

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 977 490**

51 Int. Cl.:

C07D 215/18 (2006.01)

A61K 31/47 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.06.2020 PCT/EP2020/065629**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2020 WO20245358**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.06.2020 E 20730277 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024 EP 3980403**

54 Título: **Sales de Montelukast y composiciones farmacéuticas que contienen las mismas**

30 Prioridad:

07.06.2019 IT 201900008340

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

26.08.2024

73 Titular/es:

GENETIC S.P.A. (100.0%)

Via G. Della Monica 26

84083 Castel San Giorgio (SA), IT

72 Inventor/es:

CALIENDO, GIUSEPPE;

CIRINO, GIUSEPPE;

FIORINO, FERDINANDO;

FRECENTESE, FRANCESCO;

MUSCARA', MARCELO, NICOLAS;

PERISSUTTI, ELISA;

PETTI, ANTONIO;

ROVIEZZO, FIORENTINA;

SANTAGADA, VINCENZO y

SEVERINO, BEATRICE

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 977 490 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

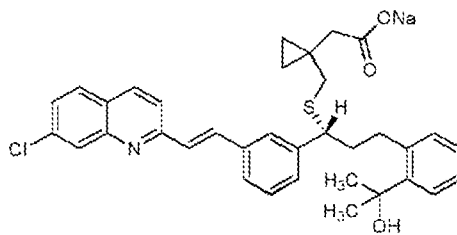
DESCRIPCIÓN

Salas de Montelukast y composiciones farmacéuticas que contienen las mismas

5 La presente invención se refiere a sales de Montelukast con agonistas adrenérgicos β_2 , composiciones farmacéuticas que las contienen y su uso en el tratamiento de patologías inflamatorias respiratorias, patologías obstructivas y disfunciones de las vías respiratorias inducidas por alérgenos. La invención se refiere además al proceso para preparar estas sales.

Antecedentes de la invención

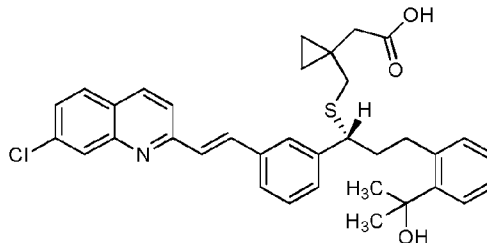
10 Montelukast sódico (Fórmula I) es un antagonista selectivo bien conocido de CysLT₁. Se administra por vía oral y ha demostrado ser efectivo en el tratamiento del asma o en otras enfermedades dependientes de leucotrienos como alergias e inflamación. Se comercializa en tabletas que contienen una cantidad de sal de sodio que corresponde a 4, 5 o 10 mg de ácido de Montelukast.



FORMULA I

Montelukast sódico es un polvo higroscópico blanco, soluble en metanol, etanol y agua.

15 La sal de sodio se obtiene a partir de ácido carboxílico libre de Montelukast (ácido (R,E)- 2-(1-((1-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il)vinil) fenil)-3-(2-(2-hidroxipropan-2-il)fenil)propil)io)-metil)ciclopropil)acético, Fórmula II) mediante tratamiento de una fuente de ion de sodio.



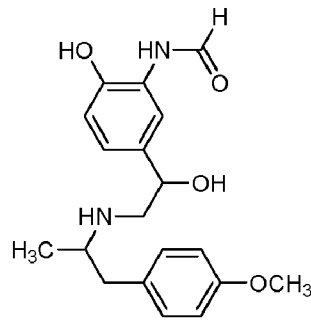
FORMULA II

20 Varias patentes han reportado los procedimientos para la síntesis u obtención de ácido libre de Montelukast: en particular, W02005/074935 describe un procedimiento sintético del intermedio carboxílico clave, en tanto que WO 2004/108679, US 2005/0107612 y US 2005/0234241 describen la generación de una sal de amina (díciclohexil amina o tercbutilamina) y la conversión en Montelukast sódico o ácido libre.

25 Los agonistas del receptor adrenérgico β_2 (beta2) son una clase de fármacos que actúan sobre el receptor adrenérgico β_2 . Los agonistas adrenérgicos β_2 provocan dilatación del músculo liso de los pasajes bronquiales, vasodilatación en el músculo y el hígado, relajación del músculo uterino y liberación de insulina. Se utilizan principalmente para tratar el asma y otros trastornos pulmonares, tal como la EPOC.

Se pueden dividir en agonistas de los receptores adrenérgicos β_2 de acción corta, de acción prolongada y de acción ultra prolongada.

30 Formoterol, (+/-)N-[2-hidroxi-5-[1-hidroxi-2[[2-(p-metoxifenil)-2-propil] -amino]-etil] -fenil]-formamida (Fórmula III) es un agonista β_2 de acción prolongada (LABA), utilizado en forma de sal de fumarato, para el tratamiento de patologías respiratorias inflamatorias u obstructivas debido a su efecto broncodilatador muy potente y de larga duración. Se caracteriza por dos centros quirales. Se administra por inhalación como mezcla racémica.



FORMULA III

Definiciones

5 Salvo que se defina de otra manera, todos los términos de la técnica, anotaciones y otra terminología científica utilizada en la presente se propone que tengan los significados comúnmente comprendidos por aquellos expertos en la técnica a la cual pertenece esta divulgación. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en la presente para claridad y/o para referencia inmediata; por lo tanto, la inclusión de estas definiciones en la presente no se debe interpretar que representa una diferencia sustancial sobre lo que se entiende en general en la técnica.

10 El término "excipiente fisiológicamente aceptable" en la presente se refiere a una sustancia desprovista de cualquier efecto farmacológico propio y que no produce reacciones adversas cuando se administra a un mamífero, preferentemente un ser humano. Los excipientes fisiológicamente aceptables se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, sexta edición 2009, que se incorpora en la presente como referencia.

El término "Montelukast" en la presente se refiere a ácido carboxílico libre de Montelukast.

15 Los términos "agonistas del receptor adrenérgico β_2 de acción corta" o "agonistas β_2 de acción corta" o "SABA" en la presente se refieren a agonistas del receptor P2 adrenérgico que tienen una duración de acción de aproximadamente 4 a 6 horas. Los ejemplos preferidos de SABA que se pueden utilizar en la presente invención son fenoterol, orciprenalina, salbutamol y terbutalina.

20 Los términos "agonistas del receptor adrenérgico β_2 de acción prolongada" o "agonistas β_2 de acción prolongada" o "LABA" en la presente se refieren a agonistas del receptor P2 adrenérgico que tienen una duración de acción de hasta 12 horas. Los ejemplos preferidos de LABA que se pueden utilizar en la presente invención son Bambuterol, Clenbuterol, Formoterol y Salmeterol.

25 Los términos "agonistas del receptor adrenérgico β_2 de acción ultra prolongada" o "agonistas β_2 de acción ultra prolongada" o "Ultra-LABA" en la presente se refieren a agonistas del receptor adrenérgico β_2 que tienen una duración de 24 horas, lo que permite una dosificación una vez al día. Los ejemplos preferidos de Ultra-LABA que se pueden utilizar en la presente invención son Vilanterol, Indacaterol y Olodaterol.

Los términos "Formoterol", "Fenoterol", "Salmeterol" y "Vilanterol" en la presente se refieren a bases libres de Formoterol, Fenoterol, Salmeterol y Vilanterol.

Los términos "de manera aproximada" y "aproximadamente" en la presente se refieren al intervalo del error experimental, que se puede presentar en una medición.

30 Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" se van a interpretar términos abiertos (es decir, que significan "que incluye, pero no se limita a") y se van a considerar como que proporcionan apoyo también para términos como "que consta esencialmente de", "que consta esencialmente de", "que consta de" o "que consta de".

35 Los términos "consta esencialmente de", "consta esencialmente de" se van a interpretar como términos semicerrados, lo que significa que no se incluyen otros ingredientes que afectan sustancialmente las características básicas y novedosas de la invención (por lo tanto, se pueden incluir excipientes opcionales).

Los términos "consta de", "consta de" se deben interpretar como términos cerrados.

Breve descripción de la invención

Recientemente, una gran cantidad de medicamentos aprobados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias se caracteriza por la combinación de moléculas como Beclometasona/Formoterol, furoato de Fluticasona/Vilanterol, Budesonida/Formoterol, Indacaterol/Glicopirronio con diferentes mecanismos de acción, con el objetivo de lograr un efecto terapéutico sinérgico.

5 El objetivo de la presente invención es proporcionar nuevas sales de Montelukast que tengan un efecto terapéutico sinérgico. De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a las sales de Montelukast con agonistas adrenérgicos β_2 en donde el agonista adrenérgico beta2 se selecciona de agonistas beta2 de acción corta, agonistas beta2 de acción prolongada o agonistas beta2 de acción ultra prolongada.

10 Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que las sales de la presente invención muestran un efecto sinérgico en el control de las disfunciones de las vías respiratorias inducidas por alérgenos.

Un segundo aspecto de la presente invención es un proceso para la preparación de las sales de Montelukast.

Un tercer aspecto de la presente invención son composiciones farmacéuticas que comprenden las sales de Montelukast en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

15 Un cuarto aspecto de la presente invención son las sales de Montelukast anteriores y composiciones farmacéuticas para usarse como medicamentos.

Un quinto aspecto de la presente invención son las sales de Montelukast anteriores y composiciones farmacéuticas para usarse en el tratamiento de patologías inflamatorias respiratorias, patologías obstructivas, disfunciones de las vías respiratorias inducidas por alérgenos.

Breve descripción de las figuras

20 La figura 1 muestra el espectro de difracción de rayos X en polvo de la sal de Montelukast Formoterol obtenida a partir de acetato de etilo.

La figura 2 muestra los espectros de difracción de rayos X en polvo de los fármacos originales: A) Formoterol; B) Montelukast.

25 La figura 3 muestra el espectro de difracción de rayos X en polvo de la sal de Montelukast Formoterol, obtenida a partir de acetato de etilo, con posiciones de pico relativas (2θ) y espaciado d (Angstrom).

La figura 4 muestra el espectro de $^1\text{H-NMR}$ (700 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) de la sal de Montelukast Formoterol obtenida a partir de acetato de etilo.

La figura 5 muestra los espectros de comparación de RMN ^1H (700 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) de la sal de Montelukast Formoterol (datos subrayados), Montelukast y Formoterol (datos no subrayados).

30 La figura 6 muestra el espectro RMN ^{13}C HMBC (175 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) de la sal de Montelukast Formoterol.

La figura 7 muestra el espectro de RMN ^{13}C (175 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) de la sal de Montelukast Formoterol.

La figura 8 muestra los espectros de comparación de RMN ^{13}C (175 MHz; $\text{DMSO-}d_6$) de la sal de Montelukast Formoterol (datos subrayados), Montelukast y Formoterol (datos no subrayados).

La figura 9 muestra el espectro de FT-IR de la sal de Montelukast Formoterol.

35 La figura 10 muestra el espectro de FT-IR de Montelukast.

La figura 11 muestra el espectro FT-IR de formoterol.

La figura 12 muestra el efecto de formoterol 2 versus formoterol 1 $p < 0,001$.

La figura 13 muestra el efecto antiinflamatorio de la sal de Montelukast Formoterol versus vehículo (** $*p < 0,001$).

40 La figura 14 muestra la eficacia terapéutica en la prevención de la hiperreactividad bronquial de la sal de Montelukast Formoterol (0,3, 0,75 y 1,5 mg/Kg) versus OVA $p < 0,001$; sal de Montelukast Formoterol 0,75 mg/Kg versus 0,3 mg/Kg $p < 0,001$; sal de Montelukast Formoterol 0,75 mg/Kg versus 1,5 mg/Kg $p < 0,05$.

La figura 15 muestra la eficacia terapéutica para preservar la relajación bronquial inducida por salbutamol de la sal de Montelukast Formoterol 0,75 mg/kg versus OVA $p < 0,001$. La figura 16 muestra la eficacia terapéutica en la prevención de la hiperreactividad bronquial de la sal de Montelukast Formoterol. Formoterol, Montelukast y sal de Montelukast Formoterol versus OVA $p < 0,001$; sal de Montelukast Formoterol versus Formoterol $p < 0,05$.

5 La figura 17 muestra la eficacia terapéutica en la conservación de la relajación bronquial inducida por salbutamol de la sal de Montelukast Formoterol. Sal de montelukast de formoterol versus OVA $p < 0,001$; Sal de montelukast de formoterol versus Formoterol $p < 0,001$; Sal de montelukast de formoterol versus Montelukast $p < 0,001$.

10 La figura 18 representa (A) los niveles de IgE en plasma: vehículo versus OVA $p < 0,01$; (B) dosis pulmonar de IL-4: vehículo versus OVA $p < 0,01$, formoterol (0,3mg/Kg), montelukast (0,3mg/Kg) y sal de Montelukast Formoterol (0,75mg/kg) versus OVA $p < 0,05$; (C) dosis pulmonar de IL-13: vehículo versus OVA $p < 0,01$, formoterol (0,3mg/Kg), montelukast (0,3mg/Kg) y sal de Montelukast Formoterol (0,75mg/kg) versus OVA $p < 0,05$.

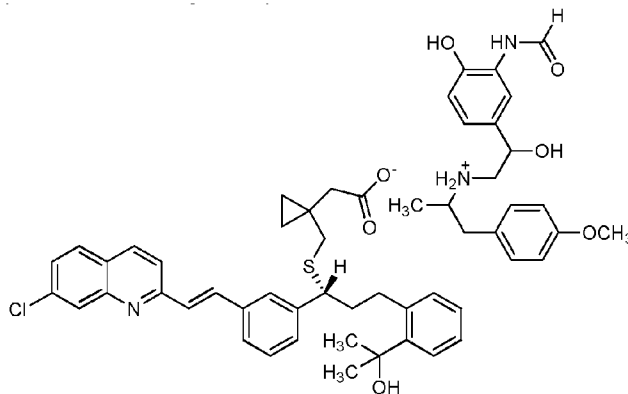
Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a una sal de Montelukast con un agonista adrenérgico β_2 , en donde el agonista adrenérgico β_2 se selecciona de agonistas β_2 de acción corta, agonistas β_2 de acción prolongada o agonistas β_2 de acción ultra prolongada.

En otra realización preferida de la invención, el agonista adrenérgico β_2 se selecciona del grupo que comprende Fenoterol, Orciprenalina, Salbutamol, Terbutalina, Bambuterol, Clenbuterol, Formoterol, Salmeterol, Vilanterol, Indacaterol y Olodaterol.

Más preferentemente, los agonistas adrenérgicos β_2 son Formoterol, Fenoterol, Salmeterol y Vilanterol.

20 En particular, la sal de Montelukast Formoterol de la fórmula IV representa una sal farmacéuticamente aceptable capaz de potenciar el potencial terapéutico.



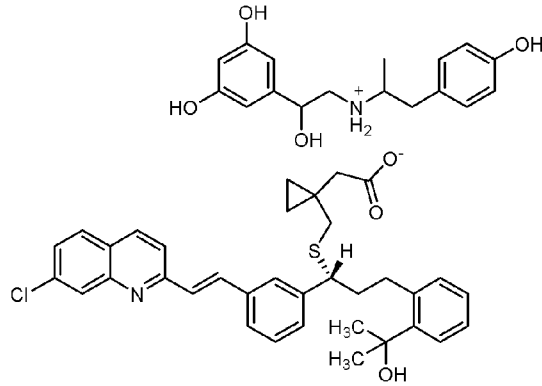
FORMULA IV

25 Permite el inicio rápido y la acción de larga duración de Formoterol con la disminución del número de veces que se utiliza el inhalador de rescate proporcionado por Montelukast. Se puede administrar por inhalación y esta es otra diferencia con Montelukast sódico: La sal de Montelukast Formoterol es menos hidrófila en comparación a Montelukast sódico y, por lo tanto, tiene un buen potencial para pasar las membranas celulares a través de una ruta de inhalación debido a la naturaleza lipófila de los dos componentes.

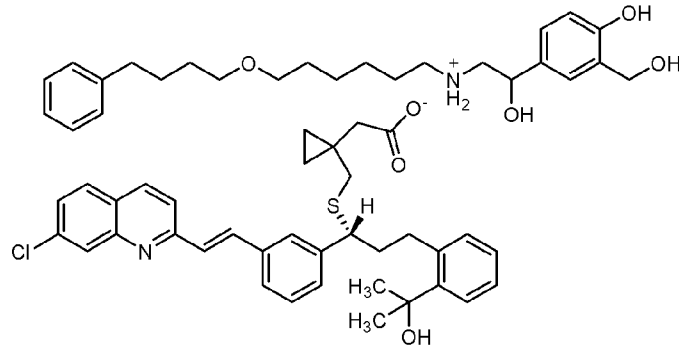
30 En una realización de acuerdo con la invención, la sal de Montelukast Formoterol en forma cristalina I se caracteriza por un espectro de difracción de rayos X en polvo, que se obtiene por el uso de radiación de $\text{CuK}\alpha$ y se representa por un ángulo de 2θ , en el que hay picos característicos en aproximadamente 6,39, 9,97, 13,05, 13,77, 15,42, 16,87, 17,87, 18,25, 20,37, 20,77, 23,14, 24,57, 26,23, 28,01, 2896, 32,09, 33,81 y 38,57.

En otra realización de acuerdo con la invención, la sal de montelukast en forma cristalina I se caracteriza por un espectro de difracción en polvo de rayos X como se representa en la figura 1.

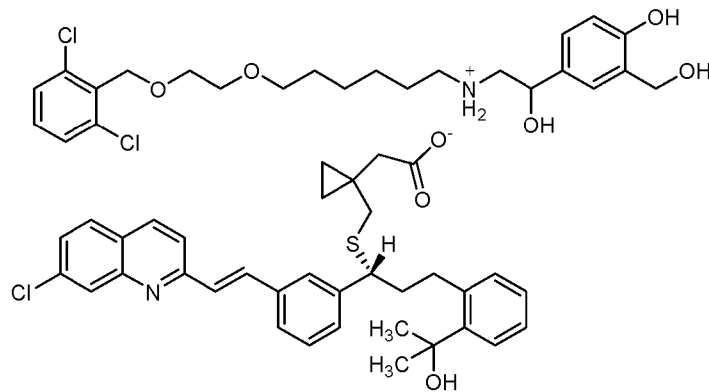
35 Otros derivados farmacéuticamente aceptables son Montelukast Fenoterol (Fórmula V), Salmeterol (Fórmula VI) y sales de Vilanterol (Fórmula VII).



FORMULA V



FORMULA VI



FORMULA VII

Como se mostrará en la sección experimental, se han evaluado las sales de Montelukast Formoterol, Fenoterol, Salmeterol y Vilanterol realizando estudios preclínicos.

10 Los experimentos *in vitro* e *in vivo* (edema de ratón de pata y un modelo de asma de ratón) destacaron las ventajas terapéuticas de estas asociaciones.

En particular, la eficacia terapéutica de la sal de Montelukast Formoterol demostró ser significativamente mayor que la de Formoterol y Montelukast administrados a dosis molar doble.

Los datos obtenidos demuestran un efecto sinérgico de la combinación de Formoterol y Montelukast, en particular, tanto en el control del tono bronquial como en la modulación de la respuesta inflamatoria.

5 Los datos obtenidos evidencian una marcada reducción del fenómeno de desensibilización de receptor β_2 , que determina una eficacia incrementada en el control de la disfunción de las vías respiratorias inducida por alérgenos y una actividad antiinflamatoria incrementada. Otro aspecto de esta invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende como ingrediente activo una sal de Montelukast con un agonista adrenérgico β_2 en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.

10 Preferiblemente, estas composiciones están en la forma de polvo, suspensión o solución, más preferentemente estas composiciones se administran por inhalación o vía oral.

15 Las composiciones se pueden utilizar para inhalación a través de la mucosa o constan de una solución para terapia de aerosol. Para la administración por inhalación, el compuesto de la invención se puede administrar en la forma de un aerosol en envases presurizados o por el uso de nebulizadores. Además, la formulación también se puede administrar como un polvo inhalado a través de las insuflaciones de los dispositivos inhaladores. El sistema de administración preferido para la inhalación es un aerosol de inhalación de dosis medida formulado como una suspensión o solución de los ingredientes en propulsores adecuados para preparaciones farmacéuticas inhalables.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para usarse oral se pueden administrar en la forma de tabletas, cápsulas o jarabes.

20 Otro aspecto de la invención se refiere a las sales de Montelukast o sus composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención para usarse como un medicamento.

De acuerdo con una realización preferida de la invención, las sales de Montelukast o sus composiciones farmacéuticas son útiles en el tratamiento de patologías inflamatorias respiratorias, patologías obstructivas, disfunciones de las vías respiratorias inducidas por alérgenos tal como asma, EPOC y fibrosis pulmonar.

25 Ventajosamente, las sales de Montelukast de la invención reducen significativamente la disfunción de las vías respiratorias inducida por alérgenos incluso si se administran a la mitad de la dosis con respecto a fármacos individuales.

En particular, la composición farmacéutica que comprende la sal de Montelukast Formoterol de acuerdo con la invención incrementa la actividad antiinflamatoria en comparación a Montelukast y Formoterol administrados a dosis doble y reduce la desensibilización de receptor β_2 .

30 Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para la preparación de las sales de Montelukast de acuerdo con la invención, que comprende los pasos de: i) disolver o suspender Montelukast en un solvente orgánico;

ii) adicionar un agonista adrenérgico β_2 , preferentemente Formoterol, Fenoterol, Salmeterol o Vilanterol, bajo agitación;

iii) aislar la sal de Montelukast con el agonista adrenérgico β_2 , preferentemente la sal de Montelukast Formoterol, Fenoterol, Salmeterol o Vilanterol.

35 Los solventes útiles para la formación de sales incluyen alcoholes alifáticos C_1-C_4 (metanol, etanol, isopropanol), cetonas alifáticas C_2-C_6 (acetona, metiletilcetona, metilisopropilcetona, dietilcetona), éteres alifáticos C_4-C_8 (dietiléter, diisopropiléter, diter-butiléter), éteres cíclicos C_4-C_6 (tetrahidrofurano, dioxano), ésteres alifáticos C_3-C_8 (acetato de etilo), hidrocarburos C_5-C_8 (tolueno, xileno, pentano, hexano, heptano), hidrocarburos clorados C_1-C_4 (diclorometano, cloroforno, dicloroetano), nitrilos alifáticos C_2-C_4 (acetonitrilo) o mezclas de los mismos.

40 El solvente preferido para la formación de sal es acetato de etilo.

Preferentemente, en el proceso de acuerdo con la invención, la relación de mmol/mL entre Montelukast y el solvente orgánico es de 1:1 a 1:5.

Preferentemente, en el proceso de acuerdo con la invención, la relación molar entre Montelukast y el agonista adrenérgico β_2 , preferentemente Formoterol, Fenoterol, Salmeterol o Vilanterol, es de 1:1 a 1:1,5.

45 De acuerdo con una realización preferida del proceso de la invención, la etapa de aislamiento iii) se lleva a cabo por la adición de un anti-solvente seleccionado de hidrocarburos de cadena lineal alifáticos C_5-C_8 , preferentemente pentano,

hexano, heptano o una mezcla de los mismos.

Preferentemente, la relación de volumen del solvente orgánico con respecto al anti-solvente es de 2:1 a 1:2, preferentemente una relación de volumen de 1:1.

Alternativamente, el paso de aislamiento iii) se lleva a cabo por cristalización.

- 5 Los solventes útiles para la cristalización son los mismos reportados anteriormente para la formación de sal, preferentemente éter dietílico.

Preferentemente, la cristalización se lleva a cabo por siembra.

En una realización de acuerdo con la invención, el proceso comprende además un paso de secado a una temperatura que varía de 30 a 80 °C, preferentemente 40-50 °C. Preferentemente, el paso de secado se realiza en horno.

10 Materiales y Métodos

a) Química.

Montelukast, Formoterol, Fenoterol y Salmeterol se compraron de Carbosynth Ltd (Compton Berkshire, Reino Unido). Vilanterol se compró de Accel Pharmtech (East Brunswick, Estados Unidos de América). Todos los otros productos comerciales se han comprado de Merck-Sigma Aldrich. Los espectros de RMN ¹H (700 MHz) y ¹³C (175 MHz) se registraron en un espectrómetro Agilent INOVA; se hizo referencia a los desplazamientos químicos a la señal de solvente residual (DMSO-*d*₆: 5h = 2,49, be = 39,0); las conectividades de dos y tres enlaces ¹H-¹³C se determinaron por experimentos de gradiente 2D HMBC optimizados para un ²J de 8 Hz. La difracción de rayos X en polvo (XRPD) se realizó utilizando un difractómetro Panalytical X'pert PRO. Los perfiles de intensidad se recolectaron en el intervalo de 2θ de 4-40° usando radiación de CuKα filtrada con Ni (A = 1,5406 Å) a 40 kV y 30 mA, con un tamaño de paso de 0,02°, a un tiempo de escaneo de 120 s/paso. Los patrones de difracción se procesaron utilizando el conjunto Highscore Plus.

b) Ensayos farmacológicos preclínicos

Estudio *in vitro*. Los ratones BALB/c hembra (8 semanas; Charles River) se sacrificaron y los tejidos bronquiales se diseccionaron rápidamente y se limpiaron de grasa y tejido conectivo. Se cortaron anillos de 1-2 mm de longitud y se colocaron en baños de órganos montados en transductores de fuerza isométricos (tipo 7006, Ugo Basile, Comerio, Italia) y se conectaron a un Powerlab 800 (AD Instruments). Los anillos se estiraron inicialmente hasta que se alcanzó una tensión de reposo de 0,5 g y se dejaron equilibrar durante al menos 30 minutos. En cada experimento, los anillos bronquiales se estimularon con carbacol (10⁻⁶ mol/L) hasta que la respuesta fue reproducible. Una vez que se logró una respuesta reproducible, se evaluó la reactividad bronquial realizando una curva de concentración-respuesta acumulativa a formoterol en presencia o ausencia de montelukast (1 μM).

30 Estudio *in vivo*

Edema de ratón de pata. Los ratones macho CD1 (Charles River; peso 25-30 g) se dividieron en grupos (n=7) y se anestesiaron ligeramente con enflurano. Cada grupo de animales recibió administración subplantar de 50 μl de solución fisiológica que contenía carragenina (1%). El volumen de pata se midió utilizando un hidropletismómetro especialmente modificado para volúmenes pequeños (Ugo Basile, Milan Italia) inmediatamente antes de la inyección subplantar y 0,5, 1, 2, 3, 4 y 24, 48 y 72 h después. El grupo de control recibió administración intraplantar del vehículo. El incremento en el volumen de pata se evaluó como la diferencia entre el volumen de pata en cada punto de tiempo y el volumen de pata basal.

A fin de evaluar *in vivo* el efecto sinérgico de la sal de Montelukast Formoterol, los ratones recibieron 30 minutos antes de la inyección intraplantar de carragenina administración intraperitoneal de vehículo, Formoterol (0,3mg/Kg), Montelukast (0,3mg/Kg) o sal de Montelukast Formoterol (0,3mg/Kg).

Modelo de asma de ratón. Los ratones BALB/c hembra (8 semanas; Charles River) se sensibilizaron mediante administración subcutánea de ovoalbúmina (100 μg disueltos en 400 μl de AlOH₃ 13,5 mg/ml) en los días 0 y 8, en el vigésimo primer día los ratones se estimularon por administración en aerosol de ovoalbúmina (3% durante veinte minutos). Los ratones se sacrificaron después de 48 horas y los bronquios se utilizaron para la evaluación de la reactividad bronquial en carbacol y salbutamol. Los fármacos se administraron por vía intraperitoneal antes de cada exposición al alérgeno. Montelukast y formoterol se administraron a una dosis de 0,3 mg/kg, en tanto que las dosis de 0,3, 0,75 y 1,5 mg/kg se probaron para la sal de Montelukast Formoterol. Las dosis se han elegido para garantizar una comparación equimolar de los fármacos en términos de eficacia terapéutica. Los tejidos pulmonares se recolectaron y se utilizaron para la dosificación de citocinas tal como IL-4 e IL-13. Además, se midieron los niveles en plasma de IgE.

Sección experimental

Ejemplo 1

Síntesis de sal de Montelukast formoterol (IV)

5 N-(2-(3-formamido-4-hidroxifenil)-2-hidroxi-etil)-1-(4-metoxifenil) propan-2-aminio-2-(1 -(((1-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il)vinil)-fenil)-3-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil)propil)tio)-)metil)ciclopropil)acetato

10 Montelukast (360 mg, 0,58 mmol) se disolvió en 19 mL de acetato de etilo. Se adicionó formoterol (200 mg, 0,58) a la solución de una vez bajo agitación intensa. La agitación se prolongó durante 1 hora y entonces se adicionó lentamente n-hexano (19 mL) con agitación continua. La mezcla de reacción se agitó adicionalmente durante 15 h. El sólido así obtenido se filtró, se lavó con n-hexano (2X10mL) y se secó en horno (50°C, 12h). Rendimiento 80%. M.p. 129,4± 2,1 RMN ¹H (700 MHz, DMSO-d₆, J en Hz) Formoterol: δ 0,96 (d, 6,2, 3H), 2,44 (traslapado, 1H), 2,77 (traslapado, 1H), 2,82 (traslapado, 1H), 3,03 (traslapado, 1H), 3,69 (s, 1H), 4,58 (m, 1H), 6,77 (traslapado, 2H), 6,83 (traslapado, 2H), 6,85 (traslapado, 2H), 7,06 (d, 8,5, 2H), 8,03 (s, 1 H), 8,30 (s, 1 H), 9,56 (bs, NH).

15 Montelukast: δ 0,35-0,43 (m, 4H), 1,39 (s, 6H), 2,11 (traslapado, 1H), 2,18 (traslapado, 1H), 2,30 (s, 2H), 2,49 (traslapado, 2H), 2,73 (traslapado, 1H), 3,03 (traslapado, 1H), 3,98 (t, 7,5, 1H), 6,90 (traslapado, 1H), 7,03 (traslapado, 1H), 7,11 (traslapado, 1H), 7,35 (traslapado, 1H), 7,36 (traslapado, 1H), 7,38 (traslapado, 1H), 7,40 (traslapado, 1H), 7,49 (d, 16,3, 1H), 7,59 (dd, 2,0, 10,7, 1H), 7,62 (d, 7,5, 1 H), 7,71 (s, 1H), 7,88 (d, 16,3, 1H), 7,93 (d, 8,7, 1 H), 8,00 (d, 8,7, 1 H), 8,40 (d, 8,7, 1 H)

20 Sal de Montelukast Formoterol de RMN ¹³C (175 MHz, DMSO-d₆): 5172,7, 159,8, 157,6, 156,8, 148,0, 146,7, 145,8, 143,6, 139,6, 136,6, 136,1, 135,0, 134,2, 131,0, 129,8, 128,9, 128,3, 127,2, 126,8, 126,7, 126,4, 125,9, 125,7, 125,6, 125,3, 125,2, 121,6, 120,3, 118,5, 114,6, 113,6, 69,9, 54,9, 54,1, 53,0, 49,4, 42,6, 39,9, 38,9, 31,9, 31,6, 17,3, 12,1, 11,9.

Ejemplo 2

25 Montelukast (720 mg) y Formoterol (400 mg) se cargaron en un matraz de fondo redondo y se adicionaron con acetonitrilo (30 mL) e isopropanol (12 mL). La solución se agitó durante 10 minutos y entonces se calentó a 80 °C durante 1 h. Después de enfriarse, se obtuvo un sólido por filtración. El polvo se lavó con acetonitrilo. La recristalización en éter dietílico dio el compuesto deseado. Rendimiento 62%.

Ejemplo 3

30 Montelukast (360 mg, 0,58 mmol) se disolvió en 19 mL de acetona. Se adicionó formoterol (200 mg, 0,58) a la solución de una vez bajo agitación intensa. Después de 10 minutos se formó un precipitado. La agitación se prolongó durante 4 horas y entonces el sólido se filtró. El sólido obtenido se lavó con n-hexano (2X10mL) y se secó en horno (50°C, 12h). Rendimiento 66%.

Ejemplo 4

Síntesis de sal de Montelukast fenoterol (V)

N-(2-(3,5-dihidroxifenil)-2-hidroxi-etil)-1-(4-hidroxifenil)propan-2-aminio-2-(1-(((1-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il)vinil)fenil)-3-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil)propil)tio)metil)ciclopropil)acetato

35 Montelukast (300 mg, 0,51 mmol) se disolvió en 15 mL de acetato de etilo. Se adicionó fenoterol (155 mg, 0,51 mmol) a la solución de una vez bajo agitación intensa. La agitación se prolongó durante 1 hora y entonces se adicionó lentamente n-hexano (15 mL) con agitación continua. La mezcla de reacción se agitó adicionalmente durante 15 h. El sólido así obtenido se filtró, se lavó con n-hexano (2X10mL) y se secó en horno (50°C, 12h).

Ejemplo 5

40 Síntesis de sal de Montelukast salmeterol (VI)

N-(2-hidroxi-2-(4-hidroxi-3-(hidroximetil)fenil)etil)-6-(4-fenilbutoxi) hexan-1-aminio-2-(1-(((1-(3-(2-(7-cloroquinolin-2-il)vinil)fenil)-3-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil)propil)tio)metil)ciclopropil)acetato

45 Montelukast (300 mg, 0,51 mmol) se disolvió en 15 mL de acetato de etilo. Se adicionó salmeterol (212 mg, 0,51 mmol) a la solución de una vez bajo agitación intensa. La agitación se prolongó durante 1 hora y entonces se adicionó lentamente n-hexano (15 mL) con agitación continua. La mezcla de reacción se agitó adicionalmente durante 15 h. El sólido así

obtenido se filtró, se lavó con n-hexano (2X10mL) y se secó en horno (50°C, 12h).

Ejemplo 6

Síntesis de sal de Montelukast vilanterol (VII)

5 6-(2-((2,6-diclorobencil)oxi)etoxi)-N-(2-hidroxi-2-(4-hidroxi-3- (hidroximetil)-fenil)etil) hexan-1-aminio-2-(1-(((1-(3- (2-(7-cloroquinolin-2-il)vinil)fenil)-3-(2-(2-hidroxiopropan-2-il)fenil)propil)tio)metil)ciclopropil)acetato

Montelukast (300 mg, 0,51 mmol) se disolvió en 15 mL de acetato de etilo. Se adicionó vilanterol (248 mg, 0,51 mmol) a la solución de una vez bajo agitación intensa. La agitación se prolongó durante 1 hora y entonces se adicionó lentamente n-hexano (15 mL) con agitación continua. La mezcla de reacción se agitó adicionalmente durante 15 h. El sólido así obtenido se filtró, se lavó con n-hexano (2X10mL) y se secó en horno (50°C, 12h).

10 Resultados

La sal obtenida del procedimiento informado como ejemplo 1 se seleccionó para la caracterización química específica. La sal de Montelukast Formoterol se obtuvo como un polvo marrón pálido y el patrón de XRPD, que se muestra en la figura 1, evidenció un patrón de difracción cristalina diferente de los de los fármacos originales (figuras 2A y 2B). La figura 3 informa la posición [$^{\circ}2\theta$] (Cobre(Cu)) de los picos principales de la forma cristalina.

15 A fin de determinar la interacción entre los dos constituyentes, representados por un ácido orgánico y una base, respectivamente, se realizó un análisis de RMN mono y bidimensional. En particular, se realizó un análisis espectroscópico detallado preliminar de la forma no disociada de los dos constituyentes. Posteriormente, se realizó el análisis espectroscópico de la sal.

20 El espectro de RMN ^1H de la sal de Montelukast Formoterol (figura 4) mostró diferencias en los valores de desplazamiento químico en comparación a Montelukast y Formoterol, analizados anteriormente.

En particular, se evidenció que las señales relacionadas con protones unidos a los átomos de carbono en el área química cercana a la amina secundaria Formoterol presentaron una variación neta en sus desplazamientos químicos, como se reporta en la siguiente figura 5.

25 El análisis de RMN ^{13}C , llevado a cabo por experimentos mono y bidimensionales (figuras 6 y 7, respectivamente), destacó la variación de los desplazamientos químicos cuando se compararon las formas indisociadas y la sal (figura 8).

Las variaciones de RMN demostraron que la función carboxílica se implica en una interacción con la función amina del formoterol. Además, la estequiometría (en una relación de 1:1) de la sal obtenida se definió comparando las señales de espectro de RMN ^1H de los dos componentes de la sal.

30 El análisis del espectro infrarrojo de la sal de Montelukast Formoterol (figura 9) muestra algunas absorciones diferentes en comparación a las vibraciones presentes en los espectros de IR de Montelukast (figura 10) y de Formoterol (figura 11). En particular, en el espectro de IR de la sal (figura 9), la banda de estiramiento de C=O de la función ácida presente en la figura 10 (1712 cm^{-1}) está ausente, en tanto que se muestra una banda de estiramiento asimétrica a 1608 cm^{-1} , atribuible al ion de carboxilato. Además, está presente una banda media a 2335 cm^{-1} atribuible a la sal de la amina secundaria (figura 9).

35 El efecto terapéutico sinérgico de la sal de Montelukast Formoterol en comparación a los fármacos individuales

Nuestros resultados destacan las ventajas terapéuticas de esta asociación, que por una parte optimiza el efecto relajante bronquial de Formoterol y por otra potencia el efecto antiinflamatorio de Montelukast.

40 La exposición de los bronquios, precontratado con un agonista muscarínico (carbacol), induce una contracción significativa que es efectivamente revertida por la administración de Formoterol. De hecho, la administración de Formoterol promueve una relajación bronquial significativa de una manera dependiente de la concentración (Formoterol 1). Este efecto, sin embargo, se reduce significativamente a una exposición posterior de la preparación bronquial al agonista adrenérgico (Formoterol 2), que es debido claramente a la desensibilización del receptor. Por el contrario, la preincubación de Montelukast *in vitro*, aunque no altera la respuesta broncodilatadora del formoterol, conserva su eficacia (figura 12). Se han observado efectos beneficiosos similares en términos de sinergia *in vivo*.

45 Además, el tratamiento farmacológico de ratones con Montelukast (0,3 mg/kg) y Formoterol (0,3 mg/kg) induce un efecto antiinflamatorio que se incrementa significativamente por la administración de la sal de Montelukast Formoterol (0,3 mg/kg) (figura 13). Se debe destacar que la dosis de 0,3 mg/Kg de la sal corresponde, en términos de moles, a una dosis cinco

veces menor que los dos fármacos individuales.

Con base en estos datos, se evaluó la eficacia terapéutica de la sal de Montelukast Formoterol en comparación a fármacos individuales en un modelo de asma de ratón.

5 La sensibilización a OVA induce a nivel bronquial un incremento en la respuesta al carbacol y una respuesta reducida al salbutamol (figuras 14 y 15). El tratamiento farmacológico con la sal de Montelukast Formoterol da por resultado un buen control de la hiperreactividad bronquial, que es un efecto relacionado con la dosis (figura 14). La mejor dosis de la sal fue de 0,75 mg/Kg, que reporta la reactividad bronquial a los valores basales, lo que demuestra una eficacia pertinente en la prevención del desarrollo de hiperreactividad. Esta dosis también es la más efectiva para controlar la respuesta al salbutamol (figura 15). Además, la sensibilización determina una condición inflamatoria que provoca una reducción significativa en la respuesta a los agonistas beta-adrenérgicos, que hoy en día representan los fármacos más efectivos en el control de la hiperreactividad. La dosis de 0,75 mg/Kg no solo anuló la respuesta incrementada al carbacol, sino que conservó la falta de eficacia del salbutamol para inducir la relajación bronquial.

En otra serie de experimentos, se comparó la eficacia terapéutica de la sal de Montelukast Formoterol a la dosis de 0,75 mg/kg con la administración de los fármacos individuales Formoterol (0,3 mg/kg) y Montelukast (0,3 mg/kg).

15 Los resultados obtenidos confirmaron la superioridad de la sal de Montelukast Formoterol en la preservación de la función bronquial. La sal de Montelukast Formoterol se administró en términos de moles a una concentración reducida a la mitad en comparación a los fármacos individuales (figuras 16 y 17). Los resultados obtenidos muestran una eficacia terapéutica de la sal de Montelukast Formoterol significativamente más alta que los fármacos originales Formoterol y Montelukast (administrados a una dosis molar casi doble) para controlar el desarrollo de hiperreactividad al carbacol inducido por sensibilización (figura 16). Además, la sal de Montelukast Formoterol demostró una eficacia significativa para conservar la eficacia del salbutamol en la modulación de la relajación bronquial. De hecho, como se desprende de la gráfica (figura 20 17), la exposición a ovoalbúmina induce una reducción significativa de la relajación inducida por salbutamol. Solo el tratamiento con sal de Montelukast Formoterol revierte eficientemente este efecto.

25 Se realizaron estudios bioquímicos en plasma y tejidos pulmonares recolectados de ratones sensibilizados y tratados con sal de Montelukast Formoterol (0,75/mg/Kg), Formoterol (0,3mg/Kg) y Montelukast (0,3mg/Kg) (figura 18). Los niveles en plasma de IgE (Figura 18-A) demuestran que ninguno de los fármacos probados, como se esperaba, altera la eficacia de la sensibilización ya que los niveles de IgE no se ven afectados por todos los tratamientos. Por otra parte, la sal de Montelukast Formoterol, aunque se administra a la mitad de la dosis con respecto a los fármacos individuales, muestra una eficacia similar en la inhibición de las citocinas IL-4 (figura 18B) e IL-13 (figura 18C), que desempeñan una función clave en los mecanismos celulares subyacentes al asma como características tal como hiperreactividad e inflamación de las vías respiratorias.

35 Los experimentos realizados *in vivo*, utilizando un modelo de ratón de asma, refuerzan aún más la hipótesis. Los resultados obtenidos confirman una eficacia terapéutica de la sal de Montelukast Formoterol significativamente superior a la de Formoterol y Montelukast (administrado a dosis molar doble) en el control de la disfunción de las vías respiratorias inducida por la sensibilización.

40 La sal de Montelukast Formoterol demostró una eficacia significativa tanto en el control de la hiperreactividad bronquial como en la preservación de la eficacia del salbutamol en la modulación de la relajación bronquial. De hecho, la exposición a ovoalbúmina induce tanto hiperreactividad de las vías respiratorias como una reducción significativa de la relajación inducida por salbutamol. El tratamiento con sal de Montelukast Formoterol (a la mitad de la dosis con respecto a los fármacos individuales) revierte de manera más eficiente ambos efectos de las vías respiratorias, en comparación con los fármacos individuales.

En conclusión, los datos obtenidos hasta ahora sugieren tres valores adicionados a la sal de Montelukast Formoterol: 1) reducción marcada del fenómeno de desensibilización del receptor β_2 ; 2) una mayor eficacia en el control de la disfunción de las vías respiratorias inducida por alérgenos; 3) una actividad antiinflamatoria incrementada.

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sal de Montelukast con un agonista $\beta 2$ adrenérgico, en donde el agonista $\beta 2$ adrenérgico se selecciona de agonistas $\beta 2$ de acción corta que tienen una duración de acción de aproximadamente 4 a 6 horas, agonistas $\beta 2$ de acción prolongada que tienen una duración de acción de hasta 12 horas o agonistas $\beta 2$ de acción ultra prolongada que tienen una duración de 24 horas.
2. La sal de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agonista $\beta 2$ adrenérgico se selecciona del grupo que comprende Fenoterol, Orciprenalina, Salbutamol, Terbutalina, Bambuterol, Clenbuterol, Formoterol, Salmeterol, Vilanterol, Indacaterol y Olodaterol, preferentemente el agonista $\beta 2$ adrenérgico se selecciona de Formoterol, Fenoterol, Salbutamol, Salmeterol y Vilanterol.
- 10 3. La sal de formoterol de la sal de montelukast de acuerdo con la reivindicación 2 en forma cristalina I caracterizada por un espectro de difracción de rayos X en polvo, que se obtiene por el uso de radiación de $\text{CuK}\alpha$ y representado por un ángulo de $^{\circ}2\theta$, en el que hay picos característicos a aproximadamente 6,39, 9,97, 13,05, 13,77, 15,42, 16,87, 17,87, 18,25, 20,37, 20,77, 23,14, 24,57, 26,23, 28,01, 28,96, 32,09, 33,81 y 38,57.
- 15 4. Un proceso para la preparación de la sal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, ue comprende los pasos de:
- i) disolver o suspender Montelukast en un solvente orgánico;
- ii) adicionar un agonista $\beta 2$ adrenérgico, preferentemente Formoterol, Fenoterol, Salbutamol, Salmeterol o Vilanterol, bajo agitación;
- 20 iii) aislar la sal de Montelukast con el agonista $\beta 2$ adrenérgico, preferentemente la sal de Montelukast Formoterol, Fenoterol, Salbutamol, Salmeterol o Vilanterol.
5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde este solvente orgánico se selecciona del grupo que consta de alcoholes alifáticos $\text{C}_1\text{-C}_4$, cetonas alifáticas $\text{C}_2\text{-C}_6$, éteres alifáticos $\text{C}_4\text{-C}_8$, éteres cíclicos $\text{C}_4\text{-C}_6$, ésteres alifáticos $\text{C}_3\text{-C}_8$, hidrocarburos $\text{C}_5\text{-C}_8$, hidrocarburos clorados $\text{C}_1\text{-C}_4$, nitrilos alifáticos $\text{C}_2\text{-C}_4$ o mezclas de los mismos, preferentemente el solvente orgánico se selecciona del grupo que consta de metanol, etanol, isopropanol, acetona, metiletilcetona, metilisopropilcetona, dietilcetona, dietiléter, éter diisopropílico, diterbutiléter, tetrahidrofurano, dioxano, acetato de etilo, tolueno, xileno, pentano, hexano, heptano, diclorometano, cloroformo, dicloroetano, acetonitrilo y mezclas de los mismos, más preferentemente acetato de etilo.
- 25 6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde la relación de mmol/mL entre Montelukast y el solvente orgánico es de 1:1 a 1:5.
- 30 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la relación molar entre Montelukast y el agonista $\beta 2$ adrenérgico, preferentemente Formoterol, Fenoterol, Salbutamol, Salmeterol o Vilanterol, es de 1:1 a 1:1,5.
8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el paso de aislamiento iii) se lleva a cabo por la adición de un anti-solvente seleccionado de hidrocarburos de cadena lineal alifáticos $\text{C}_5\text{-C}_8$, preferentemente pentano, hexano, heptano o una mezcla de los mismos.
- 35 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la relación en volumen del disolvente orgánico con respecto al anti-solvente es de 2:1 a 1:2, preferentemente una relación en volumen de 1:1.
10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el paso de aislamiento iii) se lleva a cabo por cristalización, preferentemente a partir de éter dietílico.
- 40 11. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que comprende además un paso de secado a una temperatura que varía de 30 a 80 $^{\circ}\text{C}$, preferentemente de 40 a 50 $^{\circ}\text{C}$.
12. Una composición farmacéutica que comprende la sal de Montelukast con un agonista $\beta 2$ adrenérgico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en combinación con al menos un excipiente fisiológicamente aceptable.
13. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde esta composición está en la forma de polvo, suspensión o solución, preferiblemente esta composición se administra por inhalación o vía oral.
- 45 14. La sal de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 o 13 para usarse como un medicamento.

15. La sal para usarse o la composición farmacéutica para usarse de acuerdo con la reivindicación 14 en el tratamiento de patologías inflamatorias respiratorias, patologías obstructivas, disfunciones de las vías respiratorias inducidas por alérgenos tal como asma, EPOC y fibrosis pulmonar.

FIGURA 1

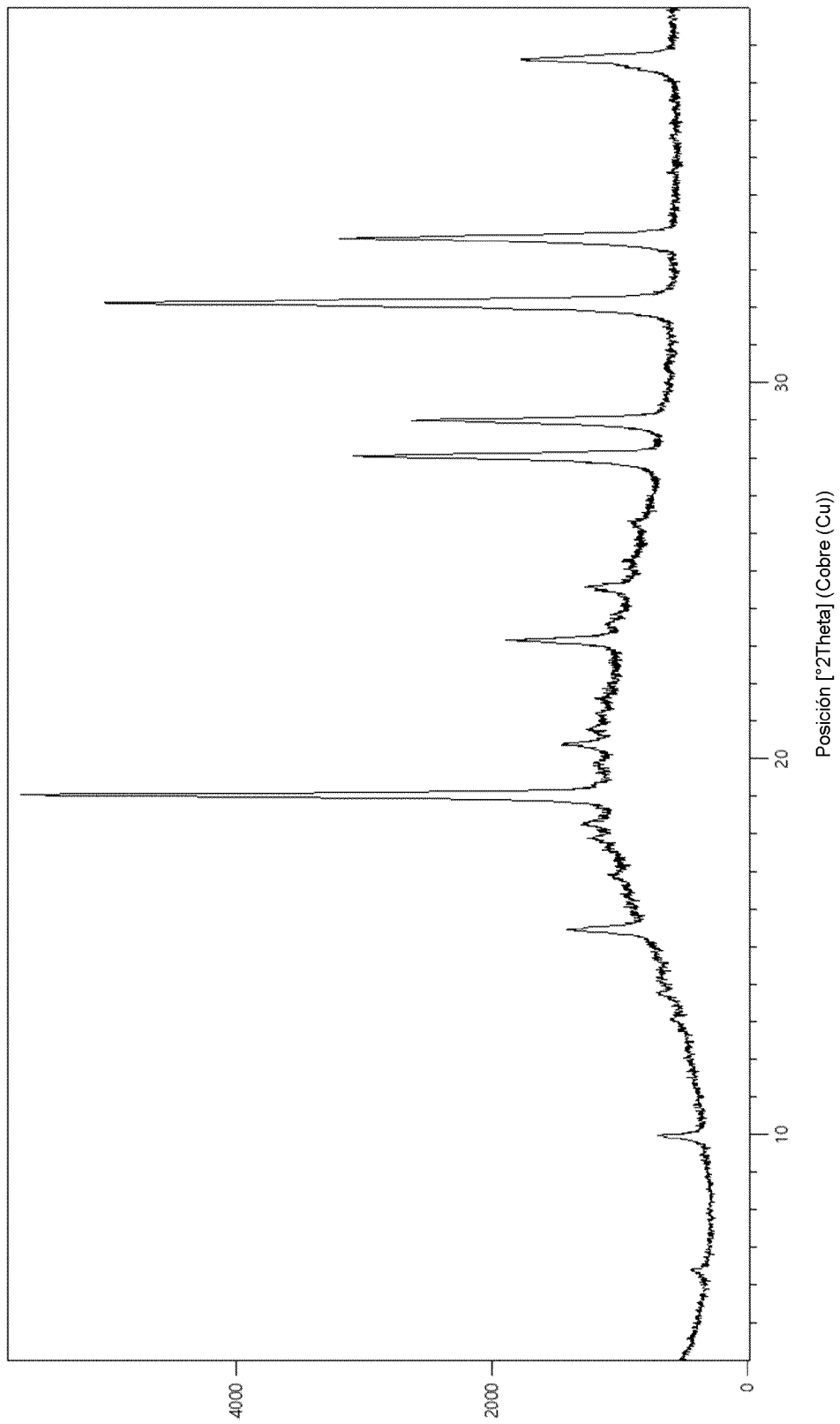


FIGURA 2A

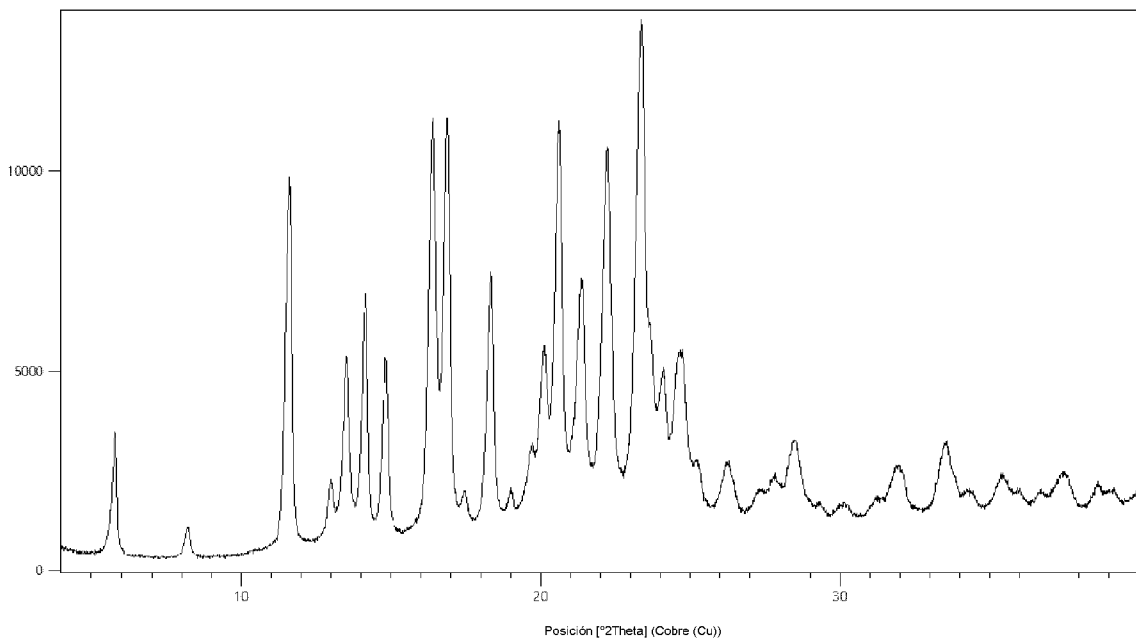


FIGURA 2B

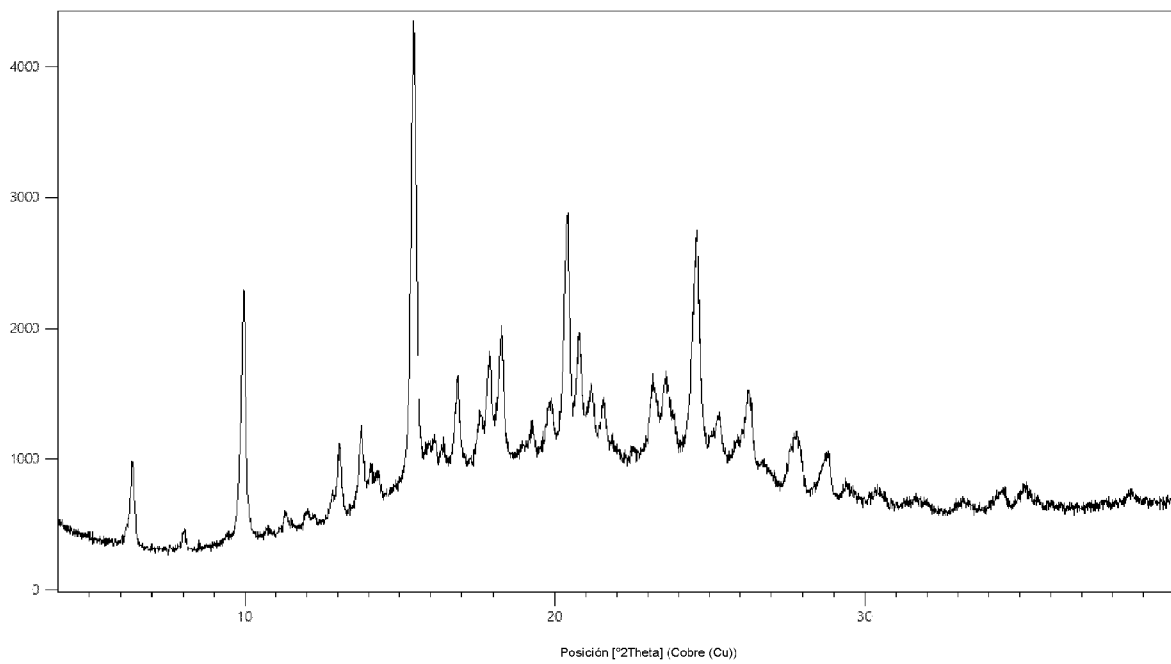


FIGURA 3

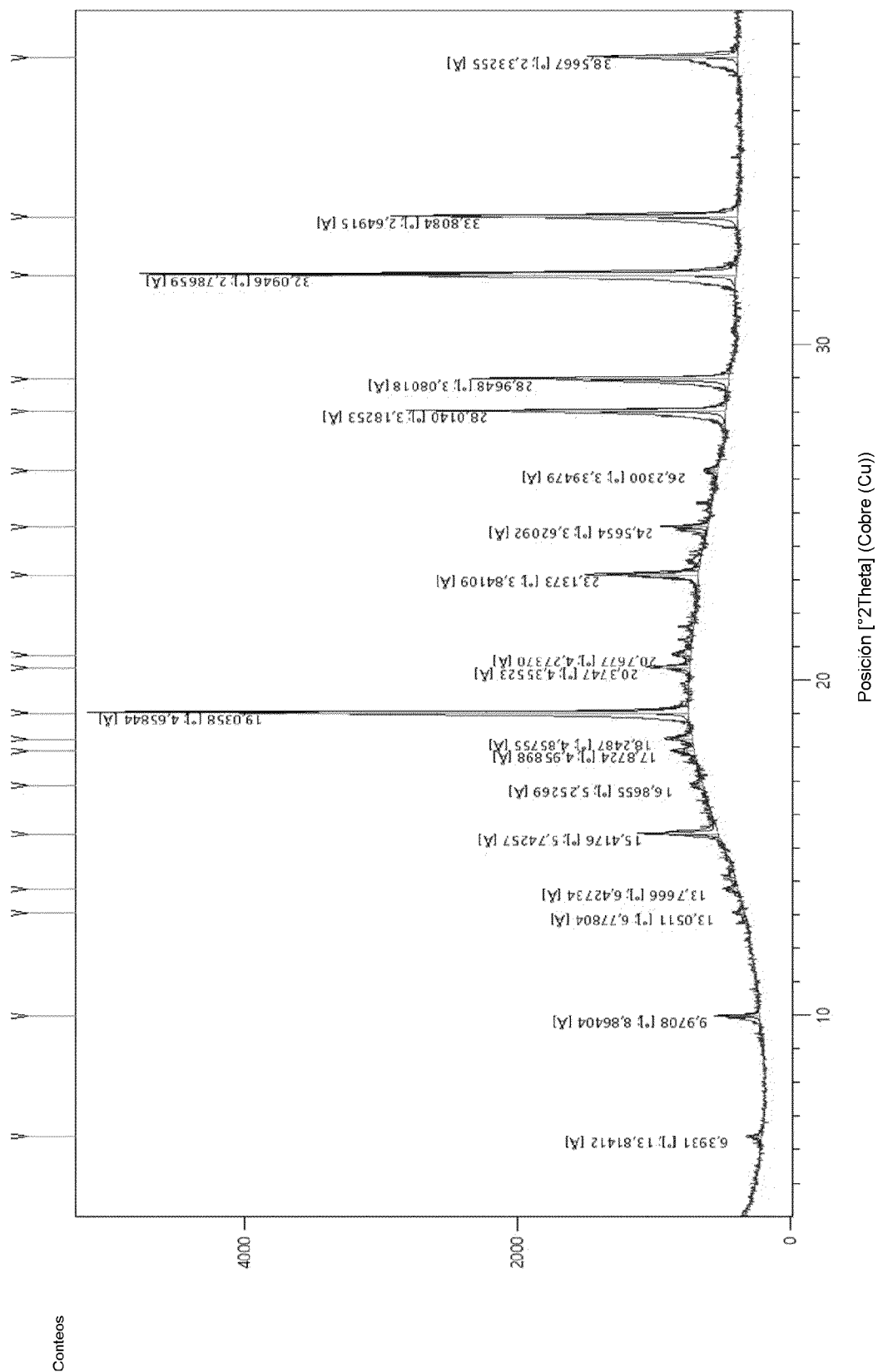


FIGURA 4

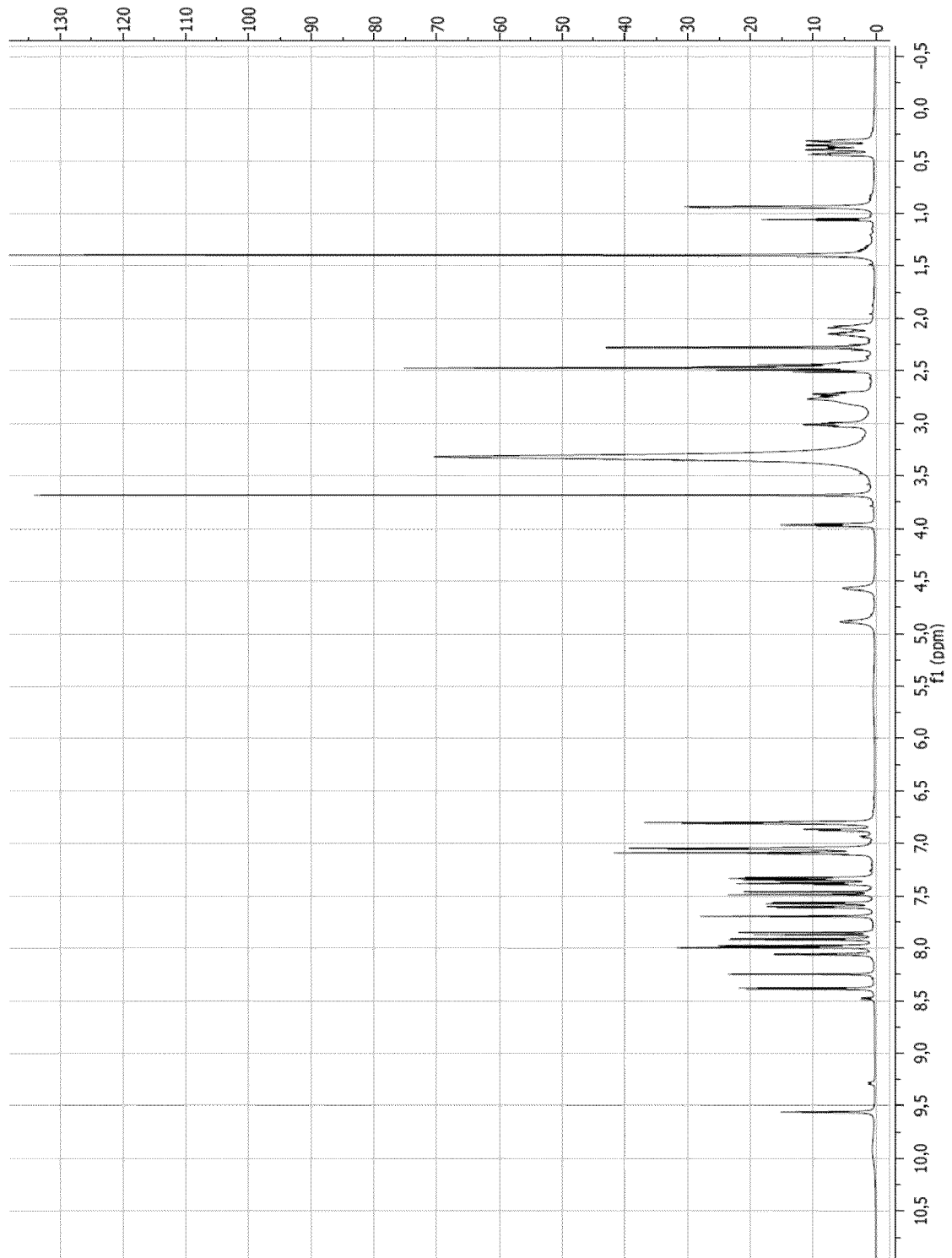


FIGURA 5

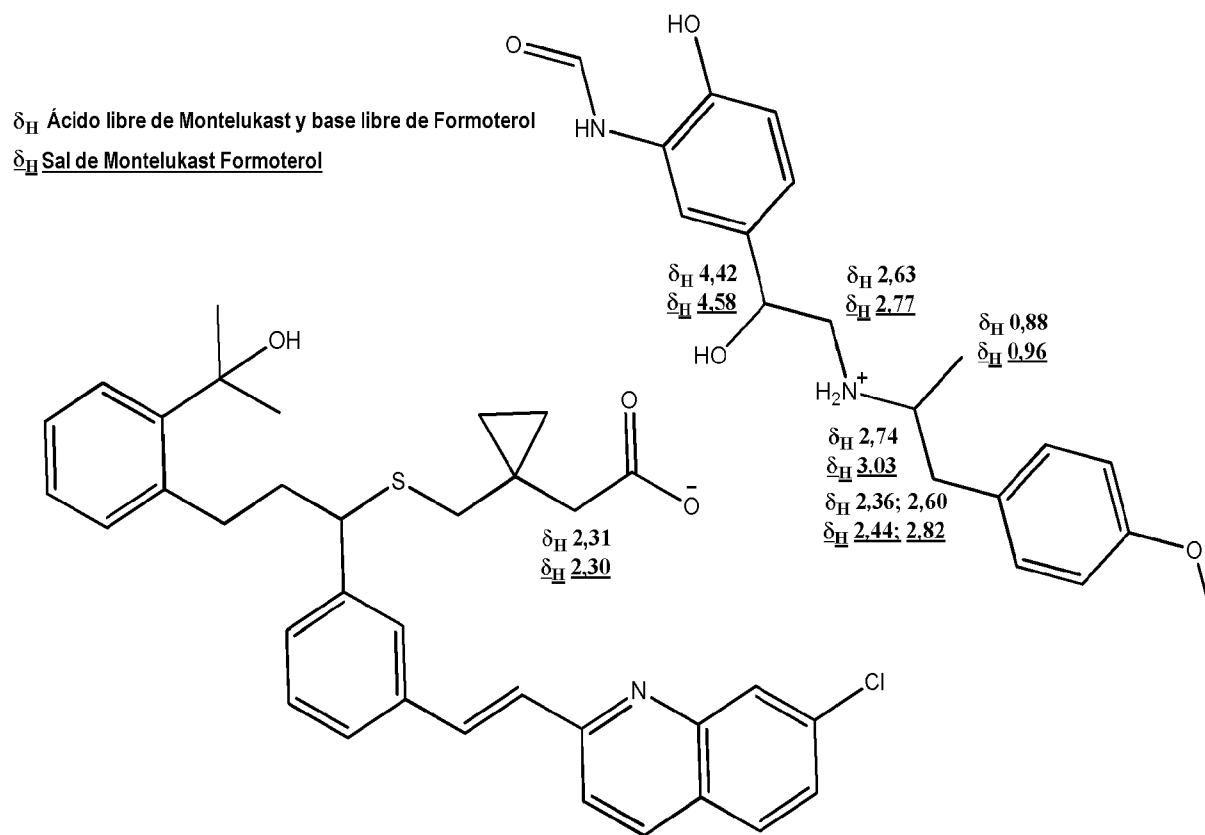


FIGURA 6

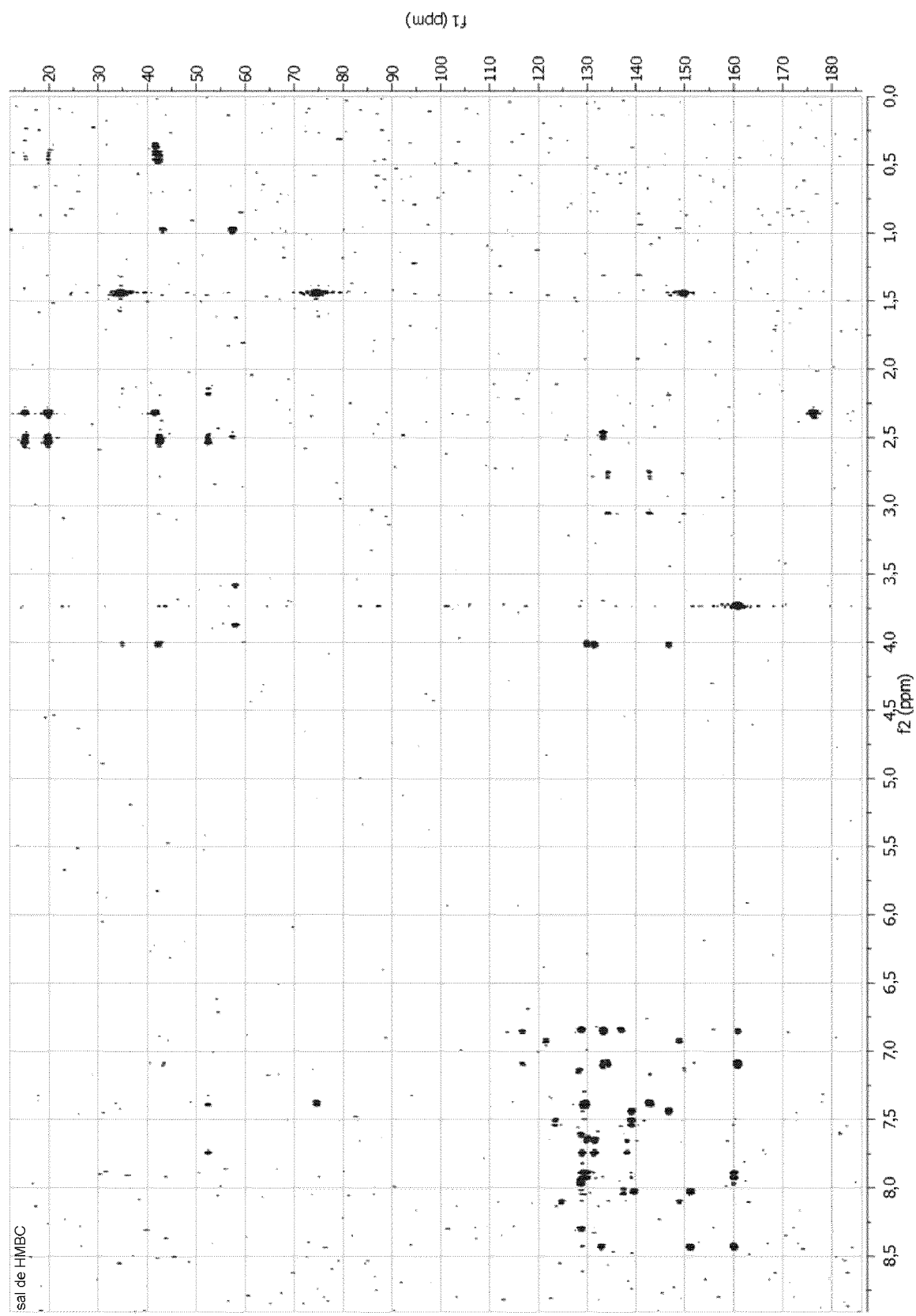


FIGURA 7

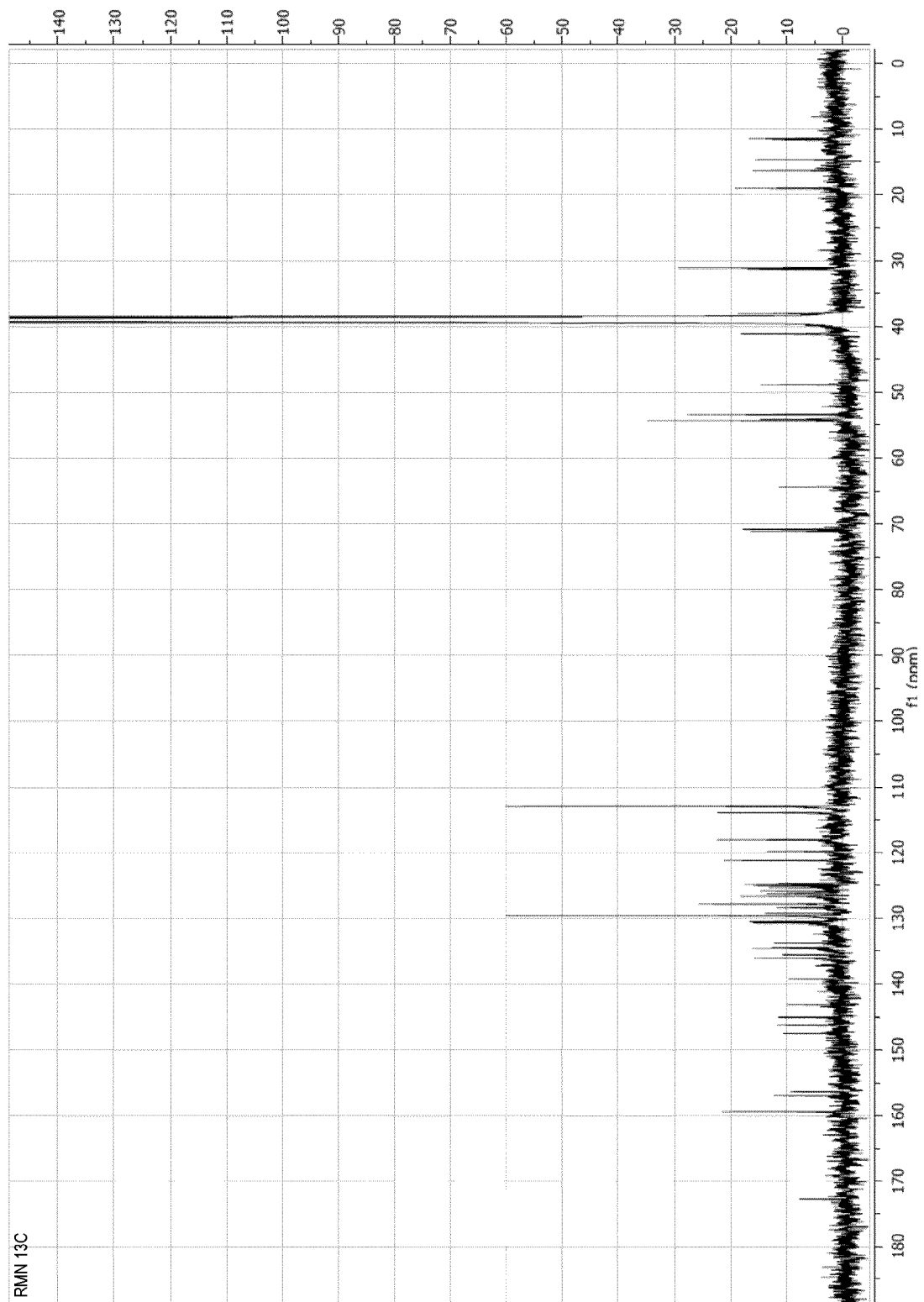


FIGURA 8

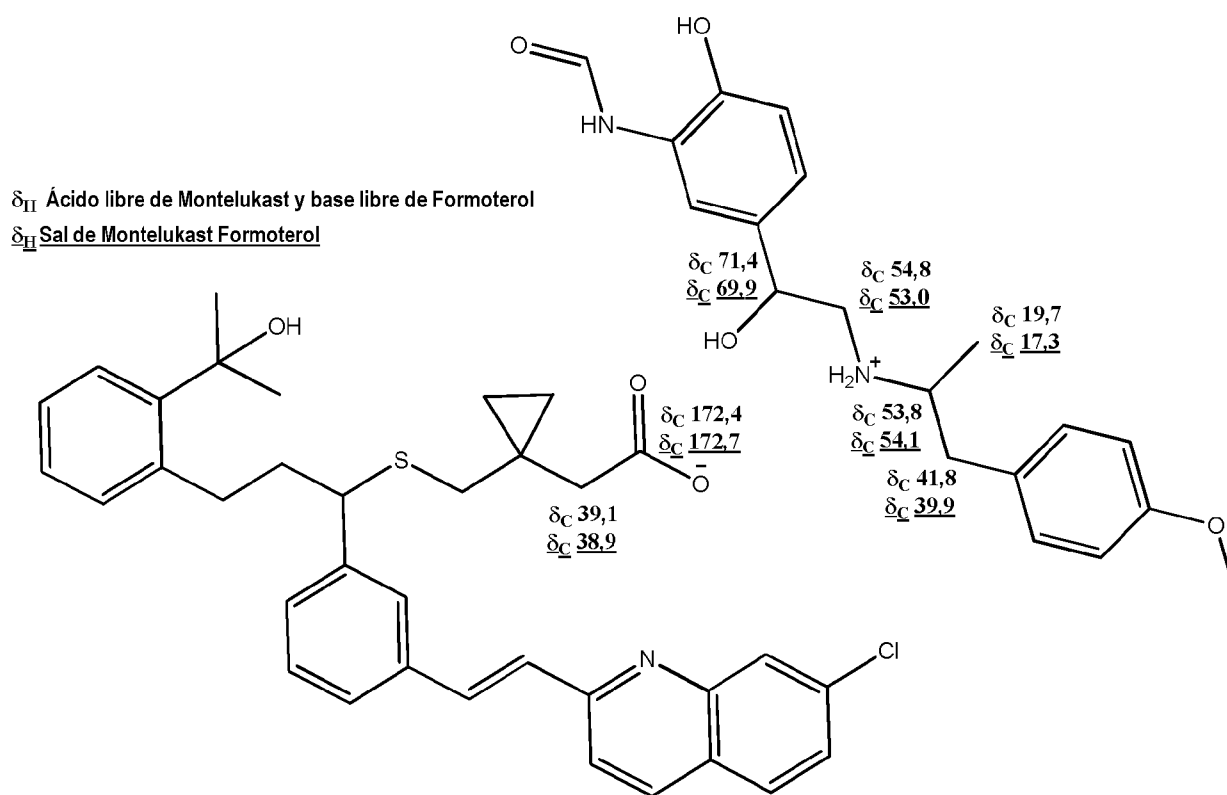


FIGURA 9

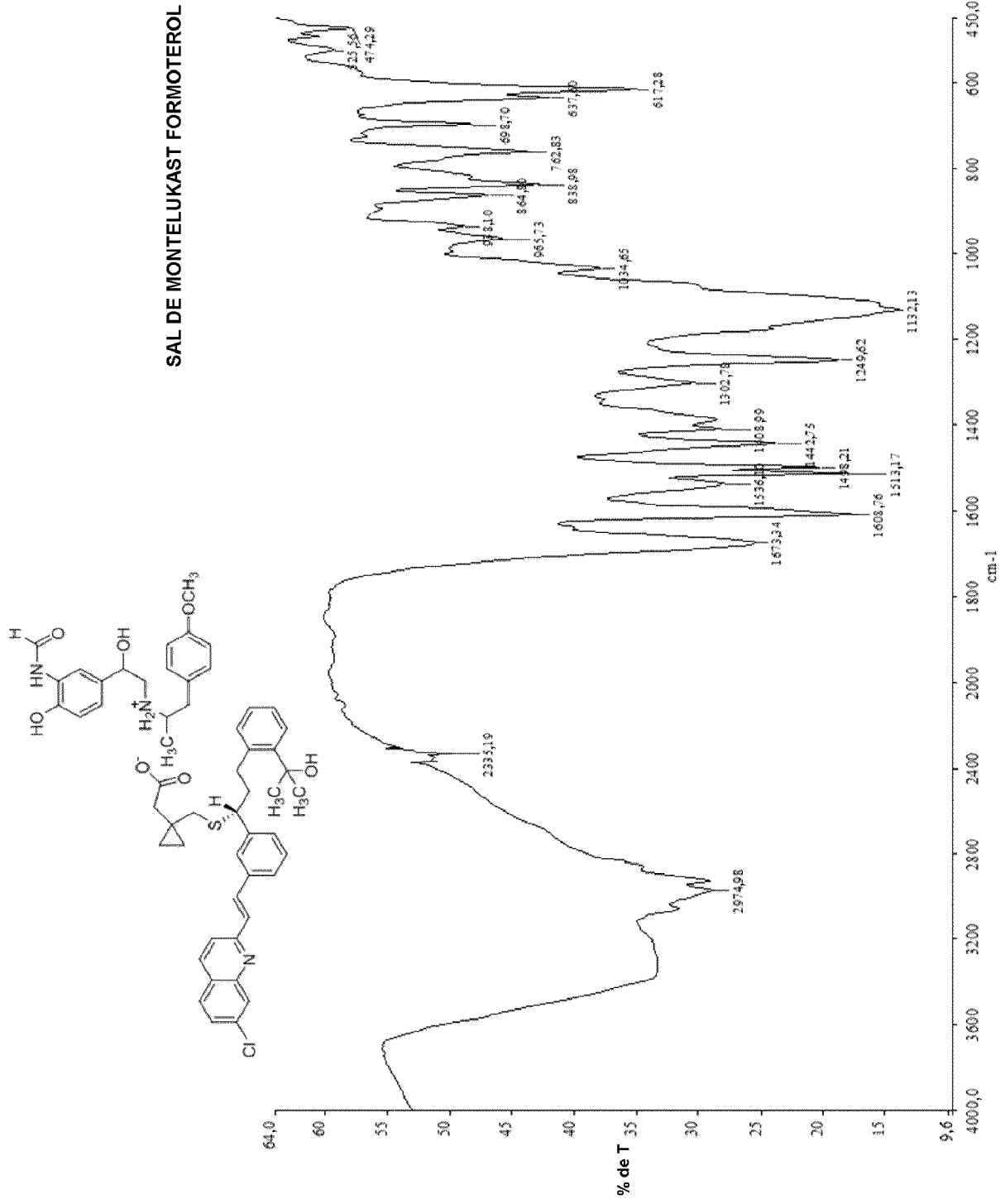


FIGURA 10

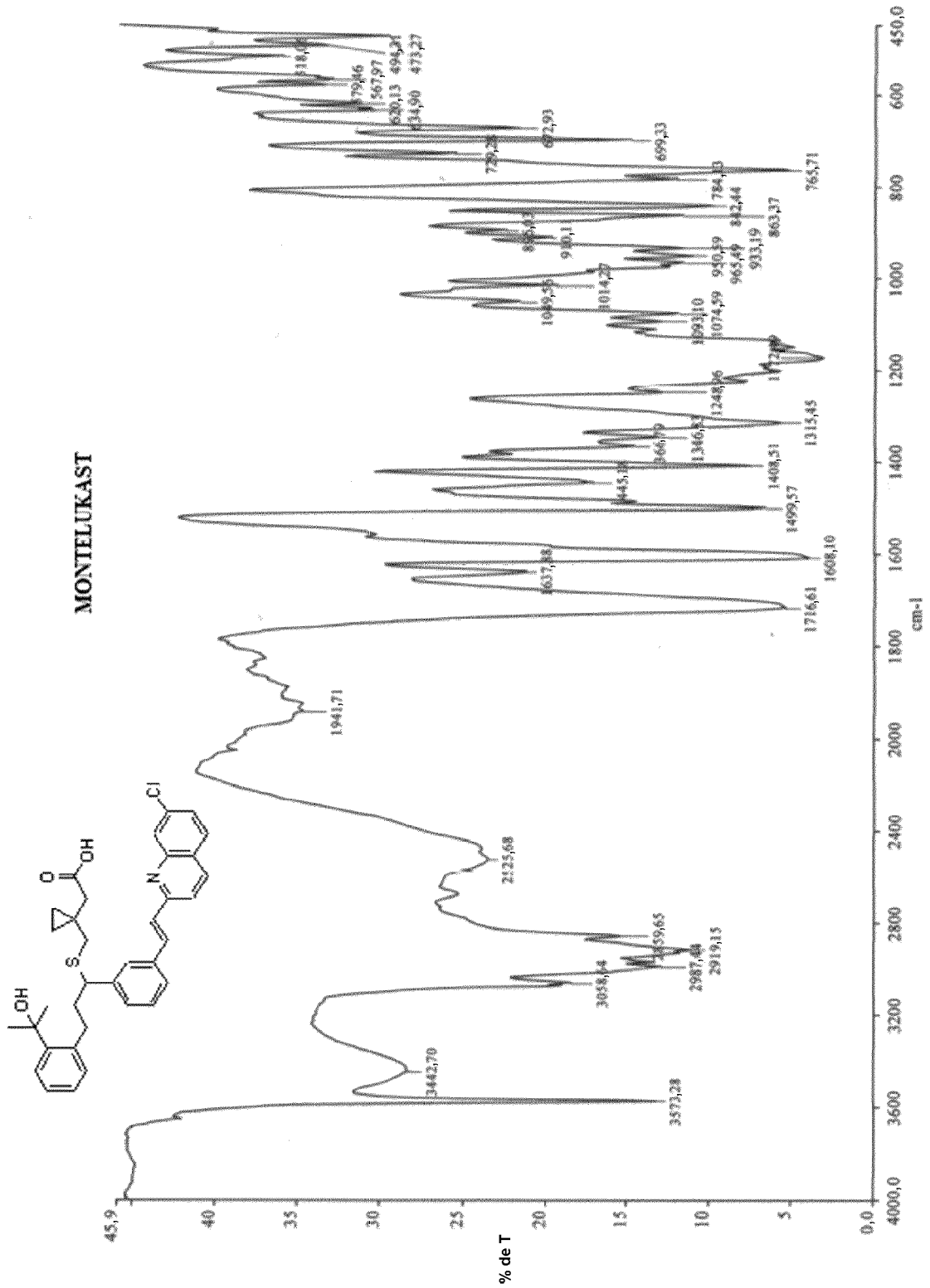


FIGURA 11

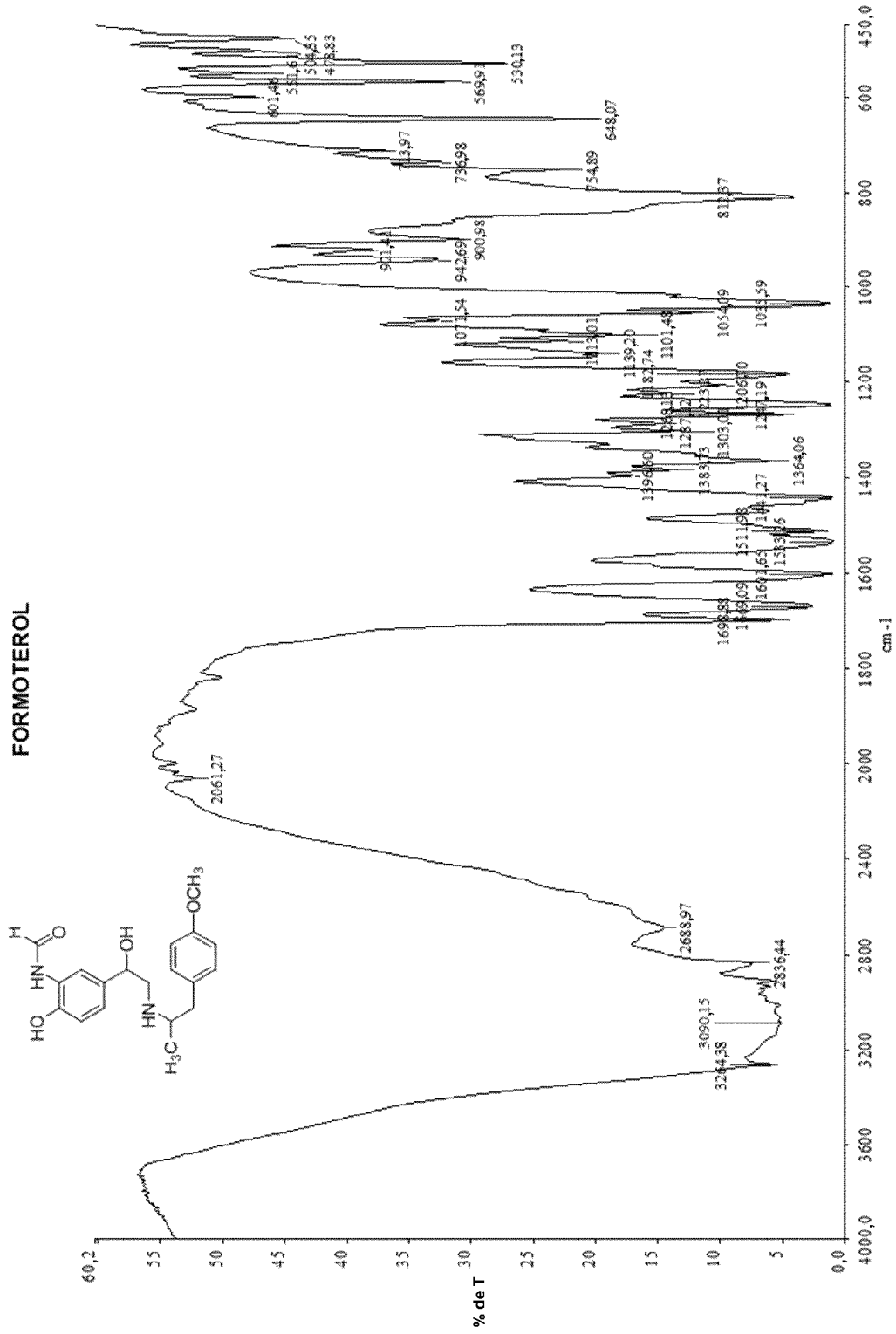


FIGURA 12

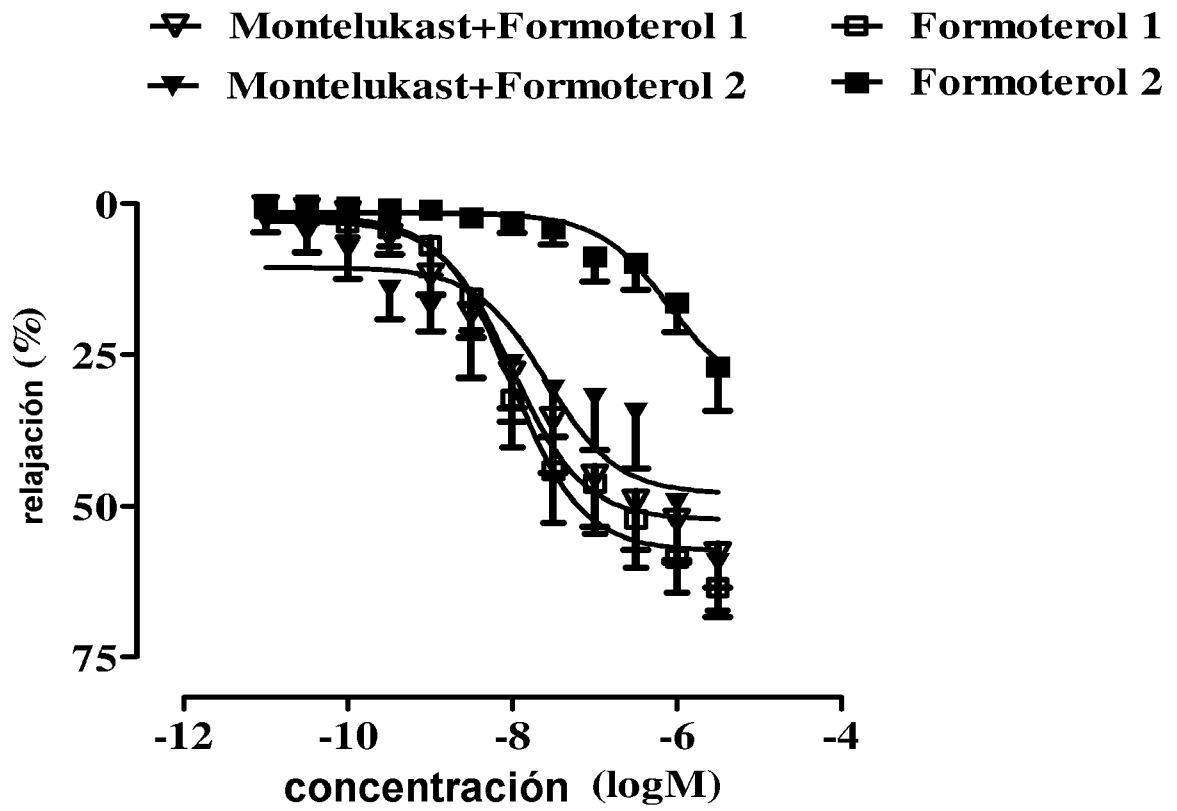


FIGURA 13

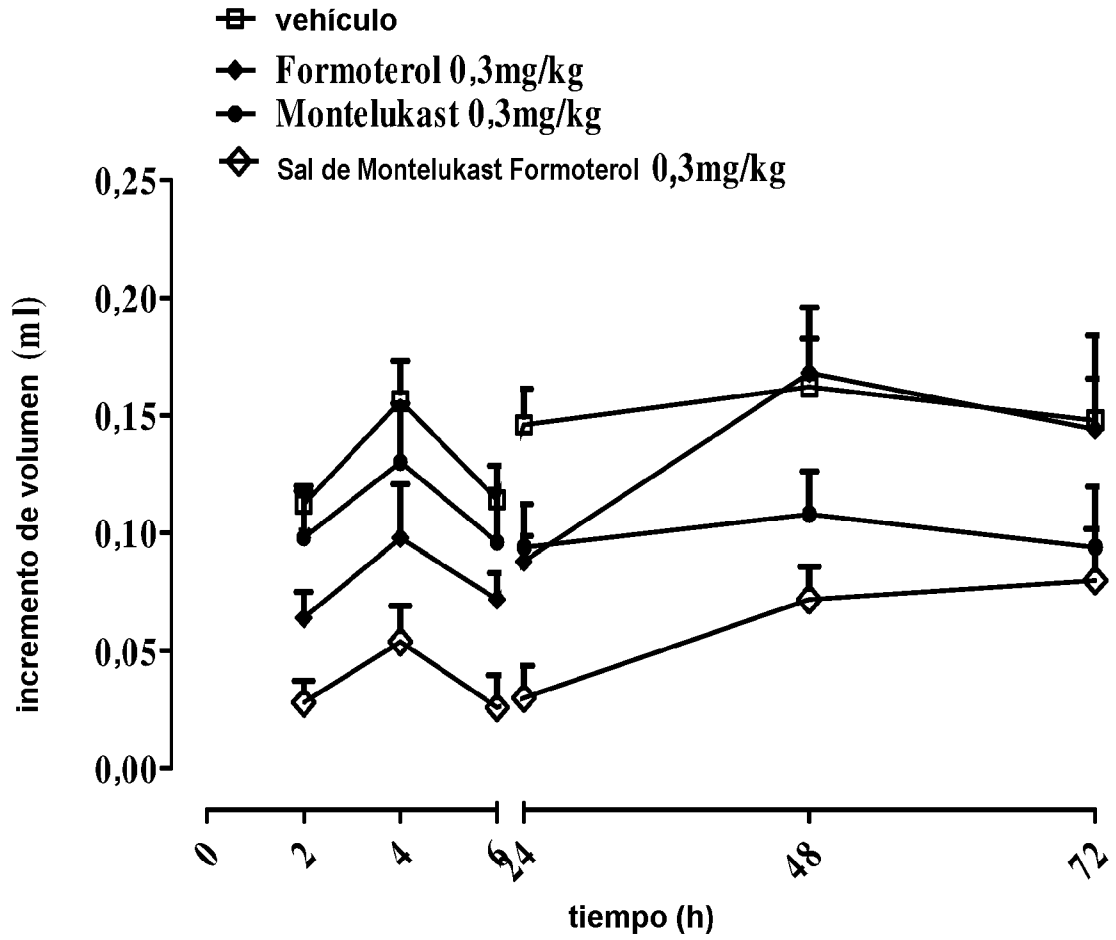


FIGURA 14

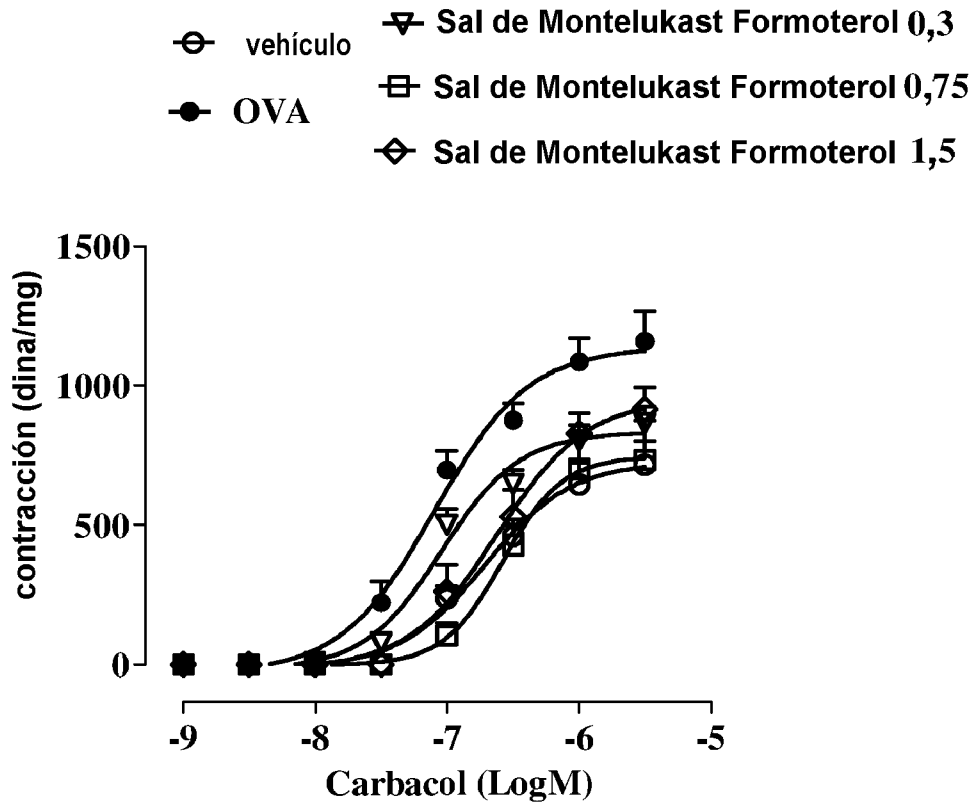


FIGURA 15

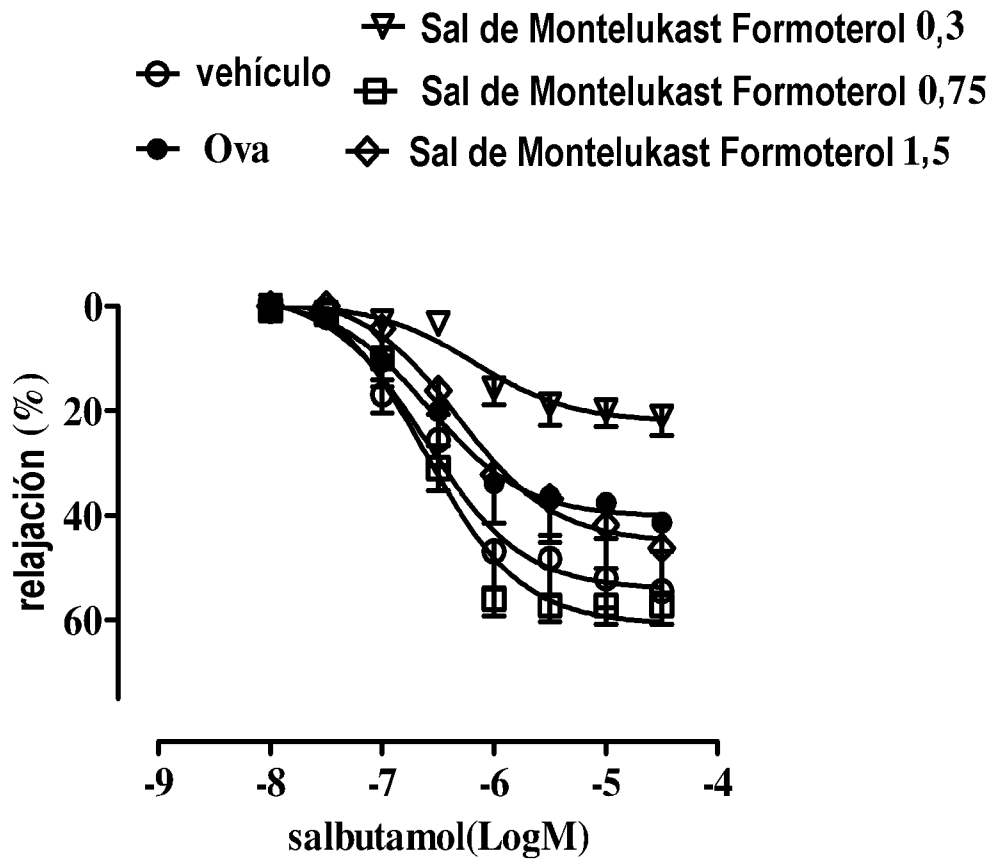


FIGURA 16

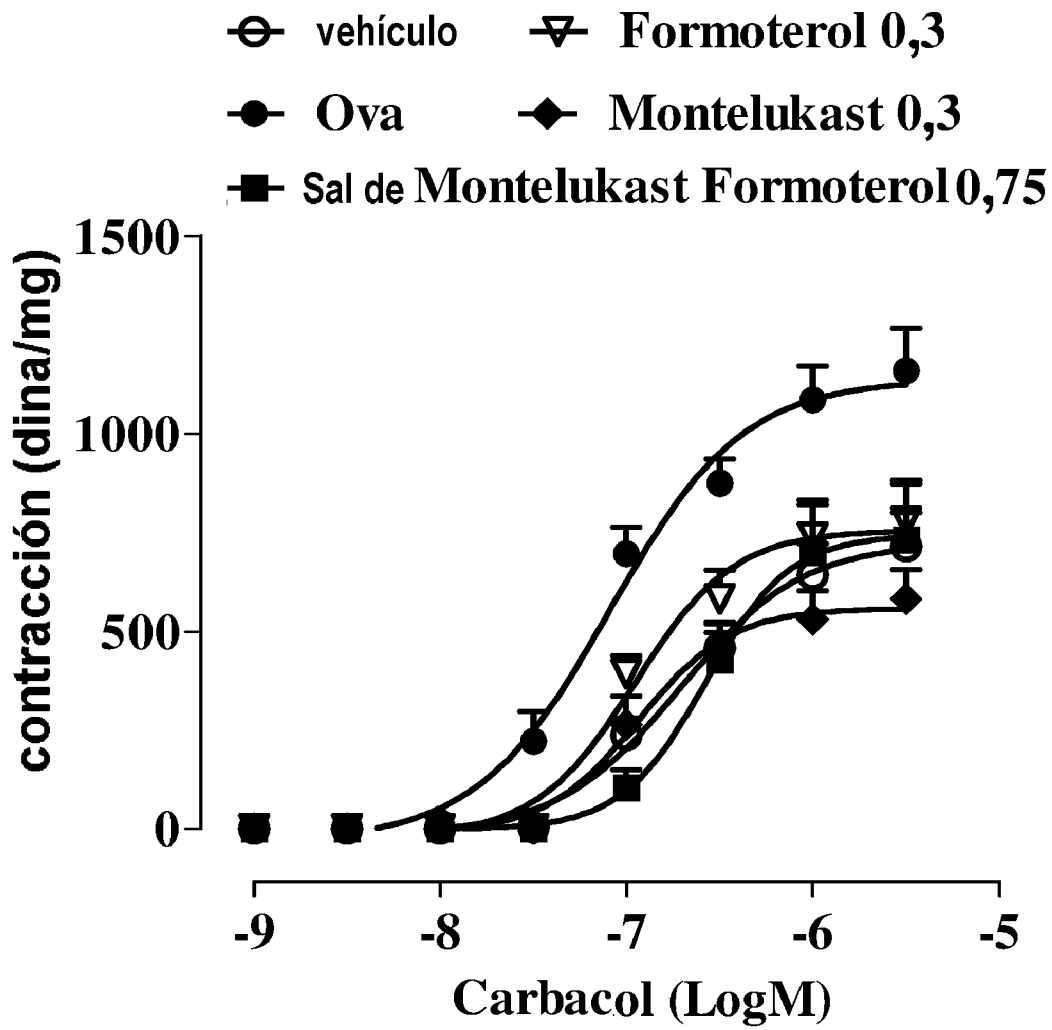


FIGURA 17

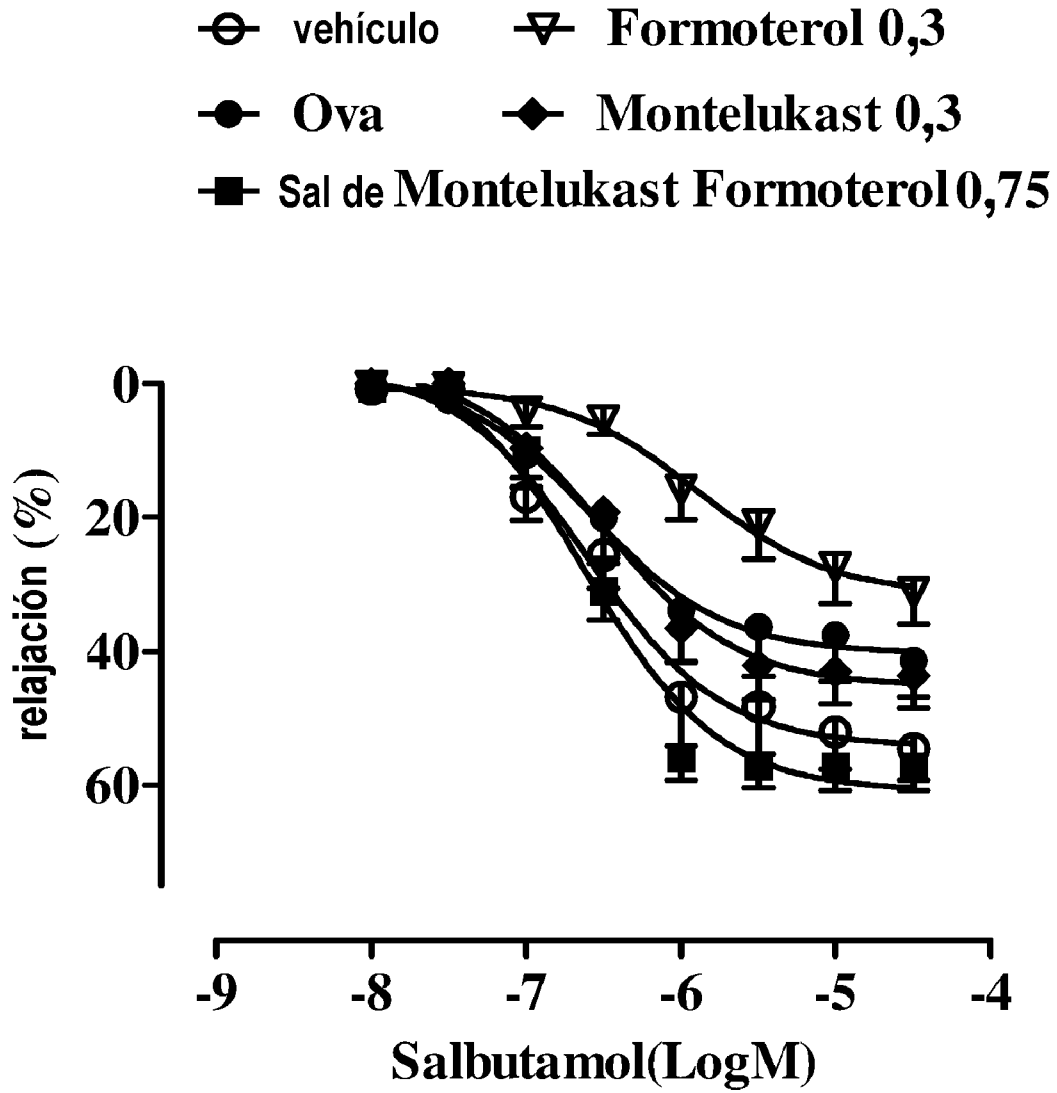


FIGURA 18A

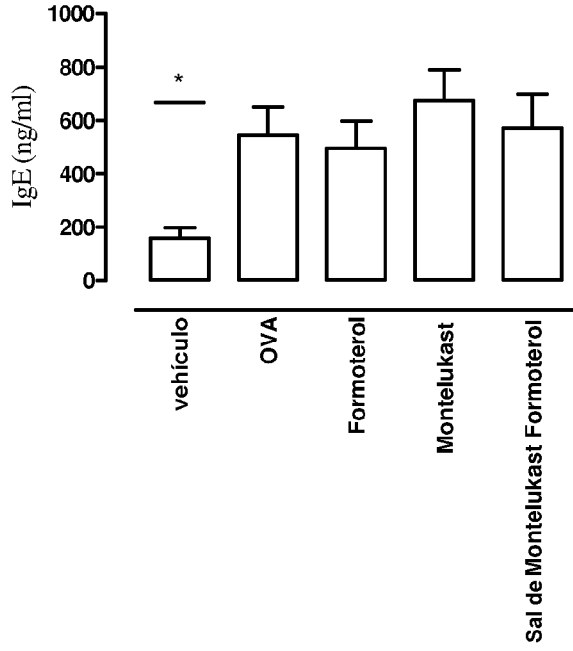


FIGURA 18B

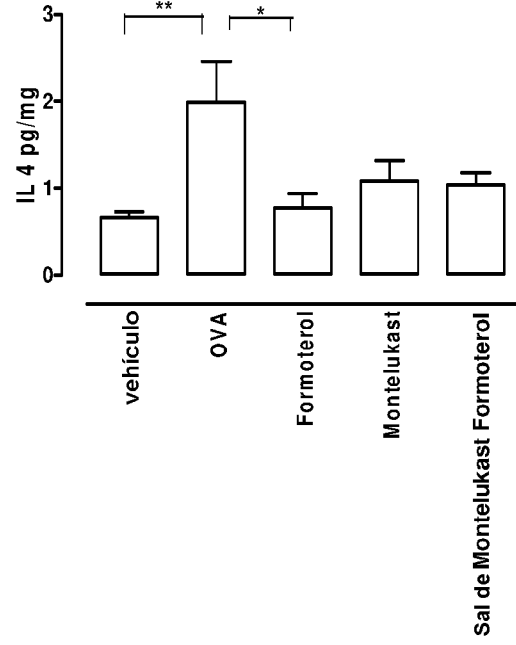


FIGURA 18C

