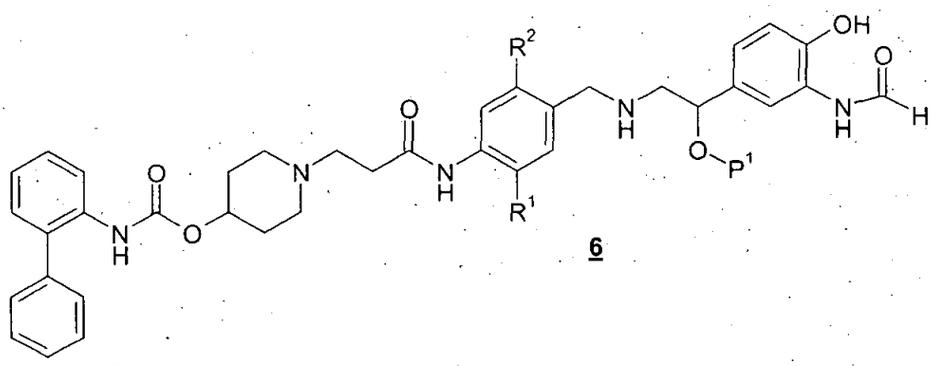
(b) realizar el ensayo biológico con un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para dar un segundo valor del ensayo; donde el paso (a) se lleva a cabo ya sea antes, después o en forma concurrente con el paso (b); y

(c) comparar el primer valor del ensayo que se obtuvo en el paso (a) con el segundo valor del ensayo que se obtuvo en el paso (b).

15. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE el ensayo biológico es un ensayo ligante de un receptor muscarínco o un ensayo ligante de un receptor β_2 adrenérgico.

16. El método de la reivindicación 14, CARACTERIZADO PORQUE el ensayo biológico es un ensayo de broncoprotección en un mamífero.

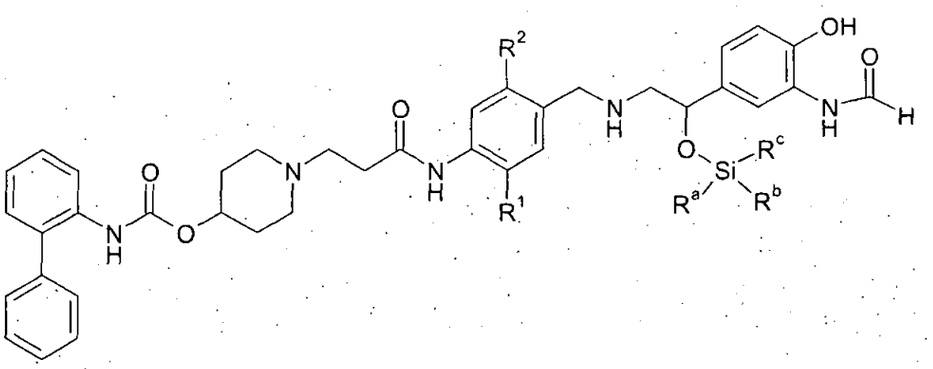
17. Un proceso para preparar el compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE dicho proceso comprende desproteger un compuesto de fórmula **6**:



6

donde P^1 es un grupo protector de hidroxilo, para dar un compuesto de fórmula I.

18. Un proceso para preparar el compuesto de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE el proceso que comprende desproteger un compuesto de fórmula **6a**:

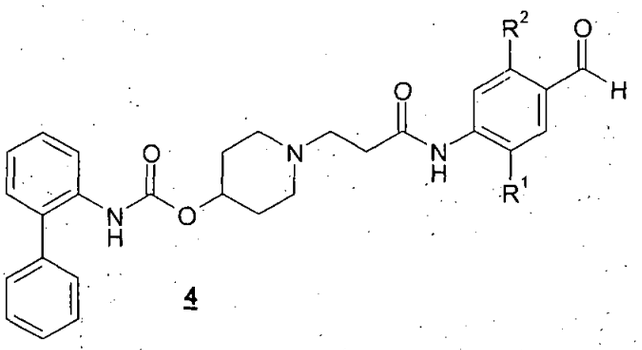


6a

donde R^a, R^b y R^c se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-4}, fenilo, -alquil C_{1-4}-(fenilo), o uno de R^{1a}, R^{1b} y R^{1c} es -O-(alquilo C_{1-4}); para dar un compuesto de fórmula I.

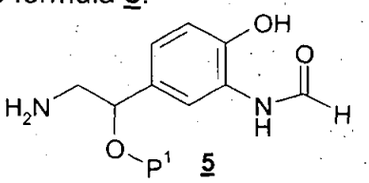
19. Un proceso para preparar el compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE dicho proceso comprende:

(a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula **4**:



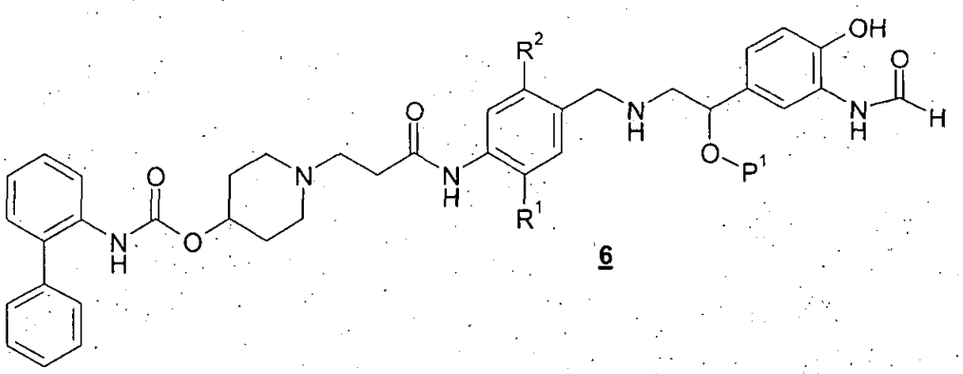
4

con un compuesto de fórmula **5**:



5

donde P^1 es un grupo protector de hidroxilo, en presencia de un agente reductor para dar un compuesto de fórmula **6**:



6

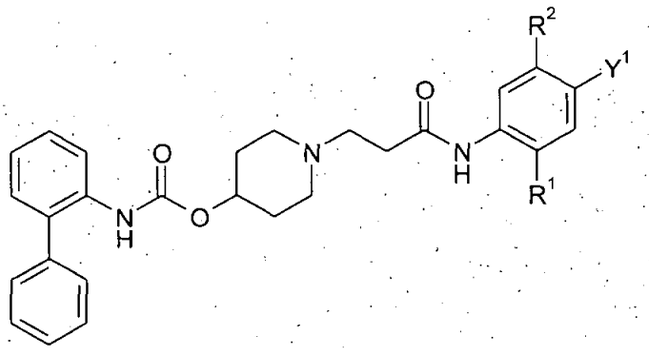
y

(b) desproteger el compuesto de fórmula **6** para dar un compuesto

de fórmula I.

20. Un proceso para preparar una sal aceptable para uso farmacéutico del compuesto de la reivindicación 1 CARACTERIZADO PORQUE dicho proceso comprende poner en contacto un compuesto de fórmula I en forma de base libre con un ácido aceptable para uso farmacéutico.

21. Un intermediario para preparar un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, CARACTERIZADO PORQUE el intermediario es un compuesto de fórmula III:



III

donde

Y^1 se selecciona entre -CHO, -CN, $-CH_2OH$, $-CH(OR^{3a})OR^{3b}$, -C(O)OH, $-C(O)OR^{3c}$, bromo y yodo, donde R^{3a} y R^{3b} se seleccionan independientemente entre alquilo C_{1-6}, o R^{3a} y R^{3b} están unidos para formar un alquileno C_{2-6}, R^{3c} se selecciona entre alquilo C_{1-6};

R^1 es metilo o etilo;

R^2 es metilo o etilo;

o una sal o estereoisómero de los mismos.

22. El compuesto de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE R^1 y R^2 son metilo.

23. El compuesto de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE Y^1 es -CHO.

24. El compuesto de la reivindicación 21, CARACTERIZADO PORQUE Y^1 es -CHO; y R^1 y R^2 son metilo.

25. Un compuesto de la reivindicación 4, CARACTERIZADO PORQUE el compuesto es éster 1-[2-(4-{[(*R*)-2-(3-formilamino-4-hidroxifenil)-2-hidroxietilamino]metil}-2,5-dimetilfenil-carbamoil)etil]piperidin-4-ílico del ácido bifenil-2-ilcarbámico como sal del ácido L-tartárico.

26. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 CARACTERIZADO PORQUE es para utilizar en terapia.

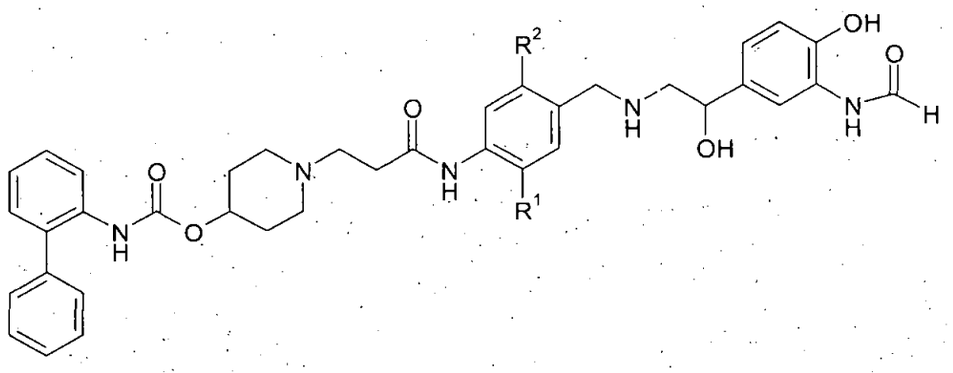
27. Uso de un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 CARACTERIZADO PORQUE es para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno pulmonar.

p.a. Theravance, Inc.

COMPUESTOS DE DIALQUILFENILO CON ACTIVIDAD AGONISTA DEL RECEPTOR β_2 ADRENÉRGICO Y ANTAGONISTA DEL RECEPTOR MUSCARÍNICO

RESUMEN

La presente invención se refiere a compuestos de fórmula I:



I

donde R^1 y R^2 son según se definió en la memoria descriptiva, o una sal o solvato o estereoisómero del mismo aceptables para uso farmacéutico. La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas y combinaciones que comprenden dichos compuestos, procesos e intermediarios para preparar dichos compuestos, y métodos para usar dicho compuesto, por ejemplo, para tratar trastornos pulmonares, como por ejemplo enfermedad pulmonar obstructiva crónica y asma.

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	

0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.009.184 MT/FOP 20060701/0.20.5
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	P-221-PCT
I	Title of Invention	DIALKYLPHENYL COMPOUNDS HAVING BETA2 ADRENERGIC RECEPTOR AGONIST AND MUSCARINIC RECEPTOR ANTAGONIST ACTIVITY
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	THERAVANCE, INC.
II-5	Address	901 Gateway Boulevard South San Francisco, California 94080 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
II-8	Telephone No.	(650)808-6000
II-9	Facsimile No.	(650)808-6078

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-1	Applicant and/or Inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	COLSON, Pierre-Jean
III-1-5	Address	301 Bryant Street #403 San Francisco, California 94107 United States of America
III-1-6	State of nationality	FR
III-1-7	State of residence	US
III-2	Applicant and/or Inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	HUGHES, Adam
III-2-5	Address	1221 Judson Street Belmont, California 94002 United States of America
III-2-6	State of nationality	GB
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or Inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	HUSFELD, Craig
III-3-5	Address	3811 Farm Hill Boulevard Redwood City, California 94061 United States of America
III-3-6	State of nationality	US
III-3-7	State of residence	US
III-4	Applicant and/or Inventor	
III-4-1	This person is	applicant and inventor
III-4-2	Applicant for	US only
III-4-4	Name (LAST, First)	MAMMEN, Mathai
III-4-5	Address	5 Barcelona Circle Redwood City, California 94065 United States of America
III-4-6	State of nationality	CA
III-4-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-5	Applicant and/or Inventor	
III-5-1	This person is	applicant and inventor
III-5-2	Applicant for	US only
III-5-4	Name (LAST, First)	RAPTA, Miroslav
III-5-5	Address	411 E. Duane Avenue Sunnyvale, California 94085 United States of America
III-5-6	State of nationality	SK
III-5-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence	
	The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	HAGENAH, Jeffrey A.
IV-1-2	Address	THERAVANCE, INC. 901 Gateway Boulevard South San Francisco, California 94080 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	(650)808-6406
IV-1-4	Facsimile No.	(650)808-6078
IV-1-6	Agent's registration No.	35,175
IV-2	Additional agent(s)	agent
IV-2-1	Name (LAST, First)	EBERLE, Shelley
IV-2-2	Address	THERAVANCE, INC. 901 Gateway Boulevard South San Francisco, California 94080 United States of America
IV-2-3	Telephone No.	(650)808-4010
IV-2-4	Facsimile No.	(650)808-6078
IV-2-5	e-mail	
IV-2-6	Agent's registration No.	31,411

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IV-3	Additional agent(s)	agent
IV-3-1	Name (LAST, First)	SAXON, Roberta P.
IV-3-2	Address	THERAVANCE, INC. 901 Gateway Boulevard South San Francisco, California 94080 United States of America
IV-3-3	Telephone No.	(650)808-3764
IV-3-4	Facsimile No.	(650)808-6078
IV-3-5	e-mail	
IV-3-6	Agent's registration No.	43,087
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the International filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
V-3	Identification of parent application or patent grant	
V-3-1	Designation	US
V-3-1-1	Kind of parent application or grant	continuation-in-part
V-3-1-2	Parent application or grant No.	60/794,702
V-3-1-3	Parent application or grant date	25 April 2006 (25.04.2006)
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	25 April 2006 (25.04.2006)
VI-1-2	Number	60/794,702
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)

PCT REQUEST

Original (for **SUBMISSION**)

VIII	**Declarations**	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	
IX	**Check list**	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	6	✓
IX-2	Description	70	-
IX-3	Claims	7	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	0	-
IX-7	TOTAL	84	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	other	Transmittal Letter to the US Receiving Office	
IX-18	other	Six (6) General Power of Attorney Documents	
IX-18	other	Receipt Postcard	
IX-19	**Figure of the drawings which should accompany the abstract**		
IX-20	**Language of filing of the international application**	English	
X-1	**Signature of applicant, agent or common representative**		
X-1-1	Name (LAST, First)	HAGENAH, Jeffrey A.	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter I of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Rule 44*bis*)

Applicant's or agent's file reference P-221-PCT	**FOR FURTHER ACTION**	See item 4 below
International application No. PCT/US2007/009925	International filing date *(day/month/year)* 24 April 2007 (24.04.2007)	Priority date *(day/month/year)* 25 April 2006 (25.04.2006)
International Patent Classification (8th edition unless older edition indicated) See relevant information in Form PCT/ISA/237		
Applicant THERAVANCE, INC.		

1. This international preliminary report on patentability (Chapter I) is issued by the International Bureau on behalf of the International Searching Authority under Rule 44 *bis*.1(a).

2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

   In the attached sheets, any reference to the written opinion of the International Searching Authority should be read as a reference to the international preliminary report on patentability (Chapter I) instead.

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

   - [x] Box No. I — Basis of the report
   - [ ] Box No. II — Priority
   - [x] Box No. III — Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
   - [ ] Box No. IV — Lack of unity of invention
   - [x] Box No. V — Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
   - [ ] Box No. VI — Certain documents cited
   - [ ] Box No. VII — Certain defects in the international application
   - [ ] Box No. VIII — Certain observations on the international application

4. The International Bureau will communicate this report to designated Offices in accordance with Rules 44*bis*.3(c) and 93*bis*.1 but not, except where the applicant makes an express request under Article 23(2), before the expiration of 30 months from the priority date (Rule 44*bis* .2).

	Date of issuance of this report 28 October 2008 (28.10.2008)
The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 82 70	Authorized officer Beate Giffo-Schmitt e-mail: pt03.pct@wipo.int

Form PCT/IB/373 (January 2004)

220

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2007/009925	24.04.2007	25.04.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07D211/46 A61K31/445 A61P11/00

Applicant
THERAVANCE, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Wolf, Claudia Telephone No. +49 89 2399-8285

221

Box No. I · Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

   ☐ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

   ☐ on paper

   ☐ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

   ☐ contained in the international application as filed.

   ☐ filed together with the international application in electronic form.

   ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

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. 9-16 in respect of industrial applicability

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

☐ 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 *(specify)*:

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 9-16 in respect of industrial applicability

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-27
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-27
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-8,17-27
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III.

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

For the assessment of the present claims 9-12 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.

Claims 9-16 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).

Re Item V.

1. Reference is made to the following documents:

D1 : WO 2005/051946 A (THERAVANCE INC [US]; MAMMEN MATHAI [US]; DUNHAM SARAH [AU]) 9 June 2005 (2005-06-09)
D2 : US 2004/167167 A1 (MAMMEN MATHAI [US] ET AL MAMMEN MATHAI [US] ET AL) 26 August 2004 (2004-08-26) cited in the application
D3 : WO 2005/087735 A (THERAVANCE INC [US]; MAMMEN MATHAI [US]; JI YU-HUA [US]; MU YONGQI [US) 22 September 2005 (2005-09-22)
D4 : WO 02/076933 A (GLAXO GROUP LTD [GB]; BIGGADIKE KEITH [GB]; FIELD RITA [GB]; GUNTRIP S) 3 October 2002 (2002-10-03)

In the light of the prior art cited above the subject matter claimed appears to be novel and to involve an inventive step (Articles 33(2) and (3) PCT).

D1 discloses compounds having beta2 adrenergic receptor agonist and muscarinic receptor antagonist activity. They differ structurally from the claimed compounds in the heterocyclic fused portion which is not present in the compounds as claimed.

D2 discloses also compounds having beta2 adrenergic receptor agonist and muscarinic receptor antagonist activity. They differ structurally from the claimed compounds in the structural linker between the piperidine and carbamoyl phenyl portion.

D3 discloses compounds useful as muscarinic receptor antagonists. They differ structurally from the claimed compoundsin that X^1 according to D3 cannot be substituted by hydroxy and in the absence of the carbamoyl portion in the compounds of D3.

D4 discloses compounds effective as beta2-adrenoreceptor agonists. They are missing the biphenyl and the piperidinyl portion present in the compounds as claimed.

The intermdediate of formula III claimed in claim 21 of the present application differs from the intermediates of formula VI in claim 19 of D3 in the Y^1 substituent which cannot be amino in the compounds as presently claimed.

2. The technical problem underlying the present application was the provision of further compounds having the combined effect as beta2 adrenoceptor agents and muscarinic receptor antagonists.

D2 is considered to represent the closest prior art for inventive step assessment. A person skilled in the art would not have arrived at the claimed compounds wothout inventive ingenuity starting from the disclosure of D2 alone nor in combination of technical features disclosed in one of the other cited documents. The structural modification of the claimed compounds when compared to the cited prior art appears to be too major to be derivable from the prior art teachings in an obvious manner. The solution appears to be non-obvious in the light of D2 and/or D1, D3 or D4.

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

HAGENAH, Jeffrey, A.
Theravance, Inc.
901 Gateway Boulevard
South San Francisco, CA 94080
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)* 18 September 2008 (18.09.2008)	
Applicant's or agent's file reference P-221-PCT	**IMPORTANT NOTIFICATION**
International application No. PCT/US2007/009925	International filing date *(day/month/year)* 24 April 2007 (24.04.2007)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☒ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
MAMMEN, Mathai 5 Barcelona Circle Redwood City, CA 94065 United States of America	CA	US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address	State of Nationality	State of Residence
MAMMEN, Mathai 1852 Valparaiso Avenue Menlo Park, CA 94025 United States of America	CA	US
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. +41 22 338 87 20	Authorized officer Piriou Pascal e-mail pt03.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 03

228

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-115666- -00000-0000

Fecha: 2008-10-29 15:00:25 Dep: 2020 NULCRLACIONI
Tra: 11 PATENTLIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 227

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

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 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 y 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 se 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 trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Sandra Rodríguez
Firma Responsable

Fecha OCT-29-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia