

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 621**

51 Int. Cl.:

A61K 31/52 (2006.01)

A61K 31/7076 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.04.2017 PCT/US2017/028996**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2017 WO17185061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2017 E 17786774 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024 EP 3445368**

54 Título: **Compuestos y métodos para el tratamiento de afecciones neurológicas y cardiovasculares**

30 Prioridad:

21.04.2016 US 201662325860 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.11.2024

73 Titular/es:

**ASTROCYTE PHARMACEUTICALS, INC. (33.3%)
245 First Street Suite 1800
Cambridge, Massachusetts 02142, US;
BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF
TEXAS SYSTEM (33.3%) y
THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND
HUMAN SERVICES (33.3%)**

72 Inventor/es:

**KORINEK, WILLIAM S.;
LECHLEITER, JAMES D.;
LISTON, THEODORE E. y
JACOBSON, KENNETH A.**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 989 621 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

Compuestos y métodos para el tratamiento de afecciones neurológicas y cardiovasculares

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos de uso de compuestos tal como se reivindica para tratar, mejorar o promover la recuperación de ciertas afecciones del cerebro, el sistema nervioso central (SNC) o el sistema cardiovascular, tal como una lesión cerebral, una enfermedad neurodegenerativa o isquemia cardíaca.

10

Antecedentes de la invención

Las lesiones cerebrales son una afección médica tristemente común y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. El cerebro es particularmente susceptible a las lesiones puesto que las neuronas tienen una capacidad limitada para repararse. Cuando nace un individuo, el cerebro ya tiene esencialmente todas las neuronas que tendrá en la vida. A diferencia de otras células en el cuerpo, las neuronas dejan de reproducirse poco después del nacimiento. Si estas células se lesionan o mueren, no se sustituyen, lo que culmina a menudo en la degradación incapacitante y en gran medida irreversible de la capacidad cognitiva y sensomotora de una persona. Afecciones que resultan en muerte y daño de las células nerviosas van de episodios isquémicos (por ejemplo, accidente cerebrovascular) y traumatismo, a trastornos degenerativos (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer).

15

20

La lesión del sistema nervioso central (SNC) es una causa importante de muerte y discapacidad en todo el mundo. Por ejemplo, de acuerdo con los CDC, aproximadamente 1,7 millones de personas sufren una lesión cerebral traumática (TBI) anualmente, lo que le cuesta a la economía de los EE. UU. más de 60 mil millones de dólares al año en términos de costos médicos y pérdida de productividad (Finkelstein, E; Corso, P; Miller, T, *The Incidence and Economic Burden of Injuries in the United States*, Oxford University Press: Nueva York, 2006). Además, el accidente cerebrovascular es la tercera causa principal de muerte en los EE. UU., con una incidencia estimada de 795.000 casos al año, una causa importante de discapacidad, y que cuesta a la economía de EE. UU. más de 34 mil millones de dólares al año (NINDS, 2014; stroke.nih.gov; and Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, *et al.* "Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association", *Circulation*. 2015; e29-322).

25

30

En la fase aguda, hay una oportunidad para el tratamiento de los pacientes dentro de las 24 horas que puede limitar el alcance de los daños. Inmediatamente después de un accidente cerebrovascular isquémico o hemorrágico, el sitio de ataque en el cerebro contiene normalmente un núcleo de tejido que se daña irreversiblemente, y luego también un área de tejido viable pero en riesgo denominada la penumbra. Durante este período, el insuficiente suministro de oxígeno y glucosa a las células cerebrales da como resultado una lesión secundaria adicional a la penumbra. La falta de oxígeno y la glucosa disminuye la producción de energía por las mitocondrias celulares. Un efecto inmediato de este agotamiento de la energía es el fallo de las bombas de iones, que mediante la elevación de iones de potasio extracelular (K^+), resulta en olas de despolarizaciones de propagación recurrente en el tejido cerebral. Al mismo tiempo, la afluencia de iones de sodio (Na^+) en las células, seguido por iones cloruro (Cl^-), da como resultado la inflamación de las células debido a la elevación de la presión osmótica, presionando las neuronas cercanas y sus procesos, lo que conduce en última instancia a la lisis (ruptura de células) y respuestas inflamatorias. En general, esta interrupción de la homeostasis de iones conduce a la excitotoxicidad, hinchazón celular y muerte celular que extiende el daño al tejido adyacente y expande lesiones por mecanismos secundarios. Hay una necesidad de tratamientos eficaces durante las primeras 24 horas para proteger a las células del cerebro estresadas. La propagación del daño cerebral en el accidente cerebrovascular es similar a la observada en otras formas de lesión cerebral tales como traumatismo y conmociones cerebrales.

35

40

45

Más allá del tratamiento agudo, la función de los astrocitos eficaz desempeña un papel clave en la neurorestauración más amplia, en el período de 24-96 horas después de la lesión cerebral, en el período de meses-años en pacientes con neurodegeneración tales como la enfermedad de Alzheimer, o más generalmente en individuos envejecidos. La incapacidad de las células cerebrales para regenerarse requiere que el tejido cerebral intacto restante se reorganice en un intento de recuperar cualquier pérdida de función. Este potencial para la reorganización neuronal se ve disminuida en las personas mayores.

50

55

Se ha sugerido que los receptores GPCR median efectos cardioprotectores. Por lo tanto, existe un potencial para el tratamiento de afecciones del corazón y cardiovasculares por mecanismos de acción similares a través de la modulación de estos receptores.

60

Gao *et al.*, 2004, *Current Topics in Medicinal Chemistry* 4(8): 855 describen agonistas parciales para receptores de adenosina A_3 .

El documento US 2011/046166 describe nucleósidos de (N)-metanocarbaadenina como agonistas de receptores de adenosina A_3 altamente potentes, composiciones farmacéuticas que comprenden tales nucleósidos y un método de uso de estos nucleósidos. Estos nucleósidos presentan selectividades similares que los agonistas del receptor A_3 frente al A_1 para receptores de adenosina tanto humanos como de ratón y se contemplan para su uso en el tratamiento

65

de varias enfermedades, por ejemplo, inflamación, isquemia cardíaca, accidente cerebrovascular, asma, diabetes y arritmias cardíacas.

5 El documento WO 2006/091905 describe compuestos así como composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos, y métodos terapéuticos que comprenden administrar los compuestos. Los compuestos tienen propiedades antivirales y son útiles para tratar infecciones virales (por ejemplo, VHC) en animales (por ejemplo, seres humanos).

10 Lewerenz *et al.*, 2003, Drug Development Research 58: 420-427 describe receptores A₃ en neuronas corticales: aspectos farmacológicos y neuroprotección durante la hipoxia.

15 El documento US 5 773 423 describe N6-benciladenosina-5'-N-uronamida y compuestos sustituidos relacionados, particularmente los que contienen sustituyentes en los grupos bencilo y/o uronamida, y ribósidos de xantina modificados, así como composiciones farmacéuticas que contienen tales compuestos. También se describe un método para activar selectivamente un receptor de adenosina A₃ en un mamífero, método que comprende administrar de manera aguda o crónica a un mamífero que necesita activación selectiva de su receptor de adenosina A₃ una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que se une con el receptor A₃ para estimular una respuesta dependiente del receptor A₃.

20 El documento US 6 586 413 describe composiciones y métodos para reducir o prevenir el daño isquémico del corazón. Se prefiere la administración simultánea de agonistas específicos del receptor A₃/A₁, a pacientes que padecen daño isquémico o en riesgo del mismo. El documento US 6 586 413 también describe un conjugado binario que actúa como agonista para el receptor A₃ y un antagonista en el receptor A_{2a}, que se administra para reducir o prevenir el daño isquémico al corazón.

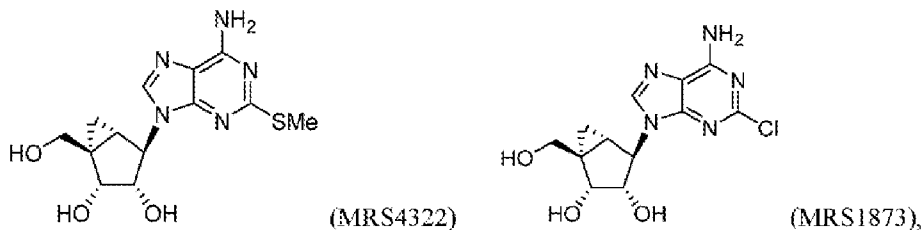
25 Es urgente y apremiante la necesidad médica no satisfecha de tratamientos más eficaces para las lesiones cerebrales, lesiones del SNC, enfermedades del corazón y cardiovasculares y afecciones relacionadas, así como la promoción de neurorestauración en pacientes que tienen una afección neurodegenerativa como Alzheimer.

30 **Sumario de la Invención**

Las referencias a métodos de tratamiento en los párrafos posteriores de esta descripción han de interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

35 Todas las realizaciones en los párrafos posteriores que no se encuentran dentro de las reivindicaciones se proporcionan para contexto/referencia. La invención es tal como se define en el conjunto de reivindicaciones adjuntas.

40 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar una lesión, enfermedad o afección seleccionada de una lesión cerebral traumática (TBI), accidente cerebrovascular, una afección neurodegenerativa o una enfermedad del corazón o cardiovascular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A₃ (A₃R) tal como se reivindica. En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar una lesión, enfermedad o afección seleccionada de una lesión cerebral traumática (TBI), accidente cerebrovascular, una afección neurodegenerativa o una enfermedad del corazón o cardiovascular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un agonista sesgado, agonista parcial o agonista parcial sesgado de un receptor de adenosina A₃ (A₃R) seleccionado de



o

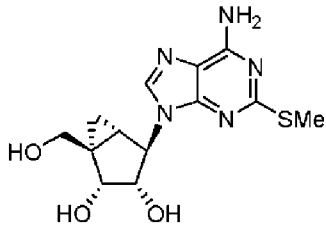
50 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el mismo.

En un aspecto, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A₃ (A₃R) para su uso para tratar una lesión, enfermedad o afección seleccionada de una lesión cerebral traumática (TBI),

accidente cerebrovascular o una afección neurodegenerativa, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo dicha cantidad eficaz, en donde el A3R se agoniza de manera sesgada hacia funciones neuroprotectoras del receptor A3R por medio de la activación preferente de la movilización de calcio intracelular con menos, o ninguna, activación de otras rutas mediadas por A3R, o por medio de la activación preferente de la movilización de calcio intracelular mediada por Gq11, modulación mediada por Gi de la producción de cAMP o la fosforilación mediada por Gi de ERK1/2 y Akt;

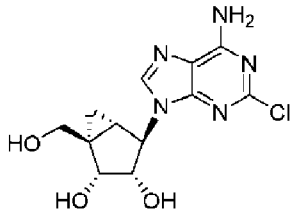
5 intracelular mediada por Gq11, modulación mediada por Gi de la producción de cAMP o la fosforilación mediada por Gi de ERK1/2 y Akt;

en donde (I) el agonista es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o:

en donde (II) el agonista es

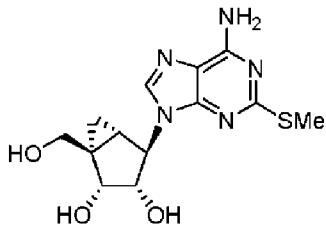


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A3 (A3R) para su uso para tratar una enfermedad del corazón o cardiovascular, comprendiendo dicho uso administrar a un paciente en necesidad del mismo dicha cantidad eficaz, en donde el agonista es un agonista sesgado de un A3R con función de cardioprotección mejorada en relación con un agonista de A3R completo por medio de la activación preferente de una o más de las siguientes rutas mediadas por A3R: activación de la movilización de calcio intracelular mediada por Gq11, modulación mediada por Gi de la producción de cAMP, fosforilación mediada por Gi de ERK1/2 y Akt, modulación de canales de potasio sensibles a ATP o modulación de la activación de beta-arrestina;

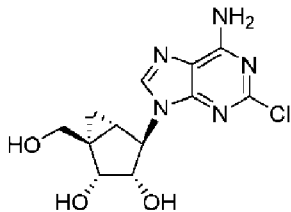
25 En un aspecto, la presente invención proporciona una cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A3 (A3R) para su uso para tratar una enfermedad del corazón o cardiovascular, comprendiendo dicho uso administrar a un paciente en necesidad del mismo dicha cantidad eficaz, en donde el agonista es un agonista sesgado de un A3R con función de cardioprotección mejorada en relación con un agonista de A3R completo por medio de la activación preferente de una o más de las siguientes rutas mediadas por A3R: activación de la movilización de calcio intracelular mediada por Gq11, modulación mediada por Gi de la producción de cAMP, fosforilación mediada por Gi de ERK1/2 y Akt, modulación de canales de potasio sensibles a ATP o modulación de la activación de beta-arrestina;

en donde (I) el agonista es



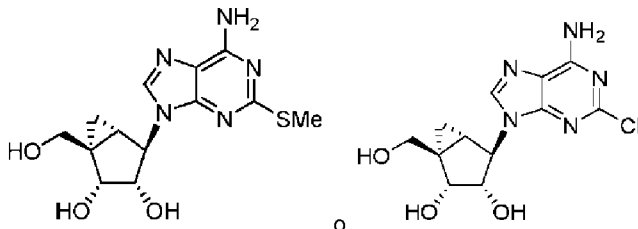
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o:

en donde (II) el agonista es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar una lesión o afección cerebral o del sistema nervioso central (SNC) seleccionada de lesión cerebral traumática (TBI) o accidente cerebrovascular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado de:



una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el mismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar o mejorar una lesión cerebral traumática (TBI), daño por radiación, accidente cerebrovascular, cefalea por migraña, una enfermedad del corazón o cardiovascular, o trastorno neurodegenerativo, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto divulgado tal como se reivindica.

Breve descripción de las figuras

La figura 1A muestra los perfiles de concentración-tiempo en plasma y cerebro de MRS4322 en ratones después de la administración intraperitoneal. La figura 1B muestra perfiles de concentración-tiempo de fluido extracelular en plasma y cerebro de MRS4322 en cerdos neonatales después de la administración intravenosa.

La figura 2 muestra los perfiles de concentración-tiempo en plasma y cerebro de MRS4322 en ratones después de la administración intraperitoneal de MRS2365.

La figura 3 muestra la estabilidad *in vitro* de MRS2365 en plasma de ratón tratado con EDTA.

La figura 4 muestra la estabilidad *in vitro* de MRS2365 en plasma humano tratado con EDTA.

La figura 5 muestra la estabilidad *in vitro* de MRS2365 en sangre completa de ratón tratada con EDTA.

La figura 6 muestra la estabilidad *in vitro* de MRS2365 en sangre completa humana tratada con EDTA.

La figura 7 muestra la estabilidad *in vitro* de MRS2365 en plasma de ratón tratado con EDTA y heparina durante un período de incubación de 90 segundos.

La figura 8 muestra la estabilidad *in vitro* de MRS2365 en plasma humano tratado con heparina y EDTA durante un período de incubación de 90 segundos.

La figura 9 muestra cromatogramas de iones de LC/MS-MS de iones positivos y espectros de iones de producto de metabolitos de MRS2365 en plasma humano heparinizado después de una incubación de 30 minutos.

La figura 10 muestra cromatogramas de iones de LC/MS-MS de iones positivos y espectros de iones de producto de metabolitos de MRS2365 en sangre completa humana heparinizada después de una incubación de 30 minutos.

La figura 11 muestra un esquema que representa los metabolitos de MRS2365 detectados por LC/MS-MS de iones positivos y negativos en plasma humano heparinizado y sangre completa. Se observaron dos metabolitos de MRS2365 después de la incubación a 100 μ M en sangre completa humana y plasma (heparina de litio como anticoagulante): M2, identificado como el metabolito parcialmente desfosforilado de MRS2365 (es decir, con un grupo de fosfato restante, MRS2347); y M1, identificado como el metabolito completamente desfosforilado de MRS2365 (es decir, MRS4322).

Las figuras 12A-12D muestran los resultados de tratamientos con MRS4322, CI-IB-MECA y MRS2365 en ratones expuestos a TBI o simulado (experimento de control). TBI normalmente induce aumentos en la expresión de GFAP. Los ratones se sometieron a tratamiento simulado o TBI (en el lado ipsilateral del cerebro) y recibieron tratamientos como se marca 30 minutos después del TBI. El plasma se obtuvo a partir de ratones a los 7 días después de la lesión, a continuación, los ratones se sacrificaron para obtener homogeneizados de cerebro de los hemisferios (tercio medio) ipsilateral ("Ipsi") y contralateral ("Cntr"). Los análisis de transferencia de tipo Western se normalizaron para actina. (Figuras 12A y 12C). Las transferencias representativas se muestran para homogeneizados de cerebro ipsilateral y el plasma en el día 7. La administración de MRS4322 o MRS2365 disminuyó los niveles cerebrales de expresión de

GFAP en ratones expuestos a TBI. (Figuras 12B y 12D). Se combinaron los datos de 3 experimentos distintos (N = número de ratones por tratamiento) y se representaron gráficamente como histogramas de barras, que se muestran como media de control +/- SEM. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ de TBI sin tratar (barra roja).

5 Las figuras 13A-13D muestran los resultados de experimentos de infarto por accidente cerebrovascular inducido por fototrombosis y los efectos de la administración de MRS4322 y/o el antagonista específico del receptor de adenosina tipo A_3 MRS1523. MRS4322 redujo los efectos del infarto por accidente cerebrovascular, pero estos efectos fueron revertidos por MRS1523. (Figura 13A). Secciones coronales de cerebros de ratón (cada grupo de secciones es de un solo ratón) con accidente cerebrovascular con fototrombosis en vehículo (solución salina inyectada) y en ratones
10 tratados, MRS4322 y MRS2365 como están marcados. Los ratones con accidente cerebrovascular recibieron un vehículo o tratamientos (inyecciones IP) dentro de los 30 minutos posteriores a la isquemia. Los ratones se sacrificaron entonces a las 24 horas después del accidente cerebrovascular, se extrajeron sus cerebros, se seccionaron y se tiñeron con TTC. (Figura 13B). Secciones coronales de ratones con accidente cerebrovascular se inyectaron previamente con el antagonista del receptor A_3 MRS1523. (Figura 13C). Volúmenes promedio de accidente cerebrovascular teñidos con TTC de MRS4322, MRS2365, MRS5698 y CI-IBMECA como están marcados. (Figura
15 13D). Volúmenes de accidente cerebrovascular en ratones pretratados con el antagonista del receptor A_3 MRS1523 como se indica. Los datos se agruparon de 2 experimentos (N = número de ratones por tratamiento) y se representaron como media +/- SEM. ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$.

20 Las figuras 14A-14B muestran los resultados de experimentos de infarto por accidente cerebrovascular inducido por fototrombosis y los efectos de la administración de MRS4322, MRS1873, o vehículo. Los infartos por accidente cerebrovascular inducidos por fototrombosis se reducen por MRS4322 y MRS1873. (Figura 14A). Secciones coronales de cerebros con accidente cerebrovascular con fototrombosis en vehículo (solución salina inyectada) y en los ratones tratados, MRS4322 y MRS1873 como están marcados. Ratones con accidente cerebrovascular recibieron vehículo o
25 tratamientos (inyecciones IP) dentro de los 30 minutos de isquemia. Los ratones se sacrificaron entonces a las 24 horas después del accidente cerebrovascular, se extrajeron sus cerebros, se seccionaron y se tiñeron con TTC. (Figura 14B). Volúmenes promedio de accidente cerebrovascular teñido con TTC como están marcados. Se combinaron los datos de 3 experimentos (N = número de ratones por tratamiento) y se representaron como media +/- SEM. ** $p < 0,01$.

30 La figura 15 muestra las estructuras de ciertos compuestos adecuados para uso en la invención reivindicada.

La figura 16 muestra los perfiles de concentración-tiempo en cerebro y líquido cefalorraquídeo de MRS4322 en cerdos neonatales después de la administración intravenosa. Después de la administración intravenosa a los cerdos neonatales, fueron detectables concentraciones de MRS4322 en muestras de plasma, cerebro, líquido extracelular del
35 cerebro y líquido cefalorraquídeo.

La figura 17 muestra experimentos de unión de competencia de MRS4322 frente al radioligando agonista de A_3 [3H]NECA (10 nM) en receptores A_3 humanos expresados en células CHO. El valor de K_i calculado para MRS4322 fue 1490 ± 410 nM.
40

La figura 18 muestra experimentos de unión de competencia de MRS4322 frente al radioligando agonista de A_3 [3H]NECA (10 nM) en receptores A_3 de ratón expresados en células CHO. El valor de K_i calculado para MRS4322 fue 4940 ± 974 nM.

45 La figura 19 muestra experimentos de acumulación de cAMP de MRS4322 y NECA en los receptores A_3 humanos expresados en células CHO. El valor de EC_{50} calculado para MRS4322 fue 3630 ± 370 nM; para NECA se determinó un valor de EC_{50} de $41,8 \pm 6,3$ nM.

50 La figura 20 muestra experimentos de acumulación de cAMP de MRS4322 y NECA en receptores A_3 de ratón expresados en células CHO. El valor de EC_{50} calculado para MRS4322 fue 759 ± 170 nM; para NECA se determinó un valor de EC_{50} de $6,85 \pm 0,88$ nM.

Descripción detallada de ciertas realizaciones de la invención

55 1. Lesiones y afecciones del cerebro, SNC, cardiovasculares y otras

Se describe un nuevo enfoque para prevenir y/o tratar el daño cerebral asociado con traumatismo cerebral agudo, así como enfermedades a largo plazo del cerebro y SNC y enfermedades y afecciones del corazón y cardiovasculares. Se describen además métodos de tratamiento de tales lesiones, enfermedades y afecciones mediante el uso de
60 efectos neuroprotectores y neurorestauradores mediados por astrocitos, que ahora se entiende como la célula cuidadora natural clave de las neuronas, así como de las mitocondrias de astrocitos, que suministran una parte significativa de la energía del cerebro. También se describen métodos de tratamiento de tales lesiones, enfermedades y afecciones por efectos cardioprotectores y regenerativos mediados por receptores A_3R . En cuanto a efectos neuroprotectores y neurorestauradores, sin desear estar limitados por la teoría, se cree que la mejora selectiva de metabolismo de la energía de astrocitos mediada por receptores A_3R y/o $P2Y_1$ promueve funciones cuidadoras de
65 astrocitos, como sus funciones neuroprotectoras y neurorestauradoras, a su vez mejora la resistencia de las neuronas

y otras células a tanto lesión aguda como estrés a largo plazo. En algunos casos, puede ser ventajoso lograr un sesgo, es decir, selectivo o preferente, de una o más rutas mediadas por receptores A_3R y/o $P2Y_1$ en donde una o más rutas no deseadas no están activadas, o activadas en un grado menor. Además de, o como alternativa a los astrocitos, se puede activar la función neuroprotectora o neurorestauradora de la glía, la microglía, las neuronas, las células del endotelio y otros tipos de células del cerebro y/o del SNC. Se describen compuestos y métodos de uso de los mismos para tratar, mejorar o promover la recuperación de ciertas afecciones del cerebro o del sistema nervioso central (SNC), tales como lesiones cerebrales, por ejemplo mediante el aumento de los efectos de neuroprotección y/o neurorestauradores mediados por astrocitos, glía, microglía, neuronas, células endoteliales u otras células del cerebro y/o SNC, que comprenden administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto descrito.

Los astrocitos desempeñan un papel clave en el apoyo y protección de las neuronas y afectan críticamente el resultado de lesiones cerebrales que causan daño cerebral, tales como lesiones isquémicas. El papel central que desempeñan las propias mitocondrias de los astrocitos en estas funciones cerebrales es menos apreciado. Por ejemplo, la inhibición de las mitocondrias de astrocitos aumenta la hinchazón y conduce a la muerte celular necrótica. Las neuronas se lesionan permanentemente por despolarizaciones de propagación recurrentes solo si falla la función mitocondrial de los astrocitos, y se requieren mitocondrias de astrocitos para la reducción de las elevaciones fisiopatológicas del K^+ extracelular, que inician las despolarizaciones de propagación. La activación de los receptores purinérgicos en los astrocitos produce un aumento del Ca^{2+} mitocondrial que mejora la función del ciclo del ácido cítrico mitocondrial y aumenta la respiración y la producción de ATP. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención se refiere al descubrimiento de que la activación de los receptores purinérgicos de astrocitos potencia las vías de señalización de supervivencia de las células cerebrales, permitiendo la viabilidad neuronal y astrocítica durante el estrés oxidativo. Además, los astrocitos activados generan y suministran glutatión reducido, un antioxidante clave que ayuda en la resistencia de los astrocitos y las neuronas al estrés oxidativo. De este modo, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para modular los receptores purinérgicos de astrocitos para promover la supervivencia y la viabilidad de uno o más tipos de células en el cerebro de un paciente después del estrés oxidativo, como el estrés oxidativo causado por una lesión cerebral, isquemia-reperfusión o afección neurodegenerativa, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo un compuesto descrito.

La activación de astrocitos puede conseguirse a través del contacto con un compuesto descrito en uno o más receptores purinérgicos tales como los receptores de adenosina (AR), por ejemplo los asociados con o expresados por astrocitos, modulando así la actividad de uno o más receptores. En algunos casos, a través de efectos sobre los receptores de adenosina, tales como A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3 en astrocitos, el compuesto activa astrocitos para tratar una o más enfermedades o afecciones descritas. En algunos casos, después de la administración a un paciente en necesidad del mismo, un compuesto descrito influye en una o más funciones tales como la captación de glutamato, gliosis reactiva, inflamación y la liberación de factores neurotróficos y neurotóxicos que tienen un impacto sobre el estrés metabólico y sus consecuencias, tratando así una o más enfermedades o afecciones. En algunos casos, el compuesto es un agonista de AR. Según la invención, el receptor purinérgico es un receptor de adenosina A_3 (A_3R). Según la invención, el compuesto es MRS4322 o MRS1873 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método de tratar o mejorar una lesión cerebral, tal como una lesión cerebral que resulta de una TBI o trastorno neurodegenerativo progresivo, en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el sujeto ha padecido una TBI, conmoción cerebral, accidente cerebrovascular, transección de la médula espinal total o parcial, o desnutrición. En otras realizaciones, el sujeto ha padecido neuropatías tóxicas, meningoencefalopatías, neurodegeneración causada por un trastorno genético, neurodegeneración relacionada con la edad, o una enfermedad vascular, u otra enfermedad descrita en el documento US 8.691.775. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar o mejorar una lesión cerebral, tal como una lesión cerebral que resulta de una TBI o un trastorno neurodegenerativo progresivo, en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un agonista de A_3R en donde el agonista es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En realizaciones adicionales, el paciente tiene o está en riesgo de adquirir una lesión cerebral tales como las de a continuación. Por lo tanto, también se proporcionan métodos para tratar las afecciones comentadas a continuación.

Lesiones cerebrales traumáticas

Las lesiones cerebrales traumáticas (TBI) son una afección médica preocupantemente común y se predice que se convertirá en la tercera causa principal de morbilidad y mortalidad global en 2020. No existen tratamientos aprobados para TBI, y la mayoría de los pacientes con TBI son dados de alta del hospital sin ningún tratamiento farmacológico (Witt 2006). Las TBI repetitivas como conmociones cerebrales pueden desencadenar la neurodegeneración asociada con la edad que da lugar a una serie de síntomas y discapacidades en las últimas décadas (McKee 2013). Las TBI pueden ocurrir a través de lesiones deportivas, accidentes automovilísticos, caídas, impactos explosivos, agresiones físicas, etc. Las lesiones varían ampliamente en su complejidad y severidad, de las conmociones cerebrales "leves" con breves alteraciones en el estado mental, dificultades cognitivas, o pérdida de conciencia a "graves" con períodos

prolongados de pérdida de conocimiento, y/o amnesia después de la lesión. En los EE. UU., aproximadamente 1,7 millones de personas tienen una lesión que resulta en una TBI cada año y buscan intervención médica (USCSF y CDC), y los CDC estiman que se producen de 1,6 a 3,8 millones de incidentes de conmoción cerebral adicionales en deportes y otras actividades recreativas que no se presentan al hospital ni a los departamentos de urgencias. (CDC; Langlois 2006). Aproximadamente el 5-10 % de los atletas recibirán una conmoción cerebral cada temporada deportiva. (Sports Concussion Institute 2012). El fútbol es el deporte con el mayor riesgo de conmoción cerebral para los hombres (75 % de probabilidad de conmoción cerebral), mientras que el soccer tiene el mayor riesgo de conmoción cerebral para las mujeres (50 % de probabilidad de conmoción cerebral). La TBI es la principal causa de muerte y discapacidad en niños y adultos jóvenes (CDC) y la lesión relacionada con el ejército más comúnmente recibida; aproximadamente el 20 % de los Miembros del Servicio de EE. UU. desplegados desde 2003 han sufrido al menos una TBI. (Chronic Effects of Neurotrauma Consortium (CENC); Warden 2006; Scholten 2012; Taylor 2012; Gavett 2011; Guskiewicz 2005; Omalu 2005). Los costos médicos directos e indirectos totales relacionados con TBI se estiman en 77 mil millones de dólares anuales (UCSF y CDC). Al menos 5 millones de estadounidenses requieren apoyo diario continuo para realizar actividades como resultado de una TBI (CDC y Thurman 1999).

La activación de los astrocitos de acuerdo con la presente invención representa una nueva opción de tratamiento para tales afecciones. En consecuencia, en un aspecto se proporciona en el presente documento un método de tratamiento de TBI o la promoción de la recuperación de la TBI, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la TBI se selecciona de lesiones traumáticas al cerebro (tales como conmoción cerebral, lesión por estallido, lesión relacionada con peleas) o la médula espinal (tal como la transección de la médula espinal parcial o total). En algunas realizaciones, la TBI resulta de un golpe leve, moderado o grave en la cabeza, comprende una herida en la cabeza abierta o cerrada, o como consecuencia de un golpe penetrante o no penetrante en la cabeza. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de tratamiento de TBI o la promoción de la recuperación de la TBI, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un agonista de A₃R en donde el agonista es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Accidente cerebrovascular

Un accidente cerebrovascular ocurre cuando un vaso sanguíneo que transporta oxígeno y nutrientes al cerebro se interrumpe debido a una obstrucción isquémica o de la ruptura hemorrágica de un vaso sanguíneo en el cerebro, provocando que neuronas, glia y células endoteliales en la región afectada del cerebro mueran. El resultado del accidente cerebrovascular depende de la ubicación y la amplitud de los daños, y los impactos de esos daños se observan en las funciones corporales reguladas por la región del cerebro dañada. Los accidentes cerebrovasculares pueden causar parálisis unilateral o bilateral, discapacidades del habla y del lenguaje, pérdida de memoria, cambios de comportamiento, e incluso la muerte. El accidente cerebrovascular es la cuarta causa principal de muerte en los Estados Unidos y es una causa importante de discapacidad en los adultos. Cada año, ~800.000 personas sufren un accidente cerebrovascular nuevo o recurrente. Cada día, más de 2000 estadounidenses tendrán un accidente cerebrovascular, lo que resulta en la muerte de más de 400 de estos incidentes. El accidente cerebrovascular representó ~1 de cada 19 muertes en los Estados Unidos en 2010. Se estima que 6,8 millones de estadounidenses ≥20 años de edad ha tenido un accidente cerebrovascular. (AHA y Go 2014). A partir de 2010, el costo anual directo e indirecto de accidente cerebrovascular se estimó en 36,5 mil millones de dólares. Pocos minutos después de un accidente cerebrovascular, la falta de flujo sanguíneo puede dañar de forma permanente un núcleo de tejido cerebral. Entre este núcleo dañado y el tejido cerebral normal hay una región del tejido conocida como la penumbra, tejido que se encuentra bajo un estrés graduado debido a la disminución del flujo sanguíneo y alguna alteración del metabolismo energético. Durante las primeras 24 a 48 horas después de un accidente cerebrovascular, el estrés en las células neuronales y de la glia en la penumbra se resuelve con alguna recuperación o además muerte celular.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método de terapia neuroprotectora en un paciente con accidente cerebrovascular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, tal terapia rescata la mayor cantidad posible de la penumbra y/o limita aún más el daño del tejido agudo y/o promueve la recuperación de las neuronas. En otro aspecto, se proporciona un método para tratar el accidente cerebrovascular o promover la recuperación del mismo, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otro aspecto, el método comprende tratar un accidente cerebrovascular o promover la recuperación de un accidente cerebrovascular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un agonista de A₃R en donde el agonista es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el accidente cerebrovascular se selecciona entre un accidente cerebrovascular isquémico, un accidente cerebrovascular hemorrágico, una hemorragia subaracnoidea, un vasoespasma cerebral o ataques isquémicos transitorios (TIA). En algunas realizaciones, el accidente cerebrovascular es isquémico. En algunas realizaciones, el accidente cerebrovascular es hemorrágico. En algunas realizaciones, el compuesto se administra dentro de las 48 horas posteriores al accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, el compuesto se administra dentro de las 24 horas posteriores al accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, el compuesto se administra

dentro de las 16 horas posteriores al accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, el compuesto se administra dentro de las 8, 4, 2 o 1 horas del accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, el compuesto se administra durante por lo menos las primeras 1-72 horas después del accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, el compuesto se administra durante por lo menos las primeras 8 a 52 horas después del accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, el compuesto se administra durante por lo menos las primeras 8 a 48 horas después del accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, el compuesto se administra durante por lo menos las primeras 24 a 48 horas después del accidente cerebrovascular. En algunas realizaciones, el compuesto se administra de manera crónica para tratar el accidente cerebrovascular a medida que se produce. En algunas realizaciones, el compuesto se administra de manera crónica para tratar ataques isquémicos transitorios (TIA).

En algunas realizaciones, el compuesto se administra crónicamente para tratar el accidente cerebrovascular isquémico, el accidente cerebrovascular hemorrágico, la hemorragia subaracnoidea, el vasoespasmo cerebral, los ataques isquémicos transitorios (TIA) o tratar a un paciente con un mayor riesgo de accidente cerebrovascular, como un paciente que ha tenido un accidente cerebrovascular en el pasado y corre el riesgo de un nuevo accidente cerebrovascular, como un paciente mayor de 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80 años de edad.

En algunas realizaciones, el compuesto trata una lesión por isquemia-reperfusión causada por el accidente cerebrovascular.

20 *Enfermedades neurodegenerativas*

Las enfermedades neurodegenerativas son síndromes incurables, progresivos y, en última instancia, debilitantes resultantes de la degeneración y/o muerte progresiva de las neuronas en el cerebro y la médula espinal. La neurodegeneración produce trastornos del movimiento (ataxias) y/o de la función cognitiva (demencias) e incluye un espectro de enfermedades como la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson (PD), la enfermedad de Huntington (HD), la esclerosis múltiple (MS), la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y la encefalopatía traumática crónica (CTE). Si bien muchas enfermedades neurodegenerativas son principalmente de origen genético, otras causas pueden incluir virus, alcoholismo, tumores o toxinas, y como ahora está claro, lesiones cerebrales repetitivas.

Las neuronas acumulan daño celular con el tiempo debido a los factores anteriores, que generalmente se considera la razón por la cual muchas enfermedades neurodegenerativas asociadas con el estrés celular prolongado, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, ocurren en individuos de edad avanzada. Las demencias representan el resultado predominante de las enfermedades neurodegenerativas representando AD aproximadamente el 60-70 % de los casos. (Kandale 2013) Como se comentó anteriormente, la activación de los mecanismos neuroprotectores y neurorestauradores puede mejorar la progresión de una o más enfermedades neurodegenerativas. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa o promover la recuperación de una enfermedad neurodegenerativa, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para promover la neuroprotección o la neurorestauración en un paciente que padece una enfermedad neurodegenerativa, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, se proporciona un método para promover la neuroprotección o la neurorestauración en un paciente que padece una enfermedad neurodegenerativa, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un agonista de A₃R en donde el agonista es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 *Enfermedad de Alzheimer (AD)*

Se estimó que 5,2 millones de estadounidenses de todas las edades tenían AD en 2014; el 11 % de la población mayor de 65 años tiene AD. (Asociación de Alzheimer). Para 2050, se proyecta que el número de personas de 65 años o más con AD casi se triplique hasta 13,8 millones proyectados. En los EE. UU., el costo de brindar atención a los pacientes con AD es de aproximadamente 214 mil millones de dólares por año; el 70 % de este costo está cubierto por Medicare y Medicaid. Las tendencias actuales proyectarían que estos costos crecerían 1,2 billones de dólares por año para 2050.

La activación de astrocitos y la promoción de la neuroprotección y la neurorestauración de acuerdo con la presente invención representa una nueva opción de tratamiento para la AD. Por lo tanto, en el presente documento, en un aspecto, se proporciona un método para tratar la AD o promover la neuroprotección o la neurorestauración en un paciente que padece AD, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto descrito en el presente documento en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar la AD o promover la neuroprotección o la neurorecuperación en un paciente que padece AD, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un agonista de A₃R en donde el agonista es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Enfermedad de Parkinson (PD)

5 Hasta un millón de estadounidenses viven con PD, y cada año se diagnostica a aproximadamente 60.000 estadounidenses sin incluir los miles de casos que no se detectan. (Parkinson's Disease Foundation). El costo total combinado directo e indirecto de la PD, incluido el tratamiento médico, los pagos de la seguridad social y la pérdida de ingresos, se estima en casi 25 mil millones de dólares por año en los Estados Unidos. (Parkinson's Disease Foundation y Huse 2005).

10 La activación de la neuroprotección y la neurorestauración de acuerdo con la presente invención representa una nueva opción de tratamiento para la PD. Por lo tanto, en el presente documento, en un aspecto, se proporciona un método para tratar la PD o promover la neuroprotección o la neurorestauración en un paciente que padece EP, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la presente invención
15 proporciona un método para tratar la PD o promover la neuroprotección o la neurorecuperación en un paciente que padece PD, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un agonista de A₃R en donde el agonista es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Esclerosis múltiple (MS)

20 Más de 400.000 personas en los Estados Unidos tienen MS. En adultos jóvenes, la MS representa la enfermedad más prevalente del sistema nervioso central. (Multiple Sclerosis Foundation). Los astrocitos tienen el potencial de revertir la destrucción de los recubrimientos de mielina de las células nerviosas causada por la MS por sus efectos neurorestauradores y la promoción de la curación en el SNC dañado de los pacientes con esclerosis múltiple.

25 La activación de la neuroprotección y la neurorestauración en el SNC de acuerdo con la presente invención representa así una nueva opción de tratamiento para la MS. Por lo tanto, en el presente documento, en un aspecto, se proporciona un método para tratar la MS o promover la neuroprotección o la neurorestauración en un paciente que padece MS, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la presente
30 invención proporciona un método para tratar la MS o promover la neuroprotección o la neurorecuperación en un paciente que padece MS, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un agonista de A₃R en donde el agonista es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 *Esclerosis Lateral Amiotrófica (ALS)/enfermedad de Lou Gehrig*

Aproximadamente 5.600 personas en los EE. UU. se diagnostican con ALS cada año; hasta 30.000 estadounidenses pueden tener la enfermedad simultáneamente. (ALS Asociación) La activación de los astrocitos puede proporcionar estimulación de la recuperación y reparación de las neuronas y sus conexiones en un paciente con ALS.

40 Por lo tanto, en un aspecto se proporciona en el presente documento un método para tratar la ALS o promover la neuroprotección o la neurorestauración en un paciente que padece ALS, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. También se proporciona en otras realizaciones un método para estimular la
45 recuperación y reparación de las neuronas y sus conexiones en un paciente con ALS, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto descrito en el presente documento en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar la ALS o promover la neuroprotección o la neurorecuperación en un paciente que padece ALS, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un agonista de A₃R en donde el agonista
50 es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Encefalopatía traumática crónica (CTE)

55 La CTE (una forma de tauopatía) es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que se encuentra en individuos que han sufrido uno o más (a menudo múltiples o repetidos a lo largo del tiempo) golpes severos en la cabeza. La CTE se diagnostica con mayor frecuencia en atletas profesionales de fútbol americano, soccer, hockey, lucha profesional, acrobacias, monta de toros y rodeo, motocross y otros deportes de contacto que han experimentado traumatismos cerebrales y/o conmociones cerebrales repetidas. Un subconjunto de pacientes con CTE tiene encefalomiopatía traumática crónica (CTEM), que se caracteriza por síntomas de enfermedad de neuronas motoras
60 que imitan la ALS. Se cree que la debilidad muscular progresiva y las anomalías motoras y de la marcha son signos tempranos de CTEM. Los síntomas de la primera etapa de CTE incluyen déficit de atención progresivo, desorientación, mareos y dolores de cabeza. Los síntomas de la segunda etapa incluyen pérdida de memoria, inestabilidad social, comportamiento errático y juicio deficiente. En la tercera y cuarta etapas, los pacientes sufren demencia progresiva, movimientos lentos, temblores, hipomimia, vértigo, impedimentos del habla, pérdida de audición y suicidio, y pueden
65 incluir disartria, disfagia y anomalías oculares, por ejemplo ptosis.

Por lo tanto, en un aspecto se proporciona en el presente documento un método para tratar o prevenir la CTE o promover la neuroprotección o la neurorestauración en un paciente que padece CTE, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. También se proporciona en otras realizaciones un método para estimular la recuperación y reparación de las neuronas y sus conexiones en un paciente con CTE, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto trata uno o más síntomas de la primera etapa, segunda etapa, tercera etapa o cuarta etapa de CTE. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar CTE o promover la neuroprotección o neurorecuperación en un paciente que padece CTE, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un agonista de A₃R en donde el agonista es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una escala microscópica, la patología incluye muerte neuronal, deposición de tau, deposición de beta-amiloide de la proteína 43 de unión al ADN de TAR (TDP 43), cambios en la sustancia blanca y otras anomalías. La deposición de Tau incluye la presencia creciente de ovillos neurofibrilares densos (NFT), neuritas y ovillos gliales, que están formados por astrocitos y otras células gliales. Por lo tanto, en algunas realizaciones, el método trata, mejora la depuración o previene la muerte neuronal, la deposición de tau, la deposición beta-amiloide de la proteína 43 de unión al ADN de TAR (TDP 43), los cambios de la sustancia blanca y otras anomalías asociadas con CTE.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la administración a largo plazo de un compuesto descrito en el presente documento en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Enfermedades cardiovasculares

Los compuestos descritos también son útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades y afecciones cardiovasculares. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad cardíaca o cardiovascular, tal como isquemia cardíaca, infarto de miocardio, una miocardiopatía, arteriopatía coronaria, arritmia, miocarditis, pericarditis, angina, cardiopatía hipertensiva, endocarditis, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita o aterosclerosis, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto descrito a un paciente en necesidad del mismo, en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo tal como MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto descrito proporciona la modulación de canales de potasio sensibles a ATP, por ejemplo a través de agonismo sesgado, agonismo parcial o agonismo parcial sesgado en un receptor A₃R.

En algunas realizaciones, la enfermedad del corazón o cardiovascular es una isquemia cardíaca o un infarto de miocardio.

Otras enfermedades

Los compuestos que modulan efectos beneficiosos tales como la neuroprotección, por ejemplo aumentando la actividad mitocondrial de los astrocitos, también tienen el potencial de tratar una variedad de otras enfermedades. Por ejemplo, debido a la función de los astrocitos en la neuroprotección descrita en la presente invención, la activación de los astrocitos, por ejemplo a través de la modulación de A₃R y/o un receptor P2Y₁, puede ser útil para tratar diversas enfermedades y afecciones que se comentan a continuación. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar o promover la neuroprotección o neuroregeneración en un paciente que padece una enfermedad o afección, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un compuesto descrito, en donde el compuesto es MRS4322 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de enfermedades autoinmunes, enfermedades alérgicas y/o rechazo de trasplantes y enfermedad de injerto contra huésped (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, el documento WO 2007/20018). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de hipertensión intraocular y/o glaucoma (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, el documento WO 2011/77435). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona entre sensibilidad al olor y/o un trastorno olfativo (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, el documento EP1624753). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de diabetes tipo 2 y/o control del dolor (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, el documento US 2010/0256086).

En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de enfermedades respiratorias y/o cardiovasculares (CV) (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, FASEB J. (2013) 27:1118.4 (abstract of meeting). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de deficiencias en la función del SNC, deficiencias en el aprendizaje y/o deficiencias en la cognición (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, Neuropsychopharmacology. Enero de 2015; 40 (2): 305-14. Doi: 10.1038/npp.2014.173. Epub 15 de julio de 2014. "Impaired cognition after stimulation of a P2Y₁ receptor in the rat medial prefrontal cortex", Koch, H. et al. PMID:

25027332). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de una enfermedad neurodegenerativa como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, enfermedad priónica y/o esclerosis lateral amiotrófica (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, el documento US 8.691.775). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de trastornos óticos, enfermedad de Meniere, hidropesía endolinfática, pérdida auditiva progresiva, mareos, vértigo, acúfenos, daño cerebral colateral asociado con la terapia de radiación contra el cáncer y/o tratamiento de la migraña (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véanse, por ejemplo, los documentos US 2009/0306225; UY31779 y US 8.399.018). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de las alteraciones patológicas del sueño, la depresión, los trastornos del sueño en los ancianos, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la epilepsia, la esquizofrenia y/o los síntomas experimentados por los alcohólicos en recuperación (para el uso de ciertos compuestos nucleósidos y nucleótidos para el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, el documento US 2014/0241990). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona del daño a las neuronas o nervios del sistema nervioso periférico durante la cirugía (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, el documento US 8.685.372). En otras realizaciones, la enfermedad o afección es un cáncer como el cáncer de próstata (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, *Biochem Pharmacol.* 15 de agosto de 2011; 82 (4): 418-425. doi: 10.1016/j.bcp.2011.05.013. "Activation of the P2Y1 Receptor Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of Prostate Cancer Cells", Qiang Wei *et al.*). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de una o más afecciones gastrointestinales, como estreñimiento y/o diarrea (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, *Acta Physiol (Oxf)*. Diciembre de 2014; 212 (4): 293-305. Doi: 10.1111/apha.12408. "Differential functional role of purinergic and nitrgic inhibitory cotransmitters in human colonic relaxation", Mañé N1, Gil V, Martínez-Cutillas M, Clavé P, Gallego D, Jiménez M. Y *Neurogastroenterol. Motil.* Enero de 2014; 26 (1): 115-23. Doi: 10.1111/nmo.12240, Epub 8 de octubre 2013. "Calcium responses in subserosal interstitial cells of the guinea-pig proximal colon", Tamada H., Hashitani H. PMID: 24329947). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de dolor mediado por el SNC, como dolor neuropático, dolor inflamatorio y/o dolor agudo (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, *Br J Pharmacol.* Marzo de 2010; 159 (5):1106-17. Doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00596.x. Epub 5 de febrero de 2010. "A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain". Andó RD1, Mészáros B, Gyires K, Illes P, Sperlág B. PMID: 20136836).

En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de cáncer del cerebro, como el glioblastoma (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, *Purinergic Signal.* Septiembre de 2015; 11 (3): 331-46. Doi: 10.1007/s11302-015-9454-7. Epub 15 de mayo de 2015. "Potentiation of temozolomide antitumor effect by purine receptor ligands able to restrain the *in vitro* growth of human glioblastoma stem cells". D'Alimonte, I. *et al.* PMID: 25976165). En otras realizaciones, la enfermedad o afección es dolor (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento del dolor, véanse, por ejemplo, *Pharmacol Biochem Behav.* Enero de 2015; 128: 23-32. Doi: 10.1016/j.pbb.2014.11.001. Epub 6 de noviembre de 2014. "Participation of peripheral P2Y₁, P2Y₆ and P2Y₁₁ receptors in formalin-induced inflammatory pain in rats". Barragán-Iglesias P. *et al.* PMID: 25449358, y *Neuropharmacology.* Abril de 2014; 79:368-79. Doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.12.005. Epub 12 de diciembre de 2013. "Blockade of peripheral P2Y₁ receptors prevents the induction of thermal hyperalgesia via modulation of TRPV1 expression in carrageenan-induced inflammatory pain rats: involvement of p38 MAPK phosphorylation in DRGs". Kwon SG, Roh DH, Yoon SY, Moon JY, Choi SR, Choi HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. PMID: 24333674). En otras realizaciones, la enfermedad o afección se selecciona de un trastorno gastrointestinal como la diarrea (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de estas afecciones, véase, por ejemplo, *Acta Physiol (Oxf)*. Diciembre de 2014; 212(4): 293-305. Doi: 10.1111/apha.12408. "Differential functional role of purinergic and nitrgic inhibitory cotransmitters in human colonic relaxation", Mañé N., Gil V, Martínez-Cutillas M, Clavé P, Gallego D, Jiménez M.). En otras realizaciones, la enfermedad o afección es una cognición deteriorada (para el uso de ciertos compuestos de nucleósidos y nucleótidos en el tratamiento de esta afección, véase, por ejemplo, *Neuropsychopharmacology.* Enero de 2015; 40 (2): 305-14. Doi: 10.1038/npp.2014.173. Epub 15 de julio de 2014. "Impaired cognition after stimulation of P2Y₁ receptors in the rat medial prefrontal cortex", Koch H, Bespalov A, Drescher K, Franke H, Krügel U. PMID: 25027332).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad o afección asociada con una lesión cerebral o una afección neurodegenerativa, tal como epilepsia, migraña, daño cerebral colateral asociado con terapia de radiación para el cáncer, depresión, cambios de humor o comportamiento, demencia, comportamiento errático, comportamiento suicida, temblores, corea de Huntington, pérdida de la coordinación del movimiento, sordera, alteración del habla, sequedad ocular, hipomimia, déficit de atención, pérdida de memoria, dificultades cognitivas, vértigo, disartria, disfagia, anomalías oculares o desorientación, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto es un agonista de A₃R en donde el agonista es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad neurodegenerativa seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson,

enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica y enfermedad priónica en un paciente en necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto es un agonista de A₃R en donde el agonista es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, la mejora en la función cognitiva o neurológica se mide como un aumento de la puntuación entre aproximadamente el 1 % y el 20 % en la tarea de recuperación verbal retrasada de la Escala de Memoria de Wechsler revisada. Por ejemplo, la mejora en la función cognitiva puede medirse como un aumento de la puntuación entre aproximadamente el 1 % y el 10 %, o entre aproximadamente el 1 % y el 5 %.

2. Descripción de ciertos compuestos de la presente invención

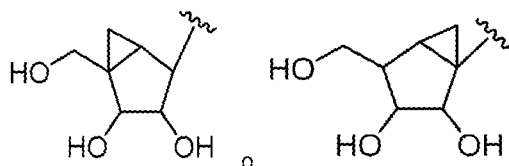
Se describen compuestos útiles para tratar, mejorar o promover la recuperación de ciertas afecciones del cerebro o del sistema nervioso central (SNC) tales como una lesión cerebral o una afección neurodegenerativa. En algunos casos, un compuesto descrito aumenta la neuroprotección y la neuroregeneración mediada por astrocitos, por lo que trata, mejora o promueve la recuperación de la afección. En algunos casos, el compuesto es selectivo para un receptor A₃, por ejemplo, selectivo para un receptor A₃ en por lo menos 10 veces con respecto a otros receptores de adenosina; o, por ejemplo, más de 25 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces en relación con otros receptores de adenosina. En algunos casos, el compuesto modula selectivamente un receptor A₃. En algunos casos, el compuesto es un agonista selectivo en un receptor A₃. En algunos casos, el compuesto es un agonista parcial selectivo en un receptor A₃. En algunas realizaciones, el compuesto es un agonista completo o parcial sesgado. En algunos casos, el compuesto es un antagonista completo o parcial sesgado.

En realizaciones adicionales, el compuesto es selectivo para un receptor P2Y₁, por ejemplo selectivo para receptores P2Y₁ por lo menos 10 veces en relación con otros receptores P2Y; o, por ejemplo, más de 25 veces, 50 veces, 100 veces, 500 veces o 1000 veces en relación con otros receptores P2Y. En algunos casos, el compuesto modula selectivamente un receptor P2Y₁. En algunos casos, el compuesto es un agonista selectivo en un receptor P2Y₁. En algunos casos, el compuesto es un agonista parcial selectivo en un receptor P2Y₁. En algunos casos, el compuesto es un agonista completo o parcial sesgado. En algunos casos, el compuesto es un antagonista completo o parcial sesgado.

El término "sesgado" se refiere a compuestos que preferentemente modulan, activan, agonizan o antagonizan una o más, pero no todas, de las rutas asociadas con un receptor.

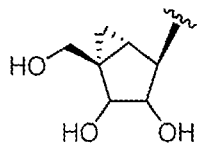
Sin pretender limitarse a ninguna teoría, se cree que el agonismo o el antagonismo completo o parcial sesgado permite la modulación selectiva de una o más rutas ligadas a un receptor A₃ o P2Y₁, lo que puede conducir a un mejor tratamiento de una enfermedad o afección y evitar la modulación de la ruta no deseada (lo que llevaría a efectos secundarios). La modulación selectiva puede activar preferentemente los astrocitos como se describe en el presente documento, por ejemplo, para tratar una lesión cerebral o una enfermedad o afección neurodegenerativa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un compuesto descrito es un agonista o antagonista completo o parcial sesgado de una o más rutas acopladas a G o independientes de G unidas al receptor de adenosina A₃ o al receptor P2Y₁. En algunos casos, el compuesto modula selectivamente una ruta mediada por el receptor A₃ o P2Y₁, como la activación de la beta-arrestina, la movilización de calcio intracelular, la modulación de cAMP, la activación de canales de potasio dependientes de ATP, o la fosforilación de ERK1/2 u otras actividades celulares posteriores asociadas con tales rutas. En algunos casos, la ruta aumenta o está relacionada con la neuroprotección o neurorestauración, o la cardioprotección o la cardiorregeneración. En algunos casos, el compuesto se selecciona de un nucleósido de (N)-metanocarba. De acuerdo con la invención, el compuesto es MRS4322; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

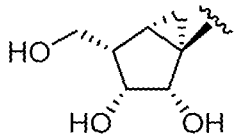
El término "nucleósido de metanocarba", como se usa en el presente documento, se refiere a un análogo de nucleósido en el que el oxígeno presente en el anillo de tetrahidrofurano del azúcar de ribosa se reemplaza por una unidad de metileno y el anillo carbocíclico resultante se fusiona con un anillo de ciclopropilo para formar un biciclo[3.1.0]hexano,



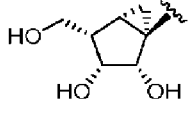
como las estructuras

o Sin querer limitarse a la teoría, se cree que los nucleósidos de metanocarba imitan una conformación o una pseudoconformación de azúcar que se cree favorecida por ciertos subtipos de receptores. En algunos casos, los nucleósidos de metanocarba Norte son aquellos que imitan o prefieren una conformación de azúcar de C3'-endo/C2'-exo y los nucleósidos de metanocarba Sur son aquellos que imitan o prefieren una conformación de C3'-exo/C2'-endo. En algunos casos, un azúcar de (N)-metanocarba

(metanocarba "Norte") tiene la siguiente estructura:  . En algunos casos, un azúcar de (N)-

metanocarba tiene la siguiente estructura:  , denominado en el presente documento un "azúcar de "D-(N)-metanocarba". En otros casos, un azúcar de metanocarba está en la configuración Sur, o(S)-metanocarba.

En algunos casos, tales azúcares de metanocarba se representan por la estructura:  . En algunos

5 casos, un azúcar de (S)-metanocarba tiene la siguiente estructura:  , denominado en el presente documento "azúcar de D-(S)-metanocarba".

En algunos casos, el compuesto es funcionalmente selectivo en el receptor A_3 o $P2Y_1$, es decir, discrimina selectivamente entre rutas mediadas por A_3 o un receptor $P2Y_1$, por ejemplo, modulando una o más rutas pero no otras, o activando una o más más rutas y desactivando una o más de otras rutas. En algunos casos, el compuesto es un antagonista medido por la señalización de cAMP, pero un agonista parcial para el reclutamiento de β -arrestina. En otros casos, el compuesto es un agonista de la movilización de Ca^{2+} mediada por Gq/11 y un agonista o antagonista parcial del reclutamiento de arrestina. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método para tratar una lesión cerebral o una enfermedad o afección neurodegenerativa mediante modulación del receptor A_3 sesgado o funcionalmente selectivo (por ejemplo, mediante agonismo o antagonismo selectivo entre rutas tales como las mencionadas anteriormente), que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto descrito a un paciente en necesidad del mismo en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De acuerdo con la invención el compuesto es MRS4322; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Se ha encontrado sorprendentemente que ciertos mono-, di- y tri-fosfatos de nucleósidos de purina, tales como los descritos en detalle en el presente documento, se desfosforilan rápidamente *in vivo*, posiblemente por ectonucleotidasas, enzimas responsables de la desfosforilación de nucleótidos que están presentes tanto en la superficie de las membranas celulares como circulando en la sangre y el plasma (véase Ziganshin *et al.* Pflugers Arch. (1995) 429: 412-418). A menudo es extremadamente difícil predecir qué análogos de nucleótidos serán sustratos para ectonucleotidasas y, por lo tanto, se espera que se desfosforilen *in vivo*. En algunos casos, el compuesto desfosforilado es responsable de la eficacia terapéutica. Por lo tanto, en algunos casos, el mono-, di-, o tri-fosfato fosforilado, o un éster de fosfato tal como un éster de alquilo o fenilo del mismo, es un profármaco o precursor del agente responsable del efecto terapéutico.

En algunas realizaciones, los compuestos utilizados en la presente invención pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BBB). El término "barrera hematoencefálica" o "BBB", como se usa en el presente documento, se refiere a la propia BBB, así como a la barrera hematoespinal. La barrera hematoencefálica, que consiste en el endotelio de los vasos cerebrales, la membrana basal y las células neurogliales, actúa limitando la penetración de sustancias en el cerebro. En algunas realizaciones, la relación cerebro/plasma del fármaco total es por lo menos aproximadamente 0,01 después de la administración (por ejemplo, administración oral o intravenosa) a un paciente. En algunas realizaciones, la relación cerebro/plasma del fármaco total es de por lo menos aproximadamente 0,03. En algunas realizaciones, la relación cerebro/plasma del fármaco total es de por lo menos aproximadamente 0,06. En algunas realizaciones, la relación cerebro/plasma del fármaco total es de por lo menos aproximadamente 0,1. En algunas realizaciones, la relación cerebro/plasma del fármaco total es por lo menos aproximadamente 0,2.

Los agonistas de adenosina A_3 prototípicos tales como Cl-IB-MECA y MRS5698 son compuestos lipofílicos de baja solubilidad con valores de cLogP normalmente >2 . Esta lipofiliidad es un factor importante que contribuye a la alta unión a proteínas plasmáticas de estos compuestos, una alta unión al cerebro y, como resultado, una baja fracción libre de fármaco disponible para interactuar con el receptor A_3 en el cerebro. En algunas realizaciones, por ejemplo afecciones neurológicas y neurodegenerativas, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos utilizados en la presente invención tales como MRS4322 y MRS1873 son sustancialmente diferentes; estos y otros compuestos relacionados son compuestos hidrofílicos con cLogP <0 , que dan como resultado una alta solubilidad, una baja unión

al plasma y al cerebro y altas concentraciones de fármacos no unidos disponibles para interactuar con el receptor A₃.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el compuesto tiene un cLogP menor de aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,6, aproximadamente 0,5, aproximadamente 0,4, aproximadamente 0,3, aproximadamente 0,2, aproximadamente 0,1, aproximadamente 0,05, aproximadamente 0,01 o aproximadamente 0,005. En algunas realizaciones, el compuesto tiene un cLogP menor de aproximadamente 0, tal como menor de aproximadamente -0,1, -0,2, -0,3, -0,4, -0,5, -0,6, -0,7, -0,8 o -0,9 o menos. En algunas realizaciones, el compuesto tiene una fracción no unida en plasma de aproximadamente 0,5 a 0,9. En algunas realizaciones, el compuesto tiene una fracción no unida en plasma de aproximadamente 0,6 a 0,85, de 0,7 a 0,8, o de aproximadamente 0,75. En algunas realizaciones, el compuesto tiene una fracción no unida en el cerebro de por lo menos aproximadamente 0,02, o por lo menos aproximadamente 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,12, 0,15 o 0,17 o superior. En algunas realizaciones, el compuesto tiene una fracción no unida en plasma de aproximadamente 0,6 a 0,85, de 0,7 a 0,8, o aproximadamente 0,75 y/o por lo menos 0,08 de fracción no unida en el cerebro.

15 Los compuestos de la invención pueden prepararse usando métodos conocidos en la técnica, usando nada más que la experimentación rutinaria. Por ejemplo, ciertos compuestos de la invención pueden prepararse siguiendo los procedimientos proporcionados en la patente estadounidense n.º 7.087.589 (y las referencias citadas en el presente documento).

20 En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona de adenosina, ADP, sal trisódica de 2-metilio-ADP, ATP, sal disódica de ATP, α,β -metileno ATP, α,β -metilenoadenosina, sal trisódica de 5'-trifosfato de 2-metilioadenosina, 2-MeSATP, sal de trietilamonio de BzATP, inosina, citidina, citidinas aciladas, monofosfato de citidina (CMP), difosfato de citidina (CDP), trifosfato de citidina (CTP), CDP-colina, CMP-colina, defunusol, denufosol tetrasodio, GTP, ITP, MRS 541, MRS 542, MRS 1760, MRS 2179, MRS 2279, MRS 2341, MRS 2365, MRS 2500, MRS 2690, MRS 2698, MRS 3558, MRS 4315, MRS 5151, MRS 5676, MRS 5678, MRS 5697, MRS 5698, MRS 5923, MRS 5930, Bencil-NECA, IB-MECA, C1-IB-MECA, LJ529, DPMA, CCPA, DBXRM, HEMADO, PEMADO, HENECA, PENECA, CP608.039, CP532.903, CGS21680, AR132, VT72, VT158, VT160, VT163, PSB 0474, uridina 5'-difosfato (UDP), UDP-glucosa, uridina β -tiodifosfato (UDP β S), uridina 5'-trifosfato (UTP), uridina γ -tiodifosfato (UTP γ S), sal tetrasódica de 2-tioUTP, sal trisódica de UTP γ S, uridina-5'-difosfoglucosa, trifosfato de diuridina, 2-(hexilitio) (HT)-AMP, pentaosfato de diadenosina, 2'-desoxi-2'-amino-UTP, 2-tio-UTP, triacetiluridina, diacetil/aciluridina, uridina, suramina, análogos de dipindamol, tetrafosfato de diadenosina Ap₄U, Ap₄A, INS365, INS37217 o INS48823; en donde cada azúcar se puede reemplazar con un azúcar de metanocarba en la conformación Norte o Sur o cada azúcar se puede reemplazar con un D-riboazúcar; o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

35 En algunos casos, el 2-metilio-ADP o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo es útil en los métodos de la presente divulgación. Sin querer limitarse a la teoría, se cree que el ADP 2-MeS se hidroliza rápidamente a 2-metilioadenosina *in vivo*, en donde es un agonista sesgado, agonista parcial o agonista parcial sesgado de A₃R. Se cree que la 2-metilioadenosina tiene datos de receptores muy similares a los de MRS4322.

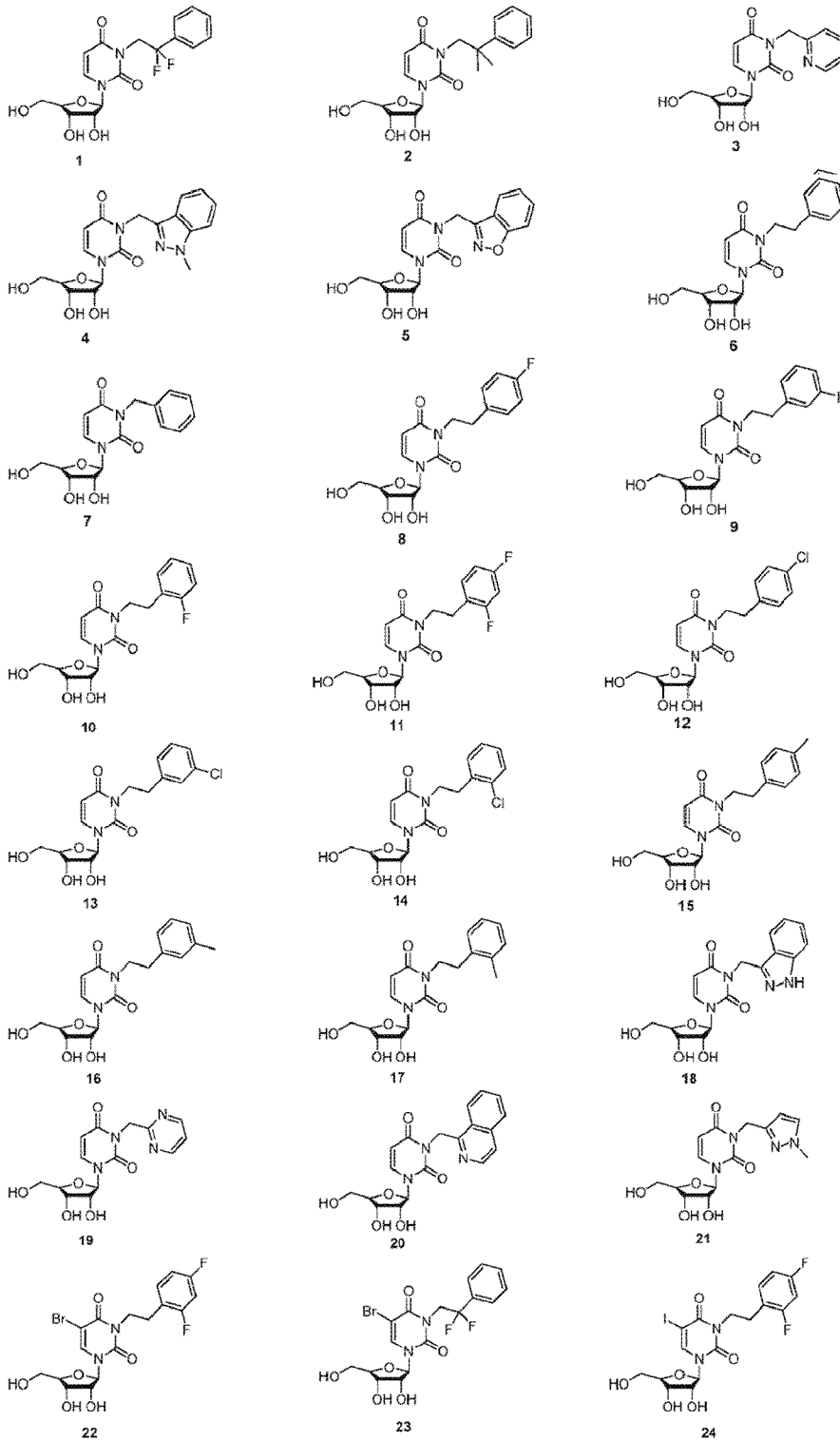
40 En algunas realizaciones, el compuesto es un agonista de A₃R tal como N⁶-benciladenosina-5'-N-metiluronamidas tal como N⁶-(3-yodobencil)-adenosina-5'-N-metiluronamida, también conocida como IB-MECA o Can-Fite CF-101, o 2-cloro-N⁶-(3-yodobencil)-adenosina-5'-N-metiluronamida (también conocida como 2-Cl-IB-MECA o Can-Fite CF-102; nucleósidos de (N)-metanocarba tales como (1R,2R,3S,4R)-4-(2-cloro-6-((3-clorobencil)amino)-9H-purin-9-ii)-2,3-dihidroxi-N-metilbicio[3.1.0]hexano-1-carboxamida (también conocida como CF502, Can-Fite Biopharma, MA);
 45 metilamida del ácido (2S,3S,4R,5R)-3-amino-5-[6-(2,5-diclorobencilamino)purin-9-ii]-4-hidroxi-tetrahidrofurano-2-carboxílico (también conocida como CP532.903); (1'S,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-(2-cloro-6-(3-clorobencilamino)-9H-purin-9-ii)-2,3-dihidroxi-N-metilbicio[3.1.0]hexano-1-carboxamida (también conocida como MRS3558), 2-(1-hexinil)-N-metiladenosina; (1S,2R,3S,4R)-2,3-dihidroxi-4-(6-((3-yodobencil)amino)-4H-purin-9(5H)-ii)-N-metilciclopentanocarboxamida (también conocida como CF101, Can-Fite); (1S,2R,3S,4R)-4-(2-cloro-6-((3-yodobencil)amino)-4H-purin-9(5H)-ii)-2,3-dihidroxi-N-metilciclopentanocarboxamida (también conocida como CF102, Can-Fite); (1'R,2'R,3'S,4'R,5'S)-4-[2-cloro-6-((3-yodofenilmetil)amino)purin-9-ii]-1-(metilaminocarbonil)-bicio[3.1.0]hexano-2,3-diol (también conocido como MRS1898); o derivados de 2-dialquilino de nucleósidos de (N)-metanocarba; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos, el compuesto se selecciona de IB-MECA (también conocido como CF101), o Cl-IB-MECA (también conocido como CF102); o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos, el compuesto se selecciona de un nucleósido de (N)-metanocarba tal como los descritos anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

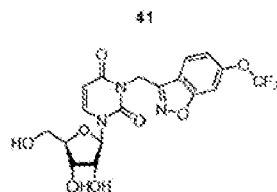
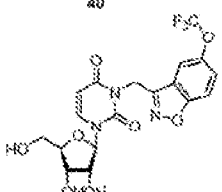
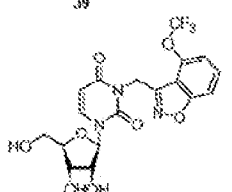
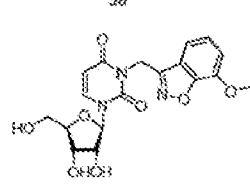
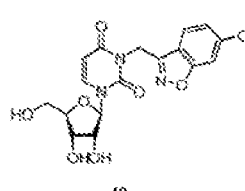
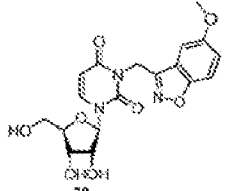
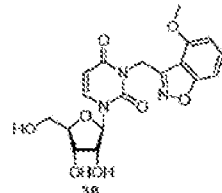
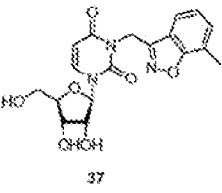
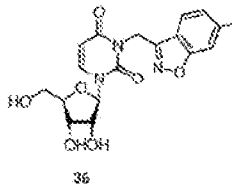
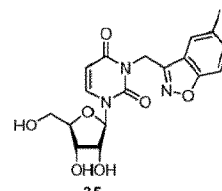
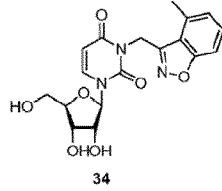
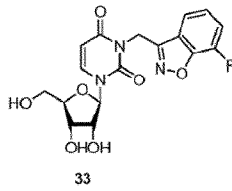
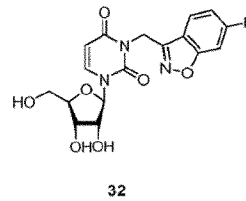
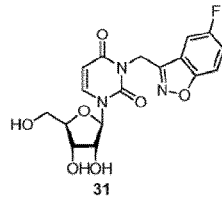
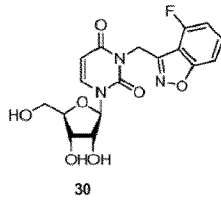
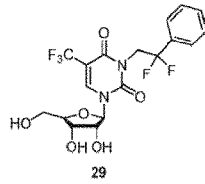
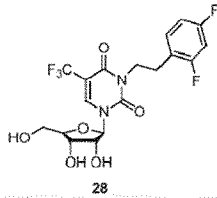
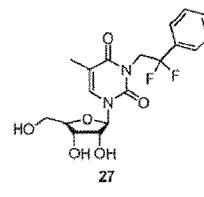
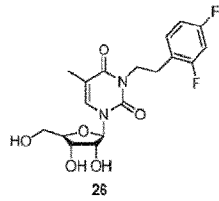
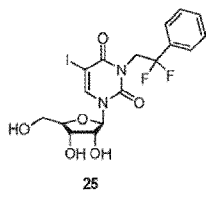
También se incluyen moduladores alostéricos de A₃R que mejoran la actividad del receptor en la presencia del ligando nativo, tal como 2-ciclohexil-N-(3,4-diclorofenil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina (también conocida como CF602, Can-Fite). Sin embargo, los agonistas de A₃R mencionados anteriormente no son en absoluto exclusivos y también pueden usarse otros agonistas de este tipo. También se contempla la administración de agonistas de A₃R unidos covalentemente a polímeros. Por ejemplo, los agonistas de A₃R pueden administrarse en forma de conjugados en los que un agonista está unido a un dendrímero de poliamidoamina (PAMAM).

65 Sin querer limitarse a la teoría, se cree que el agonismo total o parcial, incluido el agonismo sesgado, por ciertos análogos de uridina permitirá la modulación selectiva de una o más rutas que pueden conducir a un tratamiento

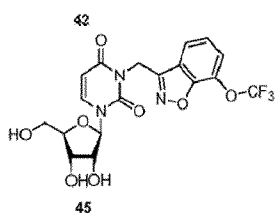
mejorado de una enfermedad o afección descrita y evitar la modulación de la ruta no deseada (lo que llevaría a efectos secundarios). En algunos casos, la modulación selectiva activa preferentemente los astrocitos u otras células gliales, como la microglía y los oligodendrocitos para tratar una lesión cerebral o enfermedad o afección neurodegenerativa descrita. Ciertos compuestos análogos de uridina adecuados para su uso en la presente invención se describen en el

- 5 documento WO 2014/160502. En algunos casos, el compuesto es un agonista de A₃R. En algunos casos, el compuesto es un agonista de P2Y₁. En algunos casos, el compuesto es un agonista sesgado en un receptor de adenosina, tal como un receptor A₁, A_{2A}, A_{2B} o A₃. En algunos casos, el compuesto es un agonista sesgado, agonista parcial o agonista parcial sesgado en un receptor A₃. En algunos casos, el compuesto es un agonista sesgado, agonista parcial o agonista parcial sesgado en un receptor P2Y₁. En algunos casos, el compuesto se selecciona del
- 10 grupo que consiste en:

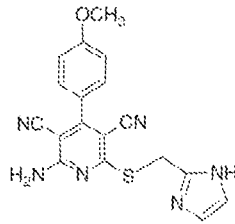




5

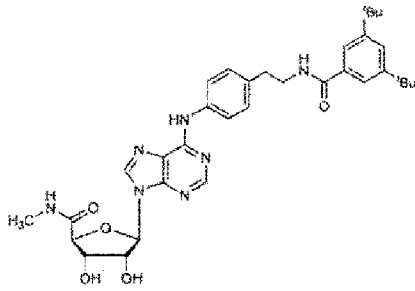


o un análogo fosforilado del mismo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

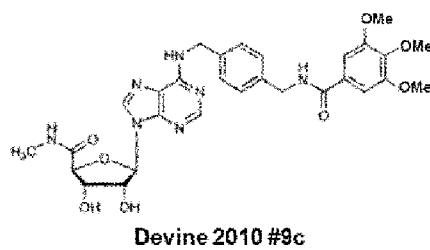
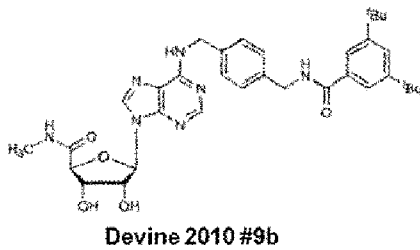
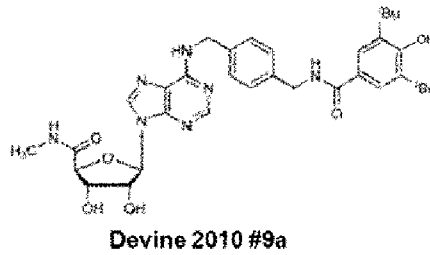
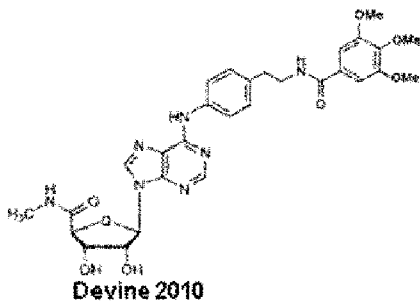


En algunos casos, el compuesto se selecciona de:

(véase Beukers MW *et al.*, (2004) "New, non-adenosine, high-potency agonists for the human adenosine A2B receptor with an improved selectivity profile compared to the reference agonist N-ethylcarboxamidoadenosine", *J. Med. Chem.* 47(15):3707-3709);

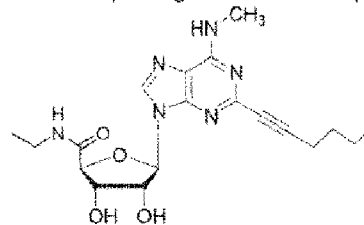


5



10

(véanse Devine SM *et al.* "Synthesis and Evaluation of new A₃R agonists", *Bioorg Med Chem* 18, 3078-3087. 2010; y Muller CE, Jacobson KA. "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs",



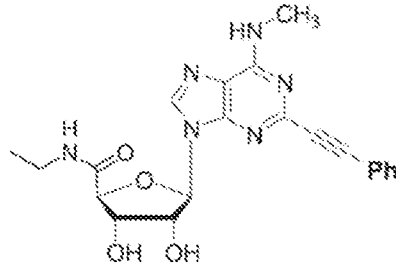
Biochimica et Biophysica Acta 1808, 1290-1308. 2011);

HENECA

(véanse Ben DD *et al.*

"Different efficacy of adenosine and NECA derivatives at the human A₃ receptor: Insight into the receptor activation switch", *Biochem Pharm* 87, 321-331. 2014; y Camaioni E, Di Francesco E, Vittori S, Volpini R, Cristalli G. "Adenosine receptor agonists: synthesis and biological evaluation of the diastereoisomers of 2-(3-hydroxy-3-phenyl-1-propyn-1-

15

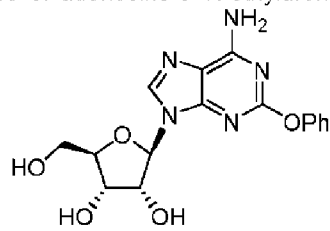


PENECA

yl)NECA", *Bioorg Med Chem* 1997;5:2267-75);

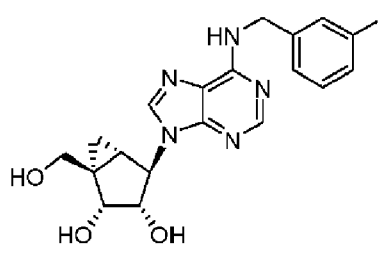
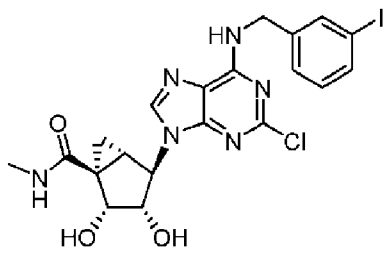
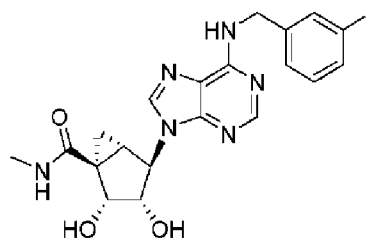
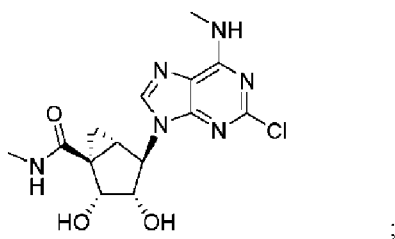
Substituted N-ethylcarboxamidoadenosine derivatives as high-affinity agonists at human A₃ adenosine receptors", *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* Agosto de 1999;360(2):103-8; y Cristalli G *et al.* (1995) "2-Aralkynyl and 2-heteroalkynyl derivatives of adenosine-5'-N-ethyluronamide as selective A_{2a} adenosine receptor agonists", *J Med*

(véanse Klotz K.N. "2-



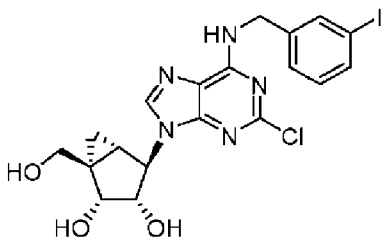
5 *Chem* 38: 1462-1472);
Model 47, 1225-1233 2007);

(véase Kim S *et al.* "3D quantitative SAR at A₃R", *J Chem Inf.*

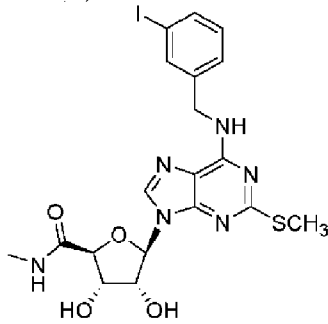


10

(MRS1898);



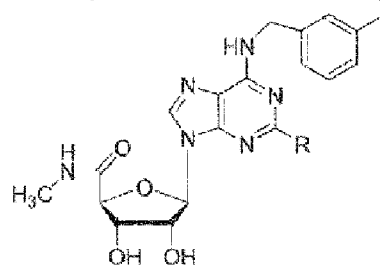
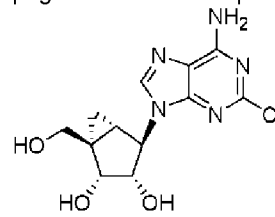
(véase Lee, K. *et al.* "Ring-Constrained (N)-Methanocarba Nucleosides as Adenosine Receptor Agonists", *Bioorg Med*



Chem Lett 2001, 11, 133-1337);

(véase Kenneth A. Jacobson *et al.* Capítulo 6. A₃ Adenosine Receptor Agonists: History and Future Perspectives págs. 96-97. Book-Springer: A₃ Adenosine Receptors

5 from Cell Biology to Pharmacology and Therapeutics, 2009); (véase Lee K *et al.* "Ring-Constrained (N)-Methanocarba Nucleosides as Adenosine Receptor Agonists", *Bioorg Med Chem Lett* 2001, 11, 1333-1337; y Gao *et al.* "Structural Determinants of A₃R Activation: Nucleoside Ligands at the Agonist/Antagonist Boundary",



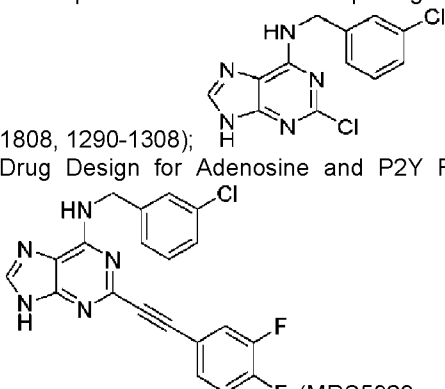
R = H: **IB-MECA (CF101)**

R = Cl: **Cl-IB-MECA (CF102)**

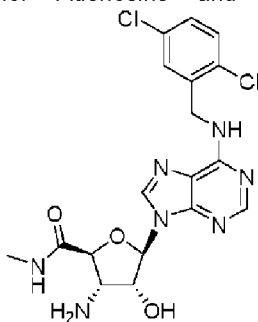
J. Med. Chem., 2002, 45, 4471-4484);

(véase Muller CE, Jacobson KA, "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs" *Biochimica et Biophysica Acta* 2011,

10 1808, 1290-1308); (MRS5930; véase Jacobson KA *et al.* "John Daly Lecture: Structure-guided Drug Design for Adenosine and P2Y Receptors", *Comp. and Struct. Biotechnology Jour* 13. 286-298. 2015);

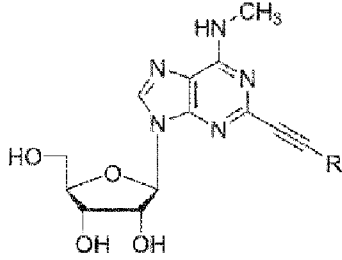


for Adenosine and P2Y Receptors", *Comp. and Struct. Biotechnology Jour* 13. 286-298. 2015);



CP532.903 (véase Tracey WR *et al.* "Novel n6-substituted adenosine 5'-N-methyluronamides with high selectivity for human A₃R reduce ischemic myocardial injury", *Am J Physiol Heart Circ*

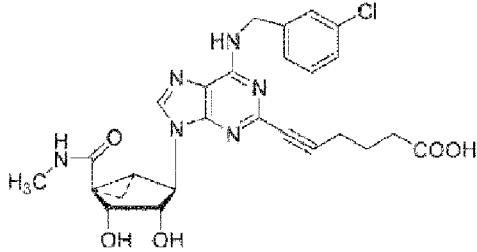
Physiol 285. 2003; Muller CE, Jacobson KA, "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs", *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011; y Wan TC *et al.* "The A₃R Agonist CP-532.903 Protects against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury", *J. of Pharmacology and Exptl Therapies* 324,1.2008);



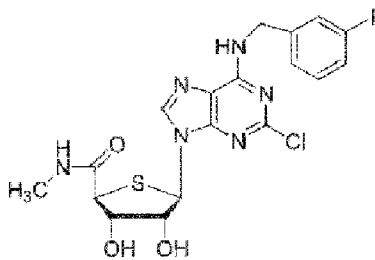
R = *n*C₄H₉: **HEMADO**

R = Ph: **PEMADO**

- 5 Chem 45, 3271-3279. 2002; Muller CE *et al.* "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs", *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011; y Volpini R *et al.* "Synthesis and Evaluation of Potent and Highly Selective Agonists for hA₃R", *J of Med Chem* 52, 7897-7900, 2009);

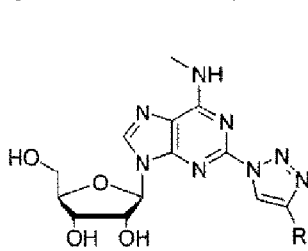


MRS5151

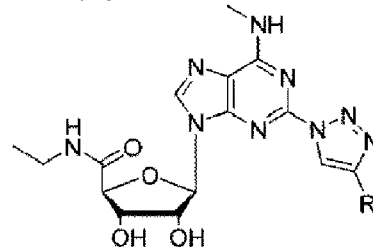


LJ529

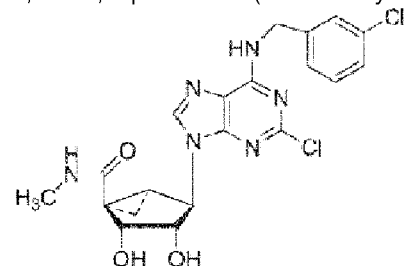
- 10 (véase Muller CE, Jacobson KA. "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs", *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011);



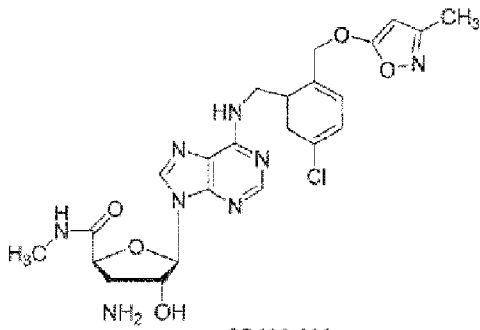
R en donde R es H o ciclopentilmetilo;



en donde R es

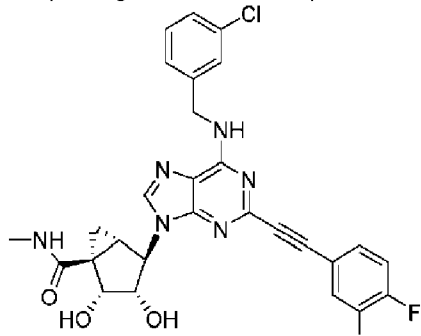


MRS3558 (CF502)



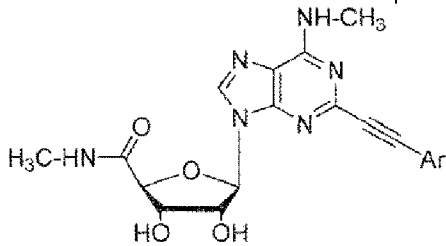
CP608,039

(véase Muller CE, Jacobson KA. "Recent Developments in adenosine receptor ligands and their potential for novel drugs", *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1290-1308. 2011);

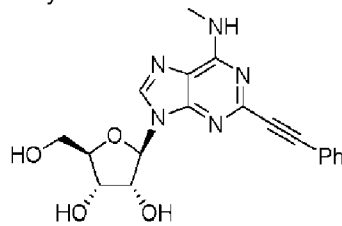


MRS5698

5 for Adenosine and P2Y Receptors", *Comp. and Struct. Biotechnology Jour* 13. 286-298. 2015);

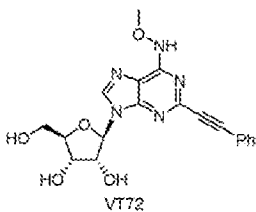


en donde Ar se selecciona de fenilo, p-CH₃CO-fenilo, p-fluorofenilo, o 2-piridilo (véase Volpini R *et al.* "Synthesis and Evaluation of Potent and Highly Selective Agonists for hA₃R", *J Med*

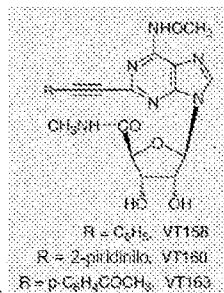


AR132

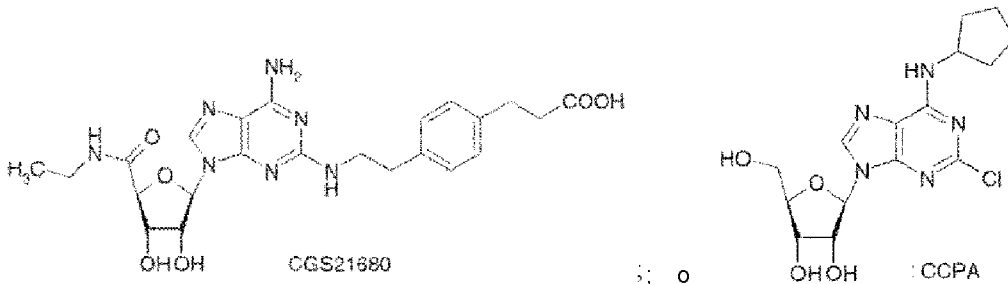
Chem 52, 7897-7900, 2009);



VT72



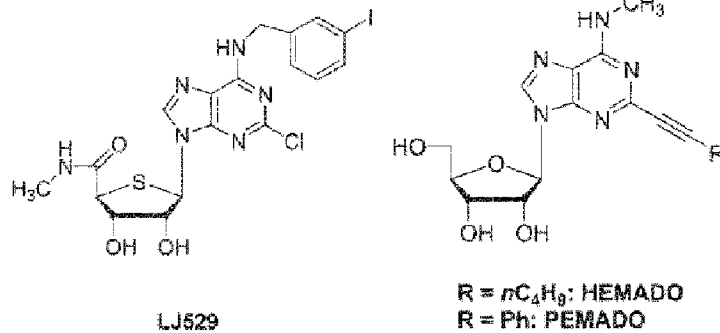
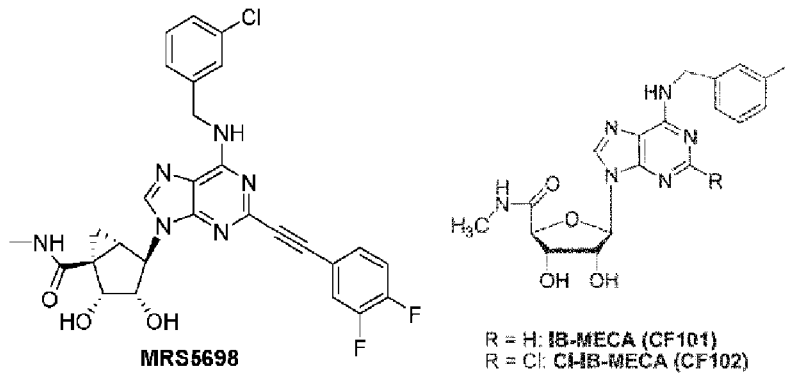
10 neurotransmission during OGD", *Biochem Pharmacology* 74. 2007);



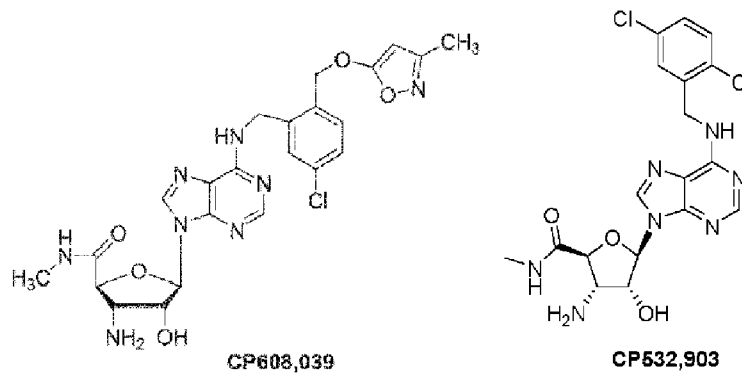
"Adenosine receptors and their ligands NS's", Arch Pharmacol. 362. 382-391. 2000); o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos, el compuesto se selecciona de un nucleósido de (N)-metanocarba tal como los descritos anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

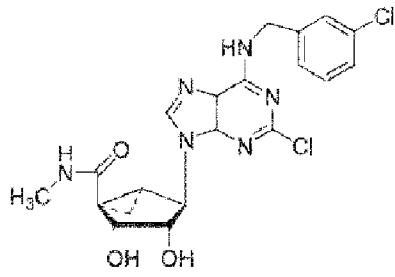
5

En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona de:

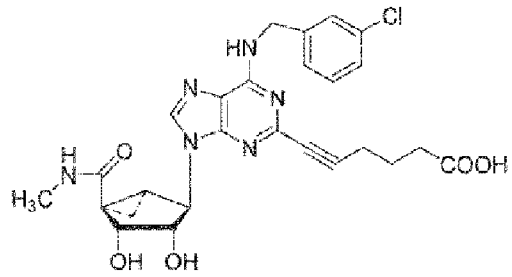


10

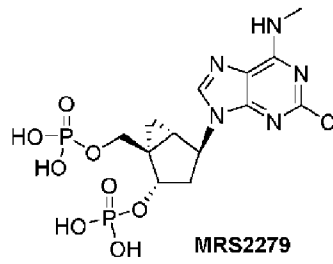




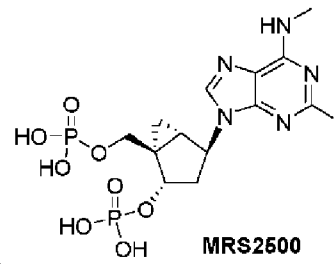
MRS3558 (CF502)



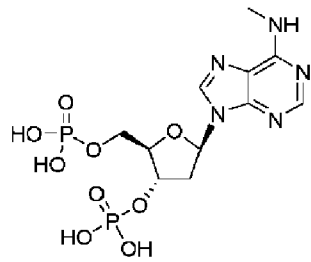
MRS5151



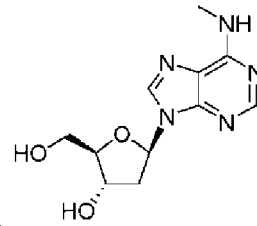
MRS2279



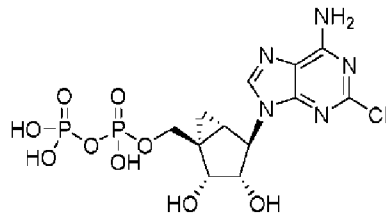
MRS2600



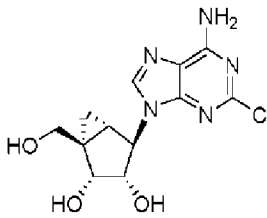
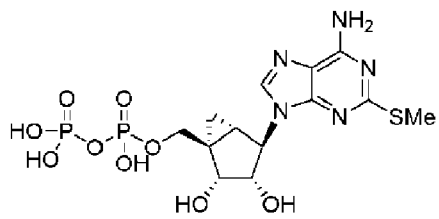
(MRS2179),



(MRS1873),



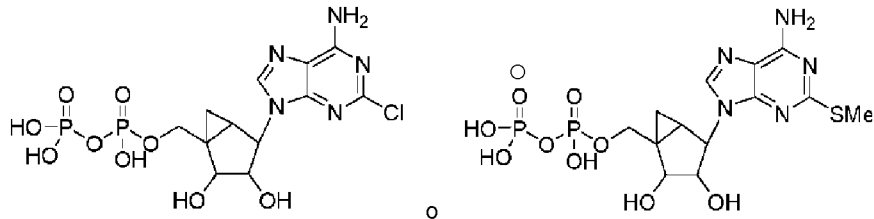
(MRS4322);



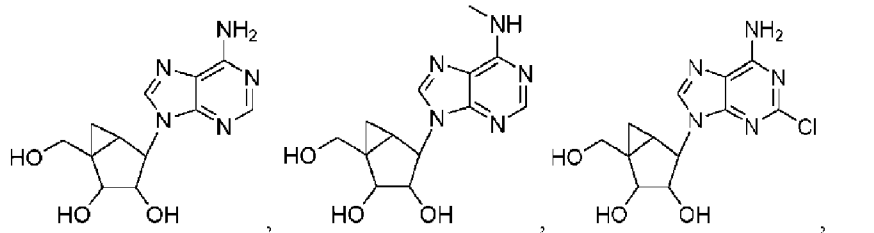
5

10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos, el compuesto se selecciona de un nucleósido de (N)-metanocarpa tal como los descritos anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

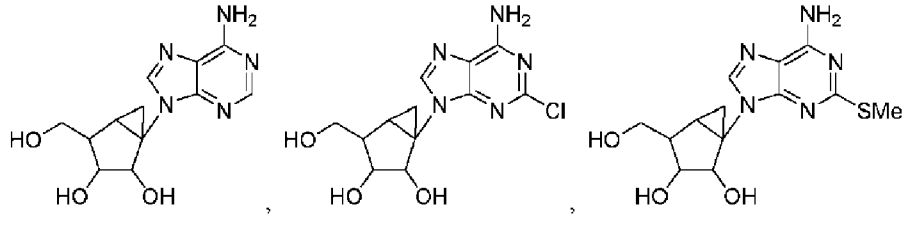
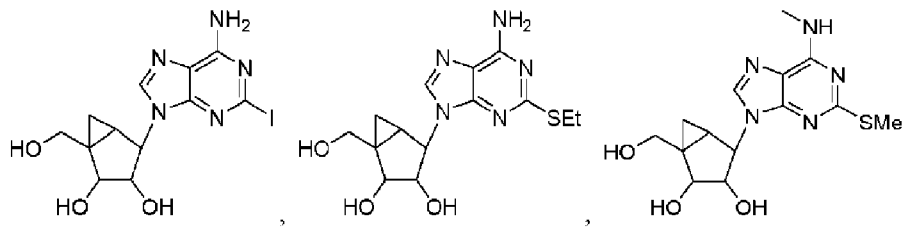
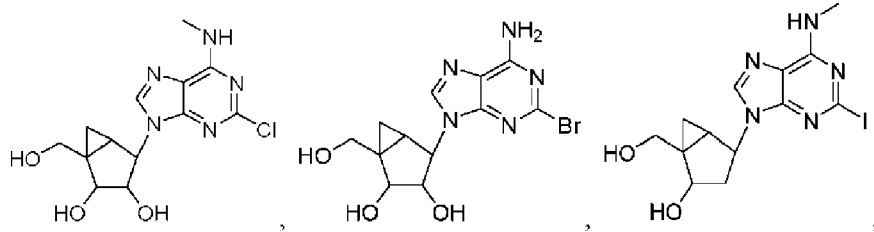
15 En algunos casos, el compuesto se selecciona de



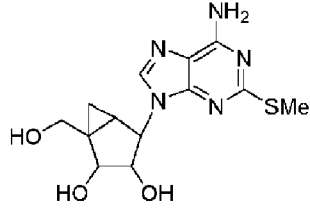
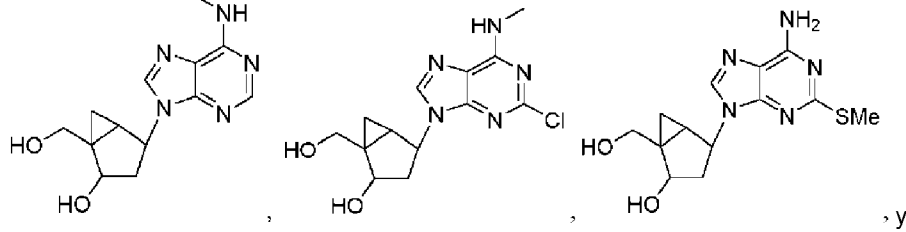
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en:



5



10



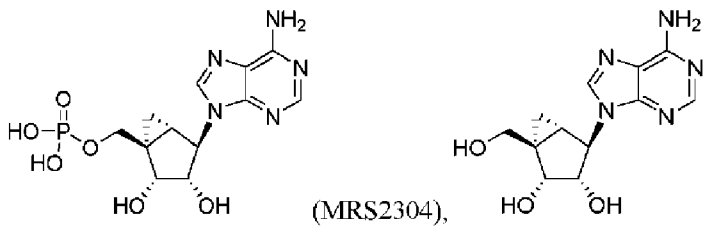
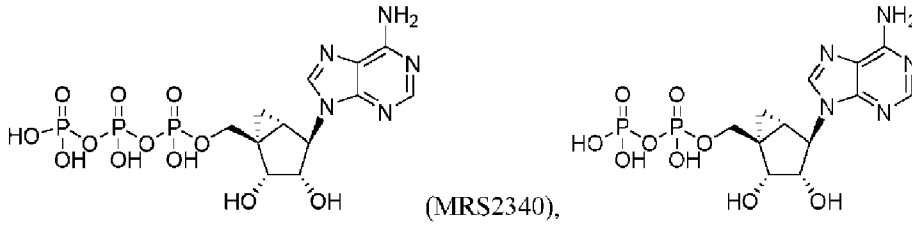
o en donde cada compuesto puede estar en la conformación Norte o Sur o el azúcar metanocarba puede reemplazarse con un D-riboazúcar; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o un mono-, di- o trifosfato del mismo o una sal farmacéuticamente aceptable del mono-, di- o trifosfato. En algunos casos,

15

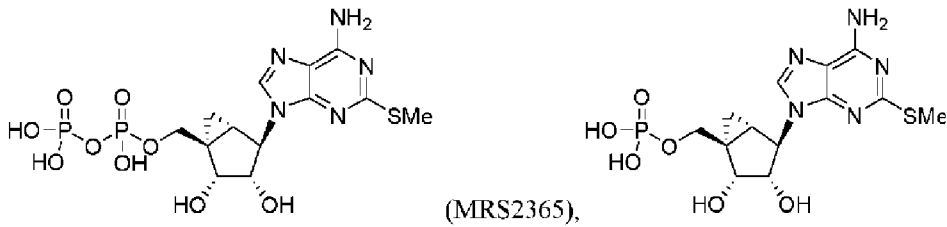
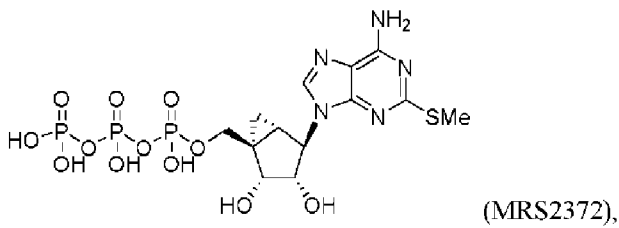
el azúcar metanocarba es un azúcar D-(N)-metanocarba. En algunos casos, el azúcar metanocarba es un azúcar D-(S)-metanocarba.

En algunos casos, el compuesto se selecciona de:

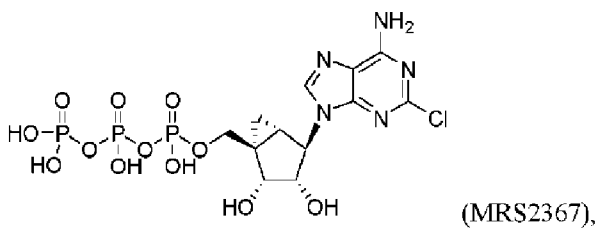
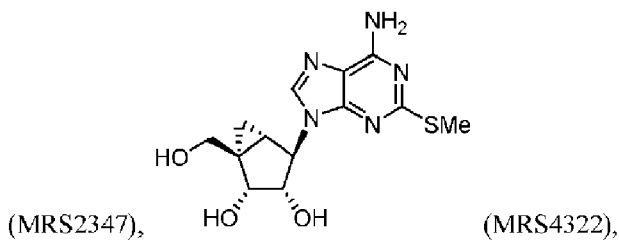
5

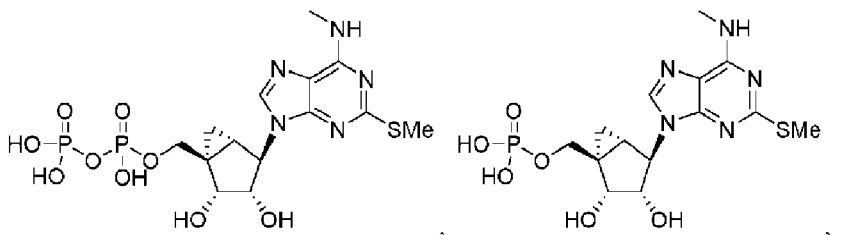
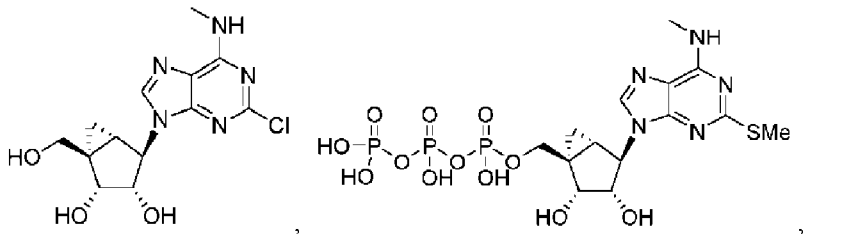
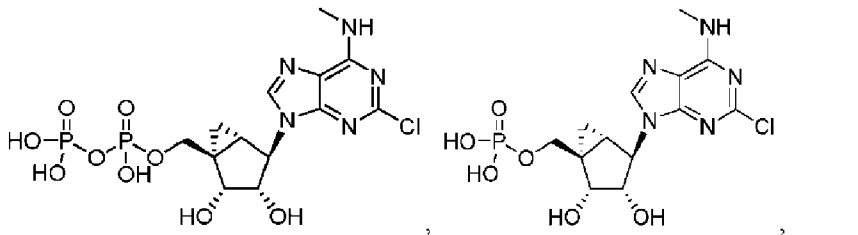
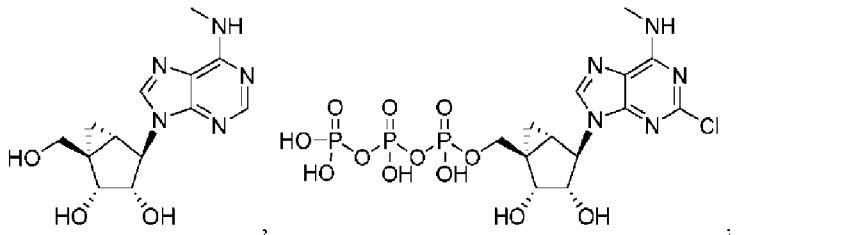
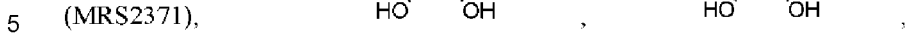
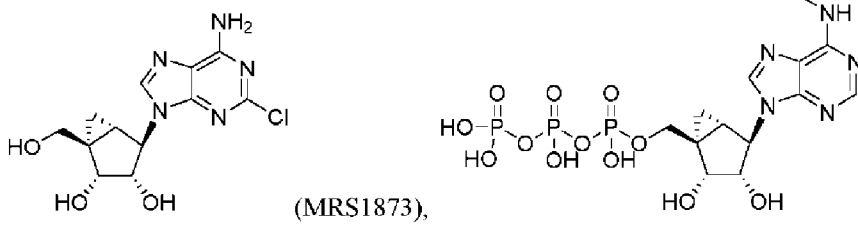
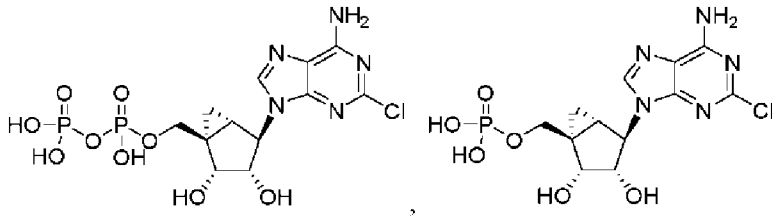


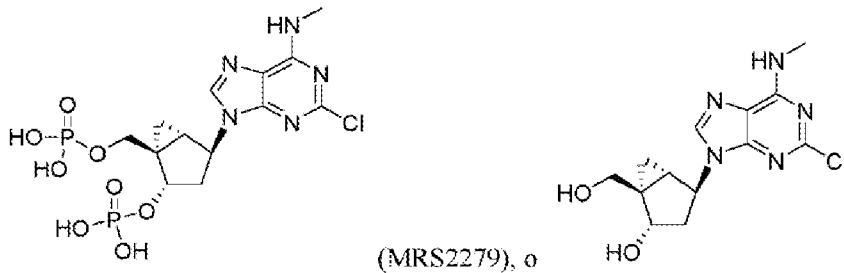
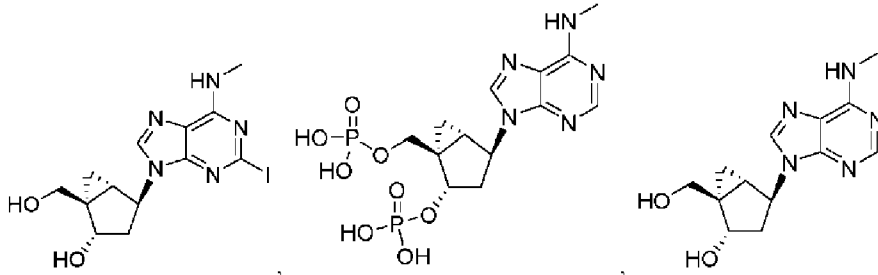
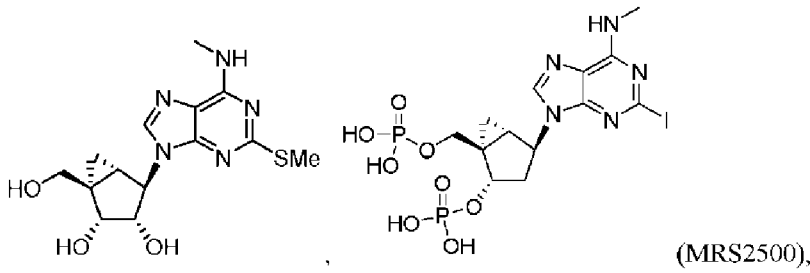
10



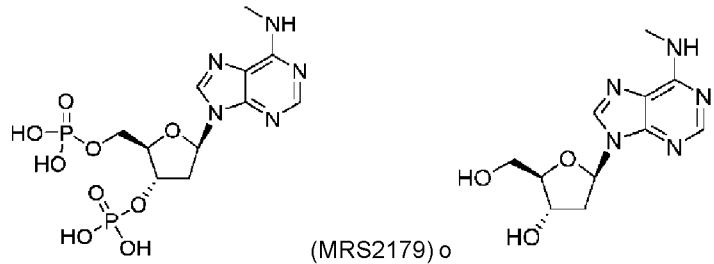
15





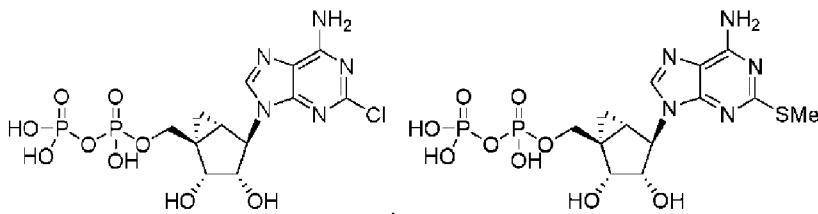


5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos, el compuesto se selecciona de un nucleósido de (N)-metanocarba tal como los descritos anteriormente; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

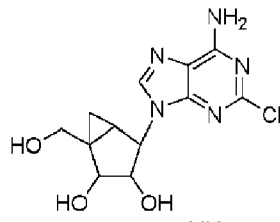


10 En algunos casos, el compuesto se selecciona de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunos casos, el compuesto se selecciona de

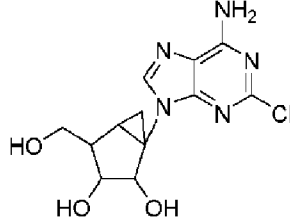


15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



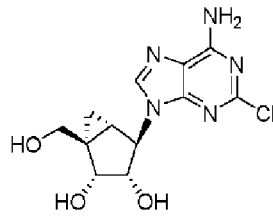
En algunos casos, el compuesto es

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En



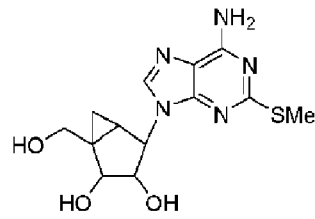
algunos casos, el compuesto es

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. De



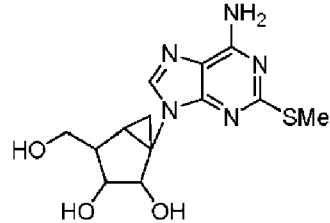
5 acuerdo con la invención, el compuesto es mismo.

o una sal farmacéuticamente aceptable del



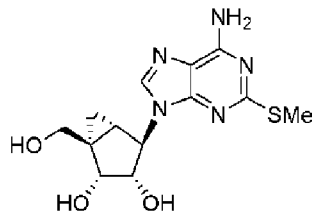
En algunos casos, el compuesto es

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



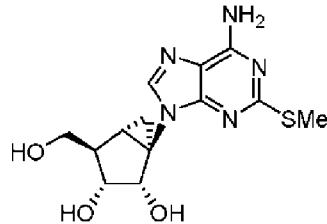
En algunos casos, el compuesto es

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



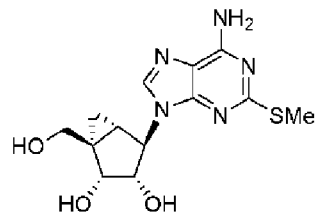
De acuerdo con la invención, el compuesto es

o una sal farmacéuticamente aceptable



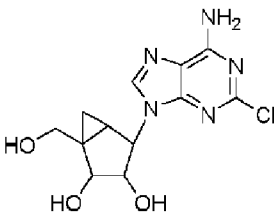
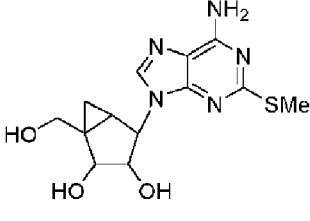
10 del mismo. En algunas realizaciones, el compuesto es

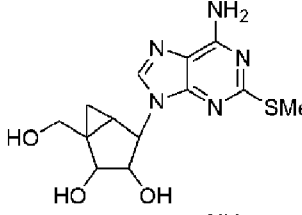
o una sal farmacéuticamente

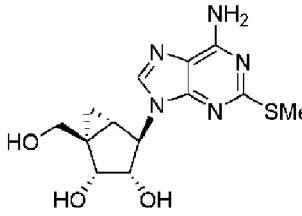


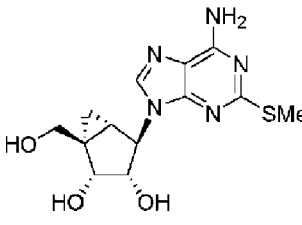
aceptable del mismo. De acuerdo con la invención, el compuesto es

También se describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el

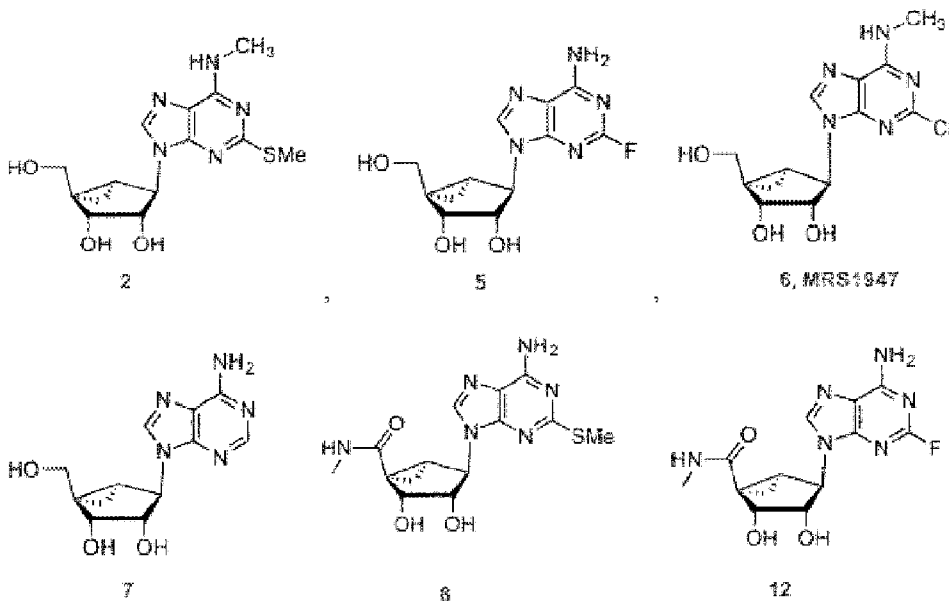
compuesto es  o  o una sal farmacéuticamente aceptable del

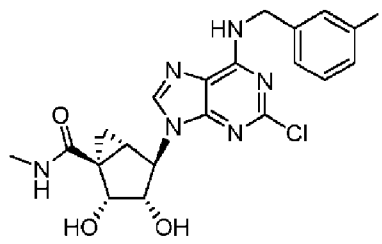
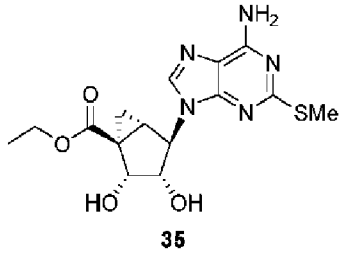
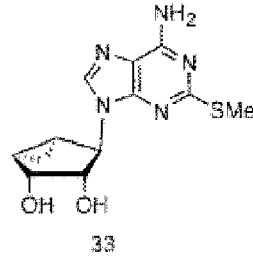
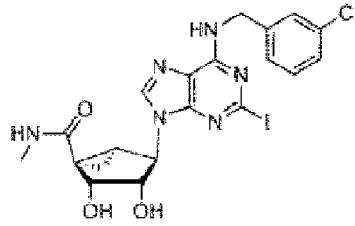
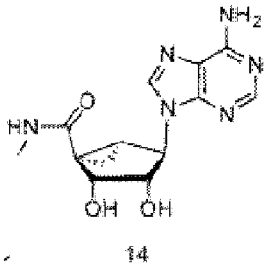
5 mismo. En algunos casos, el compuesto es  o una sal farmacéuticamente aceptable del

mismo. En algunos casos, el compuesto es  o una sal farmacéuticamente aceptable del

mismo. En algunos casos, el compuesto es  .

10 En algunos casos, el compuesto se selecciona de los de la figura 15, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En algunos casos, el compuesto se selecciona de

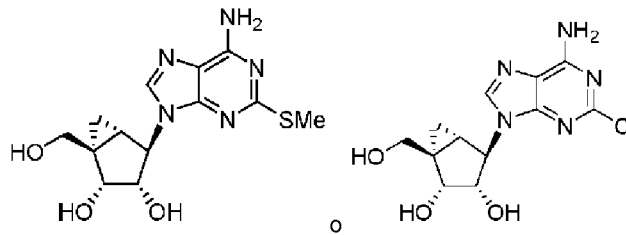




(MRS1898), o MRS1873; o una sal

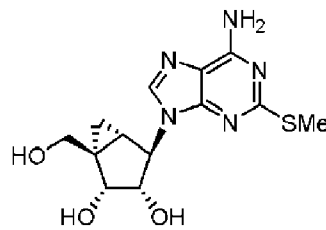
farmacéuticamente aceptable de los mismos.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar una lesión o afección cerebral o del sistema nervioso central (SNC) seleccionada de lesión cerebral traumática (TBI) o accidente cerebrovascular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado de:



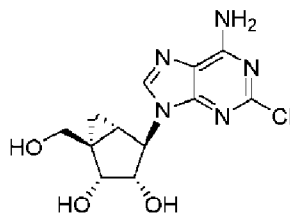
10 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el mismo.

15 En algunas realizaciones, el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En algunas realizaciones, el compuesto es



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, la lesión o afección del cerebro o del sistema nervioso central (SNC) es TBI.

En algunas realizaciones, la TBI se selecciona de conmoción cerebral, lesión por explosión, lesión relacionada con peleas o un golpe leve, moderado o severo en la cabeza.

5 En algunas realizaciones, el compuesto se administra dentro de las 24 horas posteriores a la TBI o accidente cerebrovascular.

En algunas realizaciones, el compuesto se administra dentro de las 8 horas posteriores a la TBI o accidente cerebrovascular.

10 En algunas realizaciones, el compuesto se administra al menos durante las primeras 8-48 horas después de la TBI o accidente cerebrovascular.

15 En algunas realizaciones, la lesión o afección cerebral o del sistema nervioso central (SNC) es un accidente cerebrovascular.

En algunas realizaciones, el compuesto se administra de forma crónica para tratar el accidente cerebrovascular durante el período de tiempo después de que se haya producido el accidente cerebrovascular cuando se resuelve.

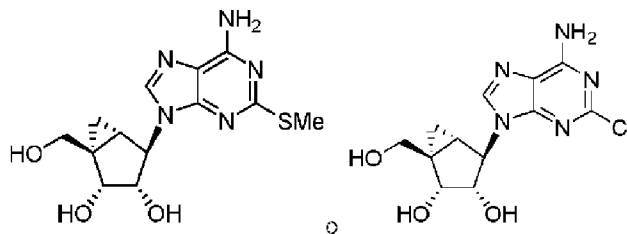
20 En algunas realizaciones, la neuroprotección o la neurorestauración se incrementa en el paciente en comparación con un paciente no tratado.

En algunas realizaciones, el compuesto es un agonista parcial sesgado en un receptor de adenosina A₃ humano (A₃R).

25 En algunas realizaciones, el A₃R está parcialmente agonizado de una manera sesgada hacia las funciones neuroprotectoras del receptor A₃R.

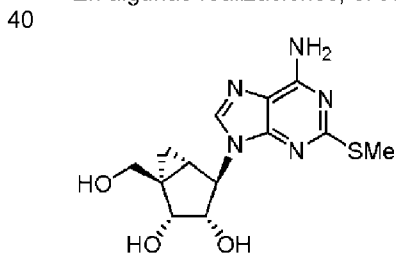
En algunas realizaciones, el compuesto se administra por vía oral, intravenosa o parenteral.

30 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la neuroprotección o la neurorestauración en un paciente que ha sufrido una TBI o accidente cerebrovascular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto seleccionado de



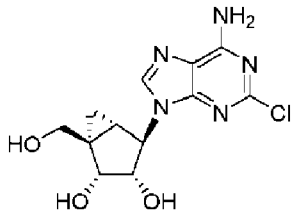
35 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el mismo.

En algunas realizaciones, el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45 En algunas realizaciones, el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 En algunas realizaciones, la neuroprotección o neurorestauración disminuye el periodo de recuperación después de la TBI o el accidente cerebrovascular en comparación con un paciente no tratado.

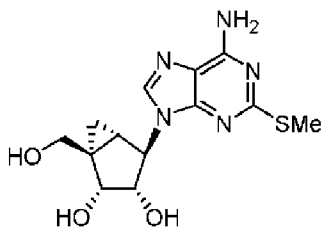
En algunas realizaciones, el compuesto es un agonista parcial sesgado en un receptor de adenosina A_3 humano (A_3R) y el A_3R está parcialmente agonizado de una manera sesgada hacia las funciones neuroprotectoras del receptor A_3R .

- 10 En algunas realizaciones, el compuesto se administra por vía oral, intravenosa o parenteral.

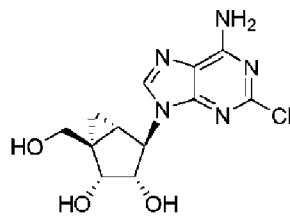
En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene una fracción no unida en plasma de por lo menos 0,7 o por lo menos 0,08 fracción no unida en el cerebro, o ambas.

- 15 En algunas realizaciones, el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo tiene una fracción no unida en plasma de por lo menos 0,7 o por lo menos 0,08 fracción no unida en el cerebro, o ambas.

- 20 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar una lesión, enfermedad o afección seleccionada de una lesión cerebral traumática (TBI), un accidente cerebrovascular, una afección neurodegenerativa o una enfermedad cardíaca o cardiovascular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A_3 (A_3R) seleccionado de



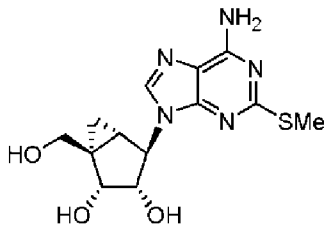
(MRS4322) o



(MRS1873),

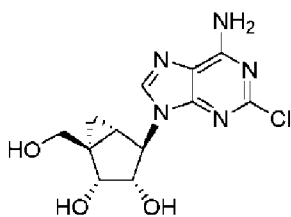
- 25 una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el mismo.

- 30 En algunas realizaciones, el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 35 En algunas realizaciones, el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, la lesión, enfermedad o afección es TBI.

5 En algunas realizaciones, la TBI se selecciona de conmoción cerebral, lesión por explosión, lesión relacionada con peleas o un golpe leve, moderado o severo en la cabeza.

10 En algunas realizaciones, la lesión, enfermedad o afección es un accidente cerebrovascular seleccionado de un accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, vasoespasma cerebral o ataques isquémicos transitorios (TIA).

15 En algunas realizaciones, la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de la enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), encefalopatía traumática crónica (CTE) o una afección neurodegenerativa causada por un virus, alcoholismo, tumor, toxina o lesiones cerebrales repetitivas.

En algunas realizaciones, la lesión, enfermedad o afección es la enfermedad de Parkinson.

20 En algunas realizaciones, la lesión, enfermedad o afección es una enfermedad de Alzheimer, migraña, cirugía cerebral o un efecto secundario neurológico asociado con la quimioterapia para cáncer.

25 En algunas realizaciones, la enfermedad del corazón o cardiovascular se seleccionan de isquemia cardíaca, infarto de miocardio, miocardiopatía, arteriopatía coronaria, arritmia, miocarditis, pericarditis, angina, cardiopatía hipertensiva, endocarditis, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita o aterosclerosis.

En algunas realizaciones, la enfermedad cardíaca o cardiovascular es una isquemia cardíaca o un infarto de miocardio.

30 En algunas realizaciones, el compuesto se administra crónicamente para tratar el accidente cerebrovascular, la isquemia cardíaca o el infarto al miocardio durante el período de tiempo posterior a la aparición de la lesión a medida que se resuelve.

35 En algunas realizaciones, la neuroprotección o la neurorestauración se incrementa en el paciente en comparación con un paciente no tratado.

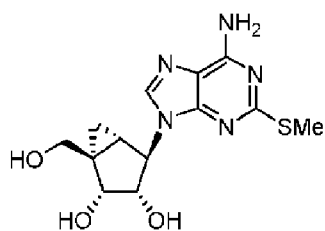
40 En algunas realizaciones, el A₃R se agoniza de forma sesgada hacia las funciones neuroprotectoras del receptor A₃R a través de la activación preferente de la movilización de calcio intracelular con una activación menor o nula de otras rutas mediadas por A₃R, o a través de la activación preferente de la movilización de calcio intracelular mediada por Gq11, la modulación mediada por Gi de la producción de cAMP, o la fosforilación mediada por Gi de ERK1/2 y Akt.

45 En algunas realizaciones, el A₃R está parcialmente agonizado de una manera sesgada hacia las funciones cardioprotectoras del receptor A₃R mediante la activación preferente de la movilización de calcio intracelular con una activación menor o nula de otras rutas mediadas por A₃R, o mediante la activación preferente de la movilización de calcio intracelular mediada por Gq11, modulación mediada por Gi de la producción de cAMP, o fosforilación mediada por Gi de ERK1/2 y Akt.

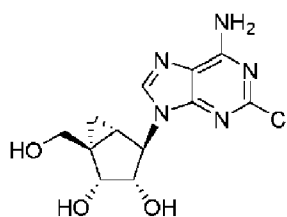
50 En algunas realizaciones, el método aumenta la neuroprotección o la neurorestauración en un paciente que padece una afección neurológica asociada o que resulta de una quimioterapia contra el cáncer o una cirugía cerebral.

En algunas realizaciones, el compuesto se administra por vía oral.

55 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la neuroprotección o la neurorestauración en un paciente que ha sufrido una TBI o un accidente cerebrovascular, tratando así la TBI o un accidente cerebrovascular, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A₃ (A₃R) seleccionado de



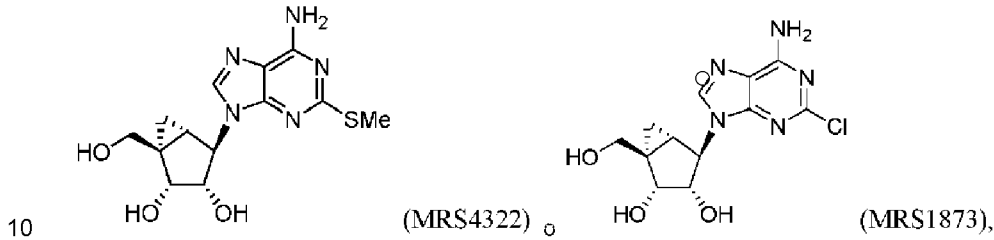
(MRS4322) o



(MRS1873),

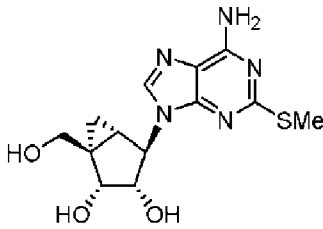
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el mismo.

- 5 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para aumentar la cardioprotección o regeneración de tejido cardíaco dañado en un paciente que ha sufrido una isquemia cardíaca o infarto de miocardio, tratando así la isquemia cardíaca o el infarto al miocardio, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A_3 (A_3R) seleccionado de



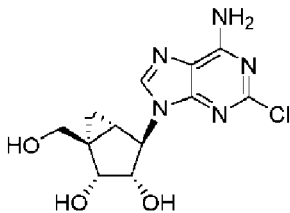
una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéuticamente aceptable que comprende el mismo.

- 15 En algunas realizaciones, el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 20 En algunas realizaciones, el compuesto es



- 25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, el período de recuperación después de la TBI, el accidente cerebrovascular, la isquemia cardíaca o el infarto al miocardio disminuye en comparación con un paciente no tratado.

- 30 En algunas realizaciones, el A_3R está parcialmente agonizado de una manera sesgada hacia las funciones neuroprotectoras del receptor A_3R .

En algunas realizaciones, el A_3R está parcialmente agonizado de una manera orientada hacia las funciones cardioprotectoras del receptor A_3R .

- 35 En algunas realizaciones, el compuesto se administra por vía oral.

En algunas realizaciones, el compuesto es un agonista sesgado de un A_3R con una función de cardioprotección mejorada en relación con un agonista de A_3R completo.

- 40 En algunas realizaciones, el compuesto es un agonista sesgado de un A_3R con función de cardioprotección mejorada en relación con un agonista A_3R completo a través de la activación preferente de una o más de las siguientes rutas mediadas por A_3R : activación de la movilización de calcio intracelular mediada por Gq11, modulación mediada por Gi de la producción de cAMP, fosforilación mediada por Gi de ERK1/2 y Akt, o modulación de la activación de beta-arrestina.
- 45

En algunas realizaciones, el compuesto es un agonista sesgado de un A₃R con una función de cardioprotección mejorada en relación con un agonista de A₃R completo a través de la activación preferente de la movilización de calcio intracelular con menos o ninguna activación de las otras vías mediadas por A₃R.

5 En algunas realizaciones, el compuesto es un agonista parcial del A₃R con una función de cardioprotección mejorada con respecto a un agonista de A₃R completo.

10 La cantidad de un compuesto descrito (es decir, un agente activo) que debería estar presente en una composición para usar un método descrito o una composición farmacéutica descrita será generalmente una cantidad terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "dosis" (o "cantidad eficaz") se refiere a la cantidad de agente activo suficiente para resultar en un resultado terapéutico deseado, como la activación de la neuroprotección, la neuroregeneración y/o la mejora de la función cognitiva o neurológica. La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones de agentes activos pueden determinarse mediante procedimientos conocidos en la
 15 técnica en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50 % del grupo de prueba) y la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % del grupo de prueba). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Las composiciones que exhiben grandes índices terapéuticos son ventajosas. Los datos obtenidos de ensayos de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular un intervalo de dosis para uso en humanos.
 20 En algunas realizaciones, la dosificación de tales composiciones se encuentra dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración usada.

25 En algunas realizaciones, la dosis eficaz y/o el resultado terapéutico deseado se establecen comparando la función cognitiva del sujeto de prueba o del paciente u otro parámetro para al menos dos mediciones; sin embargo, también se pueden usar más de dos mediciones. La medición de la función cognitiva inicial establece una línea de base inicial para el sujeto de prueba o el paciente. La función cognitiva se puede medir usando una prueba cognitiva establecida, como la tarea de recuperación verbal demorada de la Escala de memoria de Wechsler revisada. Una prueba adicional después del tratamiento con la prueba cognitiva establecerá una segunda medición. Se establece una cantidad eficaz
 30 cuando la comparación de la segunda medición con la primera medición demuestra una mejora de por lo menos aproximadamente el 1 %. En algunas realizaciones, la mejora en la función cognitiva, medida por la tarea de recuperación verbal demorada de la Escala de Memoria de Wechsler revisada, se encuentra entre aproximadamente el 1 % y el 20 %. En algunas realizaciones, la mejora está entre aproximadamente el 1 % y el 10 %. En algunas realizaciones, la mejora está entre aproximadamente el 1 % y el 5 %. Una persona experimentada en la técnica
 35 entiende que otros métodos para determinar la mejora de la función cognitiva son igualmente aplicables siempre que no midan las etapas de la demencia.

40 Los métodos de tratamiento descritos pueden abarcar la administración de un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para obtener el efecto terapéutico deseado. La composición se puede administrar durante el tiempo que sea necesario para mantener el efecto terapéutico deseado. En algunas realizaciones, el compuesto se administra entre aproximadamente uno y 12 meses. En algunas realizaciones, el compuesto se administra entre uno y seis meses. En algunas realizaciones, el compuesto se administra entre uno y tres meses.

45 En un aspecto de la invención, un compuesto descrito en donde el compuesto es MRS4322 o MRS1873, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en una cantidad de entre aproximadamente 5 mg/día y 10 g/día. En algunas realizaciones, cada dosis del compuesto está en una cantidad entre aproximadamente 5 mg/dosis y 10 g/dosis. Por ejemplo, se obtienen resultados satisfactorios mediante la administración oral de un compuesto descrito de la invención en dosis de entre aproximadamente 0,05 y 10 mg/kg/día, entre aproximadamente 0,1 y
 50 7,5 mg/kg/día, entre aproximadamente 0,1 y 2 mg/kg/día, o 0,5 mg/kg/día administrado una vez o, en dosis divididas, 2 a 4 veces por día. Para administración parenteral, por ejemplo mediante goteo o infusión i.v., se pueden usar dosis de entre aproximadamente 0,01 y 5 mg/kg/día, entre aproximadamente 0,05 y 1,0 mg/kg/día y entre aproximadamente 0,1 y 1,0 mg/kg/día. Las dosis diarias adecuadas para los pacientes son, por lo tanto, de entre aproximadamente 2,5 y 500 mg p.o., entre aproximadamente 5 y 250 mg p.o., entre aproximadamente 5 y 100 mg p.o., o entre
 55 aproximadamente 0,5 y 250 mg i.v., entre aproximadamente 2,5 y 125 mg i.v. y entre aproximadamente 2,5 y 50 mg i.v.

3. Usos, formulación y administración

60 *Composiciones farmacéuticamente aceptables*

También se describe una composición que comprende un compuesto descrito y un portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertos casos, una composición se formula para la administración a un paciente que necesita tal composición. En algunos casos, una composición se formula para administración oral a un paciente.

65 El término "paciente", como se usa en el presente documento, significa un animal, preferiblemente un mamífero, y lo

más preferiblemente un ser humano.

El término "portador, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un portador, adyuvante o vehículo no tóxico que no destruye la actividad farmacológica del compuesto con el que se formula. Los portadores, adyuvantes o vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en las composiciones de esta invención incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas de suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias amortiguadoras tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, como el sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana.

Un "derivado farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sal, éster, sal de un éster u otro derivado no tóxico de un compuesto de esta invención que, al administrarse a un receptor, sea capaz de proporcionar, directamente o indirectamente, un compuesto de esta invención o un metabolito o residuo inhibitoriamente activo del mismo.

Las composiciones pueden administrarse por vía oral, parenteral, por pulverización por inhalación, por vía tópica, rectal, nasal, bucal, vaginal o a través de un depósito implantado. El término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. En algunos casos, las composiciones se administran por vía oral, intraperitoneal o intravenosa. Las formas inyectables estériles de las composiciones de esta invención pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no tóxico y parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión.

Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados de glicéridos, son útiles en la preparación de inyectables, al igual que los aceites farmacéuticamente aceptables naturales, como el aceite de oliva o el aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxiethyladas. Estas soluciones o suspensiones de aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga, como la carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se usan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. También se pueden usar otros tensioactivos comúnmente usados, como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se usan comúnmente en la fabricación de formas farmacéuticas sólidas, líquidas u otras formas farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no se limita a, cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de comprimidos para uso oral, los portadores comúnmente usados incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, como el estearato de magnesio, también suelen agregarse. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también se pueden agregar ciertos agentes edulcorantes, saborizantes o colorantes.

Alternativamente, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden administrarse en forma de supositorios para administración rectal. Estas se pueden preparar mezclando el agente con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperatura ambiente pero líquido a temperatura rectal y, por lo tanto, se fundirá en el recto para liberar el medicamento. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abeja y polietilenglicoles.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención también pueden administrarse por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles mediante aplicación tópica, que incluyen enfermedades del ojo, la piel o el tracto intestinal inferior. Las formulaciones tópicas adecuadas se preparan fácilmente para cada una de estas áreas u órganos.

La aplicación tópica para el tracto intestinal inferior se puede efectuar en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación de enema adecuada. También se pueden utilizar parches tópicos transdérmicos.

Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticamente aceptables proporcionadas pueden formularse en una pomada adecuada que contiene el componente activo suspendido o disuelto en uno o más portadores. Los portadores para la administración tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones farmacéuticamente aceptables proporcionadas pueden formularse en una loción o crema adecuada que contenga los componentes activos suspendidos o disueltos en uno o

más portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de cetil ésteres, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencilico y agua.

5 Para uso oftálmico, siempre que las composiciones farmacéuticamente aceptables puedan formularse como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica con pH ajustado, o como soluciones en solución salina estéril isotónica con pH ajustado, ya sea con o sin un conservante tal como cloruro de benzilalconio. Alternativamente, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden formularse en una pomada tal como vaselina.

10 Las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden administrarse mediante aerosol nasal o inhalación. Tales composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencilico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

15 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticamente aceptables se formulan para administración oral. Tales formulaciones pueden administrarse con o sin alimentos. En algunos casos, las composiciones farmacéuticamente aceptables se administran sin alimentos. En otros casos, las composiciones farmacéuticamente aceptables se administran con alimentos.

En otros casos, las composiciones farmacéuticamente aceptables se formulan para administración intravenosa (IV).

25 La cantidad de compuestos utilizados en la presente invención que pueden combinarse con los materiales portadores para producir una composición en una única forma de dosificación variará dependiendo del huésped tratado, el modo particular de administración. Preferiblemente, las composiciones proporcionadas deben formularse de modo que se pueda administrar una dosis de entre 0,01 - 100 mg/kg de peso corporal/día del inhibidor a un paciente que recibe estas composiciones.

30 También debe entenderse que una dosificación específica y un régimen de tratamiento para cualquier paciente en particular dependerán de una variedad de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo, la dieta, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la combinación de fármacos y el criterio del médico tratante y la gravedad de la enfermedad en particular que se está tratando. La cantidad de un compuesto de la presente invención en la composición también dependerá del compuesto particular en la composición.

35 *Usos de compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables*

Los compuestos y composiciones descritos en el presente documento son generalmente útiles para el tratamiento de diversas enfermedades y afecciones, tales como lesiones cerebrales y afecciones neurodegenerativas, y los diversos métodos descritos en el presente documento.

45 La actividad de un compuesto usado en la presente invención puede someterse a ensayo *in vitro*, *in vivo* o en una línea celular. Los ensayos *in vitro* incluyen ensayos que determinan la modulación o la unión a una proteína. Las afecciones detalladas para someter a ensayo un compuesto se exponen en los ejemplos a continuación.

50 Como se usan en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y "que trata" se refieren a revertir, aliviar, retrasar la aparición de o inhibir el progreso de una enfermedad o trastorno, o uno o más de sus síntomas, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el tratamiento puede administrarse después de que se hayan desarrollado uno o más síntomas. En otras realizaciones, el tratamiento puede administrarse en ausencia de síntomas. Por ejemplo, el tratamiento puede administrarse a un individuo susceptible antes del inicio de los síntomas (por ejemplo, a la luz de una historia de síntomas y/o a la luz de factores genéticos u otros factores de susceptibilidad). El tratamiento también puede continuarse después de que los síntomas se hayan resuelto, por ejemplo, para prevenir o retrasar su reaparición.

55 Los compuestos y composiciones, de acuerdo con el método de la presente invención, pueden administrarse usando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para tratar o disminuir la gravedad de una enfermedad o afección descrita, o afección o síntoma asociado. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la especie, la edad y el estado general del sujeto, la gravedad de la enfermedad o la afección, el agente particular, su modo de administración y similares. Los compuestos utilizados en la invención se formulan preferiblemente en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma de unidad de dosificación" como se usa en el presente documento se refiere a una unidad físicamente discreta de agente apropiada para el paciente a tratar. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los compuestos y composiciones utilizados en la presente invención lo decidirá el médico asistente dentro del alcance de un buen juicio médico. El nivel de dosis eficaz específica para cualquier paciente u organismo en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el trastorno que se está tratando y la gravedad del trastorno; la

actividad del compuesto específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. El término "paciente", como se usa en el presente documento, significa un animal, en algunas realizaciones un mamífero, o en ciertas otras realizaciones un ser humano.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía oral, sublingual, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas o gotas), intraocularmente (como gotas oculares) bucalmente, como un aerosol oral o nasal, o similar, dependiendo de la gravedad de la enfermedad o afección que se esté tratando. En ciertas realizaciones, los compuestos utilizados en la invención pueden administrarse por vía oral o parenteral a niveles de dosificación de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg, del peso corporal del sujeto por día, una o más veces al día, para obtener el efecto terapéutico deseado.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencilico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y ajonjolí), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes.

Las preparaciones inyectables, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida usando agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución, suspensión o emulsión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, la solución de Ringer, U.S.P. y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico se utilizan en la preparación de inyectables.

Las formulaciones inyectables pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención bacteriana, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse o dispersarse en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de su uso.

Con el fin de prolongar el efecto de un compuesto utilizado en la presente invención, frecuentemente es deseable ralentizar la absorción del compuesto de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en agua. La velocidad de absorción del compuesto depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de compuesto administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se hacen formando matrices microencapsuladas del compuesto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de compuesto con respecto a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, la velocidad de liberación del compuesto se puede controlar. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios que pueden prepararse mezclando los compuestos utilizados en esta invención con excipientes o portadores adecuados no irritantes tales como manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio que son sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a la temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan el compuesto activo.

Las formas de dosificación sólidas para administración oral incluyen cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo se mezcla con por lo menos un excipiente o portador inerte, farmacéuticamente aceptable, tal como citrato de sodio o fosfato de dicalcio y/o a) rellenos o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la solución tales como parafina, f) aceleradores de la absorción como los compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes como, por

ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, la forma de dosificación también puede comprender agentes amortiguadores.

5 Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras que utilizan excipientes como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que liberen los principios activos solamente, o en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. Las composiciones sólidas de un tipo similar también se pueden emplear como rellenos en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras que utilizan excipientes como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

20 Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se indicó anteriormente. Las formas de dosificación sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, píldoras y gránulos pueden prepararse con recubrimientos y envolturas tales como recubrimientos entéricos, recubrimientos que controlan la liberación y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto activo puede mezclarse con al menos un diluyente inerte tal como sacarosa, lactosa o almidón. Tales formas de dosificación también pueden comprender, como es práctica normal, sustancias adicionales distintas de los diluyentes inertes, por ejemplo, lubricantes para la formación de comprimidos y otros adyuvantes para la formación de comprimidos tales como estearato de magnesio y celulosa microcristalina. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes amortiguadores. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden ser de una composición que liberen los principios activos solamente, o en una cierta parte del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden usarse incluyen sustancias poliméricas y ceras.

30 Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica de un compuesto utilizado en esta invención incluyen ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. El componente activo se mezcla bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o solución amortiguadora necesario, según se requiera. La formulación oftálmica, las gotas para los oídos y las gotas para los ojos también se consideran dentro del alcance de esta invención. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, que tienen la ventaja adicional de proporcionar una administración controlada de un compuesto al cuerpo. Tales formas de dosificación se pueden hacer disolviendo o dispersando el compuesto en el medio apropiado. Los potenciadores de la absorción también se pueden usar para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad puede controlarse proporcionando una membrana de control de velocidad o dispersando el compuesto en una matriz polimérica o gel.

40 Dependiendo de la afección particular, o enfermedad a tratar, también pueden estar presentes en las composiciones de esta invención agentes terapéuticos adicionales que normalmente se administran para tratar esa afección. Como se usa en el presente documento, los agentes terapéuticos adicionales que normalmente se administran para tratar una enfermedad o afección en particular, se conocen como "apropiados para la enfermedad o afección que se está tratando".

50 Como se describe en los ejemplos a continuación, en ciertas realizaciones a modo de ejemplo, los compuestos se preparan y se usan de acuerdo con los siguientes procedimientos generales. Se apreciará que, aunque los métodos generales representan la síntesis de ciertos compuestos de la presente invención, los siguientes métodos generales, y otros métodos conocidos por las personas experimentadas en la técnica, pueden aplicarse a todos los compuestos y subclases y especies de cada uno de estos compuestos, como se describe en el presente documento.

Ejemplos

55 **Ejemplo 1: Farmacocinética de MRS4322 después de la administración intraperitoneal a ratones**

Propósito

60 Este estudio se diseñó para determinar las concentraciones en plasma y cerebro de MRS4322 después de la administración intraperitoneal de una dosis usada en modelos de fototrombosis y de lesión cerebral traumática de ratón.

Métodos

65 Productos químicos: MRS4322 se obtuvo por cortesía del Dr. Ken Jacobson del Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades Digestivas y Renales (Bethesda, MD). La tolbutamida de grado analítico se obtuvo de suministros

ES 2 989 621 T3

comerciales en Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

5 Animales: Se utilizaron ratones C57BL/6J hembras que pesaban aproximadamente 0,02 kg para este estudio, suministrados por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas (San Antonio, TX). Todos los estudios se realizaron según los protocolos aprobados por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas IACUC

10 Administración del fármaco: MRS4322 se solubilizó en DMSO y luego se diluyó en solución salina para preparar la solución de dosificación. La concentración final de la solución de dosificación de MRS4322 fue de 100 µM. Se administró por vía intraperitoneal un volumen de 100 µl de solución de dosificación a cada ratón por 20 gramos de peso corporal; MRS4322 se administró por vía intraperitoneal a 0,16 mg/kg o 0,5 µmol/kg. Tres ratones recibieron MRS4322 para cada punto de tiempo de muestreo.

15 Muestreo de tejido: Se obtuvieron muestras de sangre y cerebro a las 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2 y 8 horas después de la dosis. En cada punto de tiempo, los ratones (3/puntos de tiempo) se sacrificaron en una cámara de monóxido de carbono. La sangre completa se obtuvo mediante punción cardíaca en tubos Microtainer que contenían heparina y se centrifugó inmediatamente para la preparación del plasma; el plasma se almacenó a -80 °C. En cada punto de tiempo, se obtuvieron muestras de cerebro completo por decapitación, se enjuagaron en solución salina amortiguada con fosfato enfriada con hielo y se pesaron. Las muestras de cerebro se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Bioanálisis

25 Las concentraciones en plasma y cerebro de MRS4322 se determinaron mediante LC-MS/MS usando tolbutamida como un patrón interno. La siguiente tabla resume las condiciones de LC y MS/MS empleadas:

Tabla 1: Métodos bioanalíticos para las determinaciones de concentración en plasma y cerebro de MRS4322

Métodos bioanalíticos			
Componentes del sistema			
Módulo	Fabricante	Modelo	
HPLC	Shimadzu	Bombas Binarias Prominence LC-20AD	
Inyector automático	Leap	Prominence Sil-30AC	
Espectrómetro de masas	AB Sciex	4000 Qtrap	
Método de HPLC			
Columna	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 mm, 2,6 µm)		
Elución	Gradiente, 0,4 ml/min		
	Fase Móvil A: Ácido fórmico al 0,1 %		
	Fase Móvil B: Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo		
Detección de MS y calibración para MRS4322 en plasma de ratón			
Nombre del pico: Tolbutamida			
Uso como patrón interno			
Masas Q1/Q3: 271,20/155,20 Da			
Nombre del pico: MRS4322			
Patrón Interno: Tolbutamida			
Masas Q1/Q3: 324,10/182,00 Da			
Ajuste	Lineal	Ponderación	1/(x * x)
Intersección	0,000447		

Pendiente	0,00141		
Coefficiente de correlación	0,9996		
Área de uso			
Detección de MS y calibración para MRS4322 en homogeneizado de cerebro de ratón			
Nombre del pico: tolbutamida			
Uso como patrón interno			
Masas Q1/Q3: 271,20/155,20 Da			
Nombre del pico: MRS4322			
Patrón interno: Tolbutamida			
Masas Q1/Q3: 324,10/182,00 Da			
Ajuste	Lineal	Ponderación	1/(x * x)
Intersección	0,0000465		
Pendiente	0,000883		
Coefficiente de correlación	0,9996		
Área de uso			

Para cada matriz de tejido, se crearon curvas patrón y se determinaron las concentraciones de LLOQ/ULOQ. El intervalo de calibración para la curva patrón de concentración plasmática de MRS4322 fue de 2,42-242 ng/ml. El intervalo de calibración para las concentraciones cerebrales de MRS4322 fue de 2,41-233 ng/ml.

5 Para el bioanálisis de las concentraciones cerebrales de MRS4322, las muestras de cerebro se homogeneizaron en solución salina amortiguada con fosfato enfrida con hielo en una dilución 4x. Las partes alícuotas del homogeneizado de cerebro diluido resultante se trataron con acetonitrilo y se analizaron por LC-MS/MS. Debido a la dilución del homogeneizado 4x, el intervalo de calibración de la curva patrón en cerebro de MRS4322 se tradujo a 9,64-932 ng/g.

10 En varias muestras, MRS4322 fue detectable pero cayó por debajo del LLOQ del cerebro de 9,64 ng/g pero estuvo por encima del fondo; en estos casos, la concentración cerebral final notificada se extrapolaba según las alturas de pico de MS.

Resultados

15 Después de la administración intraperitoneal a ratones, las concentraciones de MRS4322 fueron detectables en muestras de plasma y cerebro (figura 1A y tabla 2). Obsérvese que, tal como se describe en el ejemplo 11 a continuación y se muestra en las figuras 1B y 16, las concentraciones de MRS4322 fueron detectables en muestras de plasma y cerebro de cerdos neonatales. Después de la administración intravenosa a cerdos neonatales,

20 las concentraciones de MRS4322 fueron detectables en muestras de plasma, cerebro, líquido extracelular cerebral y líquido cefalorraquídeo (figuras 1B y 16, tabla 13).

Tabla 2: Concentraciones en plasma y cerebro de MRS4322 en ratones después de la administración intraperitoneal

Grupo	Matriz	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Tiempo (h)	Concentración en plasma (ng/ml) por sujeto					
					A	B	C	Media	SD	N

1	Plasma	MRS4322	0,16	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0,083	40,2	42,5	65,8	49,5	14,2	3
				0,25	37,5	41,6	46,3	41,8	4,40	3
				0,5	14,8	26,8	21,6	21,1	6,00	3
				1	7,35	4,23	85,0*	5,79	NA	2
				2	0,539 [†]	0,638 [†]	1,15 [†]	0,776	0,328	3
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
Grupo	Matriz	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Tiempo (h)	Concentración en cerebro (ng/ml) por sujeto					
					A	B	C	Media	SD	N
1	Cerebro	MRS4322	0,16	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0,083	2,04 [†]	2,18 [†]	2,55 [†]	2,11	0,100	3
				0,25	3,08 [†]	3,03 [†]	3,43 [†]	3,06	$\frac{0,040}{0}$	3
				0,5	1,77 [†]	3,00 [†]	1,81 [†]	2,39	0,870	3
				1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0

BLQ = Por debajo del límite inferior de cuantificación (2,40 ng/ml para plasma, 9,64 ng/g para cerebro debido a una dilución 4x)

5 * El animal F a un valor de 1 hora de 85,0 se consideró un valor atípico y se excluyó de las estadísticas de resumen

† Las concentraciones calculadas fueron <LLOQ. Los valores notificados están extrapolados.

Las concentraciones plasmáticas permitieron estimaciones iniciales de T_{max} , C_{max} , semivida y AUC (tabla 3).

10

Tabla 3: Farmacocinética en plasma de MRS4322 en ratones después de la administración intraperitoneal

Grupo	Matriz	Analito	Dosis (mg/ml)	ID de animal	C_{max} (ng/ml)	T_{max} (h)	AUC_{ultimo} (h*ng/ml)	AUC_{INF} (h*ng/ml)	Semivida (h)
1	Plasma	MRS4322	0,16	A	40,2	0,083	24,2	24,4	0,306
				B	42,5	0,083	27,5	27,8	0,288
				C	65,8	0,083	37,6	38,2	0,337
				N Media	3 49,5	3 0,083	3 29,8	3 30,1	3 0,310

				SD	14,2	0,000	7,01	7,19	0,0247
				% CV	28,6	0,0	23,5	23,8	8,0

Nota: los valores de BLQ se convirtieron a cero, se incluyeron valores extrapolados y se excluyó el animal F a 1 hora para los análisis de PK

5 Aunque las concentraciones en el cerebro eran detectables, los datos eran insuficientes para la estimación de la semivida u otros parámetros farmacocinéticos distintos de la $C_{máx}$ y la $T_{máx}$. Sin embargo, según los datos disponibles de plasma y cerebro, se estimó que la proporción de cerebro/plasma del fármaco total era aproximadamente de 0,06 en función de las concentraciones medias de $C_{máx}$ en plasma y cerebro.

10 Estos resultados confirman que las concentraciones plasmáticas circulantes de MRS4322 son detectables después de la administración intraperitoneal a ratones bajo las condiciones de dosificación utilizadas en los modelos de fototrombosis y lesión cerebral traumática, y que MRS4322 se distribuye al cerebro bajo estas condiciones de dosificación.

15 **Ejemplo 2: Farmacocinética de MRS4322 después de la administración intraperitoneal de MRS2365 a ratones**

Propósito

20 Este estudio se diseñó para determinar las concentraciones plasmáticas y cerebrales de MRS4322 después de la administración intraperitoneal del agonista de $P2Y_1$ MRS2365 a una dosis usada en modelos de fototrombosis y lesión traumática cerebral de ratón.

Métodos

25 **Productos químicos:** MRS4322 se obtuvo por cortesía del Dr. Ken Jacobson del Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades Digestivas y Renales (Bethesda, MD). MRS2365 se obtuvo de Tocris Biosciences (Bristol, RU). La tolbutamida de grado analítico se obtuvo de suministros comerciales en Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

30 **Animales:** Se utilizaron ratones C576BL/6J hembras que pesaban aproximadamente 0,02 kg para este estudio, suministrados por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas (San Antonio, TX). Todos los estudios se realizaron según los protocolos aprobados por el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas IACUC.

35 **Administración del fármaco:** MRS2365 se solubilizó en solución salina amortiguada con fosfato y luego se diluyó en solución salina amortiguada con fosfato para preparar la solución de dosificación. La concentración final de la solución de dosificación de MRS2365 fue de 100 μ M. Se administró por vía intraperitoneal un volumen de 100 μ l de solución de dosificación a cada ratón por 20 gramos de peso corporal; MRS2365 se administró por vía intraperitoneal a 0,5 μ mol/kg o 0,24 mg/kg. Se administró a tres ratones MRS2365 para cada punto de tiempo de muestreo.

40 **Muestreo de tejido:** Se obtuvieron muestras de sangre y cerebro a las 0, 0,083, 0,25, 0,5, 1, 2 y 8 horas después de la dosis. En cada punto de tiempo, los ratones (3/puntos de tiempo) se sacrificaron en una cámara de monóxido de carbono. La sangre completa se obtuvo mediante punción cardíaca en tubos Microtainer que contenían heparina y se centrifugó inmediatamente para la preparación del plasma; el plasma se almacenó a -80 °C. En cada punto de tiempo, se obtuvieron muestras de cerebro completo por decapitación, se enjuagaron en solución salina amortiguada con fosfato enfriada con hielo y se pesaron. Las muestras de cerebro se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

50 **Bioanálisis:** Estudios previos habían demostrado que no se observaron concentraciones circulantes y cerebrales detectables de MRS2365 después de la administración intraperitoneal o intravenosa, por lo que este estudio se centró solo en la detección y cuantificación de su metabolito MRS4322. Las concentraciones plasmáticas y cerebrales de MRS4322 se determinaron por LC-MS/MS usando tolbutamida como patrón interno. La siguiente tabla resume las condiciones de LC y MS/MS empleadas:

Tabla 4: Métodos bioanalíticos para las determinaciones de concentración en plasma y cerebro de MRS4322

55

Métodos bioanalíticos		
Componentes del sistema		
Módulo	Fabricante	Modelo
HPLC	Shimadzu	Bombas Binarias Prominence LC-20AD
Inyector automático	Leap	Prominence Sil-30AC

ES 2 989 621 T3

Espectrómetro de masas	AB Sciex	4000 Qtrap	
Método de HPLC			
Columna	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 mm, 2,6 µm)		
Elución	Gradiente, 0,4 ml/min		
	Fase Móvil A: Ácido fórmico al 0,1 %		
	Fase Móvil B: Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo		
Detección de MS y calibración para MRS4322 en plasma de ratón			
Nombre del pico: Tolbutamida			
Uso como patrón interno			
Masas Q1/Q3: 271,20/155,20 Da			
Nombre del pico: MRS4322			
patrón interno: Tolbutamida			
Masas Q1/Q3: 324,10/182,00 Da			
Ajuste	Lineal	Ponderación	1 / x
Intersección	0,000704		
Pendiente	0,00151		
Coefficiente de correlación	0,9998		
Área de uso			
Detección de MS y calibración para MRS4322 en homogeneizado de cerebro de ratón			
Nombre del pico: Tolbutamida			
Uso como patrón interno			
Masas Q1/Q3: 271,20/155,20 Da			
Nombre del pico: MRS4322			
patrón interno: Tolbutamida			
Masas Q1/Q3: 324,10/182,00 Da			
Ajuste	Lineal	Ponderación	1 / x
Intersección	0,000209		
Pendiente	0,000864		
Coefficiente de correlación	1,00		
Área de uso			

Para cada matriz de tejido, se crearon curvas patrón y se determinaron las concentraciones de LLOQ/ULOQ. El intervalo de calibración para la curva patrón de concentración en plasma de MRS4322 fue de 2,26-241 ng/ml. El intervalo de calibración para las concentraciones cerebrales de MRS4322 fue de 2,35 a 242 ng/ml.

5 Para el bioanálisis de las concentraciones cerebrales de MRS4322, se homogeneizaron muestras de cerebro en solución salina amortiguada con fosfato enfriada con hielo en una dilución 4x. Las partes alícuotas del homogeneizado de cerebro diluido resultante se trataron con acetonitrilo y se analizaron por LC-MS/MS. Debido a la dilución del homogeneizado 4x, el intervalo de calibración de la curva patrón en cerebro de MRS4322 se tradujo a 9,40-968 ng/g.

10 En varias muestras, MRS4322 fue detectable pero cayó por debajo del LLOQ cerebral de 9,40 ng/gm pero estuvo por encima del fondo; en estos casos, la concentración cerebral final informada se extrapolaba según las alturas de pico de MS.

Resultados

15 Después de la administración intraperitoneal de MRS2365 a ratones, las concentraciones de MRS4322 fueron detectables en muestras de plasma y cerebro (figura 2 y tabla 5).

20 Tabla 5: Concentraciones en plasma y cerebro de MRS4322 en ratones después de la administración intraperitoneal de MRS2365

Grupo	Matriz	Artículo de prueba	Dosis (mg/kg)	Tiempo (h)	Concentración en plasma (ng/ml) por sujeto					
					A	B	C	Media	SD	N
1	Plasma	MRS4322	0,24 MRS2365	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0,083	24,5	64,1	82,8	57,1	29,8	3
				0,25	46,5	43,2	47,4	45,7	2,20	3
				0,5	22,3	25,1	31,0	26,1	4,40	3
				1	2,30	4,02	3,53	3,28	0,890	3
				2	BLQ	1,02*	0,680*	0,850	NA	2
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
Grupo	Matriz	Artículo de prueba	Dosis	Tiempo (h)	Concentración en cerebro (ng/g) por sujeto					
					A	B	C	Media	SD	N
1	Cerebro ^a	MRS4322	0,24 MRS2365	0	2,76*	10,0	4,61*	5,79	3,76	3
				0,083	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0,25	3,92*	3,26*	4,16*	3,78	0,470	3
				0,5	3,19*	2,80*	2,70*	2,90	0,260	3
				1	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				2	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				8	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0

BLQ = Por debajo del límite inferior de cuantificación (2,26 ng/ml para plasma; 9,40 ng/g para cerebro debido a una dilución de 4 veces)

5 * Valores proyectados; estos valores estuvieron por debajo del límite de cuantificación.

^a Parece posible que las muestras 0 y 0,083 se etiquetaron incorrectamente al recibirlas

Las concentraciones en plasma permitieron estimaciones iniciales de $T_{m\acute{a}x}$, $C_{m\acute{a}x}$, semivida y AUC (tabla 6).

10

Tabla 6: Farmacocinética en plasma de MRS4322 en ratones después de la administración intraperitoneal de MRS2365

Grupo	Matriz	Analito	Dosis (mg/kg)	ID de Animal	$C_{m\acute{a}x}$ (ng/ml)	$T_{m\acute{a}x}$ (h)	$AUC_{\acute{u}ltimo}$ (h*ng/ml)	AUC_{INF} (h*ng/ml)	Semivida (h)
1	Plasma	MRS4322	0,24 MRS2365	A ^a	46,5	0,25	21,7	22,3	0,17
				B	64,1	0,08	30,0	30,5	0,34
				C	82,8	0,08	34,8	35,1	0,28
				N	3	3	3	3	3
				Media	64,5	0,14	28,8	29,3	0,27
				SD	18,2	0,10	6,65	6,51	0,09
				% CV	28,2	69,5	23,1	22,2	33,1

15 Los valores de BLQ se convirtieron a cero; se incluyeron valores extrapolados para los análisis de PK.

Aunque las concentraciones en cerebro eran detectables, los datos eran insuficientes para la estimación de la semivida u otros parámetros farmacocinéticos distintos de la $C_{m\acute{a}x}$ y la $T_{m\acute{a}x}$. Sin embargo, según los datos disponibles de plasma y cerebro, se estimó que la proporción cerebro/plasma del fármaco total era de aproximadamente 0,10 en función de

las concentraciones medias de C_{max} en plasma y cerebro.

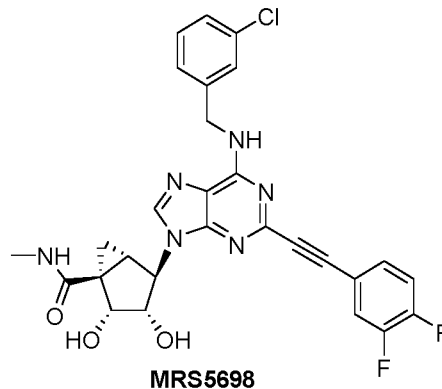
Estos resultados confirman que las concentraciones en plasma circulantes de MRS4322 son detectables después de la administración intraperitoneal del agonista de $P2Y_1$ MRS2365 a ratones bajo las condiciones de dosificación utilizadas en los modelos de fototrombosis y lesión traumática del cerebro, y que MRS4322 se distribuye en el cerebro bajo estas condiciones de dosificación.

Las concentraciones en plasma y cerebro de MRS4322 se determinaron en dos estudios diferentes, después de la administración intraperitoneal de MRS4322 (véase el ejemplo 1) y después de la administración intraperitoneal del agonista de $P2Y_1$ MRS2365. En ambos de estos estudios, se administraron MRS4322 o MRS2365 a dosis equimolares de $0,5 \mu\text{mol/kg}$. Comparando los resultados de ambos estudios, las concentraciones en plasma observadas de MRS4322 fueron virtualmente idénticas y las concentraciones en cerebro de MRS4322 fueron muy similares (comparar las figuras 1 y 2). No hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de semivida y AUC para MRS4322 después de la administración de dosis equimolares de MRS4322 o MRS2365. Estos datos indican que, después de la administración intraperitoneal a ratones, MRS2365 se metaboliza rápidamente y completamente a MRS4322, lo que da como resultado una farmacocinética de MRS4322 en plasma y cerebro muy similar a los que siguen a la administración intraperitoneal del propio MRS4322.

Ejemplo 3: Unión a plasma y cerebro de MRS4322 en ratones

Propósito

Este estudio se diseñó para determinar la fracción libre en plasma y cerebro de MRS4322 en ratones y comparar las fracciones libres con las de un agonista prototípico del receptor de adenosina A_3 , MRS5698. MRS5698 tiene la siguiente estructura química:



Métodos

Productos químicos: MRS4322 se obtuvo por cortesía del Dr. Ken Jacobson del Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades Digestivas y Renales (Bethesda, MD). MRS5698 se adquirió de Tocris Biosciences (Bristol, Reino Unido). El sulfametoxazol y la warfarina de grado analítico se obtuvieron de suministros comerciales en Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Animales y preparación de tejidos: Se obtuvo plasma de ratones CD-1 machos de BioreclamationIVT (Westbury, NY) y se almacenó a -80°C hasta su uso. Se obtuvieron cerebros de ratón CD-1 macho de BioreclamationIVT (Westbury, NY).

Las muestras en blanco de ultrafiltrado de plasma se prepararon descongelando plasma congelado y luego precalentando plasma en una cámara humidificada del 5 % de CO_2 a 37°C durante 60 minutos. Partes alícuotas de $800 \mu\text{l}$ se transfirieron a filtros centrífugos Centrifree (celulosa regenerada Ultracel (NMWL 30.000 amu) Lote R5JA31736) y se centrifugaron a 2900 RPM a 37°C durante 10 minutos; los filtrados de agua y plasma se recolectaron y utilizaron en la preparación de patrones, blancos y patrones de QC.

Se pesaron y homogeneizaron los cerebros con solución salina amortiguada con fosfato 1:9, pH 7,4 usando un homogeneizador de tejido Omni. Los cerebros de cuatro ratones se homogeneizaron, se agruparon y se mezclaron para formar una muestra.

Determinación de la unión al plasma: MRS4322, MRS5698, sulfametaxazol y warfarina se solubilizaron en DMSO y luego se diluyeron en acetonitrilo:agua 1:1 para preparar soluciones madre de diálisis $100 \mu\text{M}$. Se utilizaron

sulfametazazol y warfarina como patrones de estudio con valores de unión a plasma conocidos. Las muestras de plasma se precalentaron durante 60 minutos en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂ mantenida a 37 °C. Se añadieron alícuotas de tres ml de plasma precalentado cada una con adiciones conocidas de MRS4322, MRS5698, sulfametaxazol o warfarina usando soluciones madre 100 µM para cada compuesto, lo que dio como resultado concentraciones de prueba finales de 1 µM. Las muestras de plasma con adiciones conocidas se incubaron en un mezclador giratorio en una cámara humidificada con 5 % de CO₂ a 37 °C durante un mínimo de 60 minutos. Después de 60 minutos, se agregaron tres alícuotas de 800 µl de cada muestra a los filtros centrífugos Centrifree. Los filtros se sometieron a centrifugación a 2900 rpm durante 10 minutos a 37 °C. Se recogieron tres alícuotas de 100 µl de plasma residual junto con ultrafiltrado para bioanálisis.

Determinación de la unión al cerebro: MRS4322, MRS5698, sulfametoxazol y warfarina se solubilizaron en DMSO y se diluyeron en acetonitrilo:agua 1:1 para preparar soluciones madre de diálisis 100 µM. Los cerebros homogeneizados agrupados se precalentaron durante 60 minutos en una incubadora humidificada de 5% de CO₂ mantenida a 37 °C. Se añadieron alícuotas de tres ml de homogeneizado de cerebro cada una con adiciones conocidas de MRS4322, MRS5698, sulfametaxazol o warfarina usando las soluciones madre 100 µM para cada compuesto, lo que dio como resultado concentraciones finales con adiciones conocidas de 1 µM. Se colocaron homogeneizados de cerebro agrupados con adiciones conocidas en un mezclador Nutator en una incubadora humidificada de 5 % de CO₂ a 37 °C durante 60 minutos. Después de 60 minutos, se agregaron tres alícuotas de 800 µl de cada muestra a los filtros centrífugos Centrifree. Los filtros se sometieron a centrifugación a 2900 rpm durante 10 minutos a 37 °C. Se recogieron partes alícuotas de homogeneizado de cerebro residual y ultrafiltrado para bioanálisis.

Bioanálisis

Las concentraciones en plasma y cerebro de MRS4322 y MRS5698 en plasma con adiciones conocidas, homogeneizados de cerebro y ultrafiltrados asociados se determinaron mediante LC-MS/MS usando tolbutamida como patrón interno. Las concentraciones asociadas de sulfametaxazol y warfarina también se determinaron mediante LC-MS/MS usando condiciones estándar (datos no mostrados). Las siguientes tablas resumen las condiciones de LC y MS/MS empleadas (tablas 7 y 8). Los métodos bioanalíticos fueron idénticos para todas las matrices; los datos estadísticos de curva patrón (por ejemplo, ajuste, intercepción, pendiente, coeficiente de correlación) se determinaron para cada matriz pero no fueron significativamente diferentes y, por lo tanto, no se muestran para cada matriz.

Tabla 7: Métodos bioanalíticos para MRS4322 para la determinación de las concentraciones en plasma, homogeneizado de cerebro, ultrafiltrado de plasma y ultrafiltrado de homogeneizado de cerebro

Bioanálisis de muestras de plasma, homogeneizados de cerebro, ultrafiltrado de plasma y ultrafiltrado de homogeneizado de cerebro			
Componentes del sistema			
Módulo	Fabricante	Modelo	
HPLC	Shimadzu	Bombas Binarias Prominence LC20AD	
Inyector automático	CTC Leap	HTC PAL	
Espectrómetro de masas	AB Sciex	API 4000	
Método de HPLC			
Columna	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 mm, 2,6 µm)		
Elución	Gradiente, 0,4 ml/min		
	Fase Móvil A: Ácido fórmico al 0,1 % en agua		
	Fase Móvil B: Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo		
Condiciones de espectrómetro de masas para MRS4322			
Nombre del pico: MRS4322			
Masas Q1/Q3: 324,10/182,00 Da			
Nombre del pico: Tolbutamida			
Masas Q1/Q3: 271,20/155,20 Da			
Ajuste		Lineal	Ponderación 1 / x
Intersección		0,0181	
Pendiente		0,00192	
Coeficiente de correlación		0,9988	

Tabla 8: Métodos bioanalíticos para MRS5698 para la determinación de las concentraciones en plasma,

homogeneizado de cerebro, ultrafiltrado de plasma y ultrafiltrado de homogeneizado de cerebro

Componentes del sistema			
Módulo	fabricante	Modelo	
HPLC	Shimadzu	Bombas Binarias Prominence LC20AD	
Inyector automático	CTC Leap	HTC PAL	
Espectrómetro de masas	AB Sciex	API 4000	
Método de HPLC			
Columna	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 mm, 2,6 µm)		
Elución	Gradiente, 0,4 ml/min		
	Fase Móvil A: Ácido fórmico al 0,1 % en agua		
	Fase Móvil B: Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo		
Condiciones de espectrómetro de masas para MRS5698			
Nombre del pico: MRS5698			
Masas Q1/Q3: 565,10/395,90 Da			
Nombre del pico: Tolbutamida			
Masas Q1/Q3: 271,20/155,20 Da			
Ajuste	Lineal	Ponderación	1 / x
Intersección	0,107		
Pendiente	0,00786		
Coefficiente de correlación	0,9986		

5 Para cada matriz de tejido, se crearon curvas patrón y se determinaron las concentraciones de LLOQ/ULOQ. El intervalo de calibración para las curvas patrón de concentración en plasma de MRS4322 y MRS5698 fue de 400-1200 nM. El intervalo de calibración para las curvas patrón en ultrafiltrado de plasma de MRS4322 y MRS5698 fue de 100-1200 nM. El intervalo de calibración para las curvas patrón en ultrafiltrado de homogeneizado de cerebro y homogeneizado de cerebro de MRS4322 fue de 400-1200 nM y 100-1200 nM, respectivamente. El intervalo de calibración para las curvas patrón en ultrafiltrado de homogeneizado de cerebro de homogeneizado de cerebro de MRS5698 y fue de 400-1200 nM y 1-500 nM, respectivamente.

Resultados

15 La unión al plasma y la fracción libre se determinaron para MRS4322 y MRS5698 usando la ultrafiltración de plasma. La unión al plasma fue del 25,8 % para MRS4322; la fracción libre asociada fue de 0,742 (tabla 9).

20 Las concentraciones de MRS5698 no se detectaron en el ultrafiltrado de plasma; MRS5698 se recuperó por completo en las muestras de plasma con adiciones conocidas residual obtenidas del lado del donante de los dispositivos Centrifree (datos no mostrados). Esto indica que las bajas concentraciones en ultrafiltrado de MRS5698 no se debieron a la baja recuperación analítica del compuesto. En general, estos datos son consistentes con la alta unión a proteínas (99,88 %) de MRS5698 en plasma y tejido de ratón notificada en la bibliografía (Tosh, D. K. *et al.* Purinergic Signaling (2015) 11: 371-387). La unión de los patrones de estudio sulfametaxazol y warfarina fueron consistentes con los valores de la bibliografía.

25 Tabla 9: Fracción no unida y unión de MRS4322 y MRS5698 en plasma de ratón

Substrato	Fracción no unida		% de unión		N
	Media	SD	Media	SD	
MRS4322	0,742	0,065	25,8	6,5	3
MRS5698	*	*	*	*	3
Sulfametoxazol	0,345	0,027	65,5	2,7	3
Warfarina	0,0485	0,0031	95,1	0,3	3

* Las concentraciones en ultrafiltrado de plasma de MRS5698 fueron BLQ

5 La unión al cerebro y la fracción libre se determinaron para MRS4322 y MRS5698 usando la ultrafiltración de homogeneizado de cerebro. La unión al cerebro fue del 87 % para MRS4322; la fracción libre asociada fue de 0,13 (tabla 10).

10 Las concentraciones de MRS5698 no se detectaron en el ultrafiltrado de homogeneizado de cerebro. Para fines de estimación, se utilizó el LLOQ en ultrafiltrado de homogeneizado de cerebro de MRS5698 para calcular un valor de unión al cerebro. El valor de unión al cerebro resultante fue del 99,99 %. En general, estos datos son consistentes con la alta unión a proteínas (99,88 %) de MRS5698 en plasma y tejido de ratón notificados en la bibliografía (Tosh, D. K. *et al.* Purinergic Signaling (2015) 11: 371-387). La unión de los patrones de estudio sulfametaxazol y warfarina fueron consistentes con los valores de la bibliografía.

15 Tabla 10: Fracción no unida y unión de MRS4322 y MRS5698 en homogenizados de cerebro de ratón

Ensayo	Sustrato	Fracción no unida		% de unión		N
		Media	SD	Media	SD	
1	MRS4322	0,130	0,010	87,0	1,0	3
	MRS5698	<0,000122*	---	>99,99*	---	3
	Sulfametoxazol	0,431	0,049	56,9	4,9	3
	Warfarina	0,208	0,038	79,2	3,8	3

* MRS5698 no se detectó en el ultrafiltrado; se utilizó el LLOQ del ensayo para calcular un valor de unión estimado

20 En general, estos datos indican que MRS4322 tiene una fracción libre sustancialmente mayor y una menor unión a proteínas que el agonista de adenosina A₃ MRS5698 en plasma y cerebro. Estos datos indican que, para una concentración en plasma o cerebro total dada, concentraciones sustancialmente más altas de MRS4322 estarán disponibles para interactuar con los sitios efectores que las disponibles para MRS5698.

25 Ejemplo 4: Estabilidad *in vitro* y metabolismo de MRS2365 en sangre y plasma de ratón y ser humano

Propósito

30 Este estudio se diseñó para determinar la estabilidad *in vitro* y el destino metabólico del agonista de P2Y₁ MRS2365 en sangre y plasma de ratón y ser humano.

Métodos

35 Productos químicos: MRS2365 se obtuvo de Tocris Biosciences (Bristol, RU). MRS4322 se obtuvo por cortesía del Dr. Ken Jacobson del Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades Digestivas y del Ríñon (Bethesda, MD). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Enalapril y procaína se utilizaron como patrones de estabilidad en plasma y sangre para ratón y ser humano, respectivamente.

40 Preparación de tejido: Se obtuvo plasma de ratones CD-1 machos y seres humanos de BioreclamationIVT (Westbury, NY) y se almacenó a -80 °C hasta su uso. La sangre completa se obtuvo de ratones CD-1 machos y voluntarios humanos en Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO). Las muestras de plasma y sangre se prepararon usando EDTA (1 mM) o heparina de litio como anticoagulantes.

45 Determinación de la estabilidad en plasma: MRS2365, enalapril y procaína se solubilizaron en solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4. Las muestras de plasma (preparadas a partir de sangre con EDTA o heparina de litio

como anticoagulante) se precalentaron durante 60 minutos en una incubadora humidificada de 5 % de CO₂ mantenida a 37 °C. Las incubaciones de estabilidad se iniciaron con la adición de MRS2365 (concentración final de 1 µM). Las evaluaciones iniciales de la estabilidad en plasma generado por EDTA utilizaron puntos de tiempo de incubación de 0, 10, 30, 60, 120 y 240 minutos (figuras 3 y 4). Los estudios posteriores que compararon el plasma generado por EDTA y heparina utilizaron puntos de tiempo de incubación de 0, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 y 30 minutos (figura 7). Se realizaron incubaciones de estabilidad en plasma adicionales que comparan el plasma generado por EDTA y heparina usando puntos de tiempo de 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60 y 90 segundos (figura 8). Para los análisis de exploración de metabolitos, se incubó MRS2365 en plasma humano heparinizado a una concentración de 100 µM durante 10 o 30 minutos (figura 9). En todos los estudios, el plasma se colocó inmediatamente en tubos Microtainer, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Determinación de la estabilidad en sangre: MRS2365, enalapril y procaína se solubilizaron en solución salina amortiguada con fosfato, pH 7,4. Las muestras de sangre (tratadas con EDTA o heparina de litio) se precalentaron durante 60 minutos en una incubadora humidificada de 5 % de CO₂ mantenida a 37 °C. Las incubaciones de estabilidad se iniciaron con la adición de MRS2365 (concentración final de 1 µM) (figuras 5 y 6). Se obtuvieron alícuotas de muestra de sangre a los 0, 1, 2,5, 7,5, 10 y 30 minutos y se colocaron en tubos Microtainer. Para los análisis de exploración de metabolitos, se incubó MRS2365 en sangre humana heparinizada a una concentración de 100 µM durante 10 o 30 minutos (figura 10). En todos los estudios, el plasma se preparó inmediatamente por centrifugación a 4 °C, se colocó en tubos Microtainer, se congeló en hielo seco y se almacenó a -80 °C hasta su análisis.

Bioanálisis

Las concentraciones en plasma y en sangre de MRS2365 se determinaron por LC-MS/MS usando tolbutamida como un patrón interno. La siguiente tabla resume las condiciones de LC y MS/MS empleadas (tabla 11). Los métodos bioanalíticos fueron idénticos para todas las matrices; los datos estadísticos de curva patrón (por ejemplo, ajuste, intercepción, pendiente, coeficiente de correlación) se determinaron para cada matriz pero no fueron significativamente diferentes y, por lo tanto, no se muestran para cada matriz.

Tabla 11: Métodos bioanalíticos para MRS2365 para la determinación de concentraciones en plasma y en sangre en determinaciones de estabilidad *in vitro*

Métodos de bioanálisis – Plasma y sangre			
Componentes del sistema			
Módulo	Fabricante	Modelo	
HPLC	Shimadzu	Prominence	
Inyector automático	Leap	CTC Pal	
Espectrómetro de masas	AB Sciex	API 4000	
Método de HPLC			
Columna	Luna C18 (2,1 x 50 mm, 2,6 µm)		
Elución	Gradiente, 0,4 ml/min		
	Fase Móvil A: Acetato de Amonio 2 mM, pH7,65		
	Fase Móvil B: Acetato de amonio 2 mM en acetonitrilo		
Detección de MS y calibración para MRS2365 en plasma y sangre			
Nombre del pico: Tolbutamida			
Uso como patrón interno			
Masas Q1/Q3: 269,00/170,00 Da			
Nombre del pico: MRS2365			
patrón interno: Tolbutamida			
Masas Q1/Q3: 482,11/384,00 Da			
Ajuste	Lineal	Ponderación	1/(x*x)
Intersección	0,00004		
Pendiente	0,00002		
Coeficiente de correlación	0,9854		
Área de uso			

Para cada matriz de tejido, se crearon curvas patrón y se determinaron las concentraciones de LLOQ/ULOQ. El intervalo de calibración para las curvas patrón de concentración en plasma y sangre de MRS2365 fue de 5-5000 ng/ml. Las muestras de control de calidad se utilizaron en concentraciones de 32, 160, 800 y 4000 ng/ml.

Las muestras de plasma y sangre también se analizaron cualitativamente para determinar los metabolitos de MRS2365 usando un protocolo de "exploración de metabolitos" basado en LC-MS/MS. A partir de la revisión de las rutas metabólicas de otros nucleótidos (por ejemplo, ATP, ADP), se planteó la hipótesis de que los metabolitos más probables de MRS2365 serían el metabolito desfosforilado (es decir, monofosfato) (MRS2347, mw = 403,07) y/o el metabolito de ribósido completamente desfosforilado (MRS4322, mw = 323,10). Las muestras de sangre y plasma se analizaron mediante LC/MS-MS de iones positivos y negativos para el compuesto original y los metabolitos, ya que se anticipó que los compuestos fosforilados generarían iones negativos de manera preferente, mientras que el ribósido MRS4322 generaría iones positivos de manera preferente. En el modo de ion positivo, los cromatogramas de iones extraídos monitorizaron masas en el intervalo de 323,7-324,7 y 403,7-404,7 para detectar MRS4322 y MRS2347, respectivamente. Cualquier pico de iones en estos intervalos se analizó adicionalmente para generar espectros de iones de producto para estos picos de cromatograma de iones. En el modo de ion negativo, los cromatogramas de iones extraídos monitorizaron masas en el intervalo de 321,70-322,70, 401,70-402,70 y 481,70-482,70 para detectar MRS4322, MRS2347 y MRS2365, respectivamente, los picos se analizaron adicionalmente para generar espectros de iones de producto. Debido a que los patrones auténticos de MRS4322 y MRS2347 no estaban disponibles, solo se pudo hacer una identificación cualitativa de los metabolitos, ya que las alturas/áreas de los picos de iones no se pudieron comparar debido a las posibles diferencias en la eficiencia de ionización.

Resultados

Se utilizaron protocolos de dos cursos de tiempo para evaluar la estabilidad en plasma de MRS2365 en plasma de ratón y ser humano. Los datos preliminares se generaron con plasma preparado con EDTA durante un curso de tiempo de 240 minutos. Un estudio posterior utilizó puntos de tiempo de 1 a 30 minutos después de la incubación, y el estudio final utilizó un curso de tiempo más corto de 5 a 90 segundos después de la incubación. En todos los protocolos, se analizó la estabilidad en plasma en plasma preparado a partir de sangre con EDTA o heparina de litio como anticoagulante. Los datos de estabilidad *in vitro* para enalapril (ratón) y procaina (ser humano) en plasma y sangre total fueron consistentes con los valores publicados (datos no mostrados).

En los estudios de estabilidad en plasma que utilizan plasma preparado con EDTA, MRS2365 fue esencialmente estable durante el transcurso de la incubación hasta 240 minutos después de la incubación (figuras 3 y 4). Los valores de semivida no se pudieron calcular a lo largo del curso de tiempo de la incubación y, por lo tanto, fueron > 240 minutos. En los análisis de exploración de metabolitos posteriores, ni MRS2347 ni MRS4322 pudieron detectarse. Estos datos sugirieron que MRS2365 era estable *in vitro* en plasma de ratón y ser humano.

Se hicieron observaciones similares cuando se evaluó la estabilidad de MRS2365 en sangre completa de ratón y ser humano que se había tratado con EDTA como anticoagulante (figuras 5 y 6). En esos estudios, la semivida de MRS2365 en sangre de ratón tratada con EDTA fue de 47 minutos, lo que sugiere que EDTA no inhibió completamente el aclaramiento de MRS2365 en esta matriz. Sin embargo, MRS2365 fue de nuevo completamente estable en la sangre completa humana tratada con EDTA, con una semivida estimada de > 240 minutos. No se detectaron metabolitos en estos estudios de sangre completa.

Estos datos fueron inconsistentes con las evaluaciones farmacocinéticas *in vivo* iniciales de MRS2365 en ratones que utilizaron heparina como anticoagulante de sangre para la preparación de plasma, en las que MRS2365 parecía aclararse rápidamente a una velocidad que se aproxima al ritmo cardíaco, lo que sugiere un extenso aclaramiento extrahepático del compuesto. Se sabe que EDTA quela cationes divalentes que se requieren para la actividad enzimática de las ectonucleotidasas, enzimas responsables de la desfosforilación de nucleótidos, que están presentes en la superficie de las membranas celulares y circulan en la sangre y el plasma (véase Ziganshin *et al.* Pflugers Arch (1995) 429: 412-418). Por lo tanto, era posible que la ruta metabólica primaria del análogo de nucleótido agonista de P2Y₁ MRS2365 fuera completamente inhibida por el EDTA usado para preparar el plasma y la sangre completa para los estudios descritos anteriormente.

Para investigar esta posibilidad, se realizaron estudios de estabilidad adicionales para comparar la estabilidad de MRS2365 en plasma que se había generado por EDTA o heparina de litio, siendo este último un anticoagulante sin efectos inhibidores notificados sobre las ectonucleotidasas. Los estudios se realizaron por primera vez con plasma heparinizado y sangre completa durante un curso de tiempo de 0-30 minutos. La cuantificación de las concentraciones de MRS2365 reveló concentraciones extremadamente bajas de MRS2365 en todos los puntos de tiempo, con datos insuficientes para calcular una semivida *in vitro* (datos no mostrados). Puesto que se observaron concentraciones bajas/indetectables de MRS2365 incluso en los puntos de tiempo más cortos de este estudio (0 y 1 minutos), el estudio se repitió con un curso de tiempo significativamente más corto (0-90 segundos) para comparar la estabilidad *in vitro* en plasma tratado tanto con EDTA como heparina y para intentar calcular una semivida *in vitro*. En este estudio más corto, MRS2365 fue relativamente estable en plasma humano y de ratón tratado con EDTA (figuras 5 y 6); la variabilidad en las concentraciones de MRS2365 probablemente se debió a un mezclado incompleto al inicio del curso de tiempo corto y la variabilidad en el muestreo de puntos de tiempo múltiples durante el transcurso del período de incubación de 90 segundos. Sin embargo, en el plasma tratado con heparina, las concentraciones de MRS2365 fueron extremadamente bajas incluso en los puntos de tiempo más cortos (0 y 5 segundos). MRS2365 fue completamente estable cuando se incubó en solución salina amortiguada con fosfato.

Juntos, estos datos sugieren que, aunque MRS2365 es inherentemente estable en solución, se degrada rápidamente en plasma y sangre humana y de ratón por un proceso que es inhibido por EDTA. Teniendo en cuenta que MRS2365 es un análogo de nucleótido y EDTA es un inhibidor conocido de las ectonucleotidasas que desfosforilan nucleótidos, estos datos sugieren fuertemente que MRS2365 es susceptible a una rápida desfosforilación en plasma y sangre completa, consistente con los datos farmacocinéticos *in vivo* generados para MRS2365 en ratones.

Para investigar más a fondo la posibilidad de desfosforilación de MRS2365 como la causa de la inestabilidad en plasma humano y de ratón y en sangre completa, se llevó a cabo una detección de metabolitos en plasma humano heparinizado y sangre después de la incubación de MRS2365 a 100 μ M durante 10 o 30 minutos; la mayor concentración de sustrato se utilizó para asegurar la detección de cualquier metabolito formado. Se ilustran cromatogramas de iones representativos y espectros de iones de productos bajo condiciones de ionización positiva (figuras 7 y 8); los cromatogramas de ionización negativa y los espectros de iones de producto dieron resultados similares (datos no mostrados). Aunque la falta de patrones químicos impidió la determinación de concentraciones absolutas de metabolitos, la abundancia relativa del metabolito M1 aumentó en comparación con el metabolito M2 de 10 a 30 minutos después de la incubación. Los cromatogramas de iones parentales de los metabolitos M2 y M1 y los espectros de iones del producto resultante bajo ambas condiciones de ionización fueron consistentes con la masa y estructura del metabolito de monofosfato desfosforilado MRS2347 y el metabolito de ribósido desfosforilado MRS4322, respectivamente (figura 9). La detección de ambos metabolitos y el aumento en la abundancia del metabolito M1 (MRS4322) en relación con el metabolito M2 (MRS2347) sugirieron una desfosforilación gradual de MRS2365 en plasma y sangre humanos, progresando a través del producto intermedio monofosforilado MRS2347 que luego se desfosforila al ribósido no fosforilado MRS4322.

Juntos, estos datos apoyan la hipótesis de que MRS2365 se metaboliza rápidamente en plasma y sangre mediante la circulación de ectonucleotidasas que desfosforilan el compuesto original, lo que finalmente da como resultado el ribósido no fosforilado MRS4322. Este proceso se inhibe por EDTA, un agente que se sabe que quelata los cationes divalentes que se requieren para la actividad ectonucleotidasa.

Ejemplo 5: Eficacia neuroprotectora de MRS4322 después de una TBI en ratones

Propósito

Este estudio se diseñó para determinar la eficacia neuroprotectora de MRS4322 en ratones sometidos a lesión cerebral traumática (TBI) y para comparar ratones libres tratados con MRS2365 y un agonista completo del receptor de adenosina A₃, C1-IB-MECA.

Métodos

Productos químicos: MRS4322 se obtuvo por cortesía del Dr. Ken Jacobson del Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades Digestivas y Renales (Bethesda, MD). C1-IB-MECA está disponible comercialmente en Tocris Biosciences (Bristol, Reino Unido) y varios otros proveedores. Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Animales y lesión cerebral traumática (TBI): La TBI se realizó con un modelo controlado de lesión del cráneo cerrado como se describe en Talley-Watts *et al.* 2012 (J. Neurotrauma 30, 55-66). Siguiendo el método descrito allí, se usó un dispositivo de impacto neumático para generar una TBI moderada dejando intactos el cráneo y la materia dura. Para lograr esto, se anestesiaron ratones C57BL/6 con isoflurano (3 % de inducción, 1 % de mantenimiento) en 100 % de oxígeno. Se mantuvo una temperatura corporal de 37 °C usando una mesa quirúrgica calentada con control de temperatura. Se realizó una pequeña incisión en la línea media en el cuero cabelludo usando técnicas quirúrgicas asépticas. Se colocó un disco de acero inoxidable de 5 mm en el cráneo y se fijó usando pegamento rápido en el hueso parietal derecho entre bregma y lambda sobre la corteza somatosensorial. El ratón se colocó en una platina directamente debajo de la punta de impacto neumático. Se suministró un impacto calibrado a 4,5 m/s a una profundidad de 2 mm, lo que genera una lesión moderada en el ratón. Las incisiones en el cuero cabelludo se cerraron con sutura trenzada de nailon 4-0 y pomada antibiótica aplicada a la incisión. Los ratones se colocaron en una unidad de cuidados termointensivos (Braintree Scientific modelo FV-1; 37 °C, 27 % de O₂) y se monitorizaron hasta que se despertaron completamente y se movieron libremente. Treinta minutos después de una lesión o una simulación (no lesionados), los ratones se trataron con un vehículo (solución salina) o con fármacos (MRS4322, C1-IB-MECA o MRS2365). Las dosis de MRS4322, C1-IB-MECA y MRS2365 fueron 0,16, 0,24 y 0,2 mg/kg, respectivamente, cada una equivalente a dosis equimolares de aproximadamente 0,5 μ mol/kg.

Análisis de transferencia de tipo Western para GFAP: En los tiempos de supervivencia seleccionados, los ratones se anestesiaron con isoflurano y se sacrificaron. Se extrajo el cerebro y se colocó en hielo para su disección en hemisferios cerebrales impactados y no impactados. El tejido aislado se homogeneizó rápidamente en una solución amortiguadora de homogeneización enfriada (sacarosa 0,32 M, EDTA 1 mM, Tris-HCl 1 M, pH = 7,8) en hielo usando un homogeneizador de vidrio de Wheaton (20 ciclos completos). El homogeneizado se transfirió a un tubo de 2 ml y se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se recogió y analizó. La concentración de proteína

se determinó mediante el ensayo de BCA usando una dilución 1:50. Se retiraron 100 µg de proteína como una parte alícuota para cada muestra y se añadió solución amortiguadora Laemmli que contenía β-mercaptoetanol y la muestra se colocó en un bloque de calor durante 3 minutos a 95 °C. Las muestras se cargaron en un gel al 12 % y se corrieron a 80 V durante 20 minutos, seguido de 40 minutos a 130 V. Las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa a 100 V durante 1 hora. La membrana se bloqueó con leche al 5 % en TBS-T durante 30 minutos. Se añadió GFAP (1:1000-Imgenex IMG-5083-A) y se colocó a 4 °C durante la noche. La membrana se lavó con TBS-T tres veces durante 10 minutos. Se aplicó anticuerpo secundario para GFAP (conjugado con HRP anti-conejo de burro (ImmunoJackson Laboratories; 711-035-152; 1:20000) a temperatura ambiente durante 1 hora. Las membranas se lavaron con TBS-T durante 15 minutos (3 veces) y se desarrollaron usando el kit Western Lightning Plus-ECL (PerkinElmer, Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Resultados

MRS4322 reduce la expresión de GFAP en los cerebros del ratón después de TBI.

La expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) se utilizó como biomarcador para la gliosis reactiva después de una TBI (Talley-Watts *et al.* 2012; Sofroniew, 2005). Se realizó un análisis de transferencia de tipo Western para la expresión de GFAP en ratones con simulación, TBI o TBI vuelta a tratar (MRS4322 o MRS2365) sacrificados 7 días después de la lesión. En primer lugar, el análisis de transferencia de tipo Western confirmó que la TBI indujo un aumento significativo en la expresión de GFAP, tanto en el lado ipsilateral (donde se centró el impacto) como en los lados contralaterales del cerebro 7 días después de la lesión (figura 12A). La expresión de GFAP fue significativamente menor en las transferencias de ratones tratados con MRS4322 o MRS2365, que se inyectaron a los 30 minutos del traumatismo inicial (figura 12A). Para los controles de carga, se usaron transferencias de tipo Western de beta-actina y se muestran debajo de los carriles respectivos. Las transferencias de tipo Western mostradas en la figura 12A se obtuvieron de un experimento representativo y se realizaron en el mismo gel. Los datos promediados en 3 experimentos separados y que muestran el cambio relativo en las relaciones de GFAP/actina (intensidades de banda medidas en el software Image J) se presentan como media +/- SEM en la figura 12B. Los valores se han normalizado a los niveles de TBI en el día 7 (100 %) para consolidar los datos. El número total de ratones para un tratamiento experimental dado se indica con N en la figura 12B.

MRS4322 y un agonista del receptor de adenosina A₃ reducen la expresión de GFAP en el plasma de ratón después de una TBI. Los niveles de GFAP en el plasma también se han usado también como biomarcador para la TBI, debido a la ruptura de la barrera hematoencefálica (BBB) después de un traumatismo. En consecuencia, también se recogieron muestras de plasma el día 7 de ratones con TBI. Al igual que en el tejido cerebral, se encontró que los niveles de GFAP se detectaron fácilmente en el día 7 mediante el análisis de transferencia de tipo Western (figura 12C). Más importante aún, se encontró que las transferencias de tipo Western obtuvieron el plasma de ratones TBI tratados con MRS4322 o CI-IB-MECA (agonista del receptor de adenosina A₃) que mostraron niveles significativamente reducidos de GFAP en relación con la actina (figura 12C). Las gráficas de histogramas de las relaciones GFAP/actina promedio para cada condición experimental se presentan en la figura 12D. El número total de ratones por tratamiento experimental está indicado por el valor N.

MRS4322 es un agonista de baja afinidad (4900 nM) del receptor A₃ en el ratón. A la inversa, CI-IB-MECA es un agonista de alta afinidad (0,18 nM) en el ratón: las diferencias en la afinidad de estos dos compuestos son aproximadamente 25.000 veces. Sin embargo, en los modelos de accidente cerebrovascular fototrombótico de ratón y TBI, MRS4322 demuestra una eficacia significativa que está bloqueada por el antagonista de A₃ MRS1523, mientras que CI-IB-MECA está inactivo (accidente cerebrovascular) o débilmente activo (TBI, figura 12). Esto es claramente un resultado no obvio desde la perspectiva de la afinidad del receptor. La explicación actual para este hallazgo se basa en los datos de propiedad de ADME/PK que se han generado para MRS4322 y CI-IB-MECA. CI-IB-MECA es un compuesto lipofílico (cLogP aprox. 2,5) que está altamente unido a proteínas plasmáticas (fracción libre 0,002) y altamente no unido específicamente al tejido cerebral (fracción libre 0,002). MRS4322 es un compuesto muy hidrofílico (cLogP <0) que tiene una fracción no unida muy grande en plasma (0,74) y cerebro (0,13). Solamente el fármaco no unido está disponible para su distribución a través de las membranas y la interacción con los receptores. Por lo tanto, a pesar de su menor afinidad por el receptor, la fracción de MRS4322 disponible para interactuar con el receptor A₃ en estos modelos de ratón es por lo menos 1000 veces más alta que la del CI-IB-MECA. Creemos que estas diferencias significativas en las propiedades fisicoquímicas de los compuestos y las características de ADME/PK contribuyen a la eficacia no obvia de MRS4322 en comparación con CI-IB-MECA (y MRS5698, otro agonista de A₃R completo lipofílico y altamente unido/de alta afinidad) en estos modelos de ratón.

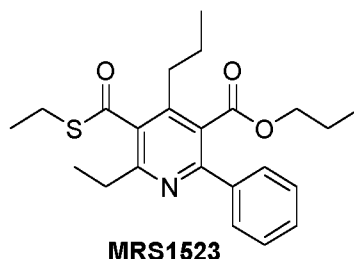
Agonismo sesgado. El receptor de adenosina A₃ es un receptor pleiotrópico acoplado a proteína G, es decir, el agonismo de este receptor potencialmente activa múltiples rutas descendentes a través de múltiples proteínas G, así como la beta-arrestina. Las rutas que se activan por el agonismo del receptor A₃ se han identificado actualmente, pero pueden no limitarse a la movilización de calcio intracelular mediada por Gq11, la modulación mediada por Gi de la producción de cAMP y la fosforilación mediada por Gi de ERK1/2 y Akt. Un aspecto de los descubrimientos se encuentra en la movilización mediada por A₃ de calcio intracelular que resulta en la promoción de la producción de ATP mitocondrial en astrocitos.

Un concepto emergente en farmacología de receptores es el agonismo sesgado. Este concepto establece que, para los receptores pleiotrópicos, existen en realidad diferentes clases de agonistas, algunos de los cuales pueden activar todas las rutas descendentes, mientras que otros muestran un sesgo en la activación de un subconjunto de las rutas descendentes. En el descubrimiento de fármacos y la farmacología del receptor, el agonismo sesgado introduce la posibilidad de una mayor especificidad en la activación de la ruta con menos efectos fuera del objetivo, es decir, menos efectos secundarios. Hay evidencia de agonismo sesgado para el receptor A_3 . Sin embargo, los agonistas prototípicos de alta afinidad como CI-IB-MECA y MRS5698 son agonistas completos que no demuestran una activación sesgada de las rutas descendentes mencionadas anteriormente. Por lo tanto, y sin querer limitarse a ninguna teoría particular, se cree que MRS4322 es un agonista sesgado que activa preferentemente la movilización de calcio intracelular con menos/hinguna activación de las otras rutas mediadas por A_3 . Este hallazgo explica la eficacia de MRS4322 observada en modelos de accidente cerebrovascular y TBI en ratones con respecto a los agonistas completos/no sesgados CI-IB-MECA y MRS5698.

Ejemplo 6: Eficacia neuroprotectora de MRS4322 después del accidente cerebrovascular en ratones

Propósito

Este estudio se diseñó para determinar la eficacia neuroprotectora de MRS4322 en ratones sometidos a accidente cerebrovascular y comparar ratones tratados con MRS2365, con y sin el antagonista del receptor A_3 MRS1523, y en comparación con los agonistas de A_3R completos MRS5698 y CI-IB-MECA. MRS1523 tiene la siguiente estructura:



Métodos

Productos químicos: MRS4322 se obtuvo por cortesía del Dr. Ken Jacobson del Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades Digestivas y Renales (Bethesda, MD). CI-IB-MECA, MRS5698 y MRS2365 están disponibles comercialmente en Tocris Bioscience (Bristol, Reino Unido) y varios otros proveedores. Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Accidente cerebrovascular inducido por fototrombosis: Se realizó fototrombosis como se describe en Zheng *et al* 2010 (PloS One 5 (12): e14401). En resumen, Rosa de Bengala es un colorante fluorescente que, cuando se inyecta en la vasculatura y se excita, genera oxígeno singlete que daña la pared endotelial e induce una trombosis local (coágulo). Usando esta técnica, a los ratones se les administró una inyección de 0,1 ml en la vena de la cola de Rosa de Bengala esterilizada (RB, Sigma, EE. UU.) en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF). La concentración de RB fue de 20 mg/ml. Una región cortical se centró en el campo de la imagen y se iluminó con un láser verde (543 nm, 5 mW) usando un objetivo de inmersión en agua 0,8-NA 40x (Nikon, Tokio). La formación de coágulos se monitorizó en tiempo real hasta que el vaso objetivo o los capilares corriente abajo se ocluyeron firmemente. Los coágulos estables se identificaron posteriormente por una segmentación de vasos no fluorescentes que terminaba con regiones altamente fluorescentes. En los experimentos de control, la iluminación con láser o la propia Rosa de Bengala no condujeron a la formación de coágulos. Los tratamientos, MRS4322 (0,16 mg/kg; 0,5 μ mol/kg) o MRS2365 (0,24 mg/kg; 0,5 μ mol/kg) se introdujeron mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.). Para los experimentos con el antagonista del receptor A_3 MRS1523, a los ratones se les administraron inyecciones intraperitoneales (2 mg/kg) en los puntos de tiempo de 0 y 2 horas para asegurar el antagonismo del receptor durante todo el curso del estudio.

Animales y accidente cerebrovascular inducido por fototrombosis: El accidente cerebrovascular se realizó como se describe en Zheng *et al* 2010 (PloS One 5 (12): e14401). Se utilizaron ratones C57Bl/6 hembras (4-6 meses) en este estudio. De los métodos de este manuscrito: los ratones se anestesiaron en isoflurano al 3 % con 100 % de oxígeno y posteriormente se mantuvieron en isoflurano al 1 % a través de un cono de nariz. La profundidad de la anestesia se monitorizó y reguló de acuerdo con los signos vitales, la retirada frente al pellizco y los parpadeos de los ojos. La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C mediante una almohadilla de calentamiento controlada por retroalimentación (Gaymar T/Pump). Los signos vitales que incluyen la saturación de oxígeno, la frecuencia respiratoria y la frecuencia cardíaca se monitorizaron continuamente mediante el uso del sistema MouseOx (STARR Life Sciences). Se recortó el pelo de la cabeza de cada ratón y se hizo una pequeña incisión en el cuero cabelludo para exponer el cráneo. Una placa de acero inoxidable hecha a medida se pegó al cráneo con adhesivo de tejido VetBond (3M, St Paul, MN). Se creó una ventana de obtención de imágenes de cráneo adelgazado craneal sobre la corteza somatosensorial primaria derecha (~ 1,5 mm posterior a Bregma y 2 mm lateral desde la línea media) dependiendo del experimento. En resumen,

una gran región del cráneo se adelgazó primero con el taladro eléctrico y luego se adelgazó con una cuchilla quirúrgica. El espesor final del cráneo adelgazado fue de aproximadamente 50 µm. Después de que se creó la ventana de obtención de imágenes craneal, los ratones se transfirieron a la platina de microscopio y se usaron para fototrombosis o experimentos de obtención de imágenes. Para los experimentos de obtención de imágenes repetidas, la placa se separó cuidadosamente del cráneo y se suturó el cuero cabelludo (sutura Ethicon 6-0 sild). Después de cada experimento, los ratones se devolvieron a las jaulas hasta el siguiente punto de tiempo o se sacrificaron. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en San Antonio. Treinta minutos después del accidente cerebrovascular o la simulación (no lesionados), los ratones se trataron con vehículo (solución salina) o con fármacos (MRS4322, MRS2365, MRS5698 o CI-IBMECA).

Evaluación después del infarto fototrombótico. El tamaño de los infartos cerebrales se evaluó usando la tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) como se describe en Zheng *et al*/2010 (PloS One 5 (12): e14401). En resumen, las lesiones inducidas por RB en cortes de cerebro se tiñeron con TTC. El TTC es un colorante incoloro que tiñe de rojo el tejido cerebral sano cuando se reduce por la enzima mitocondrial succinil deshidrogenasa (Bederson JB *et al*, 1986). La ausencia de tinción en el tejido necrótico se utiliza para definir el área de un infarto cerebral. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron sus cerebros y luego se colocaron en HBSS helado durante 3 minutos. El cerebro se transfirió posteriormente a un molde cerebral (KOPF), se cortó en secciones de 1 mm y se sumergió en TTC al 2 % (5 min) a 37 °C. Las secciones se fijaron en solución de formaldehído amortiguada al 10 % durante la noche a 4 °C. Se tomaron imágenes de los cortes en un escáner de superficie plana (HP scanjet 8300) para el análisis del tamaño de la lesión a 1200 ppp.

Resultados

El tratamiento con MRS4322 reduce los infartos cerebrales después del accidente cerebrovascular. Se indujeron accidentes cerebrovasculares fototrombóticos de múltiples vasos en ratones usando la vena de la cola inyectada junto con RB como se describió anteriormente. A los 30 minutos de la formación del coágulo, a los ratones se les inyectó intraperitonealmente vehículo (control de solución salina), MRS4322 (0,16 mg/kg; 0,5 µmol/kg) o MRS2365 (0,24 mg/kg; 0,5 µmol/kg). Veinticuatro horas después del accidente cerebrovascular inicial, se evaluó el tamaño del infarto cerebral con tinción con TTC como se describió anteriormente. Las fracciones de cerebro representativas teñidas con TTC se presentan en la figura 13A. Se encontró que tanto MRS4322 como MRS2365 redujeron significativamente el tamaño del infarto cerebral. En la figura 13C se presenta una gráfica de histograma del tamaño promedio de los infartos cerebrales para los ratones tratados con vehículo, MRS4322, MRS2365, MRS5698 o CI-IBMECA. Estos datos se agrupan de 2 experimentos independientes. N se refiere al número total de ratones analizados.

El antagonista del receptor A₃ MRS1523 inhibe la neuroprotección de los tratamientos con MRS4322 y MRS2365 después del accidente cerebrovascular. Se indujeron movimientos fototrombóticos de múltiples vasos en ratones como se describió anteriormente. Sin embargo, en este experimento, los ratones se trataron con inyecciones intraperitoneales del antagonista del receptor A₃, MRS1523 (2 mg/kg) en los puntos de tiempo de 0 y 2 horas para asegurar el antagonismo del receptor. A los ratones se les inyectó luego vehículo, MRS4322, MRS2365, MRS5698 o CI-IBMECA dentro de los 30 minutos de formación de coágulos en las concentraciones descritas anteriormente. Veinticuatro horas más tarde, se evaluaron los tamaños de infarto cerebral con tinción de TTC. Las fracciones representativas de cerebro teñidas con TTC se presentan en la figura 13B. Se encontró que el tamaño de los infartos cerebrales en ratones tratados previamente con MRS1523 no se redujo con los tratamientos con MRS4322 o MRS2365 o MRS5698. En la figura 13D se presenta una gráfica de histograma del tamaño promedio de los infartos cerebrales para estos experimentos. Los datos se agrupan a partir de 2 experimentos independientes. N se refiere al número total de ratones analizados.

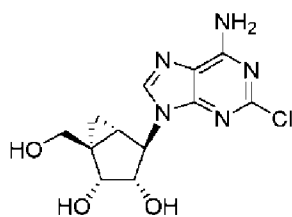
50 Ejemplo 7: Eficacia neuroprotectora de MRS1873 después del accidente cerebrovascular en ratones

Propósito

Este estudio se diseñó para determinar la eficacia neuroprotectora de MRS1873, que es el correspondiente análogo de 2-cloro de MRS4322. Los experimentos se realizaron en ratones sometidos a accidente cerebrovascular y se compararon los ratones tratados con MRS4322 y tratados con vehículo.

Métodos

Productos químicos: MRS1873 y MRS4322 se obtuvieron por cortesía del Dr. Ken Jacobson del Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades Digestivas y Renales (Bethesda, MD). MRS1873 tiene la siguiente estructura:



MRS1873

Accidente cerebrovascular inducido por fototrombosis: Se realizó fototrombosis como se describe en Zheng *et al.* 2010 (PloS One 5 (12): e14401). En resumen, Rosa de Bengala es un colorante fluorescente que, cuando se inyecta en la vasculatura y se excita, genera oxígeno singlete que daña la pared endotelial e induce una trombosis local (coágulo). Usando esta técnica, a los ratones se les administró una inyección de 0,1 ml en la vena de la cola de Rosa de Bengala esterilizada (RB, Sigma, EE. UU.) en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF). La concentración de RB fue de 20 mg/ml. Una región cortical se centró en el campo de imagen y se iluminó con un láser verde (543 nm, 5 mW) usando un objetivo de inmersión en agua de 0,8-NA 40x (Nikon, Tokio). La formación de coágulos se monitorizó en tiempo real hasta que el vaso objetivo o los capilares corriente abajo se ocluyeron firmemente. Los coágulos estables se identificaron posteriormente por una segmentación de vasos no fluorescentes que terminaba con regiones altamente fluorescentes. En los experimentos de control, la iluminación con láser o la propia Rosa de Bengala no condujeron a la formación de coágulos. Los tratamientos, MRS1873 (100 μ l de 100 μ M) o MRS4322 (100 μ l de 100 μ M) se introdujeron mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.).

Animales y accidente cerebrovascular inducido por fototrombosis: el accidente cerebrovascular se realizó como se describe en Zheng *et al.* 2010 (PloS One 5 (12): e14401). Se utilizaron ratones C57Bl/6 hembras (4-6 meses) en este estudio. De los métodos de este manuscrito: los ratones se anestesiaron con isoflurano al 3 % con 100 % de oxígeno y posteriormente se mantuvieron en isoflurano al 1 % a través de un cono de nariz. La profundidad de la anestesia se monitorizó y reguló de acuerdo con los signos vitales, la retirada frente al pellizco y los parpadeos de los ojos. La temperatura corporal se mantuvo a 37 °C mediante una almohadilla de calentamiento controlada por retroalimentación (Gaymar T/Pump). Los signos vitales que incluyen la saturación de oxígeno, la frecuencia respiratoria y la frecuencia cardíaca se monitorizaron continuamente mediante el uso del sistema MouseOx (STARR Life Sciences). Se recortó el pelo de la cabeza del ratón y se hizo una pequeña incisión en el cuero cabelludo para exponer el cráneo. Una placa de acero inoxidable hecha a medida se pegó al cráneo con adhesivo de tejido VetBond (3M, St Paul, MN). Se creó una ventana de obtención de imágenes de cráneo adelgazado craneal sobre la corteza somatosensorial primaria derecha (~ 1,5 mm posterior a Bregma y 2 mm lateral desde la línea media) dependiendo del experimento. En resumen, una gran región del cráneo se adelgazó primero con el taladro eléctrico y luego se adelgazó con una cuchilla quirúrgica. El espesor final del cráneo adelgazado fue de aproximadamente 50 μ m. Después de que se creó la ventana de obtención de imágenes craneal, los ratones se transfirieron a la platina de microscopio y se usaron para fototrombosis o experimentos de obtención de imágenes. Para los experimentos de obtención de imágenes repetidas, la placa se separó cuidadosamente del cráneo y se suturó el cuero cabelludo (sutura Ethicon 6-0 sild). Después de cada experimento, los ratones se devolvieron a las jaulas hasta el siguiente punto de tiempo o se sacrificaron. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) en el Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en San Antonio. Treinta minutos después de un accidente cerebrovascular o una simulación (sin lesiones), los ratones se trataron con un vehículo (solución salina) o con fármacos (MRS4322 o MRS2365).

Evaluación después del infarto fototrombótico. El tamaño de los infartos cerebrales se evaluó usando la tinción con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) como se describe en Zheng *et al.* 2010 (PloS One 5 (12): e14401). En resumen, las lesiones inducidas por RB en cortes de cerebro se tificaron con TTC. El TTC es un colorante incoloro que tinte de rojo el tejido cerebral sano cuando se reduce por la enzima mitocondrial succinil deshidrogenasa (Bederson JB *et al.*, 1986). La ausencia de tinción en el tejido necrótico se utiliza para definir el área de un infarto cerebral. Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron sus cerebros y luego se colocaron en HBSS helado durante 3 minutos. El cerebro se transfirió posteriormente a un molde cerebral (KOPF), se cortó en secciones de 1 mm y se sumergió en TTC al 2 % (5 min) a 37 °C. Las secciones se fijaron en solución de formaldehído amortiguada al 10 % durante la noche a 4 °C. Se tomaron imágenes de los cortes en un escáner de superficie plana (HP scanjet 8300) para el análisis del tamaño de la lesión a 1200 ppi.

50 Resultados

El tratamiento con MRS1873 reduce los infartos cerebrales después de un accidente cerebrovascular: Se indujeron accidentes cerebrovasculares fototrombóticos de múltiples vasos en ratones usando la vena de la cola inyectada junto con RB como se describió anteriormente. A los 30 minutos de la formación del coágulo, a los ratones se les inyectó por vía intraperitoneal vehículo (control de solución salina), MRS1873 (100 μ l de 100 μ M) o MRS4322 (100 μ l de 100 μ M). Veinticuatro horas después del accidente cerebrovascular inicial, se evaluó el tamaño del infarto cerebral con tinción con TTC como se describió anteriormente. Las fracciones representativas de cerebro teñidas con TTC se presentan en la figura 14B. Se encontró que tanto MRS1873 como MRS4322 redujeron significativamente el tamaño

del infarto cerebral. En la figura 14B se presenta una gráfica de histograma del tamaño promedio de los infartos cerebrales para los ratones tratados con vehículo, MRS1873 y MRS4322. Estos datos se agrupan a partir de 3 experimentos independientes. N se refiere al número total de ratones analizados.

5 Farmacocinética y justificación para la eficacia.

MRS1873 es el análogo de 2-Cl de MRS4322 y también es un agonista de adenosina A₃. Las propiedades fisicoquímicas de MRS1873 son idénticas a las de MRS4322 en cuanto a bajo peso molecular, hidrofiliidad (cLogP <0) y área de superficie polar topológica. Puesto que los parámetros ADME/PK, como la unión al plasma y al cerebro, el aclaramiento y el volumen de distribución están impulsados por estas propiedades fisicoquímicas, se demostró una farmacocinética similar para MRS4322 y MRS1873. Además, se demostró una eficacia similar para MRS4322 y MRS1873 en un modelo fototrombótico murino de accidente cerebrovascular.

15 **Ejemplo 8: Protocolo experimental para determinar el agonismo sesgado de compuestos en el receptor de adenosina A₃ (A₃R)**

El siguiente ensayo se puede usar para determinar si un compuesto descrito, como MRS4322 o MRS1873, muestra agonismo sesgado (también conocido como selectividad funcional o tráfico de agonistas) en el receptor A₃.

20 **Materiales.** Fluo-4, el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) y la penicilina-estreptomicina se pueden comprar en Invitrogen (Carlsbad, CA). La adenosina desaminasa (ADA) y la higromicina-B se pueden comprar en Roche (Basilea, Suiza). El suero bovino fetal (FBS) se puede comprar en ThermoTrace (Melbourne, Australia). Los kits de quinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2 SureFire de AlphaScreen (ERK1/2), Akt 1/2/3 y AMPs se pueden obtener de PerkinElmer (Boston, MA). Todos los compuestos prefijados con MRS se pueden sintetizar como se describió anteriormente (Tosh *et al.*, 2012a, b). Todos los demás reactivos se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

30 **Cultivo celular.** La secuencia del A₃R humano puede clonarse en el vector de entrada Gateway, pDONR201, y luego se transfirió al vector destino Gateway, pEF5/FRT/V5-dest, usando los métodos descritos anteriormente (Stewart *et al.*, 2009). Las células A₃-FlpIn-CHO se pueden generar usando los métodos descritos anteriormente (May *et al.*, 2007) y se mantienen a 37 °C en una incubadora humidificada que contiene 5 % de CO₂ en DMEM complementado con 10 % de FBS y la selección del antibiótico higromicina B (500 µg/ml). Para los ensayos de supervivencia celular, fosforilación de ERK1/2, fosforilación de Akt 1/2/3 y movilización de calcio, las células pueden sembrarse en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 4 x 10⁴ células/pocillo. Después de 6 horas, las células se lavan con DMEM sin suero y se mantienen en DMEM sin suero durante 12 a 18 horas a 37 °C en 5 % de CO₂ antes del ensayo. Para los ensayos de cAMP, las células se pueden sembrar en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 2 x 10⁴ células/pocillo y se incuban durante la noche a 37 °C en 5 % de CO₂ antes del ensayo.

40 **Ensayos de supervivencia celular.** El medio se retira y se reemplaza con solución salina amortiguada con HEPES (ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinetanosulfónico 10 mM, NaCl 146 mM, D-glucosa 10 mM, KCl 5 mM, MgSO₄ 1 mM, CaCl₂ 2 mM y NaHCO₃ 1,5 mM, pH 7,45) que contiene ADA (1 U/ml) y penicilina-estreptomicina (0,05 U/ml) en ausencia y presencia de ligandos de A₃R. Las placas se mantienen luego a 37 °C en una incubadora humidificada durante 24 horas, después de lo cual se añaden 5 mg/ml de yoduro de propidio a las células. Luego, las placas se pueden leer en un lector de placas EnVision (PerkinElmer), con la excitación y la emisión ajustadas a 320 nm y 615 nm, respectivamente. Los datos se normalizarán a 100 % de supervivencia celular y 0 % de supervivencia celular, determinada a t = 0 horas en solución amortiguadora HEPES y t = 24 horas en agua Milli-Q, respectivamente.

50 **Ensayos de fosforilación de ERK1/2 y Akt 1/2/3.** Se puede realizar una curva de concentración-respuesta de ERK1/2 y Akt 1/2/3 para cada ligando en DMEM sin suero que contiene 1 U/ml de ADA (exposición de 5 minutos a 37 °C). La estimulación con agonistas puede terminarse mediante la eliminación de los medios y la adición de 100 µl de solución amortiguadora de lisis SureFire a cada pocillo. Las placas se agitan luego durante 5 minutos. La detección de pERK1/2 puede implicar una dilución 80:20:120:1:1 v/v/v/v de lisado:solución amortiguadora de activación:solución amortiguadora de reacción:perlasceptoras AlphaScreen:perlas donadoras AlphaScreen en un volumen total de 11 µl en una placa ProxiPlate de 38 pocillos. Las placas se pueden incuban en la oscuridad a 37 °C durante 1 hora, seguido de la medición de la fluorescencia por un lector de placas EnVision (PerkinElmer) con excitación y emisión ajustadas a 630 nm y 520–620 nm, respectivamente. La detección de la fosforilación de Akt 1/2/3 puede emplear una dilución 40:9.8:39.2:1v/v/v/v de lisado:solución amortiguadora de activación:solución amortiguadora de reacción:perlasceptoras AlphaScreen en un volumen total de 9 µl en un Proxiplate de 384 pocillos. Las placas pueden incubarse en la oscuridad a temperatura ambiente durante 2 horas, después de las cuales se puede agregar una dilución de 19:1 v/v de solución amortiguadora de dilución:perlas donadoras AlphaScreen en un volumen total de 11 µl. Las placas pueden incubarse a temperatura ambiente durante 2 horas más, seguidas de la medición de la fluorescencia por un lector de placas EnVision (PerkinElmer) con excitación y emisión ajustadas a 630 nm y 520–620 nm, respectivamente. Las curvas de concentración-respuesta del agonista se normalizan a la fosforilación mediada por FBS al 10 % (estimulación de 5 minutos).

65 **Ensayos de movilización de calcio.** Los medios pueden retirarse de las placas de 96 pocillos y reemplazarse con

solución salina amortiguada con HEPES que contiene 1 U/ml de ADA, probenecid 2,5 mM, albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 % y Fluo4 1 M. Las placas pueden incubarse en la oscuridad durante 1 hora a 37 °C en una incubadora humidificada. Un lector de placas FlexStation (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) puede realizar la adición de solución salina amortiguada con HEPES en ausencia y presencia de agonista y fluorescencia medida (excitación, 485 nm; emisión, 520 nm) cada 1,52 segundos durante 75 segundos. La diferencia entre el pico y la fluorescencia de referencia puede medirse como un marcador para la movilización de Ca^{2+} intracelular. Las curvas de concentración-respuesta del agonista A_3R pueden normalizarse a la respuesta mediada por ATP 100 μM para tener en cuenta las diferencias en el número de células y la eficiencia de carga.

- 10 Inhibición de los ensayos de acumulación de cAMP. Los medios pueden reemplazarse con una solución amortiguadora de estimulación (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, MgSO_4 0,8 M, Na_2HPO_4 0,2 mM, KH_2PO_4 0,44 mM, CaCl_2 1,3 mM, D-glucosa 5,6 mM, HEPES 5 mM, BSA al 0,1 %, 1 U/ml de ADA y rolipram 10 μM , pH 7,45) e incubarse a 37 °C durante 1 hora. La inhibición de la acumulación de cAMP puede evaluarse mediante la preincubación de células $\text{A}_3\text{-FlpIn-CHO}$ con agonistas de A_3R durante 10 minutos, después de lo cual se añadió forskolina 3 μM durante 30 minutos más.
- 15 La reacción se puede terminar mediante la eliminación rápida de la solución amortiguadora y la adición de 50 μl de etanol al 100 % helado. Se deja evaporar el etanol antes de la adición de 50 μl de solución amortiguadora de detección (BSA al 0,1 %, Tween-20 al 0,3 %, HEPES 5 mM, pH 7,45). Las placas se agitan durante 10 minutos, después de lo cual se transfirieron 10 μl de lisado a una placa Optiplate de 384 pocillos. La detección puede emplear la adición de una dilución de 5 μl de 1:49 v/v de las perlasceptoras AlphaScreen:solución amortiguadora de estimulación. Después de esto, una dilución de 15 μl de 1:146: 3 v/v/v de las perlas donadoras AlphaScreen:solución amortiguadora de detección:3,3 U/ μl de cAMP biotinilado para formar un volumen total de 30 μl . La mezcla de perla donadora/cAMP biotinilado se puede equilibrar durante 30 minutos antes de la adición. Las placas se pueden incubar durante la noche en la oscuridad a temperatura ambiente, seguido de la medición de la fluorescencia por un lector de placas EnVision (PerkinElmer) con excitación y emisión ajustadas a 630 nm y 520–620 nm, respectivamente. Las curvas de concentración-respuesta del agonista pueden normalizarse a la respuesta mediada por forskolina 3 μM (0 %) o solución amortiguada (100 %) sola.

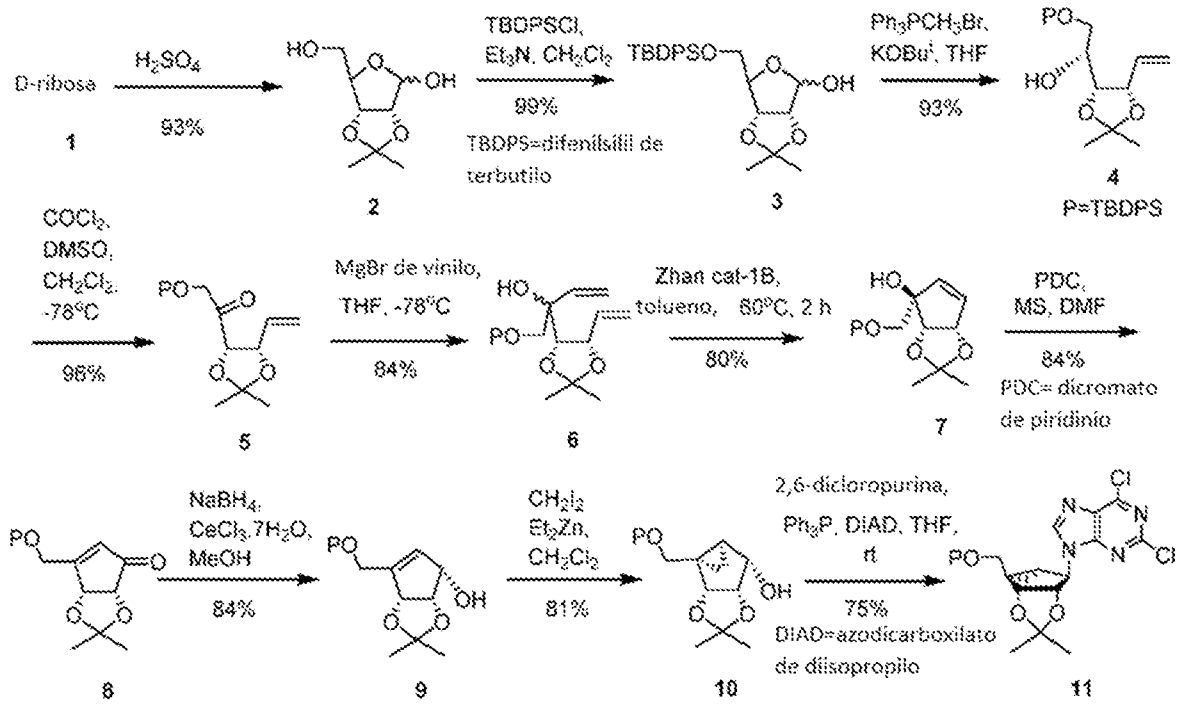
- Modelado molecular. Se pueden realizar simulaciones de acoplamiento para todos los compuestos investigados en este estudio usando modelos de homología del A_3R humano. En particular, se pueden usar tres modelos notificados anteriormente: un modelo completamente basado en una estructura cristalina de $\text{hA}_{2\text{A}}\text{AR}$ unido a agonista (PDB ID: 3QAK), un modelo basado en una plantilla híbrida de $\text{A}_{2\text{A}}\text{AR}$ -receptor adrenérgico β_2 y un modelo basado en una plantilla híbrida de $\text{A}_{2\text{A}}\text{AR}$ -opsina (estructura de rayos X del receptor adrenérgico β_2 ID PDB: 3SN6; estructura cristalina de rayos X del cristal de opsina ID PDB: 3DQB) (Tosh *et al.*, 2012a). Los modelos basados en plantillas híbridas mostrarán un movimiento hacia afuera de TM2 en comparación con el modelo basado en $\text{A}_{2\text{A}}\text{AR}$. Las estructuras de los ligandos de A_3R pueden construirse y prepararse para el acoplamiento usando las herramientas Builder y LigPrep implementadas en la suite Schödingler (Schödingler Release 2013-3, Schödingler, LLC, Nueva York, NY, 2013). El acoplamiento molecular de los ligandos en los modelos de A_3R se puede realizar por medio de la parte del paquete Glide de la suite Schödingler. En particular, una Glide Grid puede centrarse en el centroide de algunos residuos clave del bolsillo de unión de los receptores de adenosina, es decir, Phe (E12), Asn (6,55), Trp (6,48) y His (7,43). La Glide Grid puede construirse usando una caja interna (caja del punto medio del diámetro del ligando) de 14 Å x 14 Å x 14 Å y una caja externa (caja dentro de la cual deben estar contenidos todos los átomos de ligando) que se extiende a 25 Å en cada dirección desde la interna. El acoplamiento de los ligandos se puede realizar en el sitio de unión rígida usando el procedimiento XP (precisión adicional). Las conformaciones de acoplamiento de puntuación superior para cada ligando pueden someterse a inspección visual y análisis de interacciones proteína-ligando para seleccionar las conformaciones de unión propuestas de acuerdo con los datos experimentales.

- Análisis de datos. Los análisis estadísticos y el ajuste de curvas pueden realizarse usando Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA). Para cuantificar el sesgo de señalización, las curvas de concentración-respuesta del agonista pueden analizarse mediante regresión no lineal usando una derivación del modelo operacional de agonismo Black-Leff, como se describió anteriormente (Kenakin *et al.*, 2012; Wootten *et al.*, 2013; van der Westhuizen *et al.*, 2014). El coeficiente de transducción, $1/\text{KA}$ [expresado como un logaritmo, $\text{Log}(1/\text{KA})$] se puede usar para cuantificar el agonismo sesgado. Para tener en cuenta los efectos dependientes de las células en la respuesta del agonista, la relación de transducción se puede normalizar a los valores obtenidos para el agonista de referencia, IB-MECA, para generar $\text{ALog}(1/\text{KA})$. Para determinar el sesgo de cada agonista en diferentes rutas de señalización, el $\text{ALog}(1/\text{KA})$ se normalizará a una ruta de referencia, pERK1/2, para generar $\text{AALog}(1/\text{KA})$. El sesgo se puede definir como $10^{\text{AALog}(1/\text{KA})}$ en donde la falta de sesgo resultará en valores que no son estadísticamente diferentes de 1 o 0 cuando se expresan como un logaritmo. Todos los resultados pueden expresarse como la media \pm S.E.M. Los análisis estadísticos implicarían una prueba de F o un análisis de varianza de una vía con una prueba post hoc de Tukey o Dunnett, con significación estadística determinada como P, 0,05.

60 Ejemplo 9: Ruta de síntesis para MRS4322

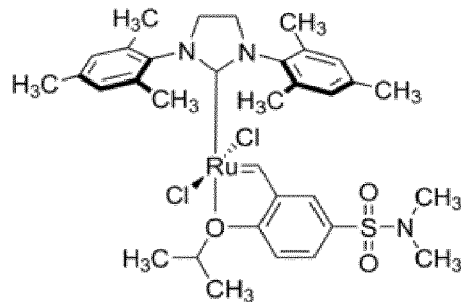
- MRS4322 y compuestos similares tales como MRS1873 se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, MRS4322 puede prepararse a partir de D-ribosa siguiendo las rutas descritas en Choi, W. J. *et al.* J. Org. Chem. 2004, 69, 2634-2636, Tosh, D. K. *et al.* Purinergic Signalling 2015, 11, 371-387; y Chem. Eur. J., 2009, 15, 6244-6257. Los esquemas de reacción 1 y 2 a continuación muestran la ruta de síntesis.

Esquema de reacción 1: Síntesis de MRS4322



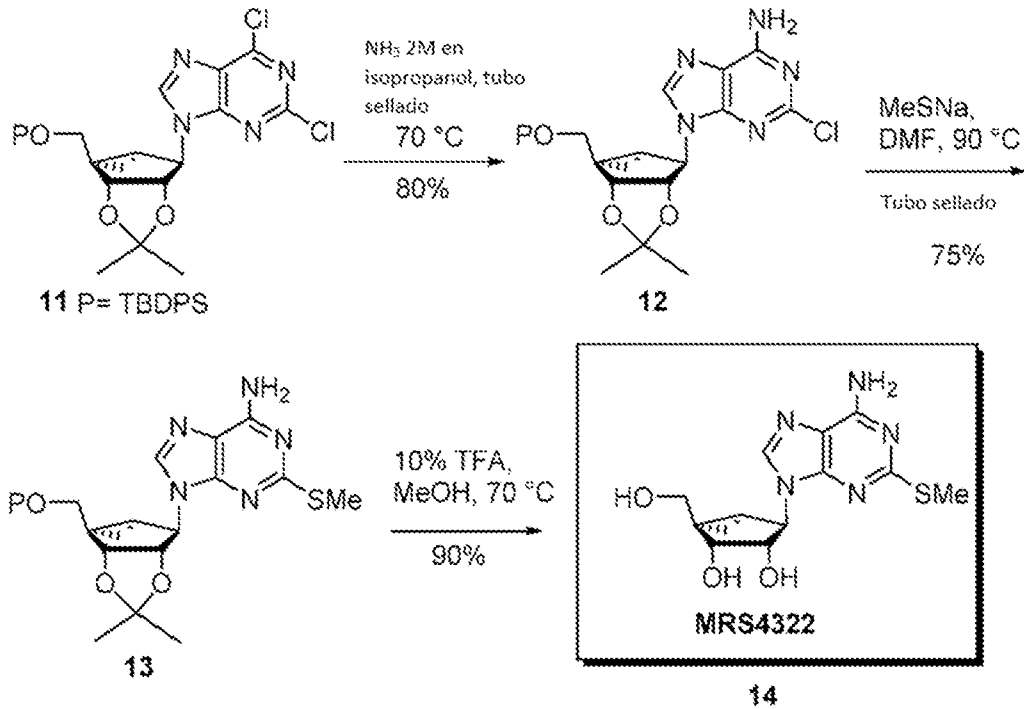
5

Zhan cat-1B tiene la siguiente estructura:



10 El esquema de reacción 2 muestra el resto de la síntesis.

Esquema de reacción 2: Síntesis de MRS4322 (continuación)



Ejemplo 10: Justificación para la cardioprotección de los compuestos descritos

- 5 Se ha demostrado la desfosforilación cuantitativa extremadamente rápida de agonistas de P2Y1 a compuestos, tales como, MRS4322 que son agonistas de adenosina A₃. Se encontró sorprendentemente que estos agonistas de la adenosina A₃ son eficaces en múltiples modelos murinos de accidente cerebrovascular y lesión cerebral traumática, como se describe en el presente documento. Sin desear estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que los agonistas A₃ descritos actualmente, tales como MRS4322 y MRS1873, son eficaces como agentes cardioprotectores.
- 10 Los datos que muestran una desfosforilación cuantitativa y rápida de MRS2365 y nucleósidos fosforilados relacionados a compuestos tales como MRS4322 y MRS1873 respaldan la afirmación de que la supuesta eficacia cardioprotectora de estos agonistas de P2X4 se debe en realidad al agonismo de adenosina A₃ de sus metabolitos desfosforilados. De hecho, se ha demostrado que MRS1873 es un agonista de adenosina A₃ que es eficaz en los modelos de accidente cerebrovascular y lesión cerebral traumática.
- 15

Ejemplo 11: Farmacocinética y unión de MRS4322 después de la administración intravenosa a cerdos neonatales

20 **Propósito**

Este estudio se diseñó para determinar las concentraciones en plasma, cerebro y CSF de MRS4322 después de la administración intravenosa a cerdos neonatales.

25 **Métodos**

Productos químicos. MRS4322 se obtuvo por cortesía del Dr. Ken Jacobson del Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades Digestivas y del Riñón (Bethesda, MD).

30 **Animales.** Para este estudio se utilizaron cerdos neonatales hembras de cuatro semanas de edad que pesaban aproximadamente 7,5 kg, suministrados por el Departamento de Bioingeniería de la Universidad de Pensilvania (Filadelfia, PA). Los animales se equiparon con sondas de microdiálisis cerebral para obtener muestras de líquido extracelular cerebral para las determinaciones de concentración de fármaco durante el estudio. Todos los estudios se realizaron según los protocolos aprobados de la Universidad de Pensilvania IACUC.

35

Administración del fármaco: MRS4322 se solubilizó en DMSO y luego se diluyó en solución salina para preparar la solución de dosificación. Se administró un volumen de 10 ml de solución de dosificación mediante administración de bolos intravenosos a cada cerdo neonatal (n = 3).

40 **Muestreo de tejido:** Se obtuvieron muestras de sangre a 0,25, 0,5, 1, 2, 4 y 6 horas después de la dosis. Las muestras de líquido extracelular del cerebro se obtuvieron a partir de sondas de microdiálisis implantadas 1, 4 y 6 horas después

de la dosis. Se obtuvo sangre completa (1 ml) en cada punto de tiempo y se colocó en tubos Vacutainer que contenían heparina y se centrifugó inmediatamente para la preparación del plasma; el plasma se almacenó a -80 °C. Las muestras de líquido extracelular cerebral y líquido cefalorraquídeo se almacenaron a -80 °C. En el momento de la eutanasia (6 horas después de la dosis), se obtuvieron muestras de líquido cefalorraquídeo y se congelaron, mientras que las muestras de cerebro de la corteza y el hipocampo se obtuvieron por decapitación, se enjuagaron con solución salina amortiguada con fosfato y se pesaron. Las muestras de cerebro se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C.

Bioanálisis

Las concentraciones en plasma, cerebro, líquido extracelular cerebral y líquido cefalorraquídeo de MRS4322 se determinaron mediante LC-MS/MS usando tolbutamida como patrón interno. La siguiente tabla resume las condiciones de LC y MS/MS empleadas:

Tabla 12: Métodos bioanalíticos para las determinaciones de la concentración en plasma, cerebro, líquido extracelular cerebral y líquido cefalorraquídeo de MRS4322

Componentes del sistema			
Módulo	Fabricante	Modelo	
LC	Waters	Acquity I Class	
Inyector automático	Waters	Acquity Sample Manager	
Detección de MS	AB Sciex	API 5500 QQQ	
Método de HPLC			
Columna	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 mm, 2,6 µm)		
Elución	Gradiente, 0,6 ml/min		
	Fase Móvil A: Ácido fórmico al 0,1 %		
	Fase Móvil B: Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo		
Detección de MS y calibración para MRS4322 en plasma porcino			
Nombre del pico: Tolbutamida			
Uso como patrón interno			
Masas Q1/Q3: 271,00/155,00 Da			
Nombre del pico: MRS4322			
Patrón interno: Tolbutamida			
Masas Q1/Q3: 324,08/182,10 Da			
Ajuste	Lineal	Ponderación	1 / x
Intersección	0,000570		
Pendiente	0,00699		
Coefficiente de correlación	0,9998		
Área de uso			
Detección de MS y calibración para MRS4322 en homogeneizado de cerebro de cerdo			
Nombre del pico: Tolbutamida			
Uso como patrón interno			
Masas Q1/Q3: 271,00/155,00 Da			
Nombre del pico: MRS4322			
Patrón interno: Tolbutamida			
Masas Q1/Q3: 324,08/182,10 Da			
Ajuste	Cuadrático	Ponderación	1 / x
a0	0,000244		
a1	0,00675		
a2	-0,00000134		
Coefficiente de correlación	0,9999		
Área de uso			
Detección de MS y calibración para MRS4322 en ECF y CSF porcino			
Nombre del pico: Tolbutamida			
Uso como patrón interno			
Masas Q1/Q3: 271,00/155,00 Da			
Nombre del pico: MRS4322			
Patrón interno: Tolbutamida			
Masas Q1/Q3: 324,08/182,10 Da			
Ajuste	Cuadrático	Ponderación	1 / x
a0	0,000297		
a1	0,00783		
a2	0,000000130		

Coefficiente de correlación	0,9998
Área de uso	

Para cada matriz de tejido, se crearon curvas patrón y se determinaron las concentraciones de LLOQ/ULOQ. Los intervalos de calibración para todas las curvas patrón de la matriz de MRS4322 fueron 0,1-1000 ng/ml.

- 5 Para el bioanálisis de concentraciones en el cerebro de MRS4322, las muestras de cerebro se homogeneizaron en solución salina amortiguada con fosfato enfrida con hielo en una dilución 4x. Las partes alícuotas del homogeneizado de cerebro diluido resultante se trataron con acetonitrilo y se analizaron por LC-MS/MS.

Resultados

- 10 Después de la administración intravenosa a cerdos neonatales, se detectaron concentraciones de MRS4322 en muestras de plasma, cerebro, líquido extracelular cerebral y líquido cefalorraquídeo (figuras 1B y 16, tabla 13).

- 15 Tabla 13: Concentraciones en plasma, cerebro, líquido extracelular cerebral y líquido cefalorraquídeo de MRS4322 en cerdos neonatales después de la administración intravenosa

Artículo de prueba	Matriz	Ruta	Dosis (mg/kg)	Tiempo (h)	Concentración en plasma (ng/ml) por sujeto					
					161128U	161128U-1	161128U-2	Media	SD	N
MRS4322	Plasma	IV	0,2	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	---	0
				0,25	133	120	163	139	22	3
				0,5	85,3	54,1	98,7	79,4	22,9	3
				1	58,9	51,4	63,0	57,8	5,9	3
				2	27,2	18,7	46,8	30,9	14,4	3
				4	23,3	21,9	28,7	24,6	3,6	3
				6	15,3	9,08	20,8	15,1	5,9	3
Artículo de prueba	Matriz	Ruta	Dosis (mg/kg)	Tiempo (h)	Concentración en cerebro (ng/ml) por sujeto					
					161128U	161128U-1	161128U-2	Media	SD	N
MRS4322	Corteza Cerebral	IV	0,2	6	5,34	3,80	6,15	6,10	1,19	3
	Hipocampo de cerebro				6,47	4,56	5,39	5,47	0,96	3
Artículo de prueba	Matriz	Ruta	Dosis (mg/kg)	Tiempo (h)	Concentración en líquido extracelular (ng/ml) por sujeto					
					161128U	161128U-1	161128U-2	Media	SD	N
MRS4322	ECF	IV	0,2	1	1,55	0,641	1,70	1,30	0,57	3
				4	0,893	0,579	1,35	0,941	0,388	3
				6	0,602	0,459	1,08	0,714	0,325	3
Artículo de prueba	Matriz	Ruta	Dosis (mg/kg)	Tiempo (h)	Concentración en líquido cefalorraquídeo (ng/ml) por sujeto					
					161128U	161128U-1	161128U-2	Media	SD	N
MRS4322	CSF	IV	0,2	6	1,37	1,04	1,75	1,39	0,36	3

BLQ = Por debajo del límite inferior de cuantificación (0,0975 ng/ml para plasma)

Tabla 14. Farmacocinética en plasma de MRS4322 en cerdos neonatales después de la administración intravenosa

Artículo	Ruta	Dosis	ID de Animal	C0 (ng/ml)	C _{máx} (ng/ml)	T _{máx} (h)	AUC _{Último} (h*ng/ml)	AUCINF (h*ng/ml)	Cl	Vz	Semivida (h)
MRS4322	IV	0,2	161128U	207	133	0,25	238	344	9,68	4,04	4,82
			161128U-1	266	120	0,25	203	233	14,3	2,86	2,31
			161128U-2	269	163	0,25	307	401	8,31	2,25	3,13
			N	3	3	3	3	3	3	3	3
			Media	248	139	0,25	249	326	10,8	3,05	3,42
			SD	34,9	22,1	0,00	52,9	85,3	3,13	0,907	1,28
			%CV	14,1	15,9	0,0	21,2	26,1	29,1	29,8	37,4

5 Las concentraciones en plasma permitieron estimaciones iniciales de T_{máx}, C_{máx}, aclaramiento plasmático, volumen de distribución, semivida y AUC (tabla 14).

10 Aunque las concentraciones de MRS4322 en el cerebro, el líquido extracelular cerebral y el líquido cefalorraquídeo eran detectables, los datos eran insuficientes para la estimación de la semivida u otros parámetros farmacocinéticos distintos de C_{máx} y T_{máx}. Sin embargo, basándose en los datos disponibles de plasma y cerebro a las 6 horas posteriores a la dosis cuando se obtuvieron muestras para todas las matrices, se estimó que la relación cerebro/plasma del fármaco total fue de aproximadamente 0,3 en función de las concentraciones medias en plasma y cerebro.

15 Estos resultados confirman que las concentraciones en plasma circulantes de MRS4322 son detectables después de la administración intravenosa a cerdos neonatales, y que MRS4322 está bien distribuida en el cerebro bajo estas condiciones de dosificación.

Ejemplo 12: Unión a plasma y cerebro de MRS4322 en los cerdos neonatales

20 Propósito

Este estudio fue diseñado para determinar la fracción libre en plasma y cerebro de MRS4322 en cerdos neonatales.

Métodos

25 Productos químicos. MRS4322 se obtuvo por cortesía del Dr. Ken Jacobson del Instituto Nacional de Diabetes, Enfermedades Digestivas y del Riñón (Bethesda, MD). El sulfametoxazol y la warfarina de grado analítico se obtuvieron de suministradores comerciales en Seventh Wave Laboratories (Maryland Heights, MO). Todos los demás productos químicos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO.)

30 Animales y preparación de tejidos. Las muestras de plasma y cerebro de cerdos neonatales hembras se obtuvieron de la Universidad de Pennsylvania y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

35 Se prepararon muestras en blanco de ultrafiltrado de plasma descongelando plasma congelado y después plasma precalentando en una cámara humidificada de 5 % de CO₂ a 37 °C durante 60 minutos. Partes alícuotas de 800 ul se transfirieron a filtros centrífugos Centrifree (celulosa regenerada Ultracel (NMWL 30.000 amu) Lote R5JA31736) y se centrifugaron a 2900 RPM a 37 °C durante 10 minutos; los filtrados de agua y plasma se recolectaron y utilizaron en la preparación de patrones, blancos y patrones de QC.

40 Los cerebros se pesaron y homogeneizaron con solución salina amortiguada con fosfato 1:9, pH 7,4 usando un homogeneizador de tejido Omni. Los cerebros de cuatro ratones se homogeneizaron, se agruparon y se mezclaron para formar una muestra.

45 Determinación de la unión al plasma. MRS4322, sulfametaxazol y warfarina se solubilizaron en DMSO y luego se diluyeron en acetonitrilo:agua 1:1 para preparar soluciones madre de diálisis 100 uM. Se utilizaron sulfametafazol y warfarina como patrones de estudio con valores de unión a plasma conocidos. Las muestras de plasma se precalentaron durante 60 minutos en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂ mantenida a 37 °C. Se añadieron alícuotas de tres ml de plasma precalentado cada una con adiciones conocidas de MRS4322, sulfametaxazol o warfarina, usando soluciones madre 100 uM para cada compuesto, dando como resultado concentraciones de prueba finales de 1 uM. Las muestras de plasma con adiciones conocidas se incubaron en un mezclador giratorio en una cámara humidificada con 5 % de CO₂ a 37 °C durante un mínimo de 60 minutos. Después de 60 minutos, se agregaron tres alícuotas de 800 ul de cada muestra a los filtros centrífugos Centrifree. Los filtros se sometieron a centrifugación a 2900 rpm durante 10 minutos a 37 °C. Se recogieron tres alícuotas de 100 ul de plasma residual junto con ultrafiltrado para bioanálisis.

55 Determinación de la unión al cerebro: MRS4322, sulfametoxazol y warfarina se solubilizaron en DMSO y se diluyeron en acetonitrilo:agua 1:1 para preparar soluciones madre de diálisis 100 uM. Los cerebros homogeneizados agrupados se precalentaron durante 60 minutos en una incubadora humidificada con 5 % de CO₂ mantenida a 37 °C. Se añadieron

alícuotas de tres ml de homogeneizado de cerebro cada una con adiciones conocidas de MRS4322, sulfametaxazol o warfarina usando las soluciones madre de 100 uM para cada compuesto, lo que dio como resultado concentraciones con adiciones conocidas finales de 1 uM. Se colocaron homogeneizados de cerebro agrupados con adiciones conocidas en un mezclador Nutator en una incubadora humidificada de 5 % de CO₂ a 37 °C durante 60 minutos. Después de 60 minutos, se agregaron tres alícuotas de 800 ul de cada muestra a los filtros centrífugos Centrifree. Los filtros se sometieron a centrifugación a 2900 rpm durante 10 minutos a 37 °C. Se recogieron partes alícuotas de homogeneizado de cerebro residual y ultrafiltrado para bioanálisis.

Bioanálisis

Las concentraciones en plasma y cerebro de MRS4322 en plasma con adiciones conocidas, homogeneizados de cerebro y ultrafiltrados asociados se determinaron por LC-MS/MS usando tolbutamida como patrón interno. Las concentraciones asociadas de sulfametaxazol y warfarina también se determinaron mediante LC-MS/MS usando condiciones estándar (datos no mostrados). Las siguientes tablas resumen las condiciones de LC y MS/MS empleadas (tablas 15 y 16). Los métodos bioanalíticos fueron idénticos para todas las matrices; los datos estadísticos de curva patrón (por ejemplo, ajuste, intercepción, pendiente, coeficiente de correlación) se determinaron para cada matriz pero no fueron significativamente diferentes y, por lo tanto, no se muestran para cada matriz.

Tabla 15: Métodos bioanalíticos para MRS4322 para la determinación de concentraciones en plasma, homogeneizado de cerebro, ultrafiltrado de plasma y ultrafiltrado de homogeneizado de cerebro

Bioanálisis de muestras de plasma, homogeneizados de cerebro, ultrafiltrado de plasma y ultrafiltrado de homogeneizado de cerebro

Componentes del sistema		
Módulo	Fabricante	Modelo
HPLC	Shimadzu	Bombas Binarias Prominence LC20AD
Inyector automático	CTC Leap	HTC PAL
Espectrómetro de masas	AB Sciex	API 4000
Método de HPLC		
Columna	Phenomenex Kinetex C18 (2,1 x 50 mm, 2,6 µm)	
	Gradiente, 0,4 ml/min	
Elución	Fase Móvil A: Ácido fórmico al 0,1 % en agua	
	Fase Móvil B: Ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo	
Condiciones de espectrómetro de masas para MRS4322		
Nombre del pico: MRS4322		
Masas Q1/Q3: 324,10/182,00 Da		
Nombre del pico: Tolbutamida		
Masas Q1/Q3: 271,20/155,20 Da		
Ajuste	Lineal	Ponderación 1 / x
Intersección	0,0181	
Pendiente	0,00192	
Coeficiente de correlación	0,9988	

Para cada matriz de tejido, se crearon curvas patrón y se determinaron las concentraciones de LLOQ/ULOQ. El intervalo de calibración para las curvas patrón de concentración en plasma de MRS4322 fue de 5-1000 nM. El intervalo de calibración para las curvas patrón en ultrafiltrado de plasma de MRS4322 fue de 5-1000 nM. El intervalo de calibración para las curvas patrón en homogeneizado de cerebro y ultrafiltrado de homogeneizado de cerebro de MRS4322 fue de 5-1000 nM y 5-1000 nM, respectivamente.

Resultados

La unión a plasma y la fracción libre se determinaron para MRS4322 usando la ultrafiltración de plasma. La unión al plasma fue de 21,6 % para MRS4322; la fracción libre asociada fue de 0,784 (tabla 16). La unión de los patrones de estudio sulfametaxazol y warfarina fueron consistentes con los valores de la bibliografía.

Tabla 16: Fracción no unida y unión de MRS4322 en plasma de cerdo neonatal

Sustrato	Fracción no unida	% de unión
----------	-------------------	------------

	Media	SD	Media	SD	N
MRS4322	0,784	0,061	21,6	6,1	3
Sulfametoxazol	0,606	0,016	39,4	1,6	2
Warfarina	0,0159	0,0021	98,4	0,2	3

* Las concentraciones en ultrafiltrado de plasma de MRS5698 fueron BLQ.

5 La unión al cerebro y la fracción libre se determinaron para MRS4322 usando la ultrafiltración de homogeneizado de cerebro. La unión al cerebro fue de 74,7 % para MRS4322. La fracción libre asociada fue de 0,253 (tabla 17). La unión de los patrones de estudio sulfametaxazol y warfarina fueron consistentes con los valores de la bibliografía.

Tabla 17: Fracción no unida y unión de MRS4322 en homogeneizados de cerebro de cerdo neonatal

Sustrato	Fracción no unida		% de unión		N
	Media	SD	Media	SD	
MRS4322	0,253	0,043	74,7	4,3	3
Sulfametoxazol	0,309	0,029	69,1	2,9	3
Warfarina	0,189	0,006	81,1	0,6	3

10 Estos datos indican que, para una concentración en plasma o cerebro total dada, estarán disponibles en el cerebro concentraciones de fármaco no unidas sustanciales de MRS4322 para la interacción con el receptor de adenosina A₃. Estos hallazgos son consistentes con los observados también en el ratón.

15 Ejemplo 13: Caracterización farmacológica de MRS4322

El compuesto MRS4322 se investigó en estudios de unión competitiva en receptores de adenosina A₃ humanos y de ratón expresados de forma recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO) usando preparaciones de membrana celular. [³H]NECA se empleó como un radioligando agonista de A₃. El agonista no selectivo NECA pudo usarse porque las células CHO no expresan de forma nativa los receptores de adenosina. Se determinó el desplazamiento dependiente de la concentración del radioligando por MR4322.

Además, se realizaron experimentos de cAMP en células CHO que expresan de forma recombinante receptores de adenosina A₃ humanos o A₃ de ratón, respectivamente. El agonista no selectivo NECA se utilizó como control.

25 Resultados

MRS4322 mostró un valor de K_i de 1490 ± 410 nM en receptores A₃ humanos y un valor de K_i de 4940 ± 974 nM en receptores A₃ de ratón en estudios de unión de radioligando frente a [³H]NECA.

30 En experimentos de acumulación de cAMP funcional en células CHO que expresan receptores de adenosina A₃, MRS4322 mostró actividad agonista con un valor de EC₅₀ de 3630 ± 370 nM en el receptor A₃ humano, y un valor de EC₅₀ de 759 ± 170 nM en el receptor A₃ de ratón. Los valores de EC₅₀ de los agonistas en los GPCR dependen de los niveles de expresión del receptor. La línea celular del receptor A₃ humano parece tener un nivel de expresión más bajo que las líneas celulares con los receptores A₃ de ratón, ya que se observan valores más altos de EC₅₀, que también fue el caso del agonista de control NECA.

Tabla 18: Afinidades de los agonistas a los receptores de adenosina expresados de forma estable en células CHO determinadas en estudios de unión de radioligandos [K_i±SEM(nM)]

Receptor	A ₃ R Humano	A ₃ R de Ratón
Agonista	[³ H]NECA	[³ H]NECA
MRS4322	1490 ± 410	4940 ± 974
NECA	6,18 (K _b) ^a	15,1 (K _b) ^a

45 ^aAinouri M.W. *et al.* Selectivity is species-dependent: Characterization of standard agonists and antagonists at human, rat, and mouse adenosine receptors. *Purinergic Signal.* 2015, 11, 389-407. *Purinergic Signal.* 2015, 11, 389-407. Las mismas líneas celulares se utilizaron en el presente y en el estudio publicado.

Tabla 19: Potencias de los agonistas en los receptores de adenosina A₃ expresados de forma estable en las células CHO determinadas en los ensayos de acumulación de cAMP

	A ₃ R Humano	A ₃ R de Ratón
	EC₅₀ ± SEM (nM) (eficiencia en una concentración de 100 µM en % con respecto al efecto máximo de NECA)	
Agonista		
MRS4322	3630 ± 370 (70 ± 12)	759 ± 170 (72 ± 18)
NECA	41,8 ± 6,3	6,85 ± 0,88

5 La figura 17 muestra experimentos de unión competitiva de MRS4322 frente al radioligando agonista de A₃ [³H]NECA (10 nM) en receptores A₃ humanos expresados en células CHO. El valor de K_i calculado para MRS4322 fue de 1490 ± 410 nM.

10 La figura 18 muestra experimentos de unión competitiva de MRS4322 frente al radioligando agonista de A₃ [³H]NECA (10 nM) en receptores A₃ de ratón expresados en células CHO. El valor de K_i calculado para MRS4322 fue 4940 ± 974 nM. La figura 19 muestra los experimentos de acumulación de cAMP de MRS4322 y NECA en receptores A₃ humanos expresados en células CHO. El valor de EC₅₀ calculado para MRS4322 fue 3630 ± 370 nM; para NECA se determinó un valor de EC₅₀ de 41,8 ± 6,3 nM. La figura 20 muestra experimentos de acumulación de cAMP de MRS4322 y NECA en receptores A₃ de ratón expresados en células CHO. El valor de EC₅₀ calculado para MRS4322 fue de 759 ± 170 nM; para NECA se determinó un valor de EC₅₀ de 6,85 ± 0,88 nM.

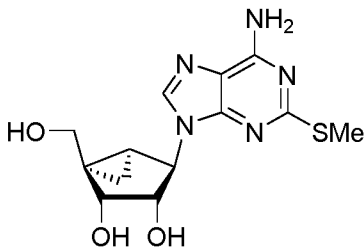
20 Estos resultados son menores pero relacionados con los datos de unión conocidos para MRS1873. A₃ humano, datos de K_i: MRS1873 K_i = 353 nM; EC₅₀ = 803 nM, publicado en: J. Med. Chem. 2002 45:4471-4484. "Structural Determinants of A₃ Adenosine Receptor Activation: Nucleoside Ligands at the Agonist/Antagonist Boundary", Gao, Z.-G. *et al.*

25 Un artículo anterior enumera el K_i de A₃ humano como 85 nM: Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 2001 11:1333-1337. "Ring-Constrained (N)-Methanocarba Nucleosides as Adenosine Receptor Agonists: Independent 5'-Uronamide and 2'-Deoxy Modifications", Lee, K. *et al.*

30 Aunque se describen varias realizaciones de esta invención, se entiende que los ejemplos particulares descritos anteriormente pueden alterarse usando experimentación rutinaria para proporcionar otras realizaciones que utilizan los compuestos y métodos de esta invención. Por lo tanto, se apreciará que el alcance de esta invención debe definirse solamente por las siguientes reivindicaciones en lugar de por las realizaciones específicas que se han proporcionado.

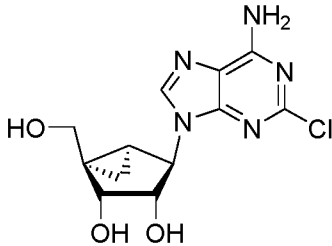
REIVINDICACIONES

1. Una cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A₃ (A₃R) para su uso en el tratamiento de una lesión, enfermedad o afección seleccionada entre lesión cerebral traumática (TBI), accidente cerebrovascular, una afección neurodegenerativa o una enfermedad del corazón o cardiovascular, comprendiendo dicho uso la administración a un paciente en necesidad del mismo de dicha cantidad eficaz, en donde (I) el agonista es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o:

en donde (II) el agonista es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A₃ para el uso de la reivindicación 1, en donde la lesión, enfermedad o afección es TBI; opcionalmente, en donde la TBI se selecciona entre conmoción cerebral, lesión por explosión, lesión relacionada con peleas o un golpe leve, moderado o grave en la cabeza.
3. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A₃ para el uso de la reivindicación 1, en donde la lesión, enfermedad o afección es un accidente cerebrovascular seleccionado entre accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, vasoespasmo cerebral o ataques isquémicos transitorios (TIA).
4. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A₃ para el uso de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la neuroprotección o neurorestauración aumenta en el paciente en comparación con un paciente no tratado.
5. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A₃ para el uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), encefalopatía traumática crónica (CTE) o una enfermedad neurodegenerativa causada por un virus, alcoholismo, tumor, toxina o lesiones cerebrales repetitivas; opcionalmente:

en donde (i) la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Parkinson; o

en donde (ii) la lesión, enfermedad o afección es enfermedad de Alzheimer, migraña, cirugía cerebral o un efecto secundario neurológico asociado a la quimioterapia contra el cáncer.

6. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A₃ para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el periodo de recuperación tras la TBI, accidente cerebrovascular, isquemia cardiaca o infarto de miocardio disminuye en comparación con un paciente no tratado.
7. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A₃ para el uso de la reivindicación 1, en donde (I) la enfermedad del corazón o cardiovascular se selecciona entre isquemia cardíaca, infarto de miocardio, una miocardiopatía, arteriopatía coronaria, arritmia, miocarditis, pericarditis, angina de pecho, cardiopatía

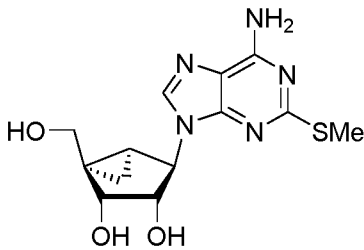
hipertensiva, endocarditis, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita o aterosclerosis; opcionalmente, en donde la enfermedad del corazón o cardiovascular es isquemia cardíaca o infarto de miocardio; o:

5 en donde (II) el agonista se administra de forma crónica para tratar el accidente cerebrovascular, la isquemia cardíaca o el infarto de miocardio durante el periodo de tiempo posterior a la lesión mientras ésta se resuelve.

8. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A_3 para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el A_3R está parcialmente agonizado.

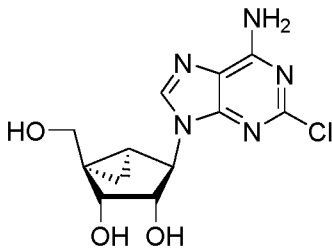
10 9. Una cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A_3 (A_3R) para su uso en el tratamiento de una lesión, enfermedad o afección seleccionada entre lesión cerebral traumática (TBI), accidente cerebrovascular o una afección neurodegenerativa, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo dicha cantidad eficaz, en donde el A_3R se agoniza de forma sesgada hacia las funciones neuroprotectoras del receptor A_3R mediante la activación preferente de la movilización de calcio intracelular con menos activación, o ninguna, de otras rutas mediadas por A_3R , o mediante la activación preferente de la movilización de calcio intracelular mediada por $Gq11$, la modulación de la producción de cAMP mediada por G_i , o la fosforilación de ERK1/2 y Akt mediada por G_i ;

20 en donde (i) el agonista es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o:

25 en donde (ii) el agonista es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 10. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A_3 (A_3R) para el uso de la reivindicación 9, en donde (I) la lesión, enfermedad o afección es una TBI; opcionalmente, en donde la TBI se selecciona entre conmoción cerebral, lesión por explosión, lesión relacionada con peleas o un golpe leve, moderado o grave en la cabeza; o:

35 en donde (II) la lesión, enfermedad o afección es un accidente cerebrovascular seleccionado entre accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico, hemorragia subaracnoidea, vasoespasmo cerebral o accidente isquémico transitorio (TIA); o:

40 en donde (III) la enfermedad neurodegenerativa se selecciona entre enfermedad de Alzheimer (AD), enfermedad de Parkinson (PD), enfermedad de Huntington (HD), esclerosis múltiple (MS), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), encefalopatía traumática crónica (CTE) o una afección neurodegenerativa causada por un virus, alcoholismo, tumor, toxina o lesiones cerebrales repetitivas; opcionalmente:

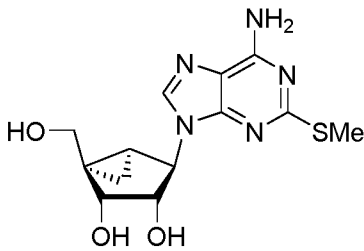
45 en donde (i) la enfermedad neurodegenerativa es enfermedad de Parkinson, o:

en donde (ii) la lesión, enfermedad o afección es enfermedad de Alzheimer, migraña, cirugía cerebral o un efecto secundario neurológico asociado a la quimioterapia contra el cáncer.

11. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A_3 (A_3R) para el uso según la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en donde la neuroprotección o la neurorrestauración aumenta en el paciente en comparación con un paciente no tratado; y/o en donde el A_3R está parcialmente agonizado con una función neuroprotectora o neurorrestauradora mejorada en relación con un agonista completo de A_3R .

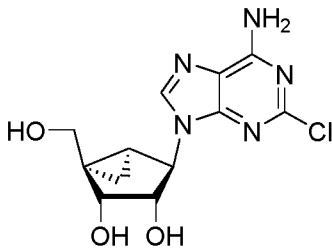
5 12. Una cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A_3 (A_3R) para el uso en el tratamiento de una enfermedad del corazón o cardiovascular, comprendiendo dicho uso la administración a un paciente en necesidad del mismo de dicha cantidad eficaz, en donde el agonista es un agonista sesgado de un A_3R con una función cardioprotectora mejorada en relación con un agonista completo de A_3R mediante la activación preferente de una o más de las siguientes rutas mediadas por A_3R : activación de la movilización de calcio intracelular mediada por Gq11, modulación de la producción de cAMP mediada por G_i , fosforilación de ERK1/2 y Akt mediada por G_i , modulación de los canales de potasio sensibles al ATP o modulación de la activación de la beta-arrestina; opcionalmente:

15 en donde (i) el agonista es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o:

20 en donde (II) el agonista es



25 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo;

opcionalmente:

30 en donde (i) el paciente ha sufrido una isquemia cardíaca o un infarto de miocardio; o:

en donde (ii) dicho uso aumenta la cardioprotección o la regeneración del tejido cardíaco dañado en el paciente.

35 13. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A_3 (A_3R) para el uso de la reivindicación 12, en donde el período de recuperación después de la isquemia cardíaca o infarto de miocardio disminuye en comparación con un paciente no tratado.

40 14. La cantidad eficaz de un agonista de un receptor de adenosina A_3 (A_3R) para el uso de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en donde el agonista es un agonista parcial del A_3R con función cardioprotectora mejorada en relación con un agonista completo del A_3R .

Figura 1A
Perfiles de concentración frente a tiempo en plasma y cerebro
de MRS4322 en ratones

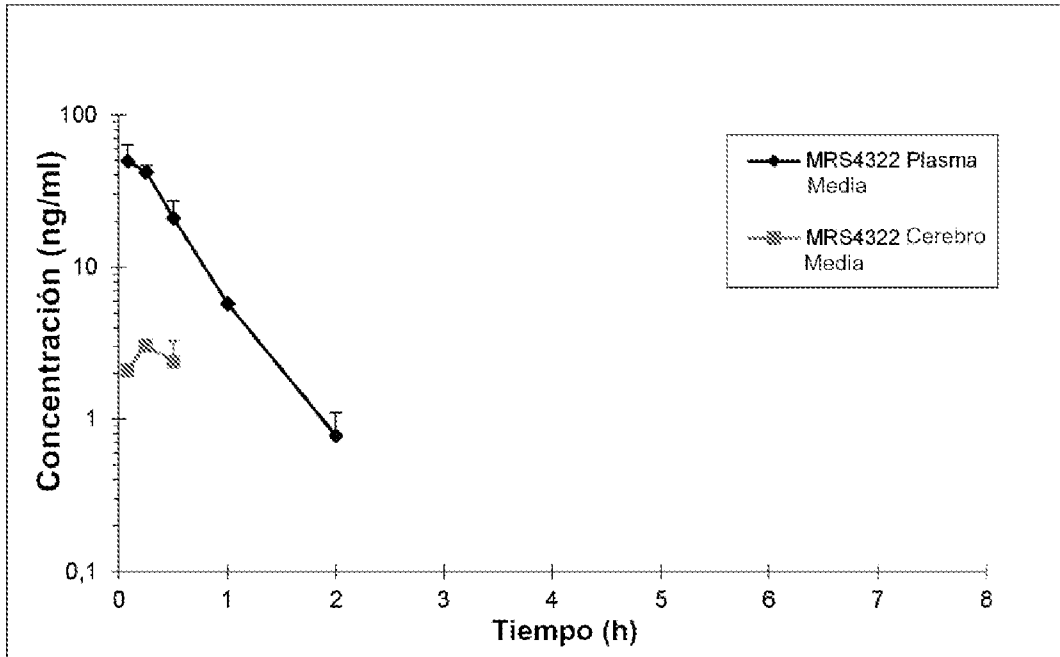


Figura 1B
Perfiles de concentración frente a tiempo en plasma y cerebro
de MRS4322 en cerdos neonatales

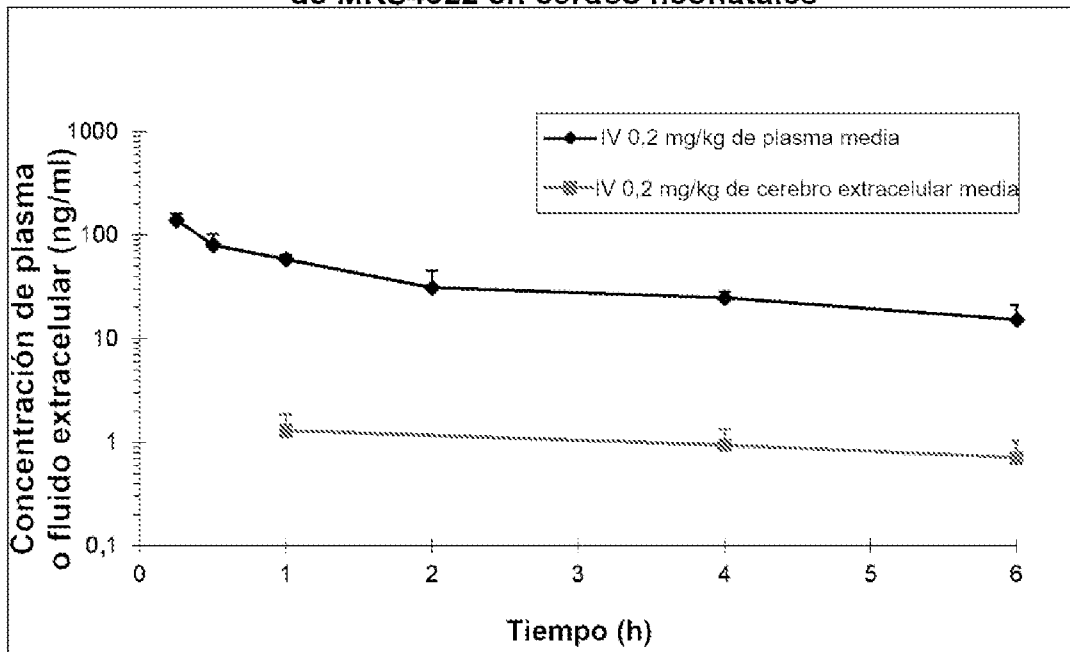


Figura 2

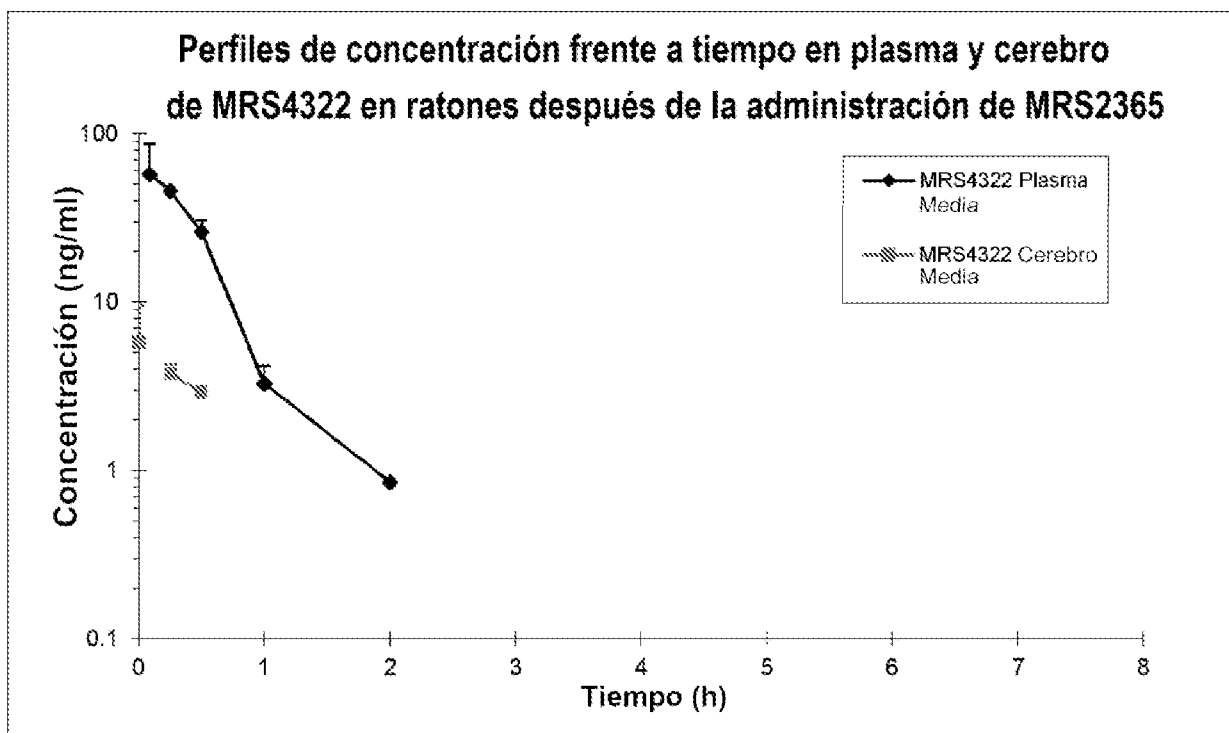


Figura 3

Porcentaje observado de monofosfato MRS2365 y MRS2365 frente a tiempo después de incubación con plasma tratado con EDTA de ratón CD-1 macho a 37°C

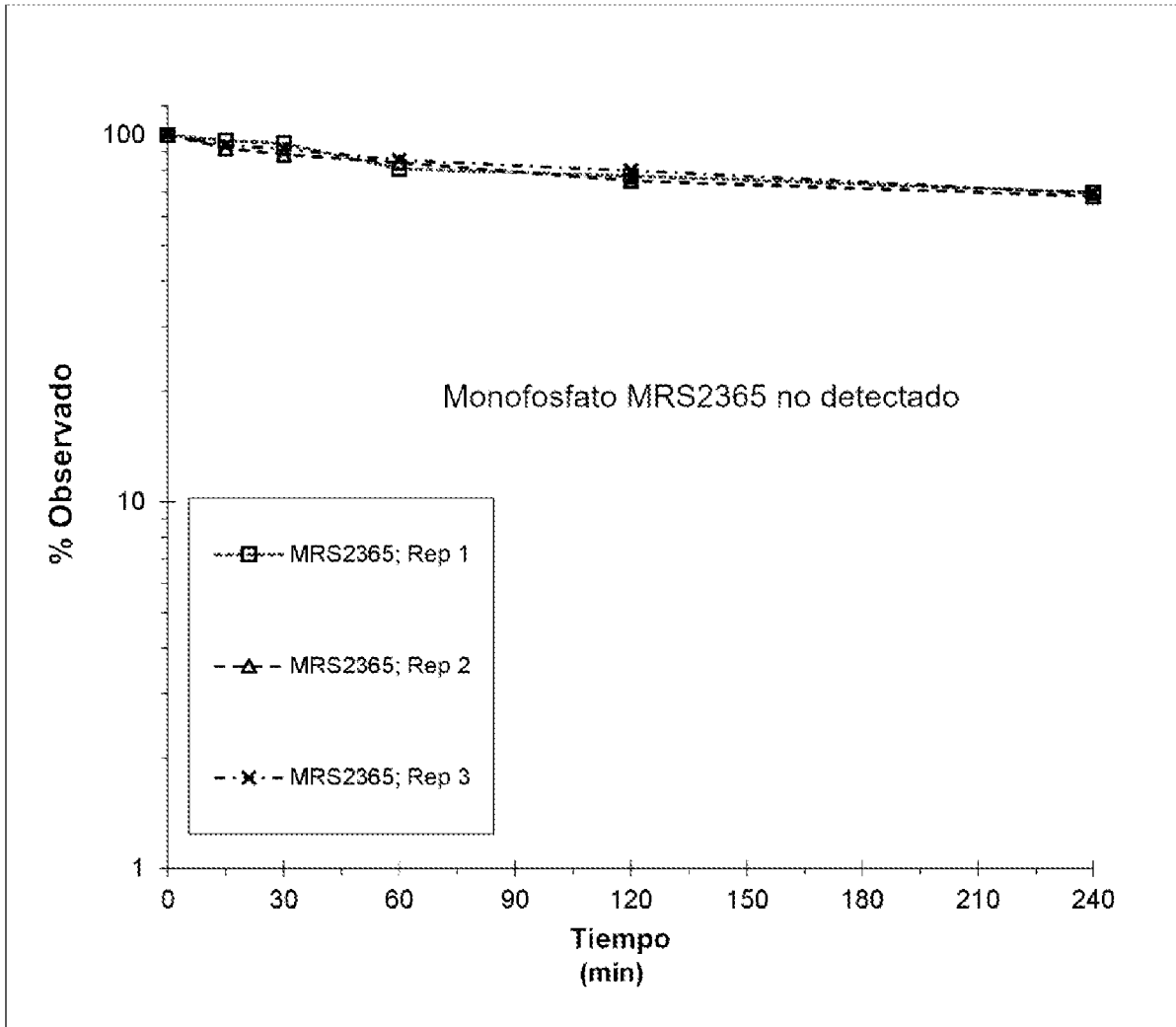


Figura 4

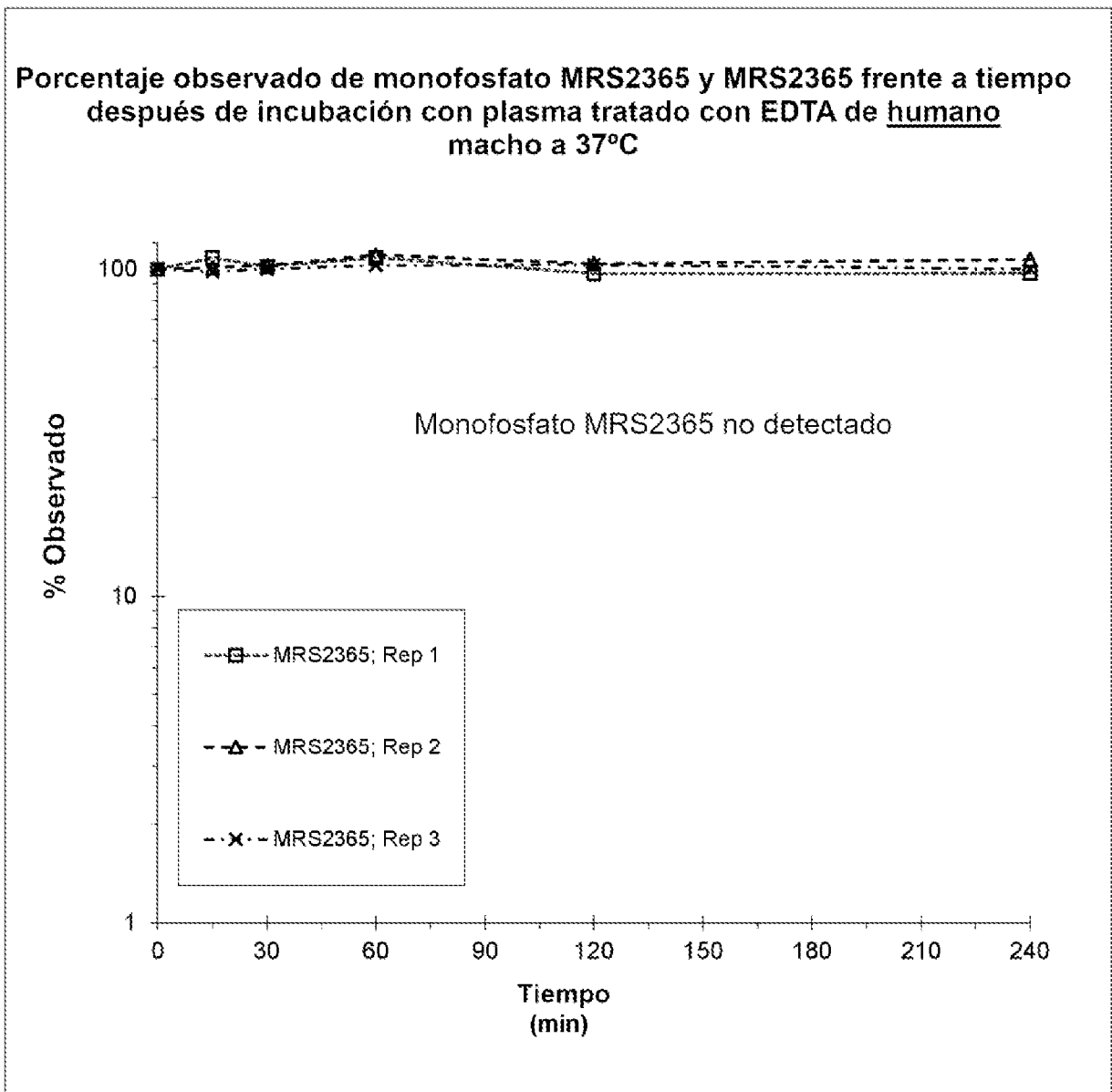


Figura 5

Porcentaje observado de monofosfato MRS2365 y MRS2365 frente a tiempo después de incubación con sangre completa tratada con EDTA de ratón CD-1 macho a 37°C

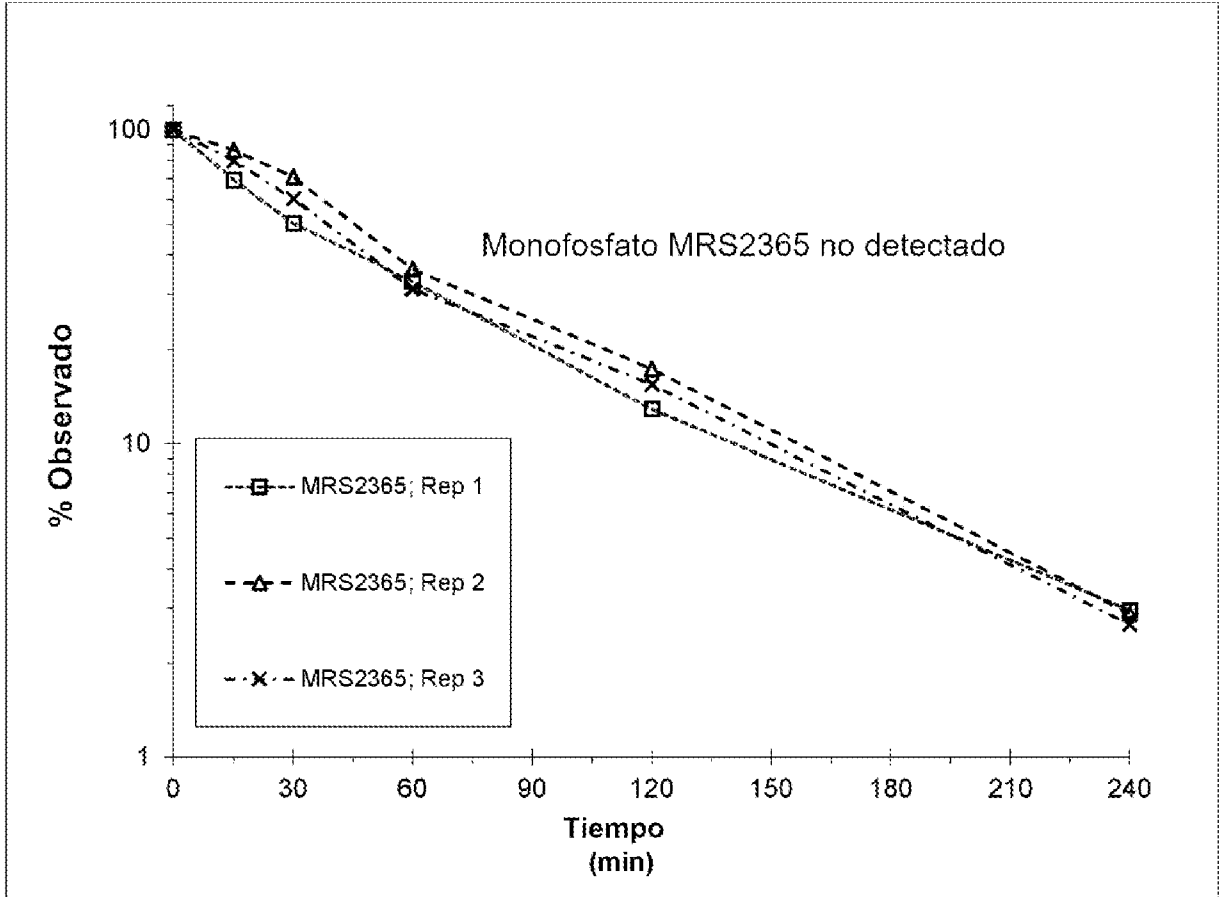


Figura 6

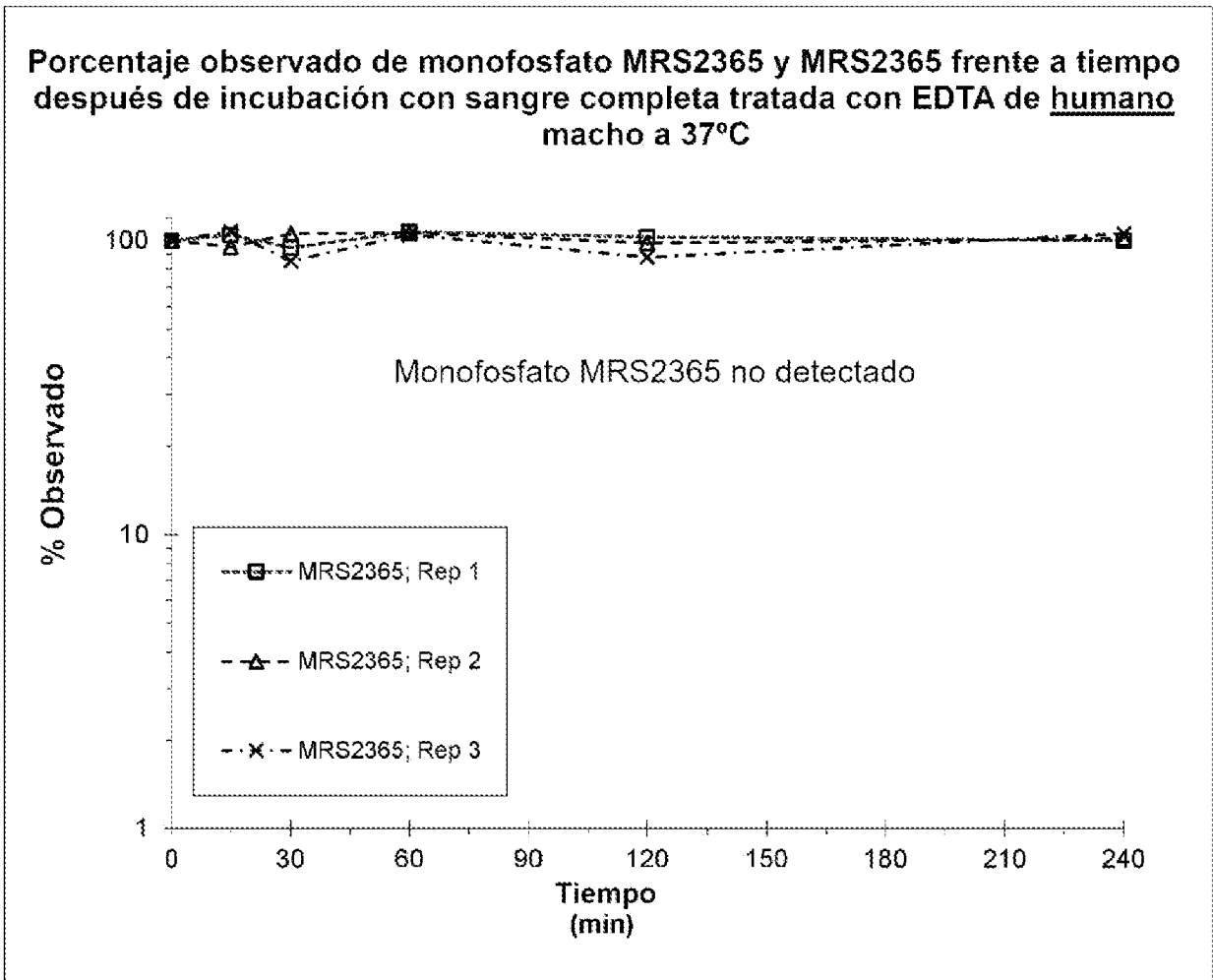


Figura 7

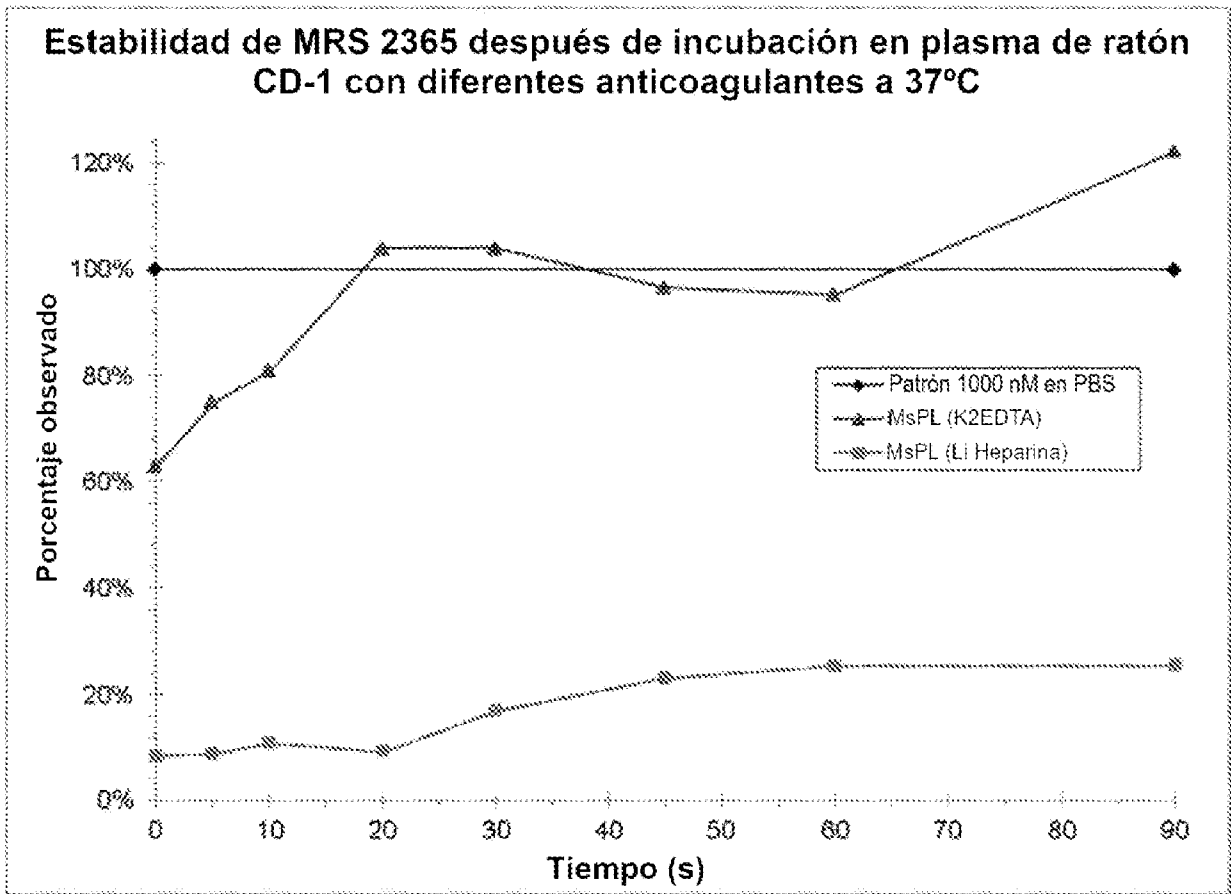


Figura 8

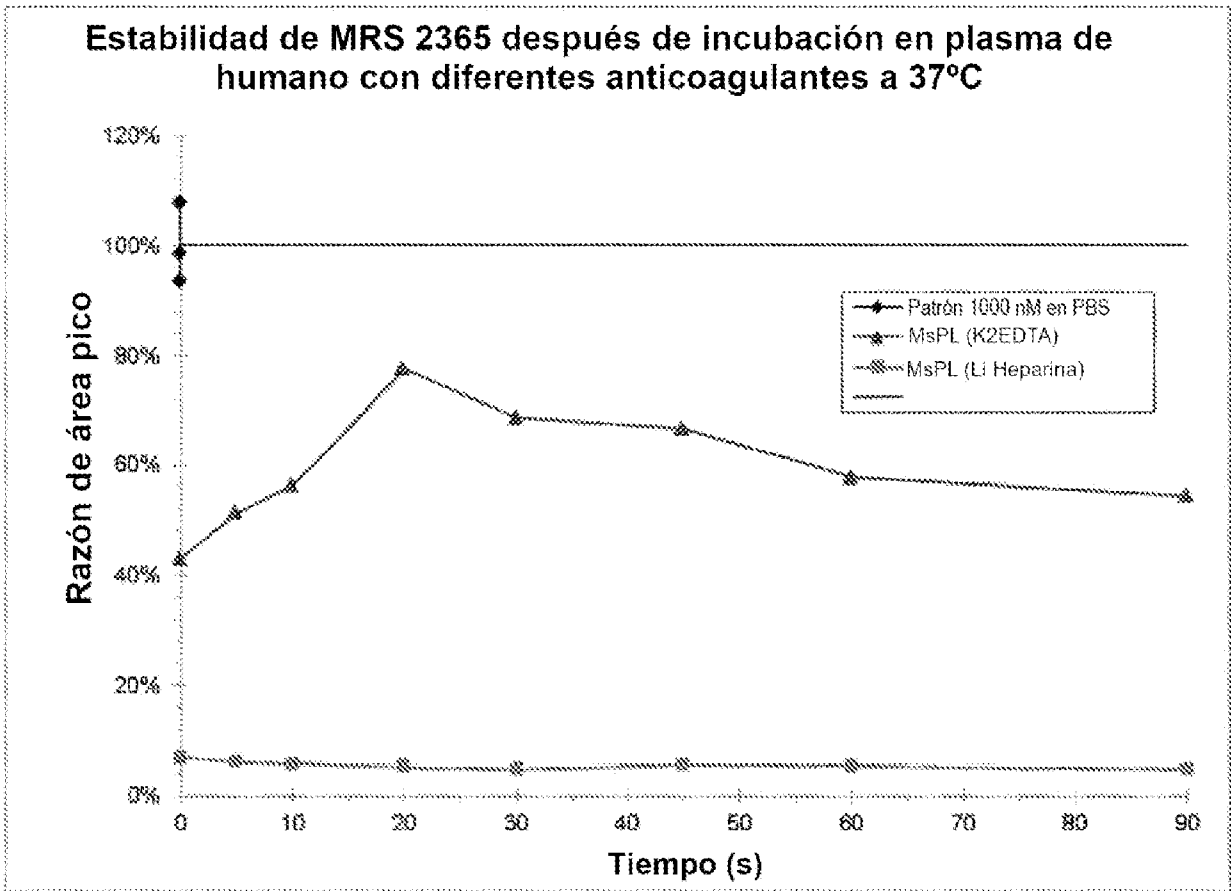


Figura 9

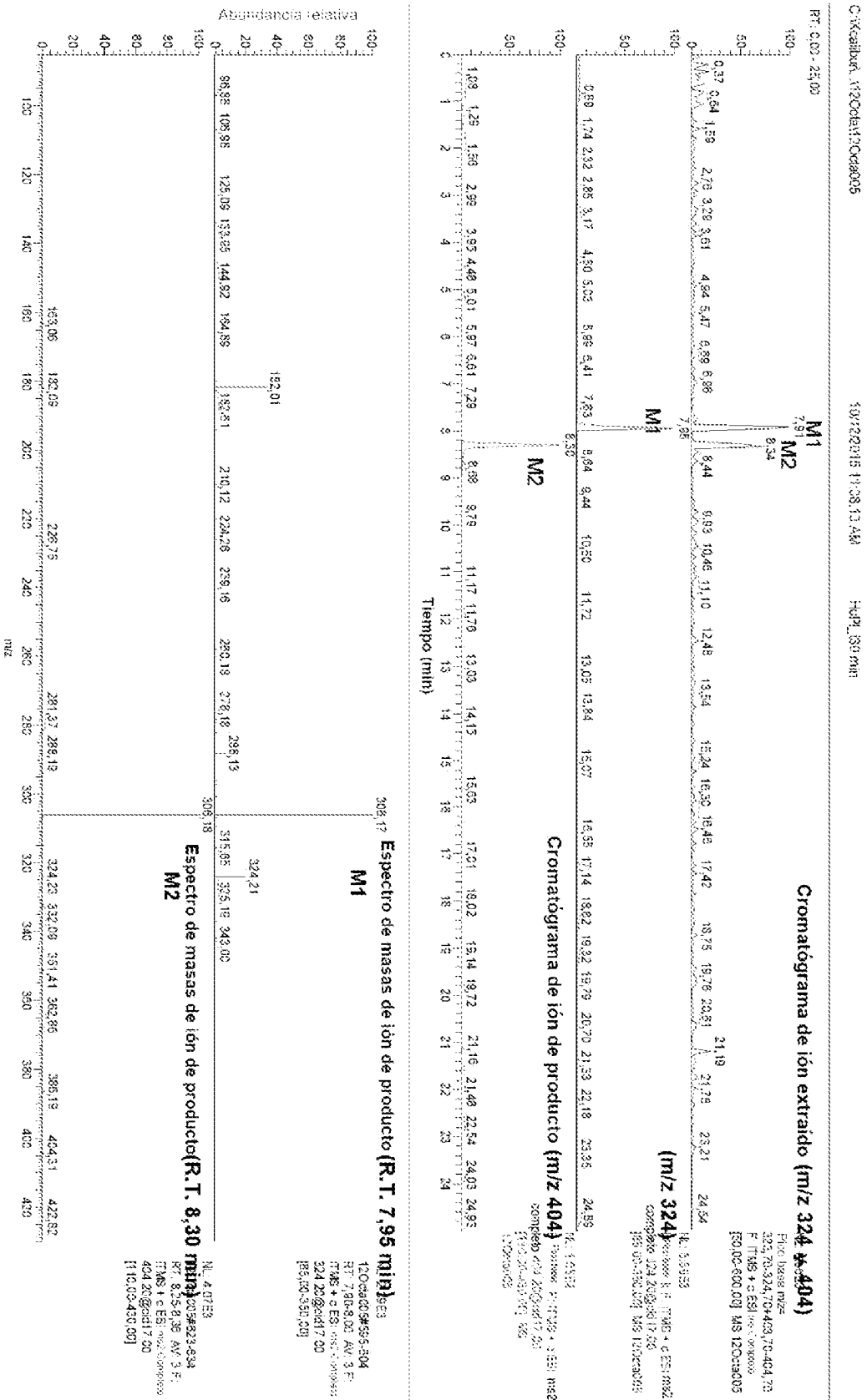


Figura 10

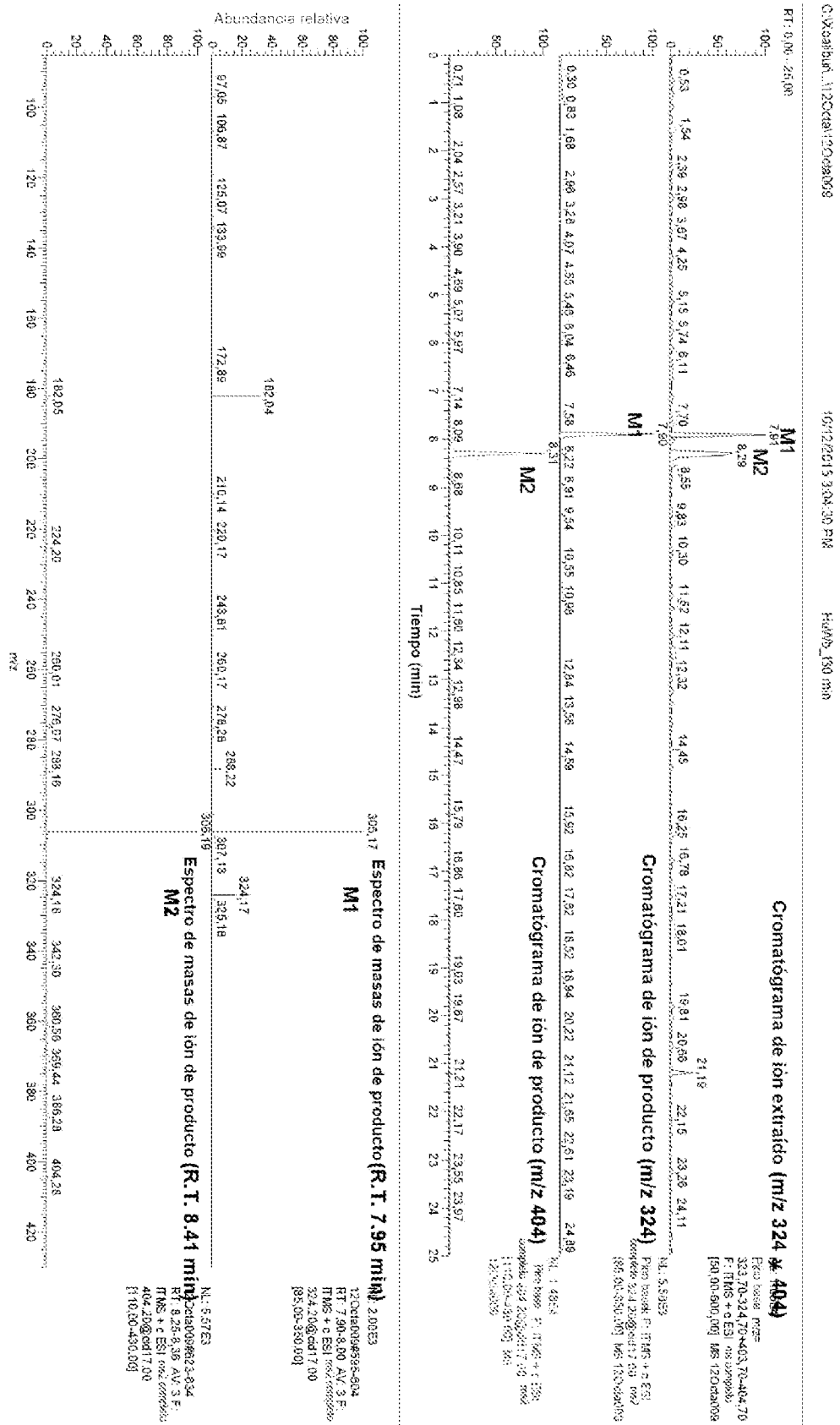
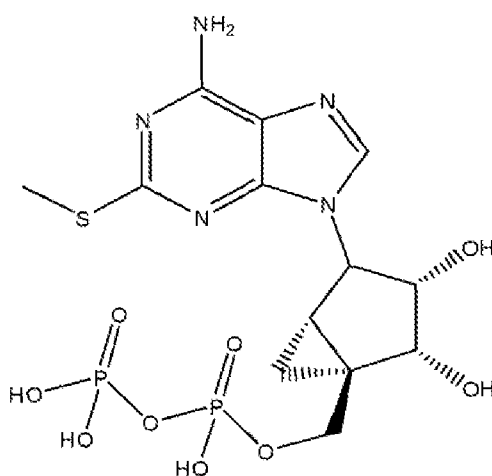
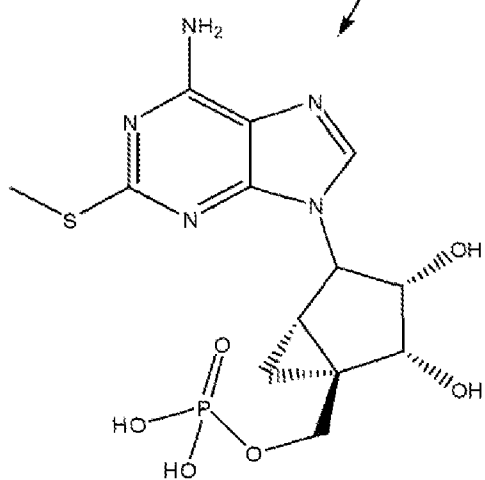


Figura 11



MRS 2365

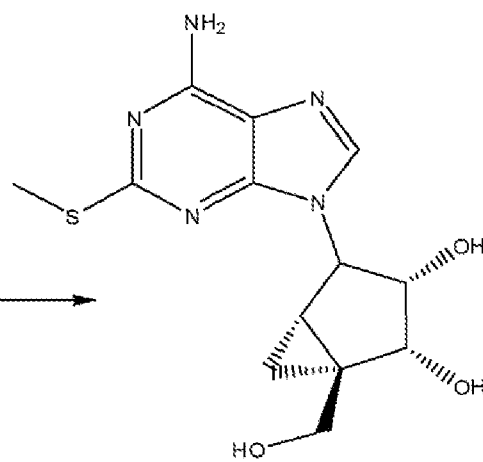
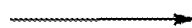
Fórmula química: $C_{13}H_{19}N_5O_9P_2S$
 Masa exacta: 483,0379



M2

Fórmula química: $C_{13}H_{18}N_5O_6PS$
 Masa exacta: 403,0715

MRS2347



MI

Fórmula química: $C_{13}H_{17}N_5O_3S$
 Masa exacta: 323,1052

MRS4322

Figura 12

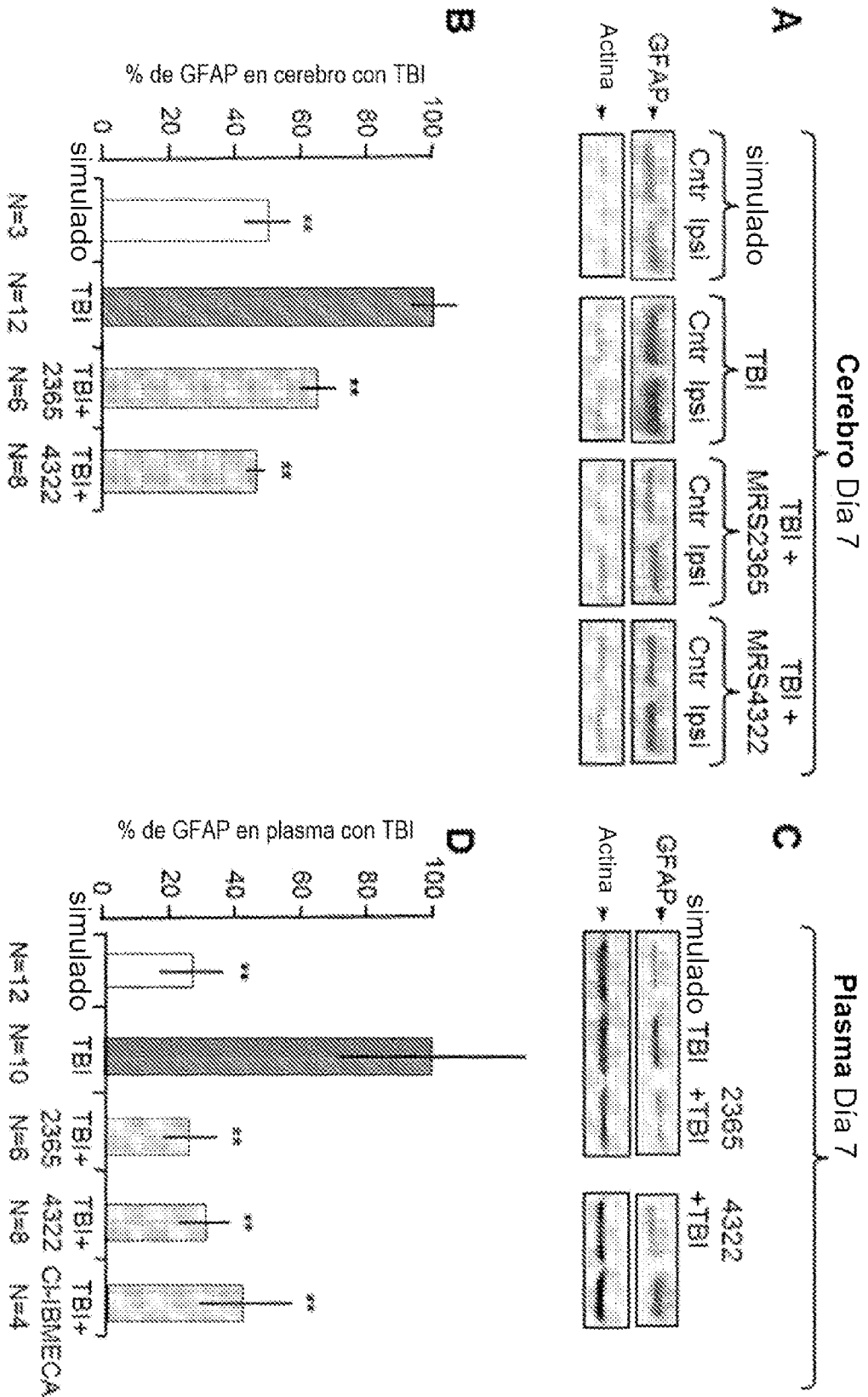


Figura 13

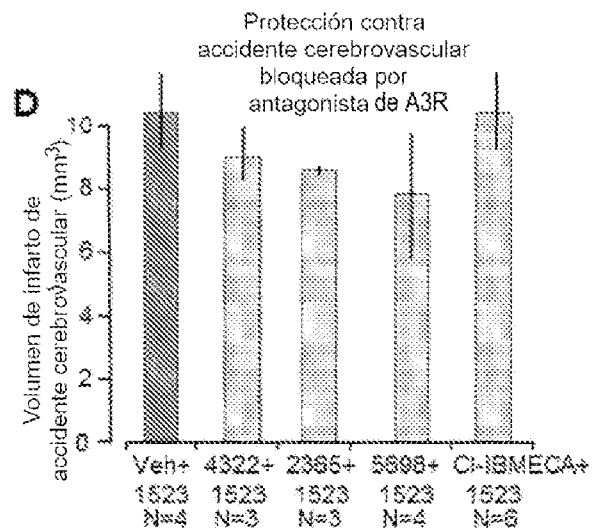
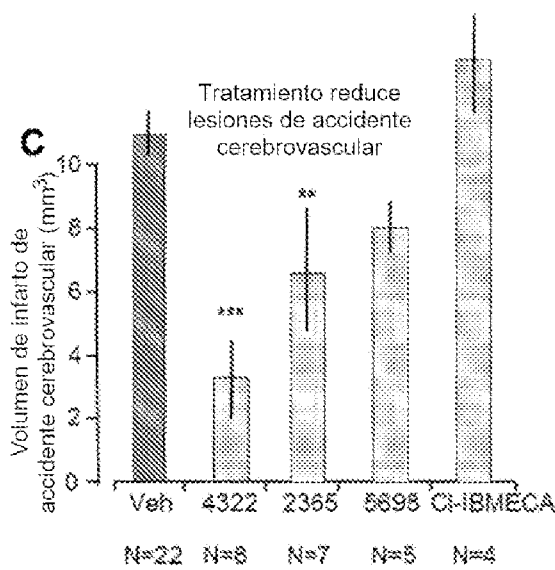
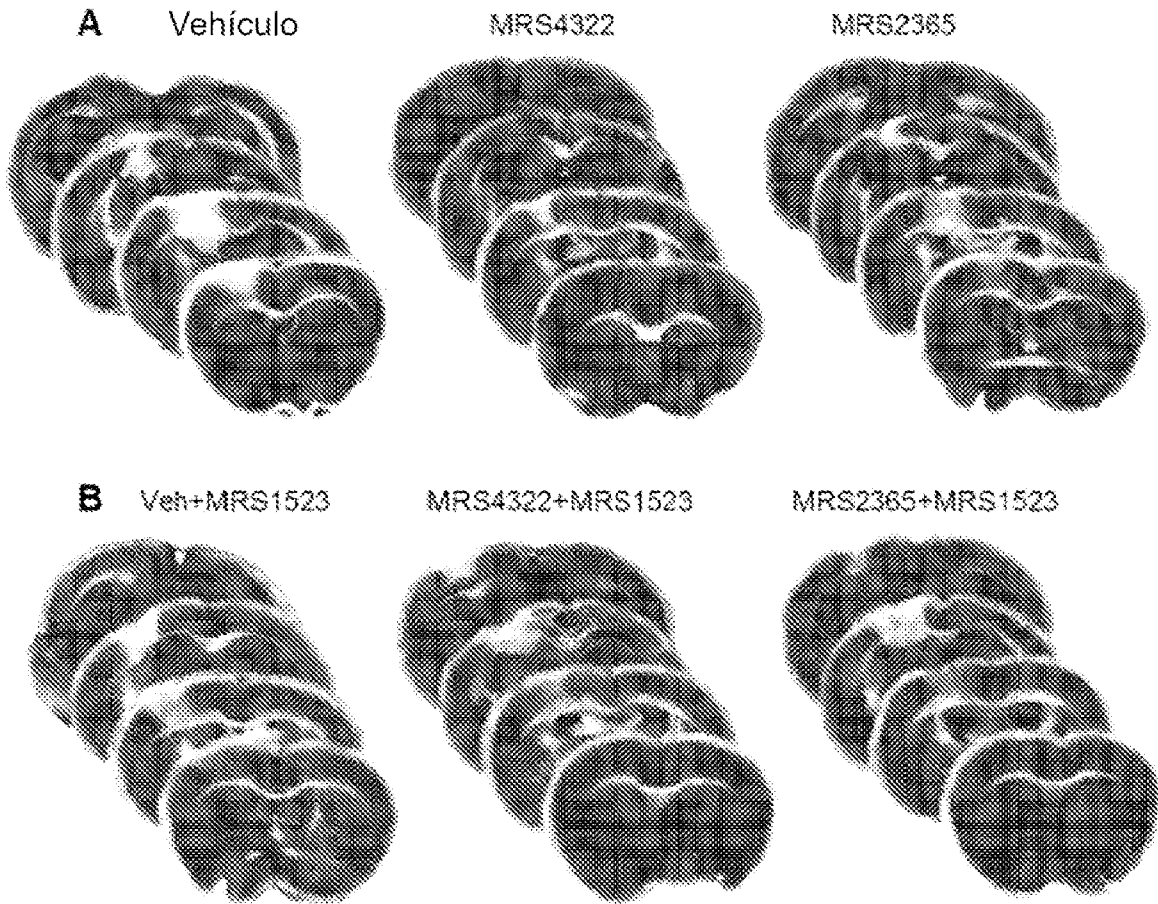


Figura 14

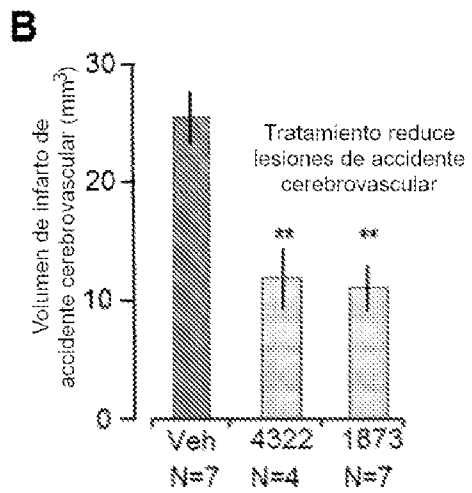
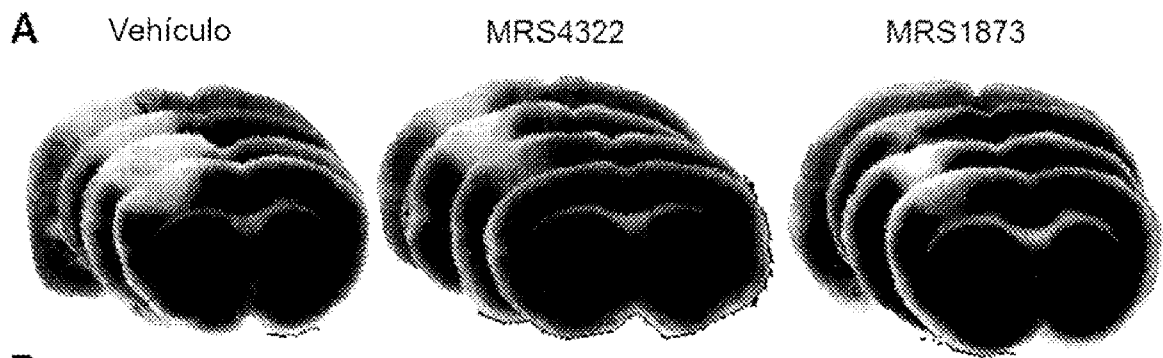


Figura 16

Perfiles de concentración-tiempo en cerebro y líquido cefalorraquídeo de MRS4322 en cerdos neonatales tras la administración intravenosa

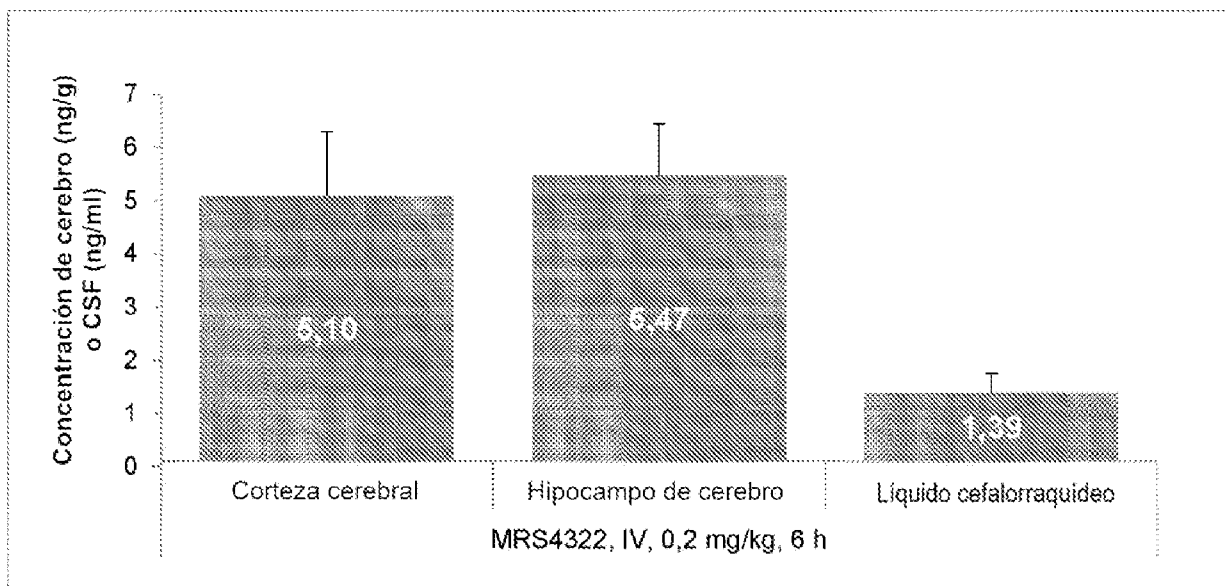


Figura 17

Experimentos de unión competitiva de MRS4322 en
receptores A3 humanos

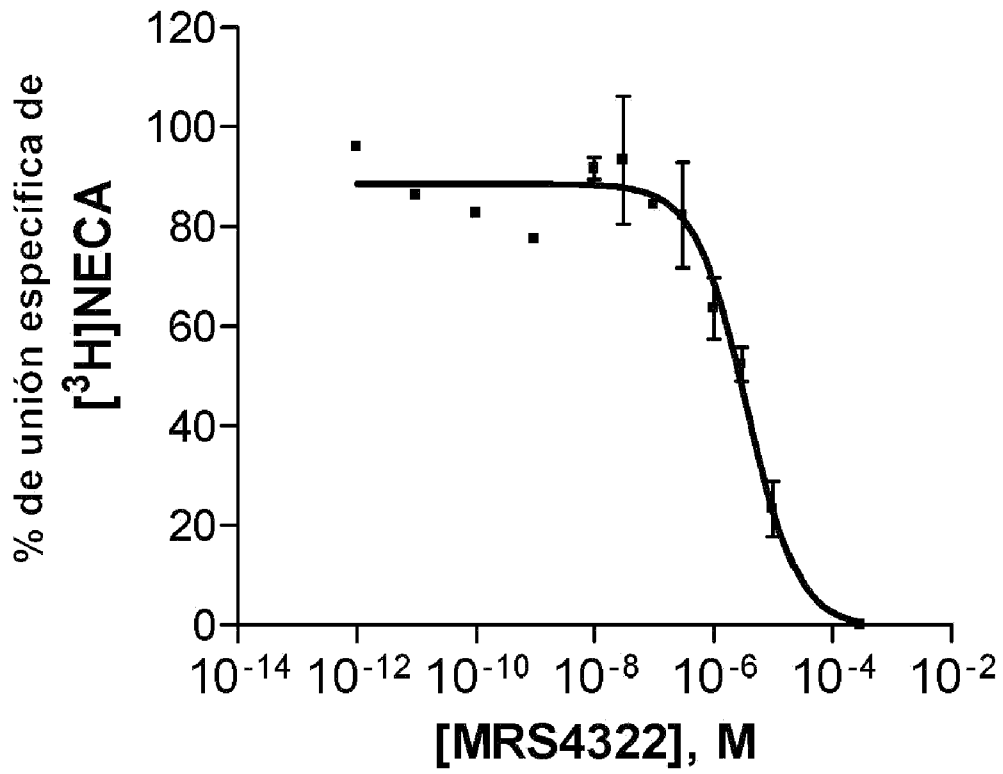


Figura 18

Experimentos de unión competitiva de MRS4322 en receptores A3 de ratón

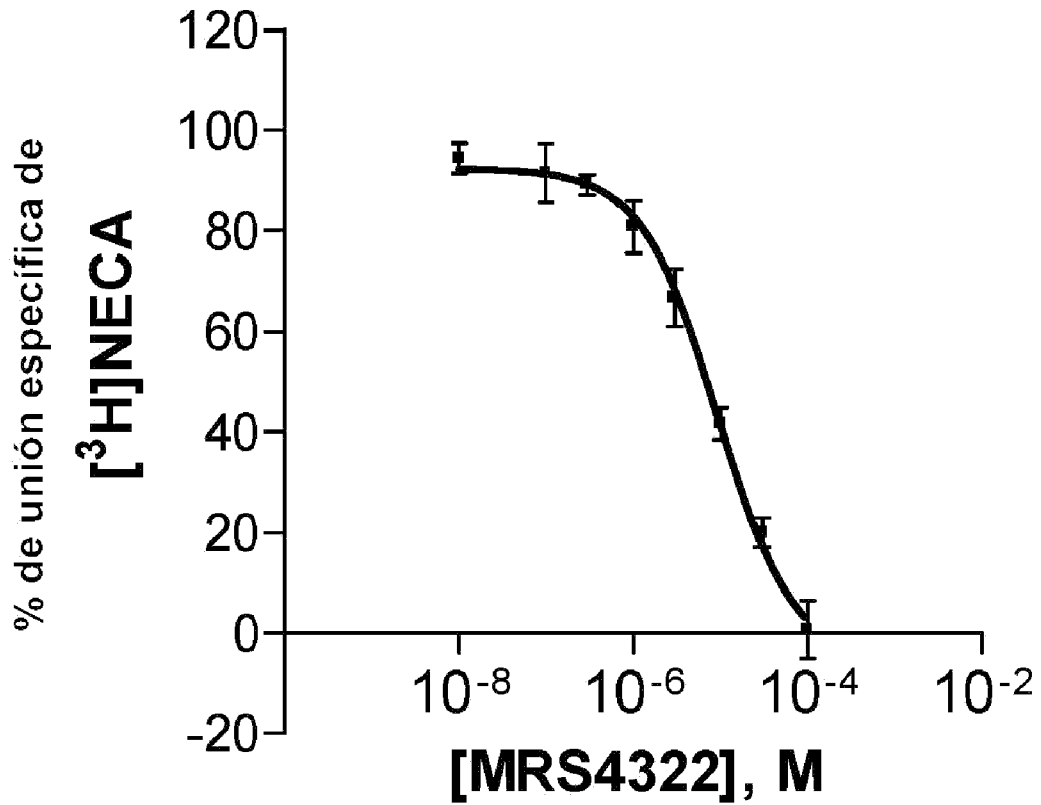


Figura 19

Experimentos de acumulación de cAMP de MRS4322 y NECA en receptores A3 humanos

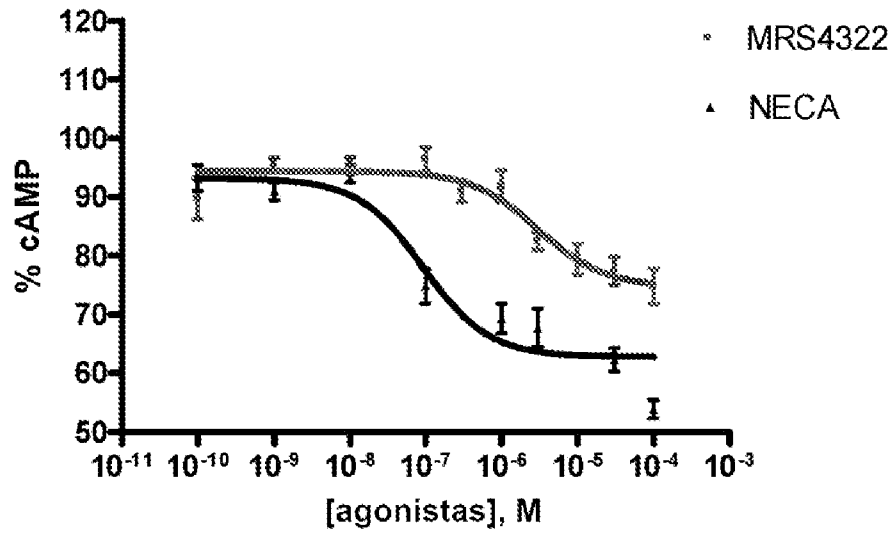


Figura 20

Experimentos de acumulación de cAMP de MRS4322 y NECA en receptores A3 de ratón

