



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2117542 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 31/428 (2006.01)

Patentstyret

- (21) Oversettelse publisert 2011.11.28
- (80) Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet: 2011.08.17
- (86) Europeisk søknadsnr: 08702047.5
- (86) Europeisk innleveringsdag 2008.02.06
- (87) Den europeiske søknadens Publiseringsdato 2009.11.18
- (30) Prioritet 2007.02.08 GB 0702456
- (84) Utpekte stater AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
- Utpekte samarbeidende stater AL BA MK RS
- (73) Innehaver AstraZeneca AB, 151 85 Södertälje, Sverige
- (72) Oppfinner CADOGAN, Elaine Bridget, AstraZeneca R & D Charnwood Bakewell RoadLoughboroughLeicestershire LE11 5RH, Storbritannia
CONNOLLY, Stephen, AstraZeneca R & D Charnwood Bakewell RoadLoughboroughLeicestershire LE11 5RH, Storbritannia
NICHOLLS, David, John, AstraZeneca R & D Charnwood Bakewell RoadLoughboroughLeicestershire LE11 5RH, Storbritannia
WILEY, Katherine, Elisabeth, AstraZeneca R & D Charnwood Bakewell RoadLoughboroughLeicestershire LE11 5RH, Storbritannia
YOUNG, Alan, AstraZeneca R & D Charnwood Bakewell RoadLoughboroughLeicestershire LE11 5RH, Storbritannia
- (74) Fullmektig Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge
-

- (54) Benevnelse **Kombinasjoner av beta-2-adrenoceptoragonistisk benzotiazolon**
- (56) Anførte publikasjoner WO-A-2007/018461 B1

Beskrivelse

Foreliggende oppfinnelse angår en kombinasjon av to eller flere farmasøytisk aktive substanser for anvendelse ved behandling av respirasjonssykdommer (for eksempel kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS) eller astma).

Den essensielle funksjonen til lungene fordrer en ømtålig struktur med enorm eksponering for miljøet, inkludert forurensende stoffer, mikrober, allergener og carcinogener. Vertsfaktorer, som følger av interaksjoner mellom livstilsvalg og genetisk sammensetning, har innflytelse på responsen på denne eksponeringen. Skade eller infeksjon i lungene kan føre til et bredt spekter av sykdommer i respirasjonssystemet (eller respirasjonssykdommer). Mange av disse sykdommene har stor betydning for folkehelsen. Respirasjonssykdommer omfatter akutt lungeskade, akutt respiratorisk stress-syndrom (ARDS), yrkesmessig lungesykdom, lungekreft, tuberkulose, fibrose, pneumokoniose, pneumoni, emfysem, kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS) og astma.

Blant de mest vanlige respirasjonssykdommene er astma. Astma er generelt definert som en inflammatorisk sykdom i luftveiene med kliniske symptomer som kommer av intermitterende tetthet i luftveiene. Den er klinisk karakterisert ved anfall av hvesing, dyspné og hoste. Den er en kronisk invalidiserende sykdom som synes å være økende i forekomst og alvorlighetsgrad. Det er anslått at 15% av barn og 5% av voksne av befolkningen i industriland lider av astma. Behandling skulle derfor ta sikte på å kontrollere symptomer slik at normalt liv er mulig og samtidig gi grunnlag for behandling av den underliggende inflammasjonen.

KOLS er en betegnelse som refererer til en stor gruppe lungesykdommer som kan forstyrre normal respirasjon. Gjeldende kliniske retningslinjer definerer KOLS som en sykdomstilstand karakterisert ved begrensning av luftstrømmen som ikke er fullstendig reversibel. Begrensningen av luftstrøm er vanligvis både progressiv og forbundet med en abnorm inflammatorisk respons i lungene på skadelige partikler og gasser. Den viktigste bidragsytende kilden til slike partikler og gasser, i det minste i den vestlige verden, er tobakksrøyk. KOLS-pasienter har mange forskjellige symptomer, inkludert hoste, kortpustethet og overflødig produksjon av sputum: slike symptomer stammer fra dysfunksjon av flere cellulære avdelinger, inkludert nøytrofiler, makrofager og epitelceller. De to viktigste tilstandene omfattet av KOLS er kronisk bronkitt og emfysem.

Kronisk bronkitt er en langvarig inflammasjon i luftrørgrenene som forårsaker økt produksjon av slim og andre endringer. Pasientens symptomer er hoste og opphosting av sputum. Kronisk bronkitt kan føre til hyppigere og mer alvorlige respiratoriske infeksjoner, innsnevring og tilstopping av bronkiene, pustevansker og tapt funksjons-
5 evne.

Emfysem er en kronisk lungesykdom som rammer alveolene og/eller endene av de minste luftrørgrenene. Lungene mister sin elastisitet og derfor blir disse områdene av lungene forstørret. Disse forstørrede områdene holder igjen brukt luft og utveksler den
10 ikke effektivt med frisk luft. Dette fører til pustevansker og kan føre til at det ikke blir levert tilstrekkelig oksygen til blodet. Det dominerende symptomet hos pasienter med emfysem er kortpustethet.

Terapeutiske midler anvendt ved behandling av respirasjonssykdommer omfatter
15 kortikosteroider. Kortikosteroider (også kjent som glukokortikosteroider eller glukokortikoider) er potente antiinflammatoriske midler. Selv om deres nøyaktige virkningsmekanisme ikke er åpenbar, er sluttresultatet av kortikosteroidbehandling en reduksjon i antall, aktivitet og bevegelse av inflammatoriske celler inn i bronkiens submukosa, hvilket fører til redusert mottakelighet av luftveiene. Kortikosteroider kan
20 også forårsake redusert avgivelse av bronkiens epitellag, vaskulær permeabilitet og mucussekresjon. Selv om kortikosteroidbehandling kan gi viktige fordeler, er effekten av disse midlene ofte langt fra tilfredsstillende, spesielt ved KOLS. Selv om anvendelse av steroider kan føre til terapeutiske effekter, er det ønskelig å være i stand til å anvende steroider i lave doser for å begrense forekomsten og alvorlighetsgraden
25 av uønskede bivirkninger som kan være forbundet med regelmessig administrering. Nyere studier har også belyst problemet med ervervelse av steroidresistens blant pasienter som lider av respirasjonssykdommer. For eksempel har sigarettrykere med astma blitt funnet å være ufølsomme for korttids inhalert kortikosteroid-behandling, men forskjellen i respons mellom røykere og ikke-røykere synes å være redusert med
30 høy dose inhalert kortikosteroid (Tomlinson et al., Thorax 2005;60:282-287).

En ytterligere klasse av terapeutisk middel anvendt ved behandling av respirasjonssykdommer er bronkodilatorer. Bronkodilatorer kan anvendes for å lindre symptomer på respirasjonssykdommer ved å relaksere bronkiens glatte muskulatur, redusere
35 obstruksjon av luftveiene, redusere hyperinflasjon av lungene og redusere kortpustethet. Typer av bronkodilatorer i klinisk bruk omfatter β_2 adrenoseptoragonister, muskarinreseptor-antagonister og metylxantiner. Bronkodilatorer blir foreskrevet hovedsakelig for symptomatisk lindring og anses ikke å endre biologien for

respirasjonssykdommer.

N-[2-(Diethylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid og dens dihydroklorid og dihydrobromid-salter er β_2 adrenoseptoragonister og er beskrevet i PCT/SE2006/000927 (publisert som WO 2007/018461, se Eksemlene 7, 15 og 16). Forbindelsen og salter derav fremviser minst en 10 ganger selektivitet for β_2 adrenoseptor agonisme fremfor adrenerg α_1D , adrenerg β_1 og dopamin D2-aktiviteter.

10 Kombinasjonsprodukter omfattende en β_2 adrenoseptoragonist og et kortikosteroid er tilgjengelige. Ett slikt produkt er en kombinasjon av budesonid og formoterol fumarat (markedsført av AstraZeneca under varemerket Symbicort®), som har vist seg å være effektiv med hensyn til å kontrollere astma og KOLS, og forbedre livskvalitet hos mange pasienter.

15 Med hensyn til kompleksiteten av respirasjonssykdommer slik som astma og KOLS, er det usannsynlig at en enkelt mediator kan behandle sykdommen tilfredsstillende alene. Selv om kombinasjonsbehandlinger som anvender en β_2 adrenoseptoragonist og et kortikosteroid gir viktige pasientfordeler, er det fortsatt et medisinsk behov for nye
20 behandlinger mot respirasjonssykdommer slik som astma og KOLS, spesielt for behandlinger med sykdomsmodifiserende potensiale.

Følgelig tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk produkt omfattende, i kombinasjon, en første aktiv ingrediens som er *N*-[2-(Diethylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid-dihydrobromid, og en andre aktiv ingrediens som er en muskarin-antagonist som er acclidinium bromid, glykopyrrolat (slik som R,R-, R,S-, S,R-, eller S,S-glykopyrronium-bromid), oksitropium bromid, pirenzepin, telenzepine eller tiotropiumbromid.

30 I et bestemt aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk produkt hvor de første og andre aktive ingrediensene er i former egnet for oral administrering (for eksempel for levering til lungene og/eller luftveiene).

35 Det farmasøytiske produktet ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en første aktiv ingrediens og en andre aktiv ingrediens, og det kan omfatte en tredje aktiv ingrediens. Den tredje aktive ingrediensen kan velges fra listen over andre aktive ingredienser men ville vanligvis ha en ulik virkningsmekanisme. Således kan, for eksempel, den

tredje aktive ingrediensen være: en ikke-steroid glukokortikosteroid reseptor-agonist, kortikosteroid, en CCR1-antagonist eller en PDE4-inhibitor.

De første og andre aktive ingrediensene kan administreres samtidig (enten i et enkelt farmasøytisk preparat {det vil si, de aktive ingrediensene er i en blanding} eller via atskilte preparater), eller sekvensielt eller separat via separate farmasøytiske preparater.

I ett spesielt aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk produkt omfattende de første og andre aktive ingrediensene i blanding. Alternativt kan det farmasøytiske produktet, for eksempel, være et sett omfattende et preparat av den første aktive ingrediensen og et preparat av den andre aktive ingrediensen og, eventuelt, instruksjoner for samtidig, sekvensiell eller separat administrering av preparatene til en pasient med behov derfor.

I ett aspekt av oppfinnelsen er muskarinreseptor-antagonisten en langtidsvirkende muskarinreseptor-antagonist, dvs. en muskarinreseptor-antagonist med virkning som vedvarer i mer enn 12 timer. Eksempler på langtidsvirkende muskarinreseptor-antagonister omfatter tiotropiumbromid.

I et annet aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk produkt omfattende, i kombinasjon, en første aktiv ingrediens som er *N*-[2-(Dietyl amino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid-dihydrobromid, og en andre aktiv ingrediens er tiotropiumbromid.

Den første aktive ingrediensen og den andre aktive ingrediensen av det farmasøytiske produktet ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres samtidig, sekvensielt eller separat for å behandle respirasjonssykdommer. Ved samtidig menes det at de aktive ingrediensene er i blanding, eller de kan være i atskilte kammere i samme inhalator. Med sekvensielt menes det at de aktive ingrediensene blir administrert, i hvilken som helst rekkefølge, én umiddelbart etter den andre. De har fortsatt den ønskede virkningen dersom de administreres separat, men når de administreres på denne måten blir de vanligvis administrert med mindre enn 4 timers mellomrom, fortrinnsvis mindre enn to timers mellomrom, mer passende mindre enn 30 minutters mellomrom og mest foretrukket mindre enn 10 minutters mellomrom, for eksempel mindre enn 10 minutter men ikke den ene umiddelbart etter den andre.

De aktive ingrediensene ifølge foreliggende oppfinnelse kan administreres ved oral eller parenteral (f.eks. intravenøs, subkutan, intramuskulær eller intraartikulær) administrering ved anvendelse av konvensjonelle systemiske doseringsformer, slik som tabletter, kapsler, piller, pulvere, vandige eller oljeholdige løsninger eller suspensjoner, emulsjoner og sterile injiserbare vandige eller oljeholdige løsninger eller suspensjoner. De aktive ingrediensene kan leveres til lungene og/eller luftveiene via oral administrering i form av en løsning, suspensjon, aerosol eller tørt pulver formulering. Disse doseringsformene vil vanligvis omfatte én eller flere farmasøytisk akseptable ingredienser som kan velges fra, for eksempel, fra en adjuvans, bærer, bindemiddel, glattemiddel, fortynningsmiddel, stabiliseringsmiddel, buffermiddel, emulgeringsmiddel, viskositetsregulerende middel, surfaktant, konserveringsmiddel, smakstilsetning eller fargestoff. Som det vil forstås av fagfolk på området, er den mest egnede metoden for administrering av de aktive ingrediensene avhengig av flere faktorer.

I en annen utførelsesform blir de første og andre aktive ingrediensene administrert via en enkelt farmasøytisk sammensetning (det vil si, de første og andre aktive ingrediensene er i en blanding). Derfor tilveiebringer foreliggende oppfinnelse videre en farmasøytisk sammensetning omfattende, i blanding, en første aktiv ingrediens som er *N*-[2-(Diethylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid-dihydrobromid, og en andre aktiv ingrediens som definert ovenfor. Den farmasøytiske sammensetningen omfatter eventuelt videre en farmasøytisk akseptabel adjuvans, fortynningsmiddel eller bærer.

De farmasøytiske sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved å blande den første aktive ingrediensen med den andre aktive ingrediensen og en farmasøytisk akseptabel adjuvans, fortynningsmiddel eller bærer. Derfor tilveiebringes, i et ytterligere aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse, en fremgangsmåte for fremstilling av en farmasøytisk sammensetning, som omfatter å blande de første og andre aktive ingrediensene og en farmasøytisk akseptabel adjuvans, fortynningsmiddel eller bærer.

Det vil forstås at den terapeutiske dosen av hver aktive ingrediens administrert i henhold til foreliggende oppfinnelse vil variere avhengig av den bestemte aktive ingrediensen som anvendes, metoden ved hvilken den aktive ingrediensen skal administreres, og tilstanden eller sykdommen som skal behandles.

I én utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse blir den første aktive ingrediensen

administrert ved inhalasjon. Når administrert ved inhalasjon vil dosen av den første aktive ingrediensen vanligvis være i området på fra 0,1 mikrogram (μg) til 5000 μg , 0,1 til 1000 μg , 0,1 til 500 μg , 0,1 til 100 μg , 0,1 til 50 μg , 0,1 til 5 μg , 5 til 5000 μg , 5 til 1000 μg , 5 til 500 μg , 5 til 100 μg , 5 til 50 μg , 5 til 10 μg , 10 til 5000 μg , 10 til 1000 μg , 10 til 500 μg , 10 til 100 μg , 10 til 50 μg , 20 til 5000 μg , 20 til 1000 μg , 20 til 500 μg , 20 til 100 μg , 20 til 50 μg , 50 til 5000 μg , 50 til 1000 μg , 50 til 500 μg , 50 til 100 μg , 100 til 5000 μg , 100 til 1000 μg eller 100 til 500 μg . Dosen vil vanligvis bli administrert fra 1 til 4 ganger pr. dag, fortrinnsvis én gang eller to ganger pr. dag, og mest foretrukket én gang daglig.

10

I én utførelsesform ifølge foreliggende oppfinnelse blir den andre aktive ingrediensen administrert ved inhalasjon. Når administrert via inhalasjon vil dosen av den andre aktive ingrediensen vanligvis være i området på fra 0,1 mikrogram (μg) til 5000 μg , 0,1 til 1000 μg , 0,1 til 500 μg , 0,1 til 100 μg , 0,1 til 50 μg , 0,1 til 5 μg , 5 til 5000 μg , 5 til 1000 μg , 5 til 500 μg , 5 til 100 μg , 5 til 50 μg , 5 til 10 μg , 10 til 5000 μg , 10 til 1000 μg , 10 til 500 μg , 10 til 100 μg , 10 til 50 μg , 20 til 5000 μg , 20 til 1000 μg , 20 til 500 μg , 20 til 100 μg , 20 til 50 μg , 50 til 5000 μg , 50 til 1000 μg , 50 til 500 μg , 50 til 100 μg , 100 til 5000 μg , 100 til 1000 μg eller 100 til 500 μg . Dosen vil vanligvis bli administrert fra 1 til 4 ganger pr. dag, fortrinnsvis én gang eller to ganger pr. dag, og mest foretrukket én gang daglig.

20

I en annen utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk produkt hvor det molare forholdet mellom første aktive ingrediens og andre aktive ingrediens er fra 1:1000 til 1000:1, slik som fra 1:100 til 100:1, for eksempel fra 1:50 til 50: 1, for eksempel 1:20 til 20:1.

25

I én utførelsesform tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et farmasøytisk produkt omfattende, i kombinasjon, en første aktiv ingrediens som definert ovenfor, og en andre aktiv ingrediens som definert ovenfor, hvor hver aktive ingrediens er formulert for administrering via inhalasjon. I et ytterligere aspekt av denne utførelsesformen, er det farmasøytiske produktet i form av en farmasøytisk sammensetning omfattende den første og andre aktive ingrediensen i blanding, og hvilken sammensetning er formulert for administrering ved inhalasjon.

30

De aktive ingrediensene ifølge foreliggende oppfinnelse blir beleilig levert via oral administrering ved inhalasjon til lungene og/eller luftveiene i form av en løsning, suspensjon, aerosol eller tørt pulver (slik som en agglomerert eller ordinert blanding) formulering. For eksempel kan en inhalasjonsanordning med oppmålt dose anvendes

35

for å administrere de aktive ingrediensene, dispergert i et egnet drivmiddel og med eller uten en ytterligere eksipiens slik som etanol, en surfaktant, glattemiddel eller stabiliseringsmiddel. Et egnet drivmiddel omfatter et hydrokarbon, klorfluorkarbon eller et hydrofluoralkan (f.eks. heptafluoralkan) drivmiddel, eller en blanding av
5 hvilke som helst av slike drivmidler, for eksempel i en spray ("pressurised metered dose")-inhalator (pMDI). Foretrukne drivmidler er P134a og P227, som hver kan anvendes alene eller i kombinasjon med et annet drivmiddel og/eller surfaktant og/eller annen eksipiens. En nebulisert vandig suspensjon eller, foretrukket, løsning kan også anvendes, med eller uten et egnet pH og/eller tonisitetsjusterende middel,
10 enten som en enhetsdose eller flerdose formulering. En egnet anordning for levering av et tørt pulver er Turbuhaler.

Det farmasøytiske produktet ifølge foreliggende oppfinnelsen kan, for eksempel, administreres: via en inhalator som har de første og andre aktive ingrediensene i
15 atskilte kammere i inhalatoren slik at de aktive ingrediensene ved administrering blandes enten i munnstykket til inhalatoren eller i munnen til en pasient eller begge deler (for samtidig anvendelse); eller, når de første og andre aktive ingrediensene er i separate inhalatorer, via separate inhalatorer (for separat eller sekvensiell anvendelse); eller de første og andre aktive ingrediensene er i blanding i en inhalator når
20 inhalatoren gis til en pasient (for samtidig bruk).

En tørt pulver-inhalator kan anvendes for å administrere de aktive ingrediensene, alene eller i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer (slik som laktose), i det siste tilfellet enten som et fint oppdelt pulver eller som en ordinert blanding. Tørt
25 pulver-inhalatoren kan ha enkeltdose eller flerdose og kan anvende et tørt pulver eller en kapsel inneholdende pulver.

Inhalator med oppmålt dose, nebulisator og tørt pulver inhalator-anordninger er velkjente og mange forskjellige slike anordninger er tilgjengelig.

30

Det farmasøytiske produktet ifølge foreliggende oppfinnelse kan anvendes for å behandle sykdommer i luftveiene slik som obstruktive sykdommer i luftveiene inkludert: astma, inkludert bronkial, allergisk, endogen, eksogen, treningsindusert, medikamentindusert (inkludert aspirin og NSAID-indusert) og støvindusert astma,
35 både intermitterende og persisterende og av alle alvorlighetsgrader, og andre årsaker til overfølsomhet i luftveiene; kronisk obstruktiv lungesykdom (KOLS); bronkitt, inkludert infeksiøs og eosinofil bronkitt, og kronisk bronkitt; emfysem; bronchiectasia; cystisk fibrose; sarkoidose; farmer's lung og beslektede sykdommer;

overfølsomhetspneumonitt; lungefibrose, inkludert kryptogen fibroserende alveolitt, idiopatisk interstitiell pneumoni, fibrose som kompliserer antineoplastisk behandling og kronisk infeksjon, inkludert tuberkulose og aspergillose og andre soppinfeksjoner; komplikasjoner ved lungetransplantasjon; vaskulitt og trombotiske forstyrrelser i lungevaskulaturen, og pulmonær hypertensjon; antitussiv effekt inkludert behandling av kronisk hoste forbundet med inflammatoriske og sekretoriske lidelser i luftveiene, og iatrogenisk hoste; akutt og kronisk rhinitt inkludert rhinitt medicamentosa, og vasomotorisk rhinitt; perennial og sesongrelatert allergisk rhinitt inkludert rhinitis nervosa (høysnue); nasal polypose; akutt virusinfeksjon inkludert forkjølelse, og infeksjon som skyldes respiratorisk syncytialvirus, influensa, coronavirus (inkludert SARS) og adenovirus.

Følgelig tilveiebringer foreliggende oppfinnelse videre et farmasøytisk produkt, sett eller sammensetning ifølge oppfinnelsen for anvendelse i terapi.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer videre anvendelse av et farmasøytisk produkt ifølge oppfinnelsen ved fremstilling av et medikament for behandling av en respirasjonssykdom, spesielt kronisk obstruktiv lungesykdom eller astma, for eksempel kronisk obstruktiv lungesykdom.

I et ytterligere aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse anvendelse av et farmasøytisk produkt, sett eller sammensetning som beskrevet i det foregående for behandling av en respirasjonssykdom, spesielt kronisk obstruktiv lungesykdom eller astma, for eksempel kronisk obstruktiv lungesykdom.

I konteksten til foreliggende spesifisering omfatter betegnelsen "terapi" også "profylakse" med mindre noe annet er spesifikt angitt. Betegnelsene "terapeutisk" og "terapeutiske" skal oppfattes i samsvar med dette. Profylakse er forventet å være spesielt relevant med hensyn til behandling av personer som har gjennomgått en tidligere episode av, eller på annen måte er ansett å være med økende risiko for den aktuelle lidelsen eller sykdommen. Personer med risiko for å utvikle en spesiell lidelse eller sykdom omfatter generelt de som har en familiehistorie med lidelsen eller sykdommen, eller de som ved genetisk testing eller screening har blitt identifisert som å være spesielt mottagelige for å utvikle lidelsen eller sykdommen.

Generelle preparative metoder

Her følger preparative metoder for *N*-[2-(Diethylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroxy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-

naftyl)etoksy]propanamid dihydrobromid (Fremstillingene 1 og 2) og også analyser og data som viser aktiviteten av denne forbindelsen (kalt Forbindelse A i analysene og Tabell 1 nedenfor).

- 5 ¹H NMR-spektra ble registrert ved et Varian *Inova* 400 MHz eller et Varian *Mercury-VX* 300 MHz-instrument. De sentrale toppene av kloroform-*d* (δ_H 7,27 ppm), dimetylsulfoksid-*d*₆ (δ_H 2.50 ppm), acetonitril-*d*₃ (δ_H 1.95 ppm) eller metanol-*d*₄ (δ_H 3.31 ppm) ble anvendt som interne referanser. Kolonnekromatografi ble utført ved anvendelse av silikagel (0,040-0,063 mm, Mercy). Dersom ikke angitt annerledes, var
- 10 utgangsmaterialer kommersielt tilgjengelig. Alle løsningsmidler og kommersielle reagenser var av laboratoriekvalitet og ble anvendt som mottatt.

De følgende metodene ble anvendt for LC/MS-analyse:

- 15 Instrument Agilent 1100; Kolonne Waters Symmetry 2,1 x 30 mm; Masse APCI; Strømningshastighet 0,7 ml/min; Bølgelengde 254 nm; Løsningsmiddel A: vann + 0,1% TFA; Løsningsmiddel B: acetonitril + 0,1% TFA ; Gradient 15-95%/B 8 min, 95% B 1 min.

- 20 Analytisk kromatografi ble kjørt på en Symmetry C₁₈-kolonne, 2,1 x 30 mm med 3,5 μ m partikkelstørrelse, med acetonitril/vann/0,1% trifluoreddiksyre som mobil fase i en gradient fra 5% til 95% acetonitril over 8 minutter ved en strømning på 0,7 ml/min.

Forkortelsene eller betegnelsene anvendt i eksemplene har følgende betydninger:

SCX:

Fastfaseekstraksjon med en sulfonsyre sorbent

25 HPLC:

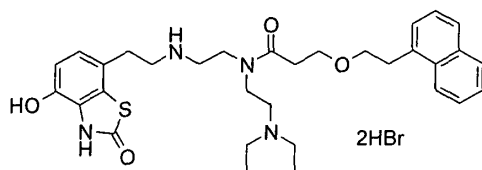
Høytrykksvæskerkromatografi

DMF:

N,N-Dimetylformamid

Fremstilling 1

- 30 *N*-[2-(Diethylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroxy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid-dihydrobromid



a) *tert*-Butyl 3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanoat

1-Naftalenetanol (10 g) ble behandlet med benzyltrimetylammoniumhydroksid (Triton B[®]; 0,9 ml av en 40% løsning i metanol) og den resulterende blandingen omrørt *in vacuo* i 30 minutter. Blandingen ble deretter avkjølt til 0°C og behandlet med *tert*-butyl-acrylat (8,19 g). Den resulterende blandingen ble langsomt oppvarmet til romtemperatur og omrørt over natten. Den ubehandlede blandingen ble deretter absorbert til aluminiumoksid (30 g) og eluert med dietyleter (200 ml). De organiske ekstraktene ble konsentrert hvilket ga et råmateriale (16,6 g) som ble renset ved flash silica-kromatografi ved eluering med 1:8, dietyleter : heksan hvilket ga tittelforbindelsen (12,83 g).

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.05 (dd, 1H), 7.84 (dd, 1H), 7.72 (dd, 1H), 7.54-7.34 (m, 4H), 3.81-3.69 (m, 4H), 3.35 (t, 2H), 2.52-2.47 (m, 2H), 1.45 (s, 9H).

b) 3-[2-(1-Nafty)etoksy]propionsyre

tert-Butyl 3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanoat (6,19 g) ble tatt opp i diklormetan (30 ml) og behandlet med trifluoreddiksyre (5 ml). Den resulterende løsningen ble omrørt ved romtemperatur i 2 timer, ytterligere 1 ml trifluoreddiksyre ble tilsatt og løsningen omrørt over natten. Blandingen ble konsentrert, tatt opp i 2M natriumhydroksid-løsning (30 ml) og vasket med eter (2 x 20 ml). Det vandige laget ble deretter surgjort (ved anvendelse av 1 M saltsyre) og ekstrahert med eter (2 x 30 ml). De kombinerte organiske ekstraktene ble vasket med saltoppløsning (20 ml), tørket over vannfritt magnesiumsulfat, filtrert og konsentrert *in vacuo* hvilket gav tittelforbindelsen (5,66 g) som en klar olje.

¹H NMR (CDCl₃) δ 8.05 (bs, 1 H), 7.85 (bs, 1 H), 7.74 (bs, 1H), 7.50-7.38 (m, 4H), 3.84-3.75 (bm, 4H), 3.39 (bs, 2H), 2.65 (bs, 2H).

c) *N*-(2-Dietylaminøetyl)-*N*-(2-hydroksyetyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]-propanamid

Oksalylklorid (0,33 g) ble tilsatt dråpevis til en løsning av 3-[2-(1-naftyl)etoksy]-propionsyre (0,53 g) i diklormetan (10 ml), dimetylformamid (1 dråpe) ble tilsatt og omrøring fortsatte ved romtemperatur i 1 time. Blandingen ble deretter konsentrert, oppløst igjen i diklormetan (10 ml) og tilsatt dråpevis til en løsning av 2-(2-dietyl-

aminoethylamino)etanol (0,35 g) og diisopropyletylamin (0,56 g) i diklormetan (10 ml). Den resulterende blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 1 time, fortynnet (diklormetan, 50 ml), vasket med vann (2 x 20 ml), saltoppløsning (20 ml), tørket over magnesiumsulfat og konsentrert hvilket ga råproduktet (0,91 g) som ble rensset ved
 5 flash kolonnekromatografi (eluering med 5-7% metanol i diklormetan) hvilket ga 0,63 g av tittelforbindelsen.

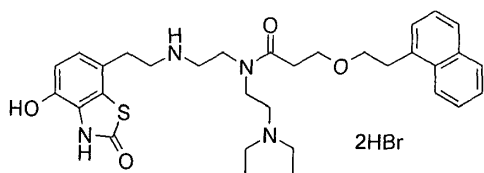
¹H NMR (CDCl₃) δ 8.05 (d, 1H), 7.85 (d, 1H), 7.73 (d, 1H), 7.52-7.47 (m, 2H), 7.42-7.35 (m, 2H), 3.84-3.78 (m, 6H), 3.72-3.70 (m, 1/2H), 3.45-3.35 (m, 6H), 2.79-2.77 (m, 1+1/2H), 2.62-2.58 (m, 2H), 2.54-2.49 (m, 4H), 1.04-1.01 (m, 6H).

10 **d) *N*-[2-(Diethylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid**

En løsning av dimetylsulfoksid (0,097 g) i diklormetan (1 ml) ble tilsatt til en løsning av oksalyklorid (0,079 g) i diklormetan (10 ml) ved -78°C. Reaksjonen ble omrørt i 15 minutter og deretter ble en løsning av *N*-(2-diethylaminoetyl)-*N*-(2-hydroksyetyl)-3-
 15 [2-(1-naftyl)etoksy]propanamid (0,22 g) i diklormetan (1 ml+ 1 ml vasking) tilsatt og reaksjonsblandingen omrørt i ytterligere 15 minutter. Trietylamin (0,29 g) ble tilsatt og reaksjonen tillatt å oppvarmes til romtemperatur over 1 time, blandingen ble deretter fortynnet (diklormetan 30 ml), de organiske fasene vasket med natriumbikarbonat (20 ml), saltoppløsning (20 ml), tørket over vannfri magnesiumsulfat,
 20 filtrert og konsentrert *in vacuo* hvilket ga tittelforbindelsen (0,21 g).

Råproduktet ble oppløst i metanol (10 ml) og 7-(2-aminoetyl)-4-hydroksy-1,3-benzotiazol-2(3H)-on-hydroklorid (fremstilt i henhold til metoden vist i Organic Process Research & Development 2004, 8(4), 628-642; 0,131 g) ble tilsatt sammen med eddiksyre (0,1 ml) og vann (0,1 ml). Etter omrøring ved romtemperatur i 30 minutter,
 25 ble natriumcyanoborhydrid (0,020 g) tilsatt og reaksjonsblandingen ble omrørt over natten. Ammoniakk (7N i metanol, 1 ml) ble tilsatt og blandingen ble konsentrert. Det rå residuet ble rensset ved flash kolonnekromatografi ved eluering med 1% ammoniakk; 5%-7% metanol i diklormetan. Råproduktet ble anvendt direkte i neste trinn.

30 **e) *N*-[2-(Diethylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid-dihydrobromid**



N-[2-(Diethylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid (0,052 g) ble oppløst i etanol (1,5 ml) og behandlet med 48 % hydrobromsyre (21 µl). Det hvite faste dihydro-

bromidsaltet (0,058 g) ble oppsamlet ved filtrering.

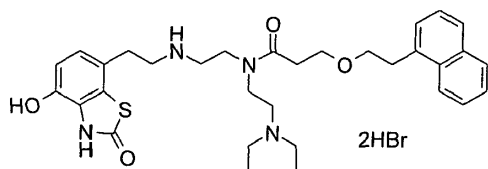
MS: APCI(+ve) 579 (M+1)

¹H NMR δ(DMSO) 11.78-11.71 (m, 1H), 10,11-10,06 (m, 1H), 9.51-9.43 (m, 0,33H), 9.21-9.13 (m, 0,66H), 8.75-8.66 (m, 1H), 8.59-8.51 (m, 1H), 8.06 (d, 1H), 7.95-7.90

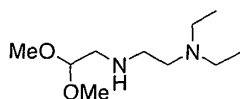
(m, 1H), 7.79 (d, 1H), 7.60-7.48 (m, 2H), 7.47-7.39 (m, 2H), 6.87 (t, 1H), 6.76 (dd, 1H), 3.78-3.53 (m, 10H), 3.25-3.09 (m, 10H), 2.91-2.80 (m, 2H), 2.73-2.61 (m, 2H), 1.26-1.15 (m, 6H). NMR indikerer omtrent 2:1 blanding av rotamerer ved 298K.

Fremstilling 2

N-[2-(Diethylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid-dihydrobromid



a) *N'*-(2,2-Dimetoksyetyl)-*N,N*-dietyl-etan-1,2-diamin.

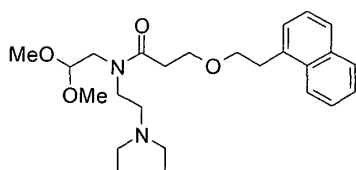


En løsning av *N,N*-dietyl-etylendiamin (150 g) i metanol (500 ml) ble behandlet dråpevis hurtig med glyksal dimetylacetal (60 vekt% oppløsn. i vann, 225 g) ved 10-15°C. Etter at tilsetningen var fullført ble løsningen oppvarmet til 15°C, deretter til 22°C og ble hensatt ved denne temperaturen i 16 timer. Reaksjonsblandingen ble behandlet med 5% palladium på karbon (Johnson-Matthey type 38H paste, 15 g) og

hydrogenert ved 6 bar helt til reaksjonen var fullstendig, som bedømt ved GC/MS. Katalysatoren ble fjernet ved filtrering og filtratet evaporert til tørrhet (toluen azeotrop, 2,5 l), hvilket ga 196,2 g av tittelforbindelsen.

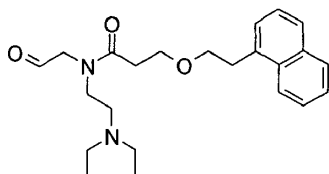
¹H NMR (CDCl₃): 4.48 (t, 1H), 3.39 (s, 6H), 2.75 (d, 2H), 2.69 (t, 2H), 2.57-2.48 (m, 6H), 1.01 (ts, 6H).

b) N-[2-(Diethylamino)etyl]-N-(2,2-dimetoksyetyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]-propanamid.



Oksalylklorid (151 ml) ble tilsatt dråpevis over 45 minutter til en løsning av 3-[2-(1-naftyl)etoksy]propionsyre (389 g) (Eksempel 7 trinn b)) i diklormetan (2,1 l) og DMF (0,5 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt i ytterligere 16 timer. Blandingen ble deretter konsentrert, oppløst igjen i DCM (1,7 l) og tilsatt dråpevis over 1,75 timer ved 0°C til en løsning av N-(2,2-dimetoksyetyl)-N,N-dietyletan-1,2-diamin (325 g) og isopropyldietylamin (551 ml) i DCM (1,7 l). Den resulterende blandingen ble omrørt ved romtemperatur i 3 timer, vasket med vandig mettet natriumbikarbonatløsning (5x1 l), vann (1,5 l) og tørket over natriumsulfat og konsentrert hvilket ga 650 g av tittelforbindelsen. m/e 431 (M+H⁺, 100%)

c) N-[2-(Diethylamino)etyl]-3-[2-(1-naftyl)etoksy]-N-(2-oksoetyl)propanamid.

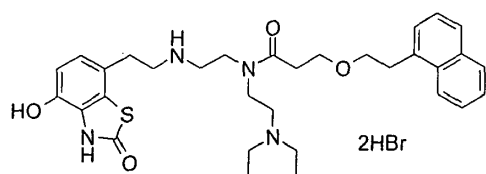


En løsning av N-[2-(diethylamino)etyl]-N-(2,2-dimetoksyetyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]-propanamid (93 g) i DCM (270 ml) ble behandlet dråpevis ved 0°C med trifluor-eddiksyre (270 ml) over 1,5 timer. Etter tilsetningen ble reaksjonsblandingen tillatt å oppvarmes til romtemperatur og omrørt i ytterligere 1 time. Reaksjonsblandingen ble konsentrert og residuet helt inn i vandig mettet natriumbikarbonatløsning (1800 ml, forsiktig!). Den vandige blandingen ble ekstrahert med DCM (4x400 ml) og de

kombinerte ekstraktene ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert. Residuet ble anvendt direkte i den påfølgende reaksjonen.

d) N-[2-(Diethylamino)etyl]-N-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid-dihydrobromid.

5



- En suspensjon av 7-(2-amino-etyl)-4-hydroksy-3H-benzotiazol-2-on hydroklorid (53g) i tørr NMP (216 ml) ble oppvarmet til 60°C og behandlet i én porsjon med en
- 10 løsning av NaOH (8,2 g) i metanol (102 ml). Den knallorange suspensjonen ble avkjølt til romtemperatur og behandlet dråpevis med en løsning av N-[2-(dietyl-amino)etyl]-3-[2-(1-naftyl)etoksy]-N-(2-oksoetyl)propanamid i diklormetan (475 ml) over 20 minutter. Reaksjonen ble hensatt til omrøring i 25 minutter. Natriumtri-acetoksyborhydrid (91,5 g) ble deretter tilsatt i porsjoner over 20 minutter og
- 15 blandingen omrørt i ytterligere 50 minutter. Reaksjonsblandingen ble helt opp i vann (1,8 l) og den sure løsningen (pH5) ble vasket med tert. butyl metyl eter (TBME) (3x500 ml). Den vandige fasen ble gjort basisk til pH8 ved tilsetning av fast kalium-karbonat og ekstrahert med diklormetan (3x750 ml); de kombinerte organiske ekstraktene ble tørket over magnesiumsulfat og konsentrert hvilket gav en mørk olje.
- 20 Denne ble oppløst i etanol (200 ml) og 48% vandig hydrobromsyre (73 ml) ble tilsatt. Løsningen ble modnet i 30 minutter og deretter evaporert til tørrhet. Residuet ble triturert med etanol (560 ml); det resulterende faste stoffet ble oppsamlet ved filtrering og tørket in vacuo ved 50°C. Det klebrige faste stoffet ble suspendert i kokende etanol (100 ml) og filtrert mens det var varmt. Det oppsamlede faste stoffet ble tørket in
- 25 vacuo ved 50°C. Dette materialet ble rekrystallisert fra etanol/vann (3:1, 500 ml). Etter å ha stått over natten ble det resulterende faste stoffet oppsamlet ved filtrering og vasket med iskald etanol (75 ml). Tørking in vacuo ved 50°C i 24 timer ga 57g av tittelforbindelsen.
- 30 Alternative salter av N-[2-(Diethylamino)etyl]-N-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid kan fremstilles ved å blande en passende syre med N-[2-(Diethylamino)etyl]-N-(2-{[2-(4-

hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid i et løsningsmiddel. Eksempler er gitt nedenfor.

Adrenerg β 2-mediert cAMP-produksjon

Cellepreparering

- 5 H292-celler ble dyrket i 225cm² kolber inkubator ved 37°C, 5% CO₂ i RPMI medium inneholdende, 10% (v/v) FBS (føtalt bovint serum) og 2 mM L-glutamin.

Ekspérimentell metode

- 10 Adherente H292-celler ble fjernet fra vevskulturkolber ved behandling med Accutase celle løsrivings-løsning i 15 minutter. Kolber ble inkubert i 15 minutter i en fuktet inkubator ved 37°C, 5% CO₂. Løsnede celler ble resuspendert i RPMI-medium (inneholdende 10% (v/v) FBS og 2 mM L-glutamin) ved $0,05 \times 10^6$ celler per ml. 5000 celler i 100 μ l ble tilsatt til hver brønn av en vevskulturbehandlet 96-brønns plate og cellene inkubert over natten i en fuktet inkubator ved 37°C, 5% CO₂.
- 15 Kulturmedium ble fjernet og celler ble vasket to ganger med 100 μ l analysebuffer og erstattet med 50 μ l analysebuffer (HBSS-løsning inneholdende 10mM HEPES pH7,4 og 5 mM glukose). Cellene fikk hvile ved romtemperatur i 20 minutter hvorefter 25 μ l rolipram (1,2 mM dannet i analysebuffer inneholdende 2,4% (v/v) dimetylsulfoksid) ble tilsatt. Cellene ble inkubert med rolipram i 10 minutter hvorefter Forbindelse A ble
- 20 tilsatt og cellene ble inkubert i 60 minutter ved romtemperatur. Den endelige konsentrasjonen av rolipram i analysen var 300 μ M og endelig konsentrasjon av vehikkel var 1,6% (v/v) dimetylsulfoksid. Reaksjonen ble stanset ved å fjerne supernatanter, vaske én gang med 100 μ l analysebuffer og erstatte med 50 μ l lysisbuffer. Celle monolaget ble frosset ved -80°C i 30 minutter (eller over natten).

AlphaScreen cAMP-deteksjon

- 25 Konsentrasjonen av cAMP (syklisk adenosin monofosfat) i cellelysatet ble bestemt ved anvendelse av AlphaScreen metodologi. Den frosne celleplaten ble tinet i 20 minutter på en platerister deretter ble 10 μ l av cellelysatet overført til en 96-brønns hvit plate. 40 μ l av blandet AlphaScreen deteksjons kuler preinkubert med biotinylert
- 30 cAMP, ble tilsatt til hver brønn og platen inkubert ved romtemperatur i 10 timer i mørke. AlphaScreen-signalet ble målt ved anvendelse av et EnVision spektrofotometer (Perkin-Elmer Inc.) med fabrikantens anbefalte innstillinger. Konsentrasjoner av cAMP ble bestemt med referanse til en kalibreringskurve bestemt i samme eksperiment ved anvendelse av standard cAMP-konsentrasjoner. En

konsentrasjon respons-kurve for Forbindelse A ble konstruert og data ble tilpasset til en fire parameters logistisk ligning for å bestemme både pEC_{50} og intrinsisk aktivitet. Intrinsisk aktivitet ble uttrykt som en fraksjon relativ til den maksimale aktiviteten bestemt for formoterol i hvert eksperiment. Et resultat for Forbindelse A er i Tabell 1.

5 Selektivitetsanalyser

Adrenerg α_1D

Membran-preparering

Membraner ble preparert fra humane embryo nyre 293 (HEK293)-celler som uttrykker rekombinant human α_D reseptor. Disse ble fortynnet i Analysebuffer (50mM HEPES, 1mM EDTA, 0,1% gelatin, pH 7,4) for å gi en sluttkonsentrasjon av membraner som ga et tydelig vindu mellom maksimal og minimal spesifikk binding.

Eksperimentell metode

Analyser ble utført i 96-brønns polypropylenplater med U-bunn. 10 μ l [3H]-prazosin (0,3 nM sluttkonsentrasjon) og 10 μ l av Forbindelse A (10x sluttkonsentrasjon) ble tilsatt til hver test-brønn. For hver analyseplate ble 8 replikater oppnådd for [3H]-prazosin-binding i nærvær av 10 μ l vehikkel (10% (v/v) DMSO i Analysebuffer; definerer maksimal binding) eller 10 μ l BMY7378 (10 μ M sluttkonsentrasjon; definerer ikke-spesifikk binding (NSB)). Membraner ble deretter tilsatt for å oppnå et sluttvolum på 100 μ l. Platene ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur og deretter filtrert opp på PEI-belagte GF/B filterplater, på forhånd bløtgjort i 1 time i Analysebuffer, ved anvendelse av en 96-brønners plate Tomtec-cellehøster. Fem vaskinger med 250 μ l vaskebuffer (50mM HEPES, 1mM EDTA, pH 7,4) ble utført ved 4°C for å fjerne ubundet radioaktivitet. Platene ble tørket og deretter forseglert fra undersiden ved anvendelse av Packard plate-forseglere og MicroScint-O (50 μ l) ble tilsatt til hver brønn. Platene ble forseglert (TopSeal A) og filterbundet radioaktivitet ble målt med en scintillasjonsteller (TopCount, Packard BioScience) ved anvendelse av en 3 minutters telle-protokoll.

Total spesifikk binding (B_0) ble bestemt ved å subtrahere gjennomsnittlig NSB fra gjennomsnittlig maksimal binding. NSB-verdier ble også subtrahert fra verdier fra alle andre brønner. Disse data ble uttrykt som prosent av B_0 . Forbindelse konsentrasjon-effekt-kurver (hemming av [3H]-prazosin-binding) ble bestemt ved anvendelse av seriefortynninger typisk i området 0,1 nM til 10 μ M. Data ble tilpasset til en fire parameters logistisk ligning for å bestemme forbindelsens potens, som ble uttrykt som

pIC₅₀ (negativ log molar konsentrasjon som induserer 50% hemming av [³H]-prazosin-binding). Resultat er vist i Tabell I nedenfor.

Adrenerg β1

Membran-preparering

- 5 Membraner inneholdende rekombinant human adrenerg beta 1 reseptorer ble oppnådd fra Euroscreen. Disse ble fortynnet i Analysebuffer (50mM HEPES, 1mM EDTA, 120mM NaCl, 0,1% gelatin, pH 7,4) for å gi en sluttkonsentrasjon av membraner som ga et tydelig vindu mellom maksimal og minimal spesifikk binding.

Ekspérimentell metode

- 10 Analyser ble utført i 96-brønns polypropylenplater med U-bunn. 10 µl [¹²⁵I]-Iodocyanopindolol (0,036 nM sluttkonsentrasjon) og 10 µl av Forbindelse A (10x sluttkonsentrasjon) ble tilsatt til hver test-brønn. For hver analyseplate ble 8 replikater oppnådd for [¹²⁵I]-Iodocyanopindolol-binding i nærvær av 10 µl vehikkel (10% (v/v) DMSO i Analysebuffer; definerer maksimal binding) eller 10 µl Propranolol (10 µM
- 15 sluttkonsentrasjon; definerer ikke-spesifikk binding (NSB)). Membraner ble deretter tilsatt for å oppnå et sluttvolum på 100 µl. Platene ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur og deretter filtrert opp på PEI-belagte GF/B filterplater, bløtlagt på forhånd i 1 time i Analysebuffer, ved anvendelse av en 96-brønns plate Tomtec cellehøster. Fem vaskinger med 250 µl vaskebuffer (50mM HEPES, 1mM EDTA,
- 20 120mM NaCl, pH 7,4) ble utført ved 4°C for å fjerne ubundet radioaktivitet. Platene ble tørket deretter forseglest fra undersiden ved anvendelse av Packard plate-forseglere og MicroScint-O (50 µl) ble tilsatt til hver brønn. Platene ble forseglest (TopSeal A) og filterbundet radioaktivitet ble målt med en scintillasjonsteller (TopCount, Packard BioScience) ved anvendelse av en 3 minutters telle-protokoll.

- 25 Total spesifikk binding (B₀) ble bestemt ved å subtrahere gjennomsnittlig NSB fra gjennomsnittlig maksimal binding. NSB-verdier ble også subtrahert fra verdier fra alle andre brønner. Disse data ble uttrykt som prosent av B₀. Forbindelse konsentrasjon-effekt-kurver (hemming av [¹²⁵I]-Iodocyanopindolol-binding) ble bestemt ved
- 30 anvendelse av seriefortynninger typisk i området 0,1 nM til 10 µM. Data ble tilpasset til en fire parameters logistisk ligning for å bestemme forbindelsens potens, som ble uttrykt som pIC₅₀ (negativ log molar konsentrasjon som induserer 50% hemming av [¹²⁵I]-Iodocyanopindolol-binding). Et result er vist i Tabell 1 nedenfor.

Dopamin D2

Membran-preparering

Membraner inneholdende rekombinant human Dopamin Subtype D2s reseptorer ble oppnådd fra Perkin Elmer. Disse ble fortynnet i Analysebuffer (50mM HEPES, 1mM EDTA, 120mM NaCl, 0,1% gelatin, pH 7,4) for å gi en sluttkonsentrasjon av membraner som ga et tydelig vindu mellom maksimal og minimal spesifikk binding.

Eksperimentell metode

Analyser ble utført i 96-brønns polypropylenplater med U-bunn. 30 μ l [3 H]-spiperon (0,16 nM sluttkonsentrasjon) og 30 μ l av Forbindelse A (10x sluttkonsentrasjon) ble tilsatt til hver test-brønn. For hver analyseplate ble 8 replikater oppnådd for [3 H]-spiperon-binding i nærvær av 30 μ l vehikkel (10% (v/v) DMSO i Analysebuffer; definerer maksimal binding) eller 30 μ l Haloperidol (10 μ M sluttkonsentrasjon; definerer ikke-spesifikk binding (NSB)). Membraner ble deretter tilsatt for å oppnå et sluttvolum på 300 μ l. Platene ble inkubert i 2 timer ved romtemperatur og deretter filtrert opp på PEI-belagte GF/B filterplater, bløtlagt på forhånd i 1 time i Analysebuffer, ved anvendelse av en 96-brønners plate Tomtec celle-høster. Fem vaskinger med 250 μ l vaskebuffer (50mM HEPES, 1 mM EDTA, 120mM NaCl, pH 7,4) ble utført ved 4°C for å fjerne ubundet radioaktivitet. Platene ble tørket, deretter forseglet fra undersiden ved bruk av Packard plate-forseglere og MicroScint-O (50 μ l) ble tilsatt til hver brønn. Platene ble forseglet (TopSeal A) og filter-bundet radioaktivitet ble målt med en scintillasjonsteller (TopCount, Packard BioScience) ved anvendelse av en 3 minutters telle-protokoll.

Total spesifikk binding (B_0) ble bestemt ved å subtrahere gjennomsnittlig NSB fra gjennomsnittlig maksimal binding. NSB-verdier ble også subtrahert fra verdier fra alle andre brønner. Disse data ble uttrykt som prosent av B_0 . Forbindelse konsentrasjon-effekt-kurver (hemming av [3 H]-spiperon-binding) ble bestemt ved anvendelse av seriefortynninger typisk i området 0,1 nM til 10 μ M. Data ble tilpasset til en fire parameters logistisk ligning for å bestemme forbindelsens potens, som ble uttrykt som pIC50 (negativ log molar konsentrasjon som induserer 50% hemming av [3 H]-spiperon-binding). Et resultat for Forbindelse A er vist i Tabell 1.

Tabell 1

Forbindelse	β 2 pEC50	β 2 Int Act	α 1 binde pIC50	β 1 binde p IC50	D2 binde pIC50
A	8.2	0,8	6.6	<5	6.1

Foreliggende oppfinnelse vil nå bli ytterligere forklart ved referanse til følgende illustrerende eksempler. Visse eksempler refererer til følgende Figur:

Figur 1.

- 5 Metacholin-indusert bronkokonstriksjon hos marsvin. Marsvin ble dosert med enten vehikkel, 1 µg/kg og 27µg/kg Forbindelse A, 0,03µg/kg tiotropiumbromid eller en kombinasjon av 1 µg/kg Forbindelse A og 0,03 µg/kg tiotropiumbromid 2 timer før metacholin-provokasjon.

Eksempel 1

- 10 **Evaluerings av forbindelses aktivitet på intraalveolær nøytrofil migrasjon etter aerosol-provokasjon med lipopolysakkarid (LPS) hos marsvin.**

Dunkin-Hartley hann-marsvin (300-600g) blir anbrakt i marsvin oppbevarings cones med åpen front festet tilfeldig rundt et sylinderformet aerosol kammer. Marsvin blir holdt i provokasjons cones og eksponert for en aerosol med vehikkel, eller LPS ved konsentrasjoner på 0,1-30µg/ml i 0,9%saltoppløsning per gruppe. Aerosoler blir generert ved anvendelse av 2 jet-nebulisatorer per kolonne med en strømningshastighet på 12 l/m. 10ml av provokasjonsmidlet blir plassert i hver nebulisator. Alternativt mottar dyr en intratrakeal dose på 0,1-10µg/kg. Dette gjentas opptil 8 ganger i henhold til forsøksprotokollen.

- 20 Marsvin blir dosert med vehikkel, standard forbindelse eller testforbindelse ved egnet administrasjonsrute og frekvens ved ulike tidspunkter før og etter provokasjon avhengig av forsøksprotokollen. Testforbindelse-grupper kunne enten være den samme forbindelsen i ulike doser eller enkeltdoser av ulike forbindelser eller en kombinasjon av de to. Testforbindelser blir gitt ved intraperitoneal, intravenøs eller subkutan injeksjon eller ved inhalasjon eller intratrakeal administrering. Marsvin underlagt provokasjon blir avlivet ved overdose av anestesi (0,5ml Euthetal i.p.) ved 4t-24 t etter provokasjon. Lungene blir deretter utskylt. Etter at luftrøret er eksponert og kanylert ved anvendelse av en luer-tilpasning kanyle (orange =størrelse 8FG), blir lungene skylt med 3 x 5ml alikvoter av Hanks Bufret saltoppøsning (HBSS, EDTA - fri). Utskyllingen blir utført med mild massasje av brystet for å sikre passende agitasjon av væsken i lungene. Vaskingene blir høstet inn i et 15ml konisk, polypropylen sentrifugerør, en alikvot av BAL-væske blir fjernet og talt i Sysmex (Sysmex UK, Milton Keynes). Cytospin-slides blir preparert ved å tilsette en 100 µl alikvot av BAL-væske inn i cytospin-trakter i en Shandon Cytospin3 kjørt ved 700 rpm i 5 min. Slides blir farget i Hema-Tek-2000 automatisk slide-farger, ved anvendelse av

Wright-Giemsa farge og typisk blir 200 celler talt under et mikroskop. Celler blir klassifisert som eosinofile, nøytrofile og mononukleære celler (mononukleære celler inkluderer monocytter, makrofager og lymfocytter) og blir uttrykt som en prosentandel av den totale tellingen.

5 **Eksempel 2**

Evaluering av forbindelse aktivitet på intraalveolær nøytrofil migrasjon etter aerosol-provokasjon med lipopolysakkarid (LPS) hos mus.

C57BL/6/J eller BALB/C hannmus (20-35g) blir plassert i Perspex eksponeringskasser i grupper på opptil 20 og eksponert for en aerosol av enten 0,3 mg/ml LPS eller 0,9% vekt/volum saltoppløsning. LPS (Sigma, E.Coli, Ref L-3755, Serotype 026:B6, Lot nr. 111k4078) er dannet i 0,9% vekt/volum saltoppløsning. En aerosol blir generert ved anvendelse av to jet-nebulisatorer kjørt ved en strømningshastighet på 12 l/min (6l/min for hver nebulisator) i 15 min. Alternativt mottar dyr en intratrakeal dose på 0,1-10µg/kg. Dette kan gjentas opptil 8 ganger.

Mus blir dosert med vehikkel, standardforbindelse eller testforbindelse ved egnet administrasjonsrute og frekvens ved ulike tidspunkter før og etter provokasjon avhengig av forsøksprotokollen. Testforbindelse-grupper kunne enten være den samme forbindelsen i ulike doser eller enkeltdoser av ulike forbindelser eller en kombinasjon av de to. Testforbindelser blir gitt ved intraperitoneal, intravenøs eller subkutan injeksjon eller ved inhalasjon eller intratrakeal administrering.

Mus blir avlivet med en overdose av Euthatal i.p 30 minutter, 1-24 timer etter LPS-provokasjon. Når sirkulasjonen har stanset, blir luftrøret kanylert (Portex intravenøs kanyle) og luftveiene skylt med 3 x 0,3ml Isoton II (Beckman Coulter Ref. 8448011 Lot nr.25775). For cytospin, blir 100µl av BALF tilsatt til en cytospin-trakt og spunnet, ved anvendelse av en ThermoShandon Cytospin modell 3 eller 4, ved 700 rpm i 5 min. Celler på sliden blir farget i Hema-Tek-2000 automatisk slide-farger, ved anvendelse av Wright-Giemsa-farge og differensielle celletellinger blir utført for å skjelne mellom eosinofile, nøytrofile og lymfomononukleære celler (inkludert monocytter, makrofager og lymfocytter). Typisk blir 200 celler talt per slide og hver celletype uttrykt som en prosentandel av den totale tellingen. BALF totalt hvite blodlegemer-telling blir målt ved anvendelse av en Sysmex (Sysmex UK, Milton Keynes).

Eksempel 3

Evaluering av lungefunksjon hos anesteserte marsvin.

Dunkin-Hartley hannmarsvin (300-600g) ble veid og dosert med vehikkel (0,05M fosfat, 0,1% Tween 80, 0,6% saltoppløsning, pH 6) eller forbindelse *via* intratrakeal administrering under gjenopprettelig gassanestesi (5% halotan i oksygen). Dyr ble dosert med forbindelse eller vehikkel to ganger før administrering av histamin eller metacholin.

Marsvin ble anestesert med pentobarbitone (1 ml/kg av 60 mg/ml løsning *i.p.*) omtrent 30 minutter før første administrering av bronkokonstriktor. Trachea ble kanylert og dyret ventilert ved anvendelse av en respirasjonspumpe med konstant volum (Harvard Rodent Ventilator modell 683) ved en hastighet på 60 åndedrag/min og et tidalvolum på 5 ml/kg. En vene i halsen ble kanylert for administrering av histamin, metacholin eller vedlikehold av anestesi (0,1 ml pentobarbitone-løsning, 60 mg/ml, etter behov).

Dyrene ble overført til et Flexivent System (SCIREQ, Montreal, Canada) for å måle luftveismotstand. Dyrene ble ventilert (kvasi-sinusoidal ventilerings modell) ved 60 åndedrag/min ved et tidalvolum på 5 ml/kg. Et positivt endeekspiratorisk trykk på 2-3 cmH₂O ble anvendt. Respirasjonsmotstand ble målt ved anvendelse av Flexivent "snapshot" innretning (1 sekund varighet, 1 Hz frekvens). Straks stabil baselinje-verdi for motstand var oppnådd ble dyrene gitt histamin eller metacholin i stigende doser (0,5, 1, 2, 3 og 5 µg/kg, *i.v.*) ved omtrent 4 minutters intervaller *via* kateteret i halsåren. Etter hver administrering av bronkokonstriktor ble maksimumsverdi for motstand registrert. Marsvin ble avlivet med omtrent 1,0 ml pentobarbitone-natrium (Euthatal) intravenøst etter fullførelse av målinger av lungefunksjon. Prosentandel bronko-proteksjon frembrakt av en forbindelse ble beregnet ved hver dose av bronkokonstriktor som følger:

$$\% \text{ bronko-proteksjon} = \frac{\% \text{ endring } R_{\text{veh}} - \% \text{ endring } R_{\text{forb.}}}{\% \text{ endring } R_{\text{veh}}}$$

Hvor % endring R_{veh} er gjennomsnittet av den maksimale prosentandel endring i luftveismotstand i den vehikkelbehandlede gruppen. Resultatene rapportert ble målt etter 5 µg/kg histamin eller metacholin og ble uttrykt som prosentandel bronko-proteksjon (gjennomsnitt ± s.e. gjennomsnitt).

Forbindelse A og tiotropiumbromid-kombinasjon:

Marsvin dosert med vehikkel, 1 og 27 µg/kg Forbindelse A, 0,03 µg/kg tiotropiumbromid eller en kombinasjon av 1 µg/kg Forbindelse A og 0,03 µg/kg tiotropiumbromid *via* intratrakeal administreringsvei. Administrering av økende intravenøse doser av metacholin (0,5, 1, 2, 3 og 5 µg/kg) fremkalte doserelatert bronkokonstriksjon i de vehikkel-behandlede dyrene i området fra $7,8 \pm 4,1\%$ ved 0,5 µg/kg til $1898 \pm 211\%$ ved 5 µg/kg to timer etter vehikkel-administrering (n=9). Intratrakeal administrering av tiotropiumbromid ved 0,03 µg/kg frembrakte 13% hemming av metacholin-indusert bronkokonstriksjon ($1656 \pm 269\%$ økning av motstand, n = 8).

Intratrakeal administrering av forbindelse A (1 og 27 µg/kg) frembrakte 15 og 82% hemming av metacholin-indusert bronkokonstriksjon (1619 ± 235 og $347 \pm 71\%$ økning i motstand, henholdsvis; n=8 og 6, henholdsvis). Kombinasjonen av tiotropiumbromid (0,03 µg/kg) og forbindelse A (1 µg/kg) frembrakte 43% hemming av metacholin-indusert bronkokonstriksjon ($1087 \pm 123\%$ økning i motstand; n=8) (Figur 1).

Eksempel 4

Evaluering av forbindelser ved antigen-indusert eosinofili hos ovalbumin-sensibiliserte norske brunrotter.

På dag 0 av studien blir norsk brunrotte gitt en subkutan injeksjon av 500 µg ovalbumin adsorbert til 100 mg aluminiumhydroksid i 0,4 ml saltoppløsning på to distinkte seter, omtrent 0,2 ml per sete. Dag 14 og 15 etter sensibilisering blir rottene underlagt provokasjon med "aerosolisert" ovalbumin, i 15 minutter. Rottene blir plassert i grupper på 10 i en akrylkasse (indre dimensjoner 320mm bred x 320mm dyp x 195 mm høy, 20 l volum). 8 ml 10 mg/ml ovalbumin i 0,9% saltoppløsning, eller 0,9% saltoppløsning alene, blir plassert i hver av to jet-nebulisatorer (Sidestream, Profile Respiratory Systems Ltd.). Trykkluft ved 6 l/min blir passert gjennom hver nebulisator og utbyttet fra nebulisatorene blir innlevert i kassen inneholdende rottene.

Rotter blir dosert via passende administrasjonsvei med vehikkel, standardforbindelse eller testforbindelse ved ulike tidspunkter før og etter provokasjon avhengig av forsøksprotokollen. Rotter blir avlivet med 0,5 ml pentobarbitone natrium (Euthatal) intraperitonealt ved forskjellige tidspunkter etter provokasjon. En tracheotomi blir utført og trachea kanylert. Luftveiene blir deretter utskylt ved anvendelse av 3 ml steril PBS ved romtemperatur. PBS blir værende i luftveien i 10 sekunder før den blir fjernet. PBS inneholdende celler blir plassert i et 15 ml sentrifugerør på is. Denne prosessen gjentas tre ganger. Sluttvolumet oppnådd blir registrert. En alikvot av BAL-

væske blir fjernet og talt ved anvendelse av en Sysmex (Sysmex UK, Milton Keynes).

Cytospin-slides blir preparert ved tilsetning av en 100 µl alikvot av BAL-væske inn i cytopsin-traktene i en Shandon Cytospin 3 kjørt ved 700 rpm i 5 min. Slides blir farget i Hema-Tek-2000 automatisk slide-farger, ved anvendelse av Wright-Giemsa-farge og typisk blir 200 celler talt under et mikroskop. Celler blir klassifisert som eosinofile, nøytrofile og mononukleære celler. Mononukleære celler inkluderer monocytter, makrofager og lymfocytter.

Eksempel 5

10 Evaluering av forbindelser ved antigen-indusert eosinofili hos ovalbumin-sensibiliserte mus.

20-25g BALB/c hannmus blir sensibilisert for ovalbumin ved i.p. administrering av 100 µg ovalbumin kvalitet 5 (Sigma) adsorbert til 1mg aluminiumhydroksid gel-blanding (Fisher Scientific UK) i 0,3 ml saltoppløsning. Grupper av mus blir pre-dosert med forbindelse om nødvendig, minimum to uker etter sensibilisering. De blir deretter dosert daglig i 1-8 dager som angitt i studieprotokollen, med testforbindelse eller 0,25 ml vehikkel.

Hver dag i de 1-8 dagene, 1 time etter dosering, blir musene plassert i perspex kammere (20x11x11cm, 10 mus maksimalt/kammer) og administrert en aerosol provokasjon av 20mg ml⁻¹ ovalbumin i 36 min (8 ml i 18 min etterfulgt av ytterligere 8 ml i 18 min). Aerosol-levering blir oppnådd ved anvendelse av en DeVilbiss jet-nebulisator med en strømningshastighet på 61 min⁻¹. 24t etter siste dose blir musene avlivet med euthatal 0,2 ml i.p. og blodprøver blir tatt (i EDTA-rør) for differensiell celletellings-analyse, trachea blir kanylert ved anvendelse av en rosa luer mount Portex kanyle kuttet til 1 cm og lungene utvasket ved anvendelse av 3 vaskinger med 1ml Isoton II. For cytopsin blir 100µl av BALF tilsatt til en cytopsin-trakt og spunnet, ved anvendelse av en ThermoShandon Cytospin modell 3 eller 4, ved 700 rpm i 5 min. Celler på sliden blir farget i Hema-Tek-2000 automatisk slide-farger, ved anvendelse av Wright-Giemsa-farge og differensielle celletellinger blir utført for å skjelne mellom eosinofile, nøytrofile og lymfomononukleære celler (inkludert monocytter, makrofager og lymfocytter). Typisk blir 200 celler talt per slide og hver celletype uttrykt som en prosentandel av den totale tellingen. BALF totalt hvite blodlegemer-telling blir målt ved anvendelse av en Sysmex (Sysmex UK, Milton Keynes).

Eksempel 6

Evaluering av effekten av forbindelse på lungefunksjon og BAL-nøytrofiler etter akutt røykeksponering hos mus

BALB/c eller C57BL6/J mus gjennomgår hel-kropps eksponering for hovedstrøms-røyk (50 min/12 sigaretter) og frisk luft én eller to ganger per dag i 1-9 dager. Mus blir dosert ved passende administreringsvei med vehikkel, standardforbindelse eller testforbindelse ved ulike tidspunkter før og etter provokasjon avhengig av forsøksprotokollen. På siste dag av forsøket blir mus enten avlivet med euthatal 0,2 ml i.p. og bronkoalveolær lavage-væske oppnådd for analyse av infiltrasjon av hvite blodceller (som beskrevet ovenfor) eller lungefunksjon vurderes ved anvendelse av et Flexivent System (SCIREQ, Montreal, Canada). Alternativt blir lungemekanikk målt ved anvendelse av et "forced manoeuvres" system (EMMS).

Mus blir anestesert med pentobarbiton (1/10 fortynning ved et dosevolum på 1 ml/kg intraperitonealt). Trachea blir kanylert og dyret overført til Flexivent Systemet hvor de blir ventilert (kvasi-sinusoidal ventilerings modell) med en hastighet på 150 åndedrag/min og et tidalvolum på 10 ml/kg for å måle luftveismotstand. Respirasjonsmotstand blir målt ved anvendelse av Flexivent "snapshot" innretning (1 sekunds varighet, 1 Hz frekvens). Mus blir avlivet med omtrent 0,5ml pentobarbiton-natrium (Euthatal) intravenøst etter fullføring av målinger av lungefunksjon.

Patentkrav

1. Farmasøytisk produkt omfattende, i kombinasjon, en første aktiv ingrediens som er *N*-[2-(dietylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid-dihydrobromid, og en andre aktiv ingrediens som er en muskarin-antagonist som er acridiniumbromid, glykopyrrolat, oksitropiumbromid, pirenzepin, telenzepin eller tiotropiumbromid.

2. Sett, omfattende;

et preparat av en første aktiv ingrediens som er *N*-[2-(dietylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid-dihydrobromid,

et preparat av en andre aktiv ingrediens som er en muskarin-antagonist som er acridiniumbromid, glykopyrrolat, oksitropiumbromid, pirenzepin, telenzepin eller tiotropiumbromid, og eventuelt

instruksjoner for samtidig, sekvensiell eller separat administrering av preparatene til en pasient med behov derfor.

3. Farmasøytisk sammensetning omfattende, i blanding;

en første aktiv ingrediens som er *N*-[2-(dietylamino)etyl]-*N*-(2-{[2-(4-hydroksy-2-okso-2,3-dihydro-1,3-benzotiazol-7-yl)etyl]amino}etyl)-3-[2-(1-naftyl)etoksy]propanamid-dihydrobromid;

en andre aktiv ingrediens som er en muskarin-antagonist som er acridiniumbromid, glykopyrrolat, oksitropium bromid, pirenzepin, telenzepin eller tiotropiumbromid; og en farmasøytisk akseptabel adjuvans, fortynningsmiddel eller bærer.

4. Farmasøytisk produkt, sett eller sammensetning ifølge hvilke som helst av de foregående kravene, hvor den andre aktive ingrediensen er tiotropiumbromid.

5. Farmasøytisk produkt, sett eller sammensetning ifølge hvilke som helst av kravene 1-4, for anvendelse i terapi.

6. Anvendelse av et farmasøytisk produkt, sett eller sammensetning ifølge hvilke som helst av kravene 1-4, for fremstilling av et medikament for behandling av en respirasjonssykdom.

7. Farmasøytisk produkt, sett eller sammensetning ifølge hvilke som helst av kravene 1-4, for anvendelse ved behandling av en respirasjonssykdom.

8. Anvendelse ifølge kravene 6 eller 7, hvor respirasjonssykdommen er kronisk obstruktiv lungesykdom eller astma.

FIGUR 1