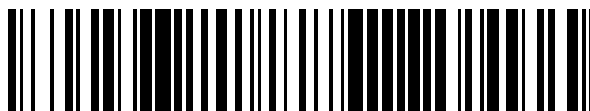


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 906 107**

51 Int. Cl.:

A61K 31/404 (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01)
A61K 31/4015 (2006.01)
A61K 31/4709 (2006.01)
A61K 31/4985 (2006.01)
A61K 31/522 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2017 PCT/US2017/051220**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **15.03.2018 WO18049417**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2017 E 17849790 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021 EP 3509589**

54 Título: **Usos novedosos**

30 Prioridad:

12.09.2016 US 201662393386 P
25.10.2016 US 201662412739 P
05.03.2017 US 201762467218 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
13.04.2022

73 Titular/es:

INTRA-CELLULAR THERAPIES, INC. (100.0%)
430 East 29th Street, Suite 900
New York, NY 10016, US

72 Inventor/es:

SNYDER, GRETCHEN;
WENNOGLE, LAWRENCE P.;
O'BRIEN, JENNIFER y
HENDRICK, JOSEPH

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 906 107 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

Usos novedosos

CAMPO DE LA INVENCION

5 El AMPc se refiere a la administración de inhibidores de la fosfodiesterasa 1 (PDE1) para el tratamiento y profilaxis de neuroinflamación y/o enfermedades o trastornos asociados con neuroinflamación y/o función microglial, estrictamente limitado al contenido de las reivindicaciones adjuntas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Se han identificado once familias de fosfodiesterasas (PDE), pero solo las PDE en la Familia I, las fosfodiesterasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina (CaM-PDE), son activadas por el Ca^{2+} -calmodulina y se ha demostrado que media en las vías de señalización del calcio y de los nucleótidos cíclicos (p. ej., AMPc y GMPc). Por lo tanto, estas PDE se activan en condiciones estimuladas cuando aumentan los niveles de calcio intracelular, lo que conduce a una mayor hidrólisis de nucleótidos cíclicos. Los tres genes CaM-PDE conocidos, PDE1A, PDE1B y PDE1C, se expresan todos en tejido del sistema nervioso central. En el cerebro, la expresión predominante de PDE1A se encuentra en la corteza y el neocórtex, la PDE1B se expresa en el neocórtex, la corteza prefrontal, el hipoAMPco y el tubérculo olfatorio, y la PDE1C se expresa de manera más ubicua.

15 La PDE4 es la principal enzima metabolizadora de AMPc que se encuentra en las células inflamatorias e inmunitarias, y los inhibidores de la PDE4 son de interés como fármacos antiinflamatorios. Sin embargo, no se ha pensado que la PDE1 desempeñe un papel importante en la respuesta inflamatoria, aunque la PDE-1 se induce en la diferenciación de monocitos a macrófagos mediada por la citocina factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Se ha demostrado que el inhibidor de PDE1, vinpocetina, es antiinflamatorio, pero se cree que la acción antiinflamatoria de la vinpocetina es causada por una inhibición directa del complejo de quinasa I κ B (IKK) en lugar del bloqueo de la PDE.

20 La microglía tiene un papel central en el mantenimiento de la homeostasis y en la mediación de la inflamación en el cerebro. La microglia se comunica con señales complejas a las neuronas y los astrocitos, determinando cuántas células cerebrales se necesitan y cuándo eliminar una sinapsis, p. ej., destruyendo las sinapsis defectuosas o no utilizadas. La microglía puede existir en diferentes estados: un estado de reposo, que es relativamente inactivo pero puede realizar funciones de vigilancia, o en uno de dos estados de activación funcionalmente distintos, M1 y M2. El estado M1 es inducido por una señal tal como IFN- γ o lipopolisacárido (LPS), y responde liberando citocinas inflamatorias como TNF-, IL-1 β y especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno (ROS/NOS). El estado M2 tiene un efecto antiinflamatorio, bloqueando la liberación de citocinas proinflamatorias, ingiriendo desechos, promoviendo la reparación de tejidos y liberando factores neurotróficos. La microglía activada se ha asociado con una variedad de enfermedades neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), y puede contribuir a la patología de estas enfermedades, aunque no se determina de manera concluyente si la inflamación es una causa subyacente o un efecto de estas condiciones.

35 No se ha demostrado previamente que la PDE1 tenga un papel significativo en la mediación de citocinas inflamatorias, en el cerebro o en otro lugar, o que tenga un efecto significativo sobre las enfermedades inflamatorias. Los procesos inflamatorios en general y las enfermedades y trastornos relacionados con la inflamación son numerosos, y los mecanismos y acciones aún no se conocen bien. Actualmente, existe una necesidad en gran medida insatisfecha de una forma eficaz de tratar la inflamación y las enfermedades y trastornos relacionados con la inflamación, especialmente con respecto a la inflamación que se produce en el cerebro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa la expresión de fosfodiesterasa en células BV2 tratadas con análisis LPS - RNAseq. FPKM se refiere a lecturas de fragmentos por kilobase de exón por millón de lecturas asignadas.

45 La Figura 2 representa que un inhibidor de PDE1 (Compuesto 214) suprime la IL1 β inducida por LPS en células BV2

La Figura 3 representa que un inhibidor de PDE1 (Compuesto 214) suprime la IL1 β inducida por LPS en el hipoAMPco de ratón, in vivo.

50 La Figura 4a representa que un inhibidor de PDE1 (Compuesto 214) reduce significativamente el aumento inducido por LPS en la expresión de las citocinas inflamatorias IL1 β , TNF- α y Ccl2 en células BV2, según lo medido por PCR cuantitativa, mientras que un inhibidor de PDE4, rolipram, muestra un perfil diferente. En un experimento separado, la Figura 4b demuestra que la administración de un inhibidor de PDE1 de la presente invención (Compuesto 214) reduce en gran medida o atenúa los cambios inducidos por LPS en los marcadores proinflamatorios en células BV2 (Figura 4b).

La figura 5 representa la inhibición de la liberación de TNF α inducida por LPS a partir de células BV2,

La figura 6 representa la reducción dependiente de la dosis por un inhibidor de PDE1 de la expresión de ARNm de TNF α estimulada por LPS.

La Figura 7 representa la inhibición por un inhibidor de PDE1 de la inducción por LPS de la expresión de citocinas proinflamatorias y un aumento de la expresión de una citocina antiinflamatoria (IL-10).

5 La Figura 8 representa un inhibidor de PDE1 (Compuesto 214) que previene cambios en la expresión de genes inflamatorios inducidos por LPS en ratones. Los ratones adultos se tratan con vehículo (barras blancas), 500 μ g/kg LPS s.c. (barras grises), o 10 mg/kg ITI-214 i.p. y 500 μ g/kg LPS s.c. (barras negras) durante 2 horas (n = 4). El tejido estriatal se analiza en busca de niveles de ARNm de TNF, IL1 β , Ccl2 e IL6. Los niveles de expresión se muestran como cambios en la señal de Q-PCR del vehículo ($\Delta\Delta$ Ct) y se comparan mediante ANOVA. * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001,

La figura 9 demuestra los niveles de expresión (FPKM) de genes seleccionados con patrones compartidos de respuesta a LPS e ITI-214. Las células BV2 se tratan con LPS, ITI-214 o LPS+ITI-214,

La Figura 10a muestra el cambio en los niveles de expresión de cada gen en células BV2 con 50 ng/ml de LPS y la dosis indicada de ITI-214 (abreviado 214).

15 La Figura 10b demuestra los efectos dependientes de la dosis de ITI-214 en ausencia de estimulación con LPS. De izquierda a derecha, para la Fig. 10a, las barras indican muestras tratadas con: LPS, 0,1 μ M 214 + LPS, 0,4 μ M 214 + LPS, 1,1 μ M 214 + LPS, 3,3 μ M 214 + LPS, 10 μ M 214 + LPS, para cada gen particular que se muestra en el eje X. De izquierda a derecha, para la Fig. 10b, las barras indican muestras tratadas con: 0,04 μ M 214, 0,1 μ M 214, 0,4 μ M 214, 1,1 μ M 214, 3,3 μ M 214, 10 μ M 214, para cada gen particular que se muestra en el eje X.

20 Fig. 11a Se puede estimular la actividad dependiente de GMPc del inhibidor de PDE1 de la presente invención (Compuesto 214), la actividad de guanilil ciclasa en partículas con péptido natriurético auricular (ANP) o la actividad de guanilil ciclasa soluble con donador de óxido nítrico DEANO. Para cada gen, de izquierda a derecha, las barras indican el tratamiento con: LPS, 214 3,3 μ M, 214 10 μ M, forskoline y DEANO.

25 La Fig. 11b demuestra la influencia de cada nucleótido cíclico (AMPc o GMPc) en la respuesta de ITI-214 al combinar la estimulación con LPS, la inhibición de PDE1 con ITI-214 y el inhibidor de PKA (AMPcS-Rp) (100 μ M) o el inhibidor de PKG (-8-Br-PET-GMPcS) (100 μ M). De izquierda a derecha, para la Fig. 11b, las barras indican muestras tratadas con: LPS, 214 3,3 μ M, 214 10 μ M, AMPcS-Rp y RP-8-Br-PET-GMPcS.

30 La Fig. 12 demuestra que el inhibidor de PDE1 probado es muy eficaz para aumentar la supervivencia de las células ganglionares de la retina en comparación con el control de PBS en el modelo de lesión óptica descrito en el Ejemplo 10,

SUMARIO DE LA INVENCION

Sorprendentemente, hemos descubierto que la PDE1 media la expresión de ciertas citocinas y quimiocinas proinflamatorias y que los inhibidores de la PDE1 tienen efectos antiinflamatorios específicos, que son diferentes de los efectos antiinflamatorios de los inhibidores de la PDE4. En un aspecto, la inhibición de PDE1 regula la actividad inflamatoria en la microglía, reduciendo la expresión de genes proinflamatorios, con un perfil diferente al de la inhibición de PDE4, proporcionando así nuevos tratamientos para la neuroinflamación tóxica.

35 La regulación negativa de las respuestas inflamatorias en la microglía por niveles elevados de nucleótidos cíclicos intracelulares proporciona un área prometedora para la intervención terapéutica. El monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) en la microglía se produce mediante la activación de los receptores natriuréticos auriculares o la guanilil ciclasa soluble y se hidroliza por las fosfodiesterasas (PDE). Se ha demostrado que el aumento de GMPc intracelular estimulando la producción o inhibiendo la hidrólisis atenúa las respuestas inducidas por LPS en la microglía. Además, se ha demostrado que GMPc desempeña un papel en la motilidad de la microglía inducida por LPS. El monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) también es un regulador clave de las respuestas inflamatorias. Se ha demostrado que la estimulación con LPS y citocinas aumenta la expresión de PDE4B y disminuye el AMPc. Las PDE son objetivos probados aptos para fármacos. Las enzimas de la familia PDE1, de las cuales la PDE1B se expresa en la microglía, hidrolizan tanto AMPc como GMPc y son activadas por el calcio.

40 Entre las funciones desempeñadas por las dianas de la enzima PDE1 de los compuestos de la invención, la isoforma PDE1B se encuentra en gran abundancia en la microglía, donde puede desempeñar un papel en el control de las respuestas inflamatorias, en particular en condiciones de calcio intracelular elevado. Esto sugiere que ITI-214 podría resultar beneficioso en enfermedades asociadas, por ejemplo, con neuroinflamación crónica.

45 En una realización, por lo tanto, la invención proporciona el uso de varios compuestos inhibidores de PDE1 para tratar la inflamación y/o enfermedades o trastornos relacionados con la inflamación. La inflamación puede ser neuroinflamación y, en una realización, los inhibidores de PDE1 pueden modular específicamente la activación microglial en el cerebro. Sorprendentemente, hemos descubierto que la expresión inducida por LPS de ciertos biomarcadores inflamatorios (p. ej., IL1 β , TNF- α y Ccl2) se puede atenuar o disminuir con la administración de un

inhibidor de PDE1 como se describe en este documento. Este descubrimiento tiene una amplia gama de aplicaciones para el tratamiento de enfermedades y trastornos inflamatorios relacionados o correlacionados con la expresión de varios biomarcadores inflamatorios.

5 Sin estar ligado a la teoría, un posible mecanismo para esta actividad es que la inhibición de PDE1B puede afectar la activación de los macrófagos en la sangre y/o la activación microglial en el SNC, para reducir la activación de M1 y la liberación de citocinas proinflamatorias, y para mejorar la acción de la microglía M2, a través de la regulación al alza de citocinas antiinflamatorias como la IL-10, El papel de la neuroinflamación y la función microglial en las patologías del SNC no se comprende completamente, pero suponemos que es relevante para una variedad de condiciones, que incluyen:

- 10 a. afecciones neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y afecciones desmielinizantes, por ejemplo, esclerosis múltiple (EM) y enfermedades priónicas;
- b. reparación de daño debido a hipoxia, hemorragia intracerebral o lesión cerebral traumática;
- 15 c. afecciones caracterizadas por una producción y/o respuesta anormales de neurotransmisores, que incluyen depresión, esquizofrenia, trastorno de estrés postraumático, ansiedad, trastorno por déficit de atención y enfermedad bipolar; p. ej., en donde cualquiera de los anteriores está asociado con neuroinflamación;
- d. infecciones crónicas del SNC, p. ej., enfermedad de Lyme, sífilis o infección del SNC como consecuencia de un estado inmunosupresor, p. ej., demencia por VIH;
- e. neuroinflamación como consecuencia de la quimioterapia.

20 Se cree que la inhibición dirigida de PDE1 en el cerebro con un compuesto de la presente invención afecta la activación microglial y reduce la señalización dañina de citocinas proinflamatorias y, al mismo tiempo, aumenta la producción de citocinas antiinflamatorias y factores involucrados en la motilidad y el reclutamiento de microglia.

25 En consecuencia, en una realización, la invención proporciona un nuevo método de tratamiento o profilaxis de la inflamación o enfermedad asociada con la inflamación que se puede mejorar mediante la administración de un inhibidor específico de la fosfodiesterasa tipo I (p. ej., un inhibidor de PDE1, p. ej., un inhibidor de PDE1B) (p. ej., un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII, XII como se describe en el presente documento).

En una realización, la invención proporciona un método para tratar la neuroinflamación y/o enfermedades o trastornos asociados con la neuroinflamación y/o la función microglial, p. ej., seleccionado entre:

- 30 a. afecciones neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y afecciones desmielinizantes, p. ej., esclerosis múltiple (EM) y enfermedades priónicas;
- b. hipoxia, hemorragia intracerebral o lesión cerebral traumática;
- 35 c. afecciones caracterizadas por una producción y/o respuesta anormales de neurotransmisores, que incluyen depresión, esquizofrenia, trastorno de estrés postraumático, ansiedad, trastorno por déficit de atención y enfermedad bipolar; p. ej., en donde cualquiera de los anteriores está asociado con neuroinflamación; y
- d. infecciones crónicas del SNC, p. ej., enfermedad de Lyme o infección del SNC como consecuencia de un estado inmunosupresor, p. ej., demencia por VIH;
- 40 e. neuroinflamación como consecuencia de la quimioterapia; que comprende administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de PDE1 de la presente invención (p. ej., un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII, XII como se describe en el presente documento), p. ej., una cantidad eficaz para (i) reducir o inhibir la activación de la microglía M1, y/o (ii) y la cantidad eficaz para reducir los niveles de una o más citocinas proinflamatorias (p. ej., IL1 β , TNF- α y Ccl2, o una combinación de las mismas); a un paciente que lo necesite.

45 En una realización, los inhibidores de PDE1 de la presente invención (p. ej., un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII, XII como se describe en el presente documento) se administran a un paciente con niveles elevados de una o más citocinas proinflamatorias (p. ej., IL1 β , TNF- α , y Ccl2, o una combinación de los mismos), p. ej., a un paciente que padece neuroinflamación y/o enfermedades o trastornos asociados con la neuroinflamación y/o la función microglial, p. ej., seleccionado entre:

- 50 a. afecciones neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y afecciones desmielinizantes, p. ej., esclerosis múltiple (EM) y enfermedades priónicas;
- b. hipoxia, hemorragia intracerebral o lesión cerebral traumática;

c. afecciones caracterizadas por una producción y/o respuesta anormales de neurotransmisores, incluyendo depresión, esquizofrenia, trastorno de estrés postraumático, ansiedad, trastorno por déficit de atención y enfermedad bipolar; p. ej., en donde cualquiera de los anteriores está asociado con neuroinflamación; y

5 d. infecciones crónicas del SNC, p. ej., enfermedad de Lyme o infección del SNC como consecuencia de un estado inmunosupresor, p. ej., demencia por VIH;

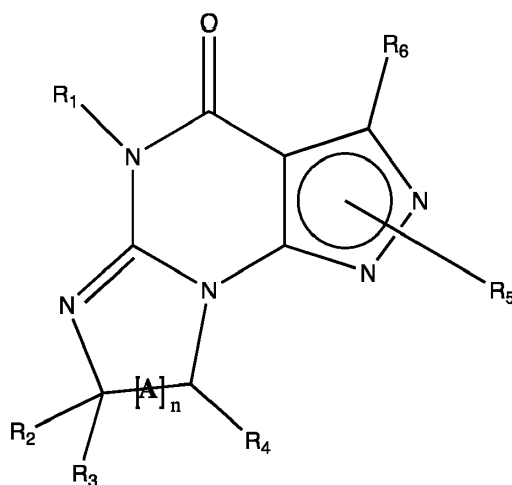
e. neuroinflamación consecuencia de la quimioterapia.

Otras realizaciones de la invención se exponen o son evidentes a partir de la descripción detallada a continuación y los ejemplos del presente documento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

10 *Compuestos para usar en los métodos de la invención*

La invención proporciona que los inhibidores de PDE1 para uso en los métodos de tratamiento y profilaxis descritos en el presente documento son compuestos de Fórmula V:



Fórmula V

15 en donde

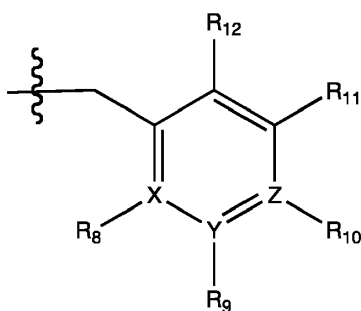
(i) R₁ es H o alquilo C₁₋₄ (p. ej., metilo);

(ii) R₄ es H o alquilo C₁₋₄ y R₂ y R₃ son, independientemente, H o alquilo C₁₋₄ (p. ejemplo, R₂ y R₃ ambos son metilo, o R₂ es H y R₃ es isopropilo), arilo, heteroarilo, (opcionalmente hetero)arilalcoxi u (opcionalmente hetero)arilalquilo;

20 o

R₂ es H y R₃ y R₄ juntos forman un puente di-, tri- o tetrametileno (pref. en donde el R₃ y R₄ juntos tienen la configuración *cis*, p. ej., donde los carbonos que llevan R₃ y R₄ tienen las configuraciones R y S, respectivamente);

(iii) R₅ es un heteroarilalquilo sustituido, p. ej., sustituido con haloalquilo o R₅ está unido a uno de los nitrógenos en la porción de pirazolo de fórmula V y es un resto de fórmula A



Fórmula A

5 en donde X, Y y Z son, independientemente, N o C, y R₈, R₉, R₁₁ y R₁₂ son independientemente H o halógeno (p. ej., Cl o F), y R₁₀ es halógeno, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo (por ejemplo, trifluorometilo), arilo (por ejemplo, fenilo), heteroarilo (por ejemplo, piridilo (por ejemplo, pirid-2-ilo) o tiadiazolilo (por ejemplo, 1,2,3-tiadiazol-4-il)), diazolilo, triazolilo, tetrazolilo, arilcarbonilo (p. ej., benzoílo), alquilsulfonilo (p. ej., metilsulfonilo), heteroarilcarbonilo o alcóxicarbonilo; siempre que cuando X, Y o Z sea nitrógeno, R₈, R₉, o R₁₀, respectivamente, no está presente; y

10 (iv) R₆ es H, alquilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo (p. ej., bencilo), arilamino (p. ej., fenilamino), heteroarilamino, N,N-dialquilamino, N,N-diarilamino o N-aril-N-(arilalquil)amino (p. ej., N-fenil-N-(1,1'-bifen-4-ilmetil)amino); y

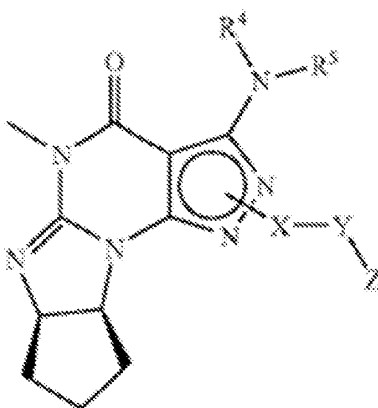
(v) n=0 o 1;

(vi) cuando n=1, A es -C(R₁₃R₁₄)-

en donde R₁₃ y R₁₄, son, independientemente, H o alquilo C₁₋₄, arilo, heteroarilo, (opcionalmente hetero)arilalcoxi o (opcionalmente hetero)arilalquilo;

15 en forma libre, de sal o de profármaco, incluidos sus enantiómeros, diastereoisómeros y racematos.

En una realización, la invención proporciona que los inhibidores de PDE1 para usar en los métodos de tratamiento y profilaxis descritos en este documento son compuestos de Fórmula VII:



Fórmula VII

20 (i) X es alquileno C₁₋₆ (p. ej., metileno, etileno o prop-2-in-1-ileno);

(ii) Y es un enlace sencillo, alquinileno (p. ej., -C≡C-), arileno (p. ej., fenileno) o heteroarileno (p. ej., piridileno);

25 (iii) Z es H, arilo (p. ej., fenilo), heteroarilo (p. ejemplo, piridilo, p. ej., pirid-2-ilo), halo (p. ejemplo, F, Br, Cl), halo alquilo C₁₋₆ (p. ej., trifluorometilo), -C(O)-R¹, -N(R²)(D³), o cicloalquilo C₃₋₇ que contiene opcionalmente al menos un^o átomo seleccionado de un grupo que consta de N u O (p. ej., ciclopentilo, ciclohexilo, tetrahidro-2H-piran-4-ilo o morfolinilo);

(iv) R¹ es alquilo C₁₋₆, halo alquilo C₁₋₆, -OH o -O alquilo C₁₋₆ (p. ej., -OCH₃);

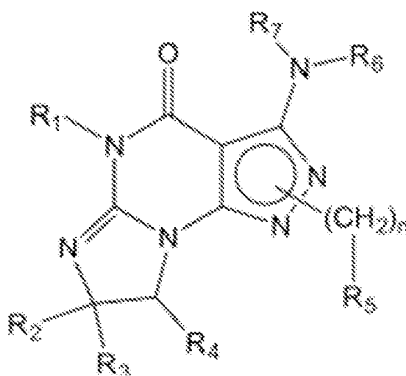
(v) R² y R³ son independientemente H o alquilo C₁₋₆;

(vi) R⁴ y R⁵ son independientemente H, alquilo C₁₋₆ o arilo (p. ej., fenilo) opcionalmente sustituido con uno o más halo (p. ej., fluorofenilo, p. ej., 4-fluorofenilo), hidroxilo (p. ej., hidroxifenilo, p. ej., 4-hidroxifenilo o 2-hidroxifenilo) o alcoxi C₁₋₆;

- 5 (vii) en donde X, Y y Z están independientemente y opcionalmente sustituidos con uno o más halo (p. ej., F, Cl o Br), alquilo C₁₋₆ (p. ej., metilo), halo alquilo C₁₋₆ (p. ej., trifluorometilo), p. ej., Z es heteroarilo, p. ej., piridilo sustituido con uno o más halo (p. ej., 6-fluoropirid-2-ilo, 5-fluoropirid-2-ilo, 6-fluoropirid-2-ilo, 3-fluoropirid-2-ilo, 4-fluoropirid-2-ilo, 4,6-dicloropirid-2-ilo), halo alquilo C₁₋₆ (p. ej., 5-trifluorometilpirid-2-ilo) o alquilo-C₁₋₆ (p. ej., 5-metilpirid-2-ilo), o Z es arilo, p. ej., fenilo, sustituido con uno o más halo (p. ej., 4-fluorofenilo),

en forma libre, de sal o de profármaco.

- 10 En otra realización más, la invención proporciona que los inhibidores de PDE1 para usar en los métodos de tratamiento y profilaxis descritos en este documento son de fórmula XII:



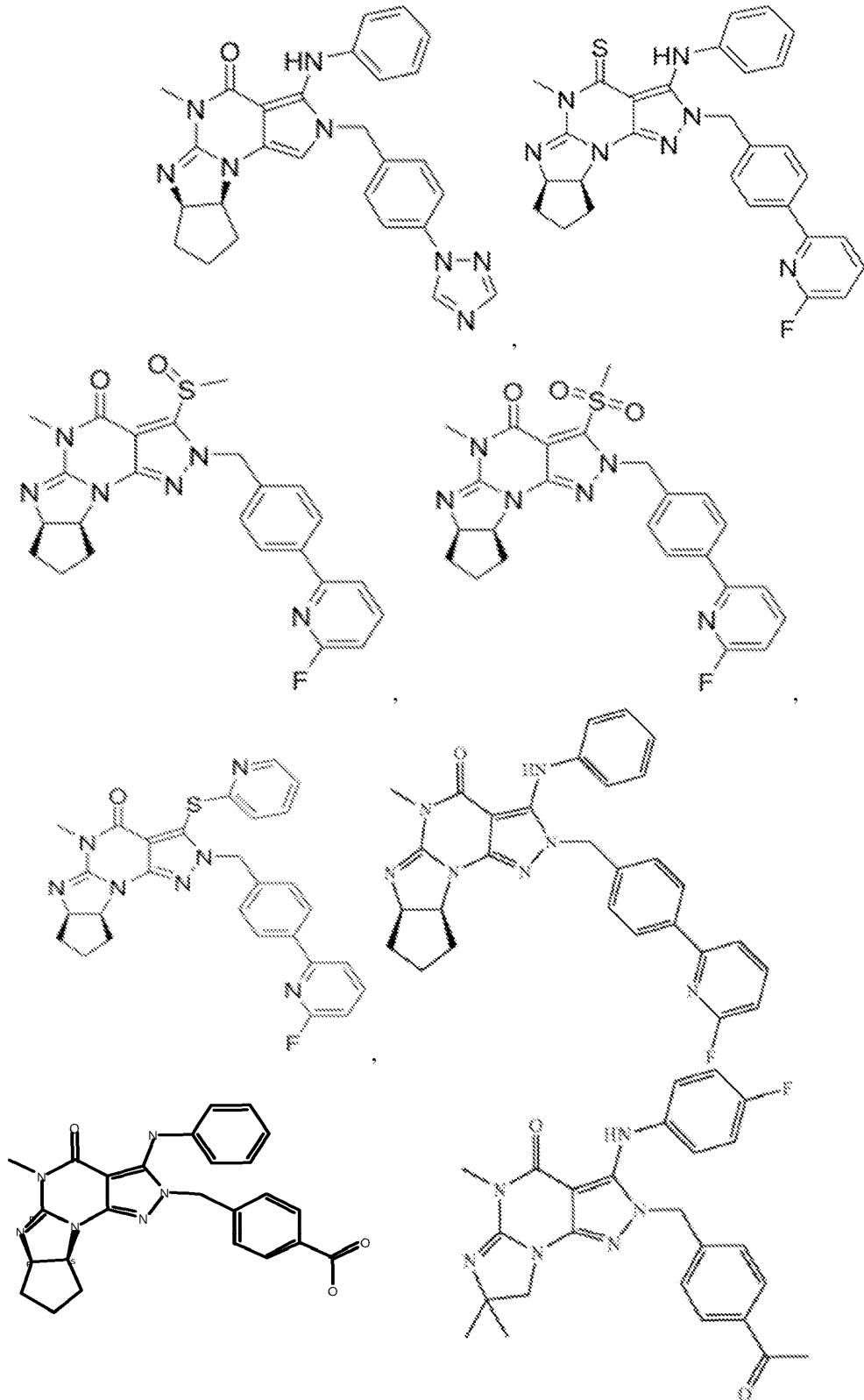
Fórmula XII

en donde

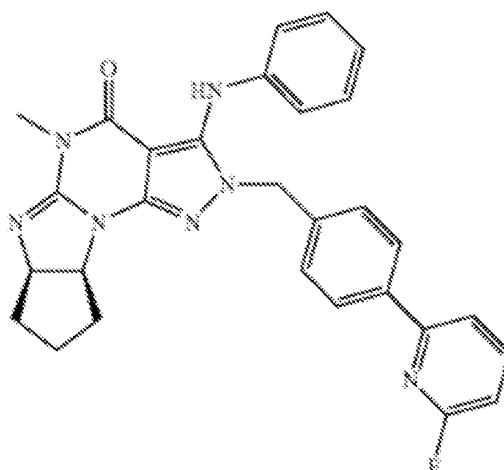
- 15 (i) R¹ es H o alquilo C₁₋₄ (p. ej., metilo o etilo);
 (ii) R² y R³ son independientemente H o alquilo C₁₋₆ (p. ej., metilo o etilo);
 (iii) R⁴ es H o alquilo C₁₋₄ (p. ej., metilo o etilo);
 (iv) R⁵ es arilo (p. ej., fenilo) opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de -C(=O)- alquilo C₁₋₆ (p. ej., -C(=O)-CH₃) y C₁₋₆-hidroxialquilo (p. ej., 1-hidroxietilo);
- 20 (v) R⁶ y R⁷ son independientemente H o arilo (p. ej., fenilo) opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de alquilo C₁₋₆ (p. ej., metilo o etilo) y halógeno (p. ej., F o Cl), por ejemplo, fenilo no sustituido o fenilo sustituido con uno o más halógenos (p. ej., F) o fenilo sustituido con uno o más alquilo C₁₋₆ y uno o más halógenos o fenilo sustituido con un alquilo C₁₋₆ y un halógeno, por ejemplo 4-fluorofenilo o 3,4-difluorofenilo o 4-fluoro-3-metilfenilo;y
- 25 (vi) n es 1, 2, 3 o 4,

en forma libre o de sal.

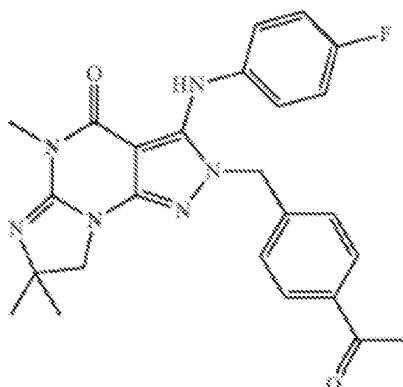
El compuesto se selecciona de cualquiera de los siguientes:



- 5 En una realización, la invención proporciona la administración de un inhibidor de PDE1 para el tratamiento o la profilaxis de la inflamación o una enfermedad o trastorno relacionado con la inflamación, en donde el inhibidor es un compuesto según lo siguiente:



En aún otra realización, la invención proporciona la administración de un inhibidor de PDE1 para el tratamiento o la profilaxis de la inflamación o una enfermedad o trastorno relacionado con la inflamación, en donde el inhibidor es un compuesto de acuerdo con lo siguiente:



5

En una realización, los inhibidores selectivos de PDE1 de cualquiera de las fórmulas anteriores (p. ej., Fórmula V, VII, XII) son compuestos que inhiben la hidrólisis de GMPC mediada por fosfodiesterasa (p. ej., mediada por PDE1, especialmente mediada por PDE1B), p. ej., los compuestos preferidos tienen un IC_{50} de menos de 1 μ M, preferiblemente menos de 500 nM, preferiblemente menos de 50 nM y preferiblemente menos de 5 nM en un ensayo de PDE con reactivo de partículas de afinidad de metal inmovilizado, en forma libre o de sal.

10

A menos que se especifique lo contrario o quede claro por el contexto, los siguientes términos del presente documento tienen los siguientes significados:

15

"Alquilo", como se usa en el presente documento, es un resto de hidrocarburo saturado o insaturado, preferiblemente saturado, preferiblemente que tiene de uno a seis átomos de carbono, que puede ser lineal o ramificado, y puede estar opcionalmente mono-, di- o tri-sustituido, p. ej., con halógeno (p. ej., cloro o flúor), hidroxilo o carboxilo.

20

"Cicloalquilo", tal como se usa en el presente documento, es un resto de hidrocarburo no aromático saturado o insaturado, preferiblemente saturado, que comprende preferiblemente de tres a nueve átomos de carbono, al menos algunos de los cuales forman una estructura no aromática mono o bicíclica o cíclica con puente, y que puede estar opcionalmente sustituido, p. ej., con halógeno (p. ej., cloro o flúor), hidroxilo o carboxilo. Cuando el cicloalquilo contiene opcionalmente uno o más átomos seleccionados de N y O y/o S, dicho cicloalquilo también puede ser un heterocicloalquilo.

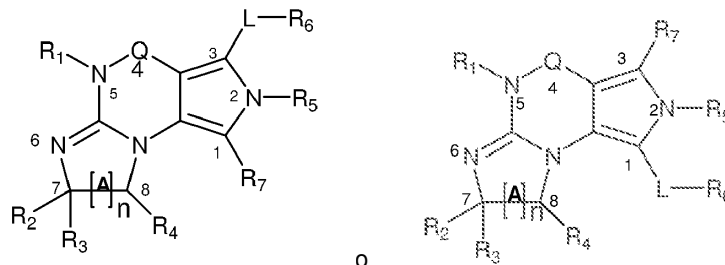
25

"Heterocicloalquilo" es, a menos que se indique lo contrario, un resto de hidrocarburo no aromático saturado o insaturado, preferiblemente saturado, que comprende preferiblemente de tres a nueve átomos de carbono, al menos algunos de los cuales forman una estructura no aromática mono o bicíclica o cíclica con puente, en donde al menos un átomo de carbono se reemplaza con N, O o S, cuyo heterocicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido, p. ej., con halógeno (p. ej., cloro o flúor), hidroxilo o carboxilo.

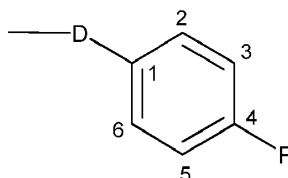
"Ariilo", tal como se usa aquí, es un hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico, preferiblemente fenilo, opcionalmente sustituido, p. ej., con alquilo (p. ej., metilo), halógeno (p. ej., cloro o flúor), haloalquilo (p. ej., trifluorometilo), hidroxilo, carboxilo, o un arilo o heteroarilo adicional (p. ej., bifenilo o piridilfenilo).

"Heteroarilo", tal como se usa en el presente documento, es un resto aromático en donde uno o más de los átomos que forman el anillo aromático es azufre o nitrógeno en lugar de carbono, p. ej., piridilo o tiadiazolilo, que puede estar opcionalmente sustituido, p. ej., con alquilo, halógeno, haloalquilo, hidroxilo o carboxi.

5 Para facilitar la referencia, los átomos en el núcleo de pirazolo-pirimidina de los Compuestos de la Invención están numerados de acuerdo con la numeración representada a continuación para la Fórmula I, a menos que se indique lo contrario o sea evidente por el contexto.



Cuando E es fenileno, la numeración es la siguiente:



10 Se pretende que cuando los sustituyentes terminan en "eno", por ejemplo, alquileno, fenileno o arilalquileno, se pretende que dichos sustituyentes formen un puente o estén conectados a otros dos sustituyentes. Por lo tanto, se pretende que metileno sea -CH2- y fenileno se pretende que sea -C6H4- y arilalquileno se pretende que sea -C6H4-CH2- o -CH2-C6H4-.

15 Compuestos de la invención, por ejemplo, 4,5,7,8-tetrahidro-2H-imidazo[1,2-a]pirrolo[3,4-e]pirimidina sustituida o 4,5,7,8,9-pentahidro-2H-pirrido[1,2-a]pirrolo[3,4-e]pirimidina, p. ej., compuestos de fórmula I (fórmula IA y IB), o un compuesto de fórmula II (p. ej., II-A o II-B), puede existir en forma libre o de sal, p. ej., como sales de adición de ácido. En esta especificación, a menos que se indique lo contrario, debe entenderse que un lenguaje como "Compuestos de la invención" abarca los compuestos en cualquier forma, por ejemplo, en forma de sal libre o de adición de ácido, o cuando los compuestos contienen sustituyentes ácidos, en forma de sal de adición de base. Los Compuestos de la

20 Invención están destinados para su uso como productos farmacéuticos, por lo que se prefieren las sales farmacéuticamente aceptables. Las sales que no son adecuadas para usos farmacéuticos pueden ser útiles, por ejemplo, para el aislamiento o la purificación de Compuestos libres de la invención o sus sales farmacéuticamente aceptables, por lo que también se incluyen.

25 Los Compuestos de la invención, que abarcan cualquiera de los compuestos descritos en el presente documento, p. ejemplo, compuestos de 4,5,7,8-tetrahidro-(opcionalmente 4-tioxo o 4-imino)-(1H o 2H)-imidazo[1,2-a]pirazolo[4,3-e]pirimidina o 4,5,7,8,9-pentahidro-(1H o 2H)-pirimido[1,2-a]pirazolo[4,3-e]pirimidina, p. ej., (1 o 2 y/o 3 y/o 5)-sustituido 4,5,7,8-tetrahidro-1H-imidazo[1,2-a]pirazolo[4,3-e]pirimidina, 4,5,7,8-tetrahidro-2H-imidazo[1,2-a]pirazolo[4,3-e]pirimidina, 4,5,7,8-tetrahidro-(1H o 2H)-pirimido[1,2-a]pirazolo[4,3-e]pirimidina-4(5H)-imina, 7,8-dihidro-1H-imidazo[1,2-a]pirazolo[4,3-e]pirimidina-4(5H)-tiona o 7,8-dihidro-2H-imidazo[1,2-a]pirazolo[4,3-e] Los Compuestos de pirimidina-4(5H)-tiona, por ejemplo, los Compuestos de Fórmula III o los Compuestos de Fórmula IV como se describe en el presente documento, pueden existir en forma libre o de sal, por ejemplo, como sales de adición de ácido.

30

Los compuestos de la invención también pueden existir en algunos casos en forma de profármaco. Una forma de profármaco es un compuesto que se convierte en el cuerpo en un Compuesto de la invención. Por ejemplo, cuando los compuestos de la invención contienen sustituyentes hidroxilo o carboxi, estos sustituyentes pueden formar ésteres fisiológicamente hidrolizables y aceptables. Como se usa en el presente documento, "éster fisiológicamente hidrolizable y aceptable" significa ésteres de Compuestos de la Invención que son hidrolizables bajo condiciones fisiológicas para producir ácidos (en el caso de Compuestos de la Invención que tienen sustituyentes hidroxilo) o alcoholes (en el caso de Compuestos de la invención que tienen sustituyentes carboxi) que son en sí mismos fisiológicamente tolerables a las dosis que se van a administrar. Por lo tanto, cuando el Compuesto de la invención contiene un grupo hidroxilo, por ejemplo, Compuesto-OH, el profármaco de éster de ácido de tal compuesto, es decir, Compuesto-O-C(O)-alquilo C₁₋₄, puede hidrolizarse en el cuerpo para formar alcohol fisiológicamente hidrolizable (Compuesto-OH) por un lado y ácido por el otro (p. ej., HOC(O)-alquilo C₁₋₄). Alternativamente, en donde el Compuesto de la Invención contiene un ácido carboxílico, por ejemplo, Compuesto-C(O)OH, el profármaco de éster ácido de tal compuesto, el Compuesto-C(O)O- alquilo C₁₋₄ puede hidrolizarse para formar el Compuesto-C(O)OH y HO-alquilo C₁₋₄. Como se apreciará, el término abarca formas convencionales de profármacos farmacéuticos.

35

40

45

En otra realización, la invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un Compuesto de la invención, en forma de sal libre o farmacéuticamente aceptable, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar como agente antiinflamatorio.

5 Los compuestos de la invención también pueden existir en algunos casos en forma de profármaco. Una forma de profármaco es un compuesto que se convierte en el cuerpo en un Compuesto de la invención. Por ejemplo, cuando los compuestos de la invención contienen sustituyentes hidroxilo o carboxilo, estos sustituyentes pueden formar ésteres fisiológicamente hidrolizables y aceptables. Como se usa en el presente documento, "éster fisiológicamente hidrolizable y aceptable" significa ésteres de Compuestos de la Invención que son hidrolizables en condiciones fisiológicas para producir ácidos (en el caso de Compuestos de la Invención que tienen sustituyentes hidroxilo) o alcoholes (en el caso de Compuestos de la invención que tienen sustituyentes carboxilo) que son en sí mismos fisiológicamente tolerables a las dosis que se van a administrar. Por lo tanto, cuando el Compuesto de la invención contiene un grupo hidroxilo, por ejemplo, Compuesto-OH, el profármaco de éster de acilo de dicho compuesto, es decir, Compuesto-O-C(O)-alquilo C₁₋₄, puede hidrolizarse en el cuerpo para formar alcohol fisiológicamente hidrolizable (Compuesto-OH) por un lado y ácido por el otro (por ejemplo, HOC(O)-alquilo C₁₋₄). Alternativamente, en donde el Compuesto de la Invención contiene un ácido carboxílico, por ejemplo, Compuesto-C(O)OH, el profármaco de éster ácido de tal compuesto, el Compuesto-C(O)O-alquilo C₁₋₄ puede hidrolizarse para formar el Compuesto-C(O)OH y HO-alquilo C₁₋₄. Como se apreciará, el término abarca formas convencionales de profármacos farmacéuticos.

En otra realización, la invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un Compuesto de la Invención, en forma de profármaco o sal farmacéuticamente aceptable libre, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar como agente antiinflamatorio.

Métodos de Fabricación de Compuestos de la Invención

Los compuestos de la invención y sus sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse usando los métodos descritos y ejemplificados en este documento y por métodos similares a los mismos y por métodos conocidos en la técnica química. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, los que se describen a continuación. Si no están disponibles comercialmente, los materiales de partida para estos procesos pueden prepararse mediante procedimientos, que se seleccionan de la técnica química utilizando técnicas que son similares o análogas a la síntesis de compuestos conocidos.

Se pueden preparar varios materiales de partida y/o Compuestos de la Invención usando los métodos descritos en los documentos US 2008-0188492 A1, US 2010-0173878 A1, US 2010-0273754 A1, US 2010-0273753 A1, WO 2010/065153, WO 2010/065151, WO 2010/065151, WO 2010/065149, WO 2010/065147, WO 2010/065152, WO 2011/153129, WO 2011/133224, WO 2011/153135, WO 2011/153136, WO 2011/153138, y la Pat. de EE.UU. 9,073,936,

Los Compuestos de la Invención incluyen sus enantiómeros, diastereoisómeros y racematos, así como sus polimorfos, hidratos, solvatos y complejos. Algunos compuestos individuales dentro del alcance de esta invención pueden contener dobles enlaces. Las representaciones de dobles enlaces en esta invención pretenden incluir tanto el isómero E como el Z del doble enlace. Además, algunos compuestos dentro del alcance de esta invención pueden contener uno o más centros asimétricos. Esta invención incluye el uso de cualquiera de los estereoisómeros ópticamente puros así como cualquier combinación de estereoisómeros.

También se pretende que los Compuestos de la Invención abarquen sus isótopos estables e inestables. Los isótopos estables son isótopos no radiactivos que contienen un neutrón adicional en comparación con los abundantes nucleidos de la misma especie (es decir, elemento). Se espera que se conserve la actividad de los compuestos que comprenden tales isótopos, y dicho compuesto también tendría utilidad para medir la farmacocinética de los análogos no isotópicos. Por ejemplo, el átomo de hidrógeno en una posición determinada de los Compuestos de la invención puede reemplazarse con deuterio (un isótopo estable que no es radiactivo). Los ejemplos de isótopos estables conocidos incluyen, entre otros, deuterio, ¹³C, ¹⁵N, ¹⁸O. Alternativamente, isótopos inestables, que son isótopos radiactivos que contienen neutrones adicionales en comparación con los abundantes nucleidos de la misma especie (es decir, elemento), por ejemplo, ¹²³I, ¹³¹I, ¹²⁵I, ¹¹C, ¹⁸F, puede reemplazar a las correspondientes especies abundantes de I, C y F. Otro ejemplo de isótopo útil del compuesto de la invención es el isótopo ¹¹C. Estos radioisótopos son útiles para estudios de radioimagen y/o farmacocinéticos de los compuestos de la invención.

Los puntos de fusión no están corregidos y (dec) indica descomposición. La temperatura se da en grados Celsius (°C); a menos que se indique lo contrario, las operaciones se realizan a temperatura ambiente o ambiente, es decir, a una temperatura en el rango de 18-25 °C. Cromatografía significa cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice; la cromatografía en capa fina (TLC) se lleva a cabo en placas de gel de sílice. Los datos de RMN están en los valores delta de los principales protones de diagnóstico, dados en partes por millón (ppm) en relación con el tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Se utilizan abreviaturas convencionales para la forma de la señal. Las constantes de acoplamiento (J) se dan en Hz. Para los espectros de masas (EM), el ion principal de masa más baja se informa para las moléculas en las que la división de isótopos da como resultado múltiples picos espectrales de masas. Las composiciones de mezclas de disolventes se dan como porcentajes en volumen o relaciones en volumen. En los casos en que los espectros de RMN son complejos, solo se notifican las señales de diagnóstico.

Términos y abreviaturas:

- BuLi = n-butillitio
- Bu^tOH = alcohol *terc-butilo*,
- CAN = nitrato de amonio y cerio (IV),
- 5 DIPEA = diisopropiletilamina,
- DMF = N,N-dimetilforamida,
- DMSO = dimetilsulfóxido,
- et₂O = éter dietílico,
- EtOAc = acetato de etilo,
- 10 equivalente = equivalente(s),
- h = hora(s),
- HPLC = cromatografía líquida de alta resolución,
- LDA = diisopropilamida de litio
- MeOH = metanol,
- 15 NBS = N-bromosuccinimida
- NCS = N-clorosuccinimida
- NaHCO₃ = bicarbonato de sodio,
- NH₄OH = hidróxido de amonio,
- Pd₂(dba)₃ = tris[dibencilidenacetona]dipaladio(0)
- 20 PMB = p-metoxibencilo,
- POCl₃ = oxiclورو de fósforo,
- SOCl₂ = cloruro de tionilo,
- TFA = ácido trifluoroacético,
- TFMSA = ácido trifluorometanosulfónico
- 25 THF = tetraedrofurano.

Métodos de uso de compuestos de la invención

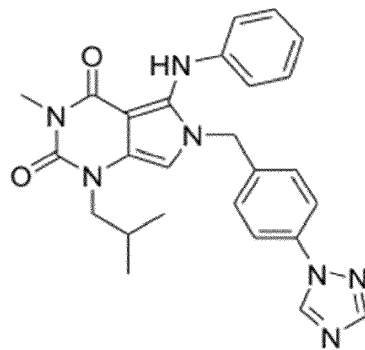
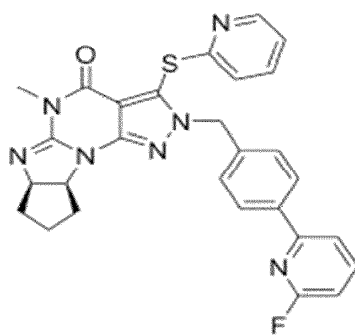
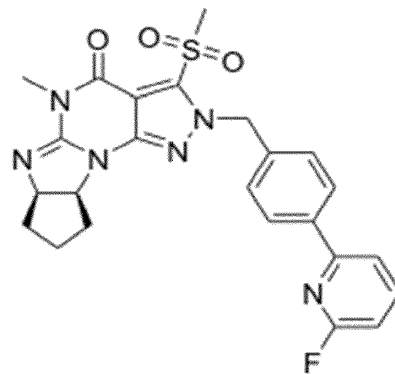
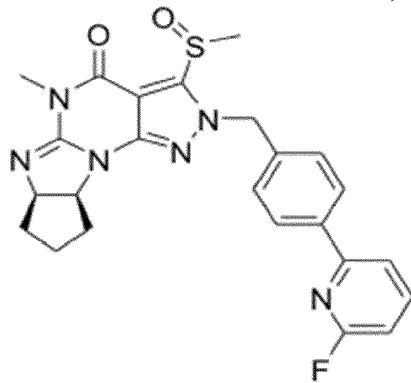
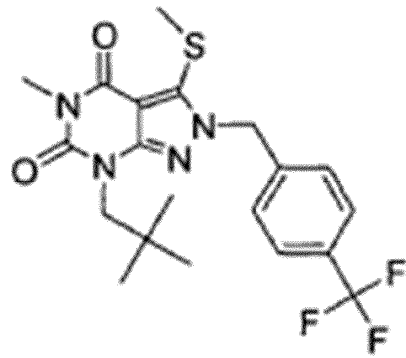
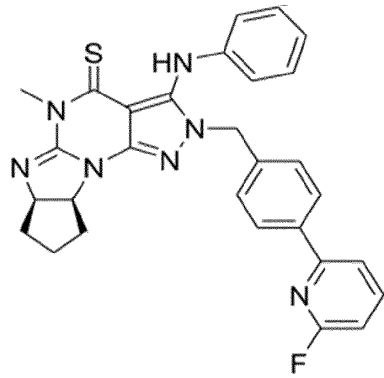
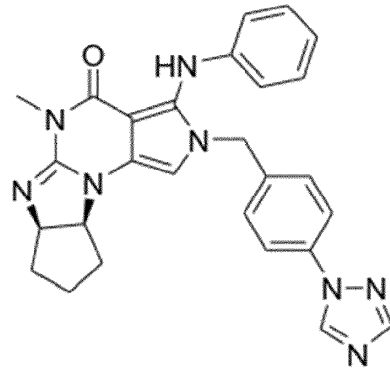
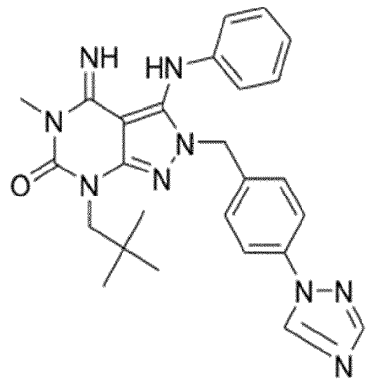
Los Compuestos de la Invención son útiles en el tratamiento de enfermedades o afecciones inflamatorias, particularmente enfermedades o afecciones neuroinflamatorias. Por lo tanto, la administración o el uso de un inhibidor de PDE1 preferido como se describe en este documento, p. ej., un inhibidor de PDE1 como se describe anteriormente en el presente documento, p. ej., un compuesto de fórmula V o XII proporciona un medio para regular la inflamación (p. ej., prevenir, reducir y/o revertir neuroinflamación y enfermedades o trastornos relacionados con la neuroinflamación), y en ciertas realizaciones proporcionan un tratamiento para diversas enfermedades y trastornos inflamatorios.

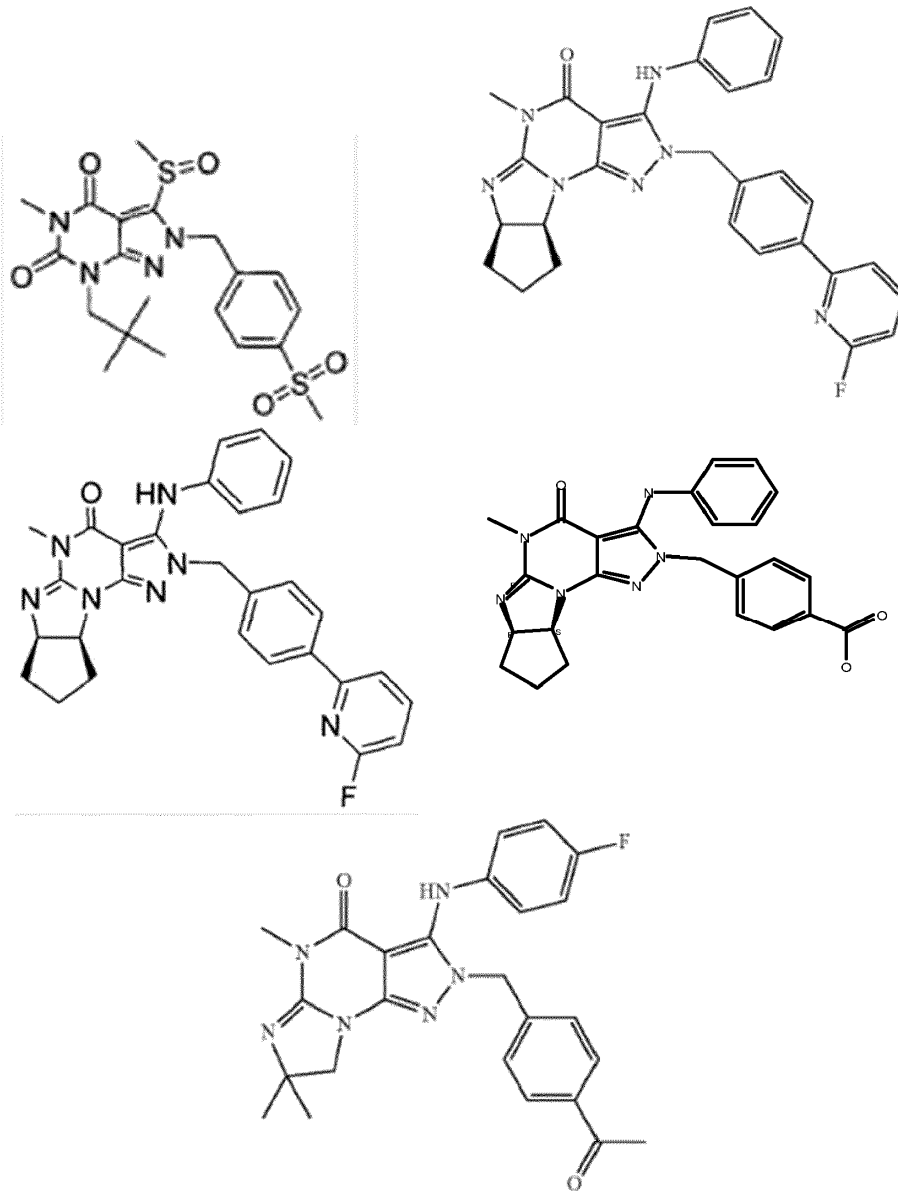
Por ejemplo, en una realización la invención proporciona un método (Método 1) de tratamiento o profilaxis de la inflamación o enfermedad asociada con la inflamación que comprende administrar una cantidad eficaz de un inhibidor específico de la fosfodiesterasa tipo I (PDE1), a un paciente que lo necesite, como se describe en las reivindicaciones adjuntas. En particular, la invención proporciona:

Un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII o XII para usar en un Método para tratar la neuroinflamación y/o enfermedades o trastornos asociados con la neuroinflamación y/o la función microglial.

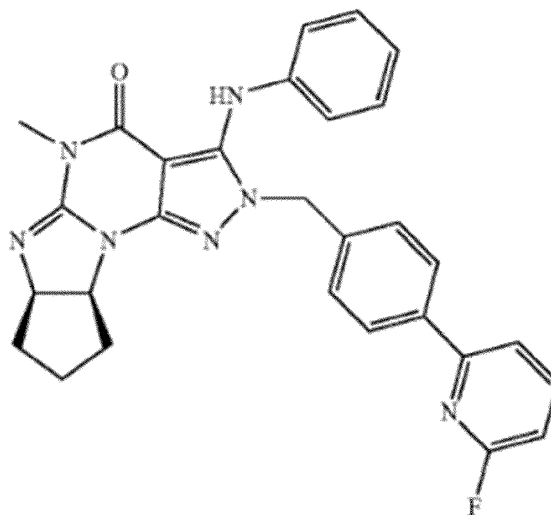
40 En una realización, la enfermedad o condición a tratar se selecciona de:

- a. afecciones neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y afecciones desmielinizantes, p. ej., esclerosis múltiple (EM) y enfermedades priónicas;
- b. hipoxia, hemorragia intracerebral o lesión cerebral traumática;
- 5 c. afecciones caracterizadas por una producción y/o respuesta anormales de neurotransmisores, que incluyen depresión, esquizofrenia, trastorno de estrés postraumático, ansiedad, trastorno por déficit de atención y enfermedad bipolar; p. ej., en donde cualquiera de los anteriores está asociado con neuroinflamación; y
- d. infecciones crónicas del SNC, p. ej., enfermedad de Lyme o infección del SNC como consecuencia de un estado inmunosupresor, p. ej., demencia por VIH;
- 10 e. neuroinflamación como consecuencia de la quimioterapia; que comprende administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII o XII, p. ej., una cantidad eficaz para (i) reducir o inhibir la activación de la microglía M1, y/o (ii) y una cantidad eficaz para reducir los niveles de uno o más citocinas proinflamatorias (p. ej., IL1 β , TNF- α y Ccl2, o una combinación de las mismas); a un paciente que lo necesite.
- 15 En una realización, la enfermedad o afección a tratar es una afección neurodegenerativa, p. ej., seleccionada de enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y afecciones desmielinizantes, p. ej., esclerosis múltiple (EM) y enfermedades priónicas.
- En una realización adicional, la enfermedad o afección a tratar se selecciona de hipoxia, hemorragia intracerebral y lesión cerebral traumática.
- 20 Opcionalmente, la enfermedad o condición a tratar es una condición caracterizada por una producción y/o respuesta anormal de neurotransmisores, p. ej., seleccionada de depresión, esquizofrenia, trastorno de estrés postraumático, ansiedad, trastorno por déficit de atención y enfermedad bipolar; p. ej., en donde cualquiera de los anteriores está asociado con neuroinflamación.
- Además, opcionalmente, la enfermedad o afección a tratar se selecciona de infecciones crónicas del SNC, p. ej., enfermedad de Lyme o infección del SNC como consecuencia de una afección inmunosupresora, p. ej., demencia por VIH.
- 25 En una realización adicional, la enfermedad o afección a tratar es la neuroinflamación como consecuencia de la quimioterapia.
- En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII o XII para usar en un método que comprende administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII o XII, p. ej., una cantidad eficaz para (i) reducir o inhibir la activación de la microglía M1, y/o (ii) y la cantidad eficaz para reducir los niveles de una o más citocinas proinflamatorias (p. ej., IL1 β , TNF- α , IL6 y Ccl2, o una combinación de las mismas); a un paciente que lo necesite.
- 30 Opcionalmente, el método comprende administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de PDE1 de fórmula I, V, VII o XII a un paciente que lo necesite, en una cantidad eficaz para las citocinas antiinflamatorias (p. ej., IL-10).
- 35 En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII o XII para usar en un método que comprende administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII o XII a un paciente que lo necesita, en una cantidad eficaz para reducir los niveles de fenotipo microglial M1 y/o potenciar los niveles de fenotipo microglial M2,
- 40 Opcionalmente, la neuroinflamación se asocia con una mayor expresión y/o activación de células microgliales (p. ej., células microgliales M1) en el cerebro.
- En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII o XII reduce o inhibe la expresión y/o actividad de citocinas proinflamatorias en el cerebro, p. ej., seleccionadas del grupo que consiste en: IL1B, IL-6, TNF- α , Ccl2, óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS).
- 45 En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII se administra en combinación con un inhibidor de PDE4 (p. ej., rolipram).
- En una realización, la invención se relaciona con un inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describió anteriormente, en donde el paciente muestra niveles aumentados de citocinas proinflamatorias (p. ej., IL1B, IL6, TNF- α , CCl2).
- 50 En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el inhibidor de PDE1 se selecciona de cualquiera de los siguientes:

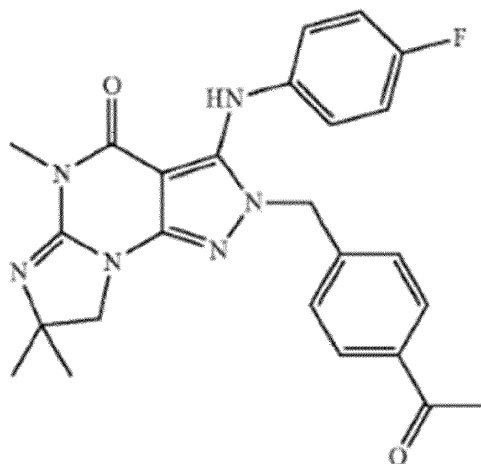




5 En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el inhibidor de PDE1 es el siguiente:



En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el inhibidor de PDE1 es el siguiente:



5 En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII para su uso en un método como se describe anteriormente, en donde el inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII se administra en combinación (p. ej., se administra de forma secuencial o simultáneamente o dentro de un período de 24 horas) con una cantidad efectiva de uno o más agentes antidepresivos, p. ej., con uno o más compuestos en forma de sal libre o farmacéuticamente aceptable, seleccionados de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN), antidepresivos tricíclicos (TCA) y antipsicóticos atípicos, p.ej., uno o más compuestos en forma de sal libre o farmacéuticamente aceptable, seleccionados de

(a) inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), p. ej., Citalopram (Celexa), Escitalopram (Lexapro, Cipralext), Paroxetina (Paxil, Seroxat), Fluoxetina (Prozac), Fluvoxamina (Luvox) Sertralina (Zoloft, Lustral);

15 (b) inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina (IRSN), p. ej., desvenlafaxina (Pristiq), duloxetina (Cymbalta), levomilnacipran (Fetzima), milnacipran (Ixel, Savella), tofenacina (Elamol, Tofacine), venlafaxina (Effexor);

20 (c) antidepresivos tricíclicos (TCA), p. ej., amitriptilina (Elavil, Endep), amitriptilinoxido (Amioxid, Ambivalon, Equilibrin), clomipramina (Anafranil), desipramina (Norpramin, Pertofrane), dibenzepina (Noveril, Victoril), dimetacrina (Istonil), Dosulepina (Prothiaden), Doxepina (Adapin, Sinequan), Imipramina (Tofranil), Lofepamina (Lomont, Gamanil), Melitraceno (Dixeran, Melixeran, Trausabun), Nitroxazepina (Sintamil), Nortriptilina (Pamelor, Aventyl), Noxiptilina (Agedal, Elronon), Nogedal, pipofezina (Azafen/Azaphen), protriptilina (Vivactil), trimipramina (Surmontil);

(d) antipsicóticos atípicos, p. ej., Aripiprazol (Abilify), Asenapina (Saphris), Brexpiprazol (Rexulti), Clozapina (Clozaril), Lumateperona, Lurasidona (Latuda), Olanzapina (Zyprexa), Paliperidona (Invega), Quetiapina (Seroquel), Risperidona (Risperdal), Sertindol (Serdolect, Serlect) Ziprasidona (Geodon);

25 opcionalmente en donde el agente antidepresivo es un agente antipsicótico atípico, por ejemplo, Lumateperona, en forma de sal libre o farmacéuticamente aceptable.

En una realización, el agente antidepresivo es un ISRS, p. ej., Fluoxetina o Escitalopram, en forma de sal libre o farmacéuticamente aceptable.

30 En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el paciente tiene niveles elevados de una o más citocinas proinflamatorias (p. ej., seleccionadas de IL1 β , TNF α , Ccl2, IL-6 y combinaciones de los mismos).

En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el paciente tiene niveles reducidos de una o más citocinas antiinflamatorias (p. ej., IL-10).

35 En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el paciente tiene niveles elevados de fenotipo microglial M1 en comparación con el fenotipo microglial M2,

40 En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el paciente tiene niveles anormales (p. ej., niveles anormales en relación con un estándar de referencia) de uno o más de las citocinas descritas en la Fig. 10 o la Fig. 11,

En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de Fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el inhibidor de PDE1 se administra para tratar o prevenir la neuroinflamación crónica o una enfermedad asociada con la neuroinflamación crónica.

5 En una realización, la invención se refiere a un inhibidor de PDE1 de fórmula V, VII o XII para usar en un método como se describe anteriormente, en donde el inhibidor de PDE1 se administra a un paciente con una lesión en el nervio óptico;

opcionalmente, en donde el inhibidor de PDE1 aumenta la expresión de PDE1 en el ganglio de la retina;

opcionalmente en donde la administración del inhibidor de PDE1 aumenta la supervivencia de las células ganglionares de la retina (p. ej., aumenta en comparación con un estándar de referencia o control).

10 La invención proporciona además el uso de un inhibidor de PDE1 de fórmula V, fórmula VII o fórmula XII en la fabricación de un medicamento para uso en cualquiera de los métodos anteriores. Las formas de dosificación oral pueden incluir tabletas, cápsulas, soluciones, suspensiones y similares.

EJEMPLO 1

Medición de la inhibición de PDEIB in vitro utilizando el kit de ensayo de fosfodiesterasa I MAP

15 La fosfodiesterasa I B (PDEIB) es una enzima fosfodiesterasa dependiente de calcio/calmodulina que convierte el monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) en monofosfato de guanosina 5' (5'-GMP). PDEIB también puede convertir un sustrato GMPc modificado, tal como la molécula fluorescente GMPc-fluoresceína, en la correspondiente GMP-fluoresceína. La generación de GMP-fluoresceína a partir de GMPc-fluoresceína se puede cuantificar usando, por ejemplo, el reactivo de partículas de afinidad de metal inmovilizado I MAP (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

20 Brevemente, el reactivo I MAP se une con gran afinidad al 5'-fosfato libre que se encuentra en la fluoresceína GMP y no en la fluoresceína GMPc. El complejo GMP-fluoresceína-I MAP resultante es grande en relación con GMPc-fluoresceína. Los fluoróforos pequeños que están unidos en un gran complejo que gira lentamente se pueden distinguir de los fluoróforos no unidos, porque los fotones emitidos a medida que emiten fluorescencia conservan la misma polaridad que los fotones utilizados para excitar la fluorescencia.

25 En el ensayo de fosfodiesterasa, GMPc-fluoresceína, que no se puede unir a I MAP y, por lo tanto, retiene poca polarización de fluorescencia, se convierte en GMP-fluoresceína, que, cuando se une a I MAP, produce un gran aumento en la polarización de fluorescencia (Amp). La inhibición de la fosfodiesterasa, por lo tanto, se detecta como una disminución de Amp.

Ensayo enzimático

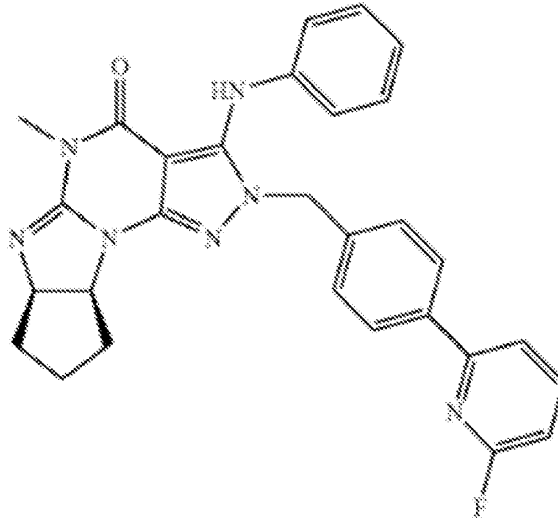
30 Materiales: todos los productos químicos están disponibles en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), excepto los reactivos I MAP (tampón de reacción, tampón de unión, perlas FL-GMP e I MAP), que están disponibles en Molecular Devices (Sunnyvale, CA).

35 Ensayo: Se pueden usar las siguientes enzimas fosfodiesterasas: fosfodiesterasa de cerebro bovino específica de nucleótido cíclico 3',5' (Sigma, St. Louis, MO) (predominantemente PDEIB) y PDE1A y PDE1B humanos de longitud completa recombinantes (r-hPDE1 A y r-hPDEIB respectivamente) que se pueden producir, p. ej., en células HEK o SF9 por un experto en la materia. La enzima PDE1 se reconstituye con glicerol al 50% a 2,5 U/ml. Una unidad de enzima hidrolizará 1,0 μ m de 3',5'-AMPc a 5'-AMP por minuto a pH 7,5 a 30 °C. Se añade una parte de enzima a 1999 partes de tampón de reacción (CaCl₂ 30 μ M, 10 U/ml de calmodulina (Sigma P2277), Tris-HCl 10 mM pH 7,2, MgCl₂ 10 mM, BSA al 0,1%, Na₃ al 0,05%) para producir una concentración final de 1,25 mU/ml. Se añaden 99 μ l de solución de enzima diluida a cada pocillo en una placa de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano a la que se añade 1 μ l de compuesto de ensayo disuelto en DMSO al 100%. Los compuestos se mezclan y preincuban con la enzima durante 10 min a temperatura ambiente.

45 La reacción de conversión de FL-GMP se inicia combinando 4 partes de mezcla de enzima e inhibidor con 1 parte de solución de sustrato (0,225 μ M) en una placa de microtitulación de 384 pocillos. La reacción se incuba en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 min. La reacción se detiene mediante la adición de 60 μ l de reactivo de unión (dilución 1:400 de perlas de I MAP en tampón de unión complementado con una dilución 1:1800 de antiespumante) a cada pocillo de la placa de 84 pocillos. La placa se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora para permitir que se complete la unión de I MAP y después se coloca en un lector de microplacas multimodo Envision (PerkinElmer, Shelton, CT) para medir la polarización de fluorescencia (Amp).

50 Una disminución en la concentración de GMP, medida como Amp disminuido, es indicativa de la inhibición de la actividad de la PDE. Los valores de IC₅₀ se determinan midiendo la actividad enzimática en presencia de 8 a 16 concentraciones del compuesto que oscilan entre 0,0037 nM y 80 000 nM y después graficando la concentración del fármaco frente a Amp, lo que permite estimar los valores de IC₅₀ utilizando un software de regresión no lineal (XLFit; IDBS, Cambridge, MA).

Los Compuestos de la Invención se prueban en un ensayo como se describe o se describe de manera similar en el presente documento para la actividad inhibidora de PDE1, Por ejemplo, el Compuesto 214 se identifica como un inhibidor específico de PDE1 de fórmula:



- 5 Este compuesto tiene eficacia a niveles subnanomolares frente a PDE1 (IC₅₀ de 0,058 nM para PDE1 de cerebro bovino en el ensayo descrito anteriormente) y alta selectividad sobre otras familias de PDE, como se muestra en la siguiente tabla:

Objetivo PDE	IC ₅₀ (nM)	relación PDEx/PDE1
cerebro bovino PDE1	0.058	1
hPDE2A	3661	63121
hPDE3B	3120	53793
hPDE4A	158	2724
r-bovina PDE5A	632	10897
retina bovina PDE6	324	5586
hPDE7B	355	6121
hPDE8A	3001	51741
hPDE9A	16569	285672
hPDE10A	1824	31448
hPDE11A	1313	22638

- 10 El compuesto también es altamente selectivo frente a un panel de 63 receptores, enzimas y canales iónicos. Estos datos, y los datos de otros inhibidores de la PDE1 descritos en este documento, se describen en Li et al., J. Med. Chem. 2016: 59, 1149-1164,

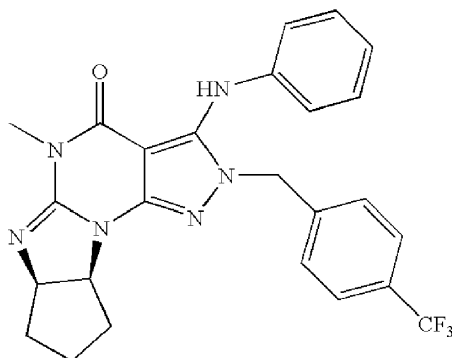
EJEMPLO 2

Inhibición de la transición de monocitos a macrófagos activados e interacción con ANP

La PDE1 se induce en la transición inflamatoria de monocitos a macrófagos activados mediada por GM-CSF, y esta transición puede inhibirse mediante la eliminación de PDE1, Bender y Beavo, 2006 PNAS 103, 460-5, El péptido natriurético auricular (ANP) eleva los niveles de GMPc al activar el receptor catalítico de ANP, que estimula la actividad de la guanilil ciclasa intracelular para convertir el GTP en GMPc. ANP tiene un efecto antiinflamatorio sobre los macrófagos, reduciendo la secreción de mediadores inflamatorios en los macrófagos. Kierner et al., Ann Rheum Dis. Nov de 2001; 60 (Suplemento 3): iii68-iii70. Específicamente, ANP inhibe la expresión inducida por lipopolisacárido (LPS) de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en macrófagos, reduce la activación de NF- κ B, inhibe la liberación de macrófagos de TNF α e interleucina 1 β (IL1 β), pero no la secreción de citocinas anti inflamatorias IL10 y antagonista del receptor de IL1 (IL1ra).

Hemos demostrado que existe un efecto sinérgico entre la inhibición de ANP y PDE1, Una línea de células pro-mieloide humana inmortalizada (HL60 de ATCC) se cultiva, diferencia y cosecha como se describe en Bender, AT y Beavo, JA, 2006, PNAS 103, 460-465, Las células se cultivan en medio RPMI 1640 tamponado con HEPES con penicilina, estreptomycin y suero bovino fetal al 10%. Se usa forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), a 100 nM durante 3 días, para diferenciar las células HL60 en células similares a macrófagos. Después de la diferenciación, las células se incuban con un inhibidor de PDE1 o vehículo (DMSO) comenzando en el tiempo 0. A los 40 minutos, se añade ionomicina 5 μ M (un ionóforo de calcio). A los 50 minutos, se añadió ANP 100 nM. A los 60 minutos, se recogen las células. Los niveles totales de GMPc se miden mediante un ELISA competitivo (Bender y Beavo, 2006).

Un inhibidor de PDE1 representativo, (6aR,9aS)-3-(fenilamino)-5,6a,7,8,9,9a-hexahidro-5-metil-2-(4-(trifluorometil)-bencil)-ciclopento[4,5]imidazo[1,2-a]pirazolo[4,3-e]pirimidin-4(2H)-ona, descrito como Ejemplo 20 del documento US 8,273,750, teniendo la siguiente estructura:



se prueba para determinar su efecto en los niveles de GMPc en este sistema. Al igual que el Compuesto 214, este compuesto es un inhibidor potente y selectivo de PDE1 (K_i = ensayo de PDE1 de cerebro bovino 0,68 nM descrito anteriormente). El nivel de GMPc inducido en las células HL60 mediante el tratamiento con ANP 100 nM en combinación con inhibidor de PDE1 100 nM es mayor que el inducido por el ANP solo o el inhibidor de PDE1 solo. Además, el nivel de GMPc alcanzado mediante el tratamiento conjunto con ANP y el inhibidor de PDE1 es mucho mayor que el obtenido mediante el tratamiento conjunto con ANP y un inhibidor mixto de PDE1/PDE5, SCH 51866 (usado a 5 μ M). En este experimento, el ionóforo de calcio ionomicina (usado a 5 μ M) se usa para elevar el nivel de calcio intracelular y contrarrestar el aumento de GMPc inducido por ANP. La disminución de la señal de GMPc provocada por la activación de PDE1 por ionomicina se previene sinérgicamente mediante la combinación de un inhibidor de PDE1 y niveles subóptimos de ANP. La adición de ionomicina solo tiene un débil efecto reductor de GMPc cuando se combina con ANP y el inhibidor de PDE1,

EJEMPLO 3

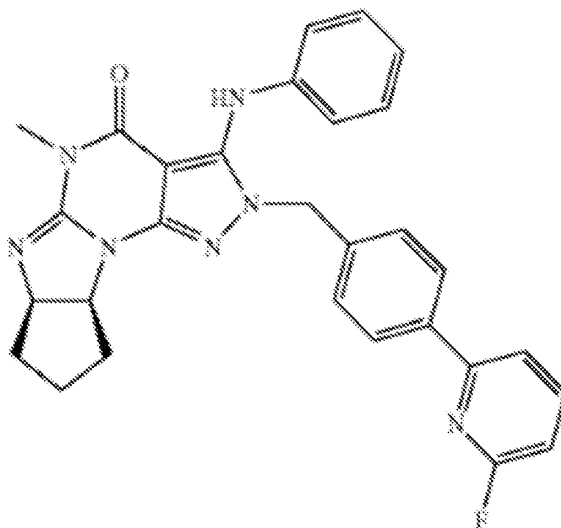
Efecto de los inhibidores de PDE1 en células derivadas de la microglía

Los procesos neuroinflamatorios están regulados en gran medida por la microglía. La microglía tiene estados de activación algo similares a los macrófagos y, en respuesta a IFN- γ o lipopolisacárido (LPS), se activarán para liberar citocinas proinflamatorias tales como TNF-, IL-1 β y especies reactivas de oxígeno/especies reactivas de nitrógeno (ROS /NOS). En otras circunstancias, se pueden activar para liberar citocinas antiinflamatorias, tal como la IL-10, y participar en la reparación de tejidos. La línea de células microgliales murinas inmortalizadas BV-2 se utiliza como modelo para la señalización de microglia. Stansley et al. Journal of Neuroinflammation 2012, 9:115,

Las células BV2 se tratan con lipopolisacárido (LPS) y el nivel de expresión de PDE se mide usando análisis RNAseq. Los datos se presentan en la Figura 1, "FPKM" representa las "Lecturas de fragmentos por kilobase de exón por millón de lecturas mapeadas". Después del tratamiento con LPS, una endotoxina asociada con la respuesta inflamatoria, los niveles de PDE1B muestran aumentos relativamente grandes en la expresión de ARN en comparación con otros

miembros de la familia de enzimas PDE. PDE1B se encuentra entre las subfamilias de fosfodiesterasas que muestran grandes aumentos en la expresión de ARN tras la administración de LPS.

5 Las células BV2 se evalúan adicionalmente mediante análisis RNAseq con estimulación con LPS en presencia o ausencia de rolipram (un inhibidor específico de PDE4), y en presencia o ausencia del Compuesto 214, que es un inhibidor específico de PDE1 de fórmula:



10 Los transcritos de ARNm 209 disminuyen en presencia de LPS + rolipram frente a LPS solo; Los transcritos de 138 disminuyen en presencia del Compuesto 214 + LPS frente a LPS solo. La superposición entre los dos conjuntos es de 48 transcritos. De manera similar, los transcritos de 156 están elevadas en presencia de LPS + rolipram frente a LPS solo; Los transcritos de 149 están elevados en presencia del Compuesto 214 + LPS frente a LPS solo. La superposición entre los dos conjuntos es de 45 transcritos.

15 Un análisis adicional de RNASeq de la expresión en células BV2 estimuladas con LPS en presencia y ausencia del Compuesto 214 y Rolipram (véase el Ejemplo 7) muestra 293 genes significativamente afectados por el Compuesto 214 pero no por el Rolipram, 251 afectados significativamente por el Rolipram pero no por el Compuesto 214, y solo 114 afectados por ambos, una superposición de solo alrededor del 17%.

20 En otro experimento adicional, un análisis de la expresión en células BV2 estimuladas con LPS en presencia y ausencia del Compuesto 214 y Rolipram, muestra que los genes expresados diferencialmente para cada par ((LPS vs LPS + rolipram, LPS vs LPS + ITI-214) comparten aproximadamente la mitad de los genes más significativos. Por ejemplo, el ensayo demuestra 1240 genes afectados significativamente por el Compuesto 214 pero no por Rolipram, 1463 afectados significativamente por Rolipram pero no por el Compuesto 214, y solo 683 afectados por ambos, una superposición de solo alrededor de la mitad.

25 Los solapamientos relativamente pequeños indican que los efectos de los inhibidores de PDE1 sobre estas células en respuesta a la estimulación con LPS son muy diferentes de los efectos de los inhibidores de PDE4. Si bien los inhibidores de la PDE4 a menudo se consideran antiinflamatorios, los dos tipos de inhibidores en este caso afectan, en su mayor parte, a la expresión de genes completamente diferentes.

30 Además, se comparan los niveles de expresión de las PDE en células BV2 con los de la microglía de cerebro de ratón según lo determinado por la cuantificación de RNAseq de transcritos de genes. Como se detalla en la Tabla A, PDE1B es el segundo transcrito de PDE más abundante en la microglía de ratón recién aislada y el transcrito de PDE más abundante en las células BV2. La expresión de PDE4B, PDE4A, PDE7A y PDE8a también es sustancial ($\geq 0,7$ FPKM/RPKM) en ambos tipos de células. Entre las varias enzimas PDE detectadas por RNA-Seq en las células BV2, PDE1 es la única con la capacidad de hidrolizar tanto AMPc como GMPc. La abundancia relativa de las isoenzimas PDE1B y PDE4 en las células BV2 indica potencialmente que estas son un modelo adecuado para los estudios de inhibidores (Tabla A):

Tabla A

X= FPKM o RPKM \leq 0,1

Expresión retenida

	Pde1b	Pde4b	Pde4a	Pde7a	Pde8a
Microglía	9,9	8,1	2,3	1,8	0,4
Células BV2	4,2	1,5	2,8	0,7	0,4

5 Abundancia, pérdida de expresión

	Pde3b	Pde2a	Pde8b	Pde9a
Microglía	33,6	9,6	2	0,5
Células BV2	X	0,2	X	X

Otros, pérdida de expresión

	Pde4d	Pde1a	Pde10a	Pde7b
Microglía	0,4	0,3	0,3	0,3
Células BV2	X	X	X	X

No en la microglía

	Pde1c	Pde10a	Pde7b
Microglía	X	X	X
Células BV2	X	1,2	X

10

EJEMPLO 4

Efecto sobre la expresión de IL1 β en células derivadas de la microglía

15 Las células BV2 se incuban con (i) LPS (10 microgramos/ml), (ii) Compuesto 214 (10 microgramos/ml), o (iii) LPS y Compuesto 214. Los niveles de IL1 β se miden usando PCR cuantitativa de ARNm de IL1 β . IL1 β se considera un marcador de inflamación. Los resultados se representan en la Figura 2 (RQ: cuantificación relativa de cambios en la expresión génica en muestras tratadas frente a control; ***p<0,01 frente a control, \sqrt p<0,01 frente a LPS solo; ANOVA con prueba post-hoc de Newman-Keuls). Por lo tanto, la administración de un inhibidor de PDE1 de la presente invención atenúa significativamente el aumento inducido por LPS en la expresión de IL1 β en células derivadas de la microglía.

20 EJEMPLO 5

Efecto sobre la expresión de IL1 β en hipocampo in vivo

25 A los ratones se les inyecta (i) LPS (2 mg/kg, sc), (ii) Compuesto 214 (10 mg/kg, ip), o (iii) LPS y Compuesto 214. A las seis horas posteriores a la inyección, los niveles de IL1 β en el hipocampo se miden mediante PCR cuantitativa de ARNm de IL1 β . IL1 β se considera un marcador de inflamación. Los datos se presentan en la Figura 3 (***p<0,01 frente a LPS solo, ANOVA con prueba post-hoc de Newman-Keuls). El efecto *in vivo* es similar a la observada en las células BV2: la administración de un inhibidor de PDE1 de la presente invención atenúa significativamente el aumento inducido por LPS en la expresión de IL1 β en el cerebro.

EJEMPLO 6 - Efecto sobre la expresión génica neuroinflamatoria en células BV2

La administración de un inhibidor de PDE1 de la presente invención (Compuesto 214) a 10 μ M reduce significativamente el aumento inducido por LPS en la expresión de las citocinas inflamatorias IL1 β , TNF α y Ccl2 en células BV2, medido mediante PCR cuantitativa, como se describe en el Ejemplo 4 con respecto a IL1 β . El inhibidor de PDE4, rolipram, muestra un perfil diferente, aumentando la expresión de IL1 β , mientras reduce la expresión de TNF- α y Ccl2. Los datos se presentan en la Figura 4a.

En un experimento separado, la administración de un inhibidor de PDE1 de la presente invención (Compuesto 214) reduce en gran medida o mitiga los cambios inducidos por LPS en los marcadores proinflamatorios en células BV2 (Figura 4b). Las células BV2 se tratan previamente con el compuesto ITI-214 o rolipram, un inhibidor de PDE4, luego se estimulan con 50 ng/ml de LPS durante 4 horas. Se miden los niveles de expresión de TNF, IL1 β , Ccl2 e IL6. Los niveles de ARNm normalizados se muestran como cambio del vehículo ($\Delta\Delta$ Ct) y se comparan usando un ANOVA unidireccional. Las líneas indican la media. * Significativamente diferente del vehículo, # Significativamente diferente del LPS. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Los transcritos de ARNm para TNF, IL1 β y Ccl2: tres de las cuatro citocinas estudiadas *in vivo* - estaban elevados en células BV2 tratadas con 50 ng/ml de LPS. Las señales de ARNm para TNF y Ccl2 se redujeron significativamente por el tratamiento con ITI-214 (10 μ M), y la señal de ARNm de IL1 β tendió a la baja.

EJEMPLO 7 - Inhibición de la liberación de TNF α inducida por LPS de células BV2

La inhibición de PDE1 reduce la expresión del gen TNF α inducido por LPS y la liberación de las células BV2,

Liberación de TNF α : Los niveles de TNF α se miden en medios acondicionados con BV2 y se normalizan a los niveles de proteína celular. La inhibición de la liberación de TNF α inducida por LPS de células BV2 se representa en la Figura 5. El panel izquierdo muestra células BV2 tratadas con Compuesto 214 10 μ M y LPS 50 ng/ml (ANOVA unidireccional, * $p < 0,05$, Vehículo $n = 16$, LPS $n = 31$, LPS+214 $n = 14$). El panel de la derecha muestra una inhibición dependiente de la dosis de la liberación de TNF α inducida por LPS (50 ng/ml de estimulación con LPS) en respuesta al Compuesto 214 (medida como % de inhibición de la respuesta total de LPS por experimento).

Expresión del gen TNF α : La figura 6 muestra que esta reducción dependiente de la dosis de la liberación de TNF α medida en el medio corresponde a una reducción en la expresión del ARNm de TNF α .

EJEMPLO 8 -

Efecto sobre la expresión génica neuroinflamatoria en células BV2 y en el estriado de ratón in vivo

Los efectos de un inhibidor selectivo de PDE1 (Compuesto 214) se prueban en células BV2 estimuladas con LPS mediante *medición* cambios en la liberación de citocinas usando ELISA y en la expresión génica usando RT-qPCR y RNA-Seq. (Experimento A ($n = 4$): (1) Vehículo; (2) Compuesto 214 10 μ M; (3) LPS 50 ng/ml; (4) LPS 50 ng/ml + Compuesto 214 10 μ M; Experimento B ($n = 2$): (1) LPS 50 ng/ml; (2) LPS 50 ng/ml + Compuesto 214 10 μ M; (3) LPS 50 ng/ml + Rolipram 10 μ M (un conocido inhibidor potente de la PDE4)). El compuesto de prueba se añade primero, el LPS se agrega una hora más tarde y las células y/o los medios se recolectan a las cinco horas del comienzo del experimento.

La inhibición de PDE1 previene los aumentos inducidos por LPS en la liberación de TNF α en células BV2. De manera similar, los aumentos inducidos por LPS en la expresión de ARNm de TNF α , IL-1 β y Ccl2 se reducen en >50% tanto en células BV2 como en ratones ($p < 0,01$) tras la inhibición de PDE1. Para comprender mejor las acciones de la inhibición de PDE1 en la microglía en reposo y activada por LPS, examinamos la regulación transcripcional utilizando RNA-Seq. Se identifica un subconjunto de genes cuya expresión de transcripción cambia significativamente con la inhibición de PDE1. Usando el software de ontología de genes (AmiGO 2), se ve que estos genes están significativamente enriquecidos ($p < 0,05$) en las vías de migración y extravasación celular, así como en las vías inflamatorias. De los genes inducidos por LPS, un subconjunto es atenuado por la inhibición de PDE1, todos los cuales están significativamente asociados con vías inflamatorias ($p < 0,05$). La inhibición de PDE4 atenúa un *diferente* subconjunto de genes inducidos por LPS, lo que demuestra las propiedades únicas de nuestro objetivo (alrededor del 17% de superposición con la inhibición de PDE1).

Células: Línea celular microglial de ratón BV2 (ICLC, Italia) cultivada en FBS inactivado por calor al 2% o al 10%.

ELISA TNF α : Thermo Fisher mouse TNF α colorimétrico, kit ELISA tipo sándwich. Valores interpolados de la curva estándar. La respuesta a la dosis se ajusta a una curva logística de 4 parámetros.

RTqPCR: ARN de células BV2 purificadas con RNeasyKit (Qiagen) y de tejido de ratón con TRIzol (Ambion). Ensayos de sonda con cebador TaqMan de Thermo Fisher. Los niveles de ARNm para todas las condiciones se normalizan a GAPDH y al control del vehículo ($\Delta\Delta$ Ct). Los datos se analizan estadísticamente utilizando ANOVA unidireccional con la prueba posterior de Bonferroni para comparaciones múltiples.

Nuestros resultados indican que la inhibición de PDE1 regula la actividad en la microglía, lo que reduce la expresión de genes inflamatorios, lo que proporciona una justificación para usar inhibidores de PDE1 para tratar la neuroinflamación tóxica.

5 RNaseq: Flashfreeze BV2cells, aísle el ARN, prepare una biblioteca mediante la selección de poliA y realice una secuenciación de lectura única de 1 x 50 pb en Illumina HiSeq 2500 en modo de alto rendimiento (utilizando la química V4). Los genes se asignan al genoma de referencia (GRCm38) utilizando CLC Genomics Server. Número de lecturas por muestra promedio ~17 millones. El análisis de la expresión génica diferencial se realiza utilizando el software DESeq2 (Bioconductor.org). Los genes expresados diferencialmente ($p < 0,01$, Waldtest) se informan como log2 (cambio de veces).

10 La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados iniciales de la expresión de biomarcadores neuroinflamatorios tanto en células BV2 como en estriado de ratón sujeto a la administración de LPS en presencia o ausencia de un inhibidor de PDE1 (Compuesto 214) o un inhibidor de PDE4 (rolipram). Los resultados se basan en una evaluación de muestras utilizando Q-PCR.

	inhibidor BV2 + LPS PDE1			Estriado PDE1 de Ratón + LPS		
	rolipram			rolipram		
biomarcador				inhibidor		
Factor de necrosis tumoral	UP	Abajo	Abajo	UP	NC	Abajo
Interleukina 1 beta	UP	Abajo	UP UP	UP	NC	UP UP
Interleukina 6	NC	NC	NC	NC	NC	UP UP
Ligando 2 del Motivo de quimiocina (C-C)	UP	Abajo	Abajo	UP	Abajo	Abajo
Factor inhibidor de la leucemia	NC	NC	UP	NC	NC	NC
Oncostatina M	NC	UP	UP	UP	Abajo	Abajo

15 La administración de un inhibidor de PDE1 de la presente invención se correlaciona con una disminución o ausencia de cambios en la expresión de biomarcadores: IL1 β , TNF- α y Ccl2 en comparación con las muestras tratadas solo con LPS. Curiosamente, el perfil antiinflamatorio del inhibidor de PDE1 es bastante diferente al del inhibidor de PDE4,

20 Los datos de un experimento adicional que mide el efecto de la inhibición de PDE1 sobre la expresión del gen inflamatorio en el estriado de ratón se representan en la Figura 7, Se tratan ratones adultos (de al menos 2 meses de edad, C57BL/6 macho) con el Compuesto 214 (10 mg/kg i.p.) y LPS (500 μ g/kg s.c.), y se sacrificaron después de dos horas. El tejido estriatal se aísla y se congela instantáneamente, y se extrae el ARN. Las mediciones de RT-qPCR se muestran como log2 cambio de veces ($2\Delta\Delta Ct$). $n=4$ * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$,

Otros efectos sobre la expresión génica neuroinflamatoria en células BV2 y en el estriado de ratón in vivo

25 Además de confirmar que el inhibidor de PDE1 inhibe la estimulación por LPS de las citocinas proinflamatorias TNF α , Ccl2, IL-1 β e IL-6, se observa que el inhibidor de PDE1 mejora significativamente la expresión de la citocina antiinflamatoria IL-10,

30 Los datos de otro experimento más que mide el efecto de la inhibición de PDE1 sobre la expresión del gen inflamatorio en el estriado de ratón se representan en la Figura 8, Los ratones adultos se tratan con vehículo (barras blancas), 500 μ g/kg LPS s.c. (barras grises), o 10 mg/kg (Compuesto 214) i.p. y 500 μ g/kg LPS s.c. (barras negras) durante 2 horas ($n = 4$). El tejido estriatal se analiza en busca de niveles de ARNm de TNF, IL1 β , Ccl2 e IL6, Los niveles de expresión se muestran como cambios en la señal de Q-PCR del vehículo ($\Delta\Delta Ct$) y se comparan mediante ANOVA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$,

35 Los solicitantes miden los niveles de ARNm de cuatro marcadores inflamatorios comunes (TNF, IL1 β , Ccl2 e IL6) usando PCR cuantitativa (Figura 8). En ratones adultos tratados con 500 μ g/kg de LPS s.c. durante 2 horas, los niveles de expresión de ARNm de los cuatro marcadores aumentan significativamente según se mide en muestras de tejido aislado del cuerpo estriado (Fig. 8). Una dosis de 10 mg/kg (Compuesto 214) que se administra i.p. atenúa la expresión

de TNF y Ccl2, En este experimento, los niveles de IL1-beta e IL6 también tendieron a niveles más bajos, pero no alcanzaron significación.

Procesos biológicos asociados con la inhibición de PDE1 en células BV2

Experimento 1

5 La siguiente tabla (Tabla 1) destaca los procesos biológicos asociados con la inhibición de PDE1 en células BV2, mediante el análisis de genes expresados diferencialmente en comparaciones de Compuesto 214 del Experimento A y comparaciones de Rolipram del Experimento B, contra una base de datos de funciones genéticas. El análisis de ontología génica se genera utilizando la versión de software AmiGO2: 2,4,24 ejecutando PANTHER.PANTHER Overrepresentation Test (versión 20160715). Base de datos de GO Ontology Publicada el 27 de octubre de 2016,
10 Lista de referencia = Mus musculus (todos los genes en la base de datos). Corrección de Bonferroni. Los procesos biológicos que se muestran son encabezados en vista jerárquica ($p < 0,05$).

Tabla 1

Aumento con Compuesto 214 vs Vehículo

Proceso biológico	ID de ruta	P-Valor
regulación positiva de la respuesta inflamatoria	GO:0050729	3,83E-05
migración de leucocitos	GO:0050900	3,15E-04
migración de leucocitos implicada en la respuesta inflamatoria	GO:0002523	1,09E-03
regulación positiva de la producción de interleucina-8	GO:0032757	3,00E-03
regulación de la extravasación celular	GO:0002691	5,90E-03
quimiotaxis de leucocitos	GO:0030595	8,30E-03
regulación positiva de la extravasación celular	GO:0002693	3,89E-02

Disminución con Compuesto 214 vs Vehículo

Proceso biológico	ID de Ruta	P-Valor
respuesta celular al lipopolisacárido	GO:0071222	2,15E-02
regulación de la activación de linfocitos	GO:0051249	3,29E-02
diferenciación de leucocitos	GO:0002521	3,45E-02
regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa basada en la recombinación somática de receptores inmunitarios construidos a partir de dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas	GO:0002822	3,58E-02

Aumento con el compuesto 214 frente al subconjunto vehículo de genes altamente expresados en microglía

(FPKM >10, RNA-Seq cerebral

base de datos)

Proceso biológico	ID de ruta	P-Valor
regulación positiva de la respuesta inflamatoria	GO:0050729	7,50E-04
quimiotaxis de leucocitos	GO:0030595	2,63E-02

Aumento con Compuesto 214 vs Vehículo

Proceso biológico	ID de ruta	P-Valor
regulación positiva de la adhesión célula-célula	GO:0022409	2,88E-02
respuesta inflamatoria	GO:0006954	1,36E-02
homeostasis celular de iones metálicos	GO:0006875	2,42E-02
regulación positiva del proceso apoptótico	GO:0043065	1,29E-02

Aumento con LPS vs Vehículo, Disminución con LPS + ITI-214 frente a LPS

Proceso biológico	ID de ruta	P-Valor
regulación positiva del proceso del sistema inmunológico	GO:0002684	3,98E-08
respuesta celular al lipopolisacárido	GO:0071222	4,69E-05
respuesta inflamatoria	GO:0006954	4,87E-05
respuesta a la citocina	GO:0034097	3,68E-03
regulación positiva de la respuesta inflamatoria	GO:0050729	1,08E-02
regulación positiva del proceso biosintético de citocinas	GO:0042108	1,59E-02
regulación positiva de la muerte celular	GO:0010942	1,94E-02
regulación positiva de la producción del factor de necrosis tumoral	GO:0032760	2,45E-02

Aumento con LPS vs Vehículo, Disminución con LPS + Rolipram frente a LPS

Proceso biológico	ID de ruta	Valor P
respuesta celular al estímulo de citocinas	GO:0071345	4,31E-03
quimiotaxis de macrófagos	GO:0048246	6,39E-03
migración de leucocitos	GO:0050900	2,18E-02
regulación positiva de la actividad GTPasa	GO:0043547	3,92E-02

Aumento con LPS vs Vehículo, Aumento con LPS + Rolipram frente a LPS

Proceso biológico	Identificación de ruta	de Valor P
regulación negativa de la secreción por la célula	GO:1903531	2,73E-02

Experimento 2

5 En otro experimento más, utilizando AmiGO, la siguiente tabla (Tabla 2) analiza las vías reguladoras afectadas por LPS e ITI-214 en experimentos de RNAseq en células BV2. En general, se cree que los cambios de tipo de proceso primario por LPS, y pueden atenuarse con la inclusión de ITI-214, se relacionan con la inflamación, la expresión de citocinas y las respuestas celulares a LPS (Tabla 2). En general, se cree que los genes expresados diferencialmente asociados con el tratamiento con ITI-214 en relación con el vehículo se asocian con procesos relacionados con la quimiotaxis y la migración. Se cree que los genes que responden solo a la combinación de LPS e ITI-214 demuestran un enriquecimiento de los procesos biológicos relacionados con la replicación del ADN, el ciclo mitótico y la reparación del ADN.

10

Tabla 2

<i>Vehículo vs Compuesto 214</i>			
Proceso biológico	ID de ruta	Enriquecimiento de pliegues	p-valor
regulación positiva del proceso biosintético del factor de necrosis tumoral	GO:0042535	15,17	3,15E-02
vía de señalización del receptor tipo toll	GO:0002224	7,53	3,40E-03
replicación de ADN dependiente de ADN	GO:0006261	5,94	8,05E-05
quimiotaxis de neutrófilos	GO:0030593	5,83	3,88E-02
respuesta celular al lipopolisacárido	GO:0071222	5,82	3,14E-07
regulación de la mineralización ósea	GO:0030500	5,48	2,71E-02
regulación positiva de la respuesta inflamatoria	GO:0050729	5,43	2,97E-04
regulación positiva de la migración de leucocitos	GO:0002687	4,27	8,12E-03
reparación de rotura de doble hebra	GO:0006302	3,78	4,03E-02
regulación del proceso metabólico de especies reactivas de oxígeno	GO:2000377	3,76	6,50E-03
respuesta inflamatoria	GO:0006954	3,5	1,69E-08
regulación positiva de la adhesión célula-célula leucocitaria	GO:1903039	3,45	4,07E-02
respuesta al ion metalico	GO:0010038	3,2	2,46E-02
diferenciación de leucocitos	GO:0002521	3,04	4,63E-04
regulación de la actividad MAP quinasa	GO:0043405	2,91	2,71E-02
respuesta celular al compuesto organonitrógeno	GO:0071417	2,82	5,72E-03
regulación de la hemopoyesis	GO:1903706	2,79	6,79E-03
activación de linfocitos	GO:0046649	2,79	2,00E-03
regulación negativa del proceso del sistema inmunológico	GO:0002683	2,71	3,69E-03
regulación negativa del ciclo celular	G0:0045786	2,64	2,13E-02
regulación positiva de la activación celular	GO:0050867	2,5	2,84E-02
regulación positiva del proceso apoptótico	GO:0043065	2,48	5,73E-04
proceso metabólico del ácido carboxílico	GO:0019752	2,41	4,72E-05
proceso apoptótico	GO:0006915	2,34	5,79E-05
proceso metabólico de organofosforados	GO:0019637	2,2	4,38E-03
respuesta al estímulo abiótico	GO:0009628	2,08	4,63E-03
regulación positiva de la proliferación celular	GO:0008284	2,06	4,99E-03
proceso metabólico de lípidos celulares	GO:0044255	2,04	4,09E-02
proceso metabólico de compuestos que contienen fosfato	GO:0006796	2,04	9,60E-08

ES 2 906 107 T3

<i>Vehículo vs Compuesto 214</i>			
Proceso biológico	ID de ruta	Enriquecimiento de pliegues	p-valor
regulación positiva de la actividad catalítica	GO:0043085	2	3,14E-03
respuesta inmune	GO:0006955	2	1,07E-03
Coestimulación de células T	GO:0031295	10,39	1,28E-02
vía de señalización del receptor tipo toll	GO:0002224	9,52	2,99E-07
citotoxicidad mediada por leucocitos	GO:0001909	7,93	7,24E-03
regulación positiva del proceso biosintético de citocinas	GO:0042108	6,91	8,67E-05
regulación de la producción de interleucina-2	GO:0032663	6,47	5,06E-03
respuesta celular al lipopolisacárido	GO:0071222	5,49	1,53E-07
regulación positiva de la respuesta inflamatoria	GO:0050729	5,27	7,64E-05
regulación positiva de la producción del factor de necrosis tumoral	GO:0032760	5,26	6,81E-03
migración de granulocitos	GO:0097530	4,95	3,20E-02
quimiotaxis de leucocitos	GO:0030595	4,68	4,81E-04

ES 2 906 107 T3

<i>Vehículo vs Compuesto 214</i>			
Proceso biológico	ID de ruta	Enriquecimiento de pliegues	p-valor
regulación de la diferenciación de leucocitos mieloides	GO:0002761	4,6	6,24E-04
respuesta al ion calcio	GO:0051592	4,28	3,35E-02
regulación positiva de la migración de leucocitos	GO:0002687	4,14	2,99E-03
regulación positiva de la proliferación de linfocitos	GO:0050671	3,87	1,58E-02
activación de células B	GO:0042113	3,82	2,71E-03
regulación de la proliferación de células T	GO:0042129	3,75	3,66E-03
regulación de la respuesta inmunitaria adaptativa basada en la recombinación somática de receptores inmunitarios construidos a partir de dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas	GO:0002822	3,7	2,88E-02
respuesta inflamatoria	GO:0006954	3,67	1,65E-11
proceso metabólico de glicerolípidos	GO:0046486	3,3	3,75E-04
regulación de la señalización de I-kappaB quinasa/NF-kappaB	GO:0043122	3,28	9,84E-03

ES 2 906 107 T3

<i>Vehículo vs Compuesto 214</i>			
Proceso biológico	ID de ruta	Enriquecimiento de pliegues	p-valor
respuesta al virus	GO:0009615	3,24	2,08E-02
regulación de la fosforilación de peptidil-tirosina	GO:0050730	3,01	1,57E-02
regulación de la angiogénesis	GO:0045765	2,94	3,71E-02
vía de señalización mediada por citocinas	GO:0019221	2,91	1,80E-02
regulación negativa de la adhesión celular	GO:0007162	2,89	3,19E-02
proceso metabólico de los fosfolípidos	GO:0006644	2,79	3,78E-02
regulación de la actividad MAP quinasa	GO:0043405	2,73	3,61E-02
regulación positiva del proceso apoptótico	GO:0043065	2,69	7,61E-07
regulación negativa del proceso del sistema inmunológico	GO:0002683	2,64	1,47E-03
diferenciación de leucocitos	GO:0002521	2,56	2,74E-02
proceso efector inmune	GO:0002252	2,55	9,04E-05
regulación negativa de la fosforilación de proteínas	GO:0001933	2,42	3,00E-02
respuesta inmune innata	GO:0045087	2,36	3,26E-04

Vehículo vs Compuesto 214

Proceso biológico	ID de ruta	Enriquecimiento de pliegues	p-valor
regulación negativa de la transducción de señales intracelulares	GO:1902532	2,31	1,29E-02
respuesta de defensa a otro organismo	GO:0098542	2,21	2,19E-02
desarrollo vascular	GO:0001944	2,19	4,69E-02
regulación positiva de la actividad de la transferasa	GO:0051347	2,18	4,90E-02
regulación del proceso catabólico	GO:0009894	2,07	9,69E-03
transducción de señales intracelulares	GO:0035556	2,06	8,20E-07
Proceso apoptótico	GO:0006915	2,04	5,92E-03

Vehículo v. LPS + Compuesto 214 (excluyendo genes expresados de manera diferente también encontrados en Vehículo vs LPS o Vehículo vs. Compuesto 214)

Proceso biológico	ID de ruta	Enriquecimiento de pliegues	p-valor
síntesis de pseudouridina	GO:0001522	10,45	1,23E-02
proceso metabólico del nucleótido de pirimidina	GO:0006220	7,3	4,98E-02
replicación de ADN dependiente de ADN	GO:0006261	5	7,52E-05
segregación de cromátidas hermanas mitóticas	GO:0000070	4,05	3,36E-02
proceso metabólico del ARNt	GO:0006399	3,57	1,38E-03
reparación de ADN	GO:0006281	2,52	5,78E-04
proceso biosintético de organofosforados	GO:0090407	2,51	1,05E-02
regulación de la organización cromosómica	GO:0033044	2,45	4,74E-02
regulación del proceso del ciclo celular	GO:0010564	2,35	3,32E-04
regulación del ciclo celular mitótico	GO:0007346	2,33	1,00E-03
división celular	GO:0051301	2,23	1,01E-02

Respuesta de genes seleccionados a ITI-214

5 En otro experimento, se selecciona un grupo de genes para su posterior análisis mediante RT-qPCR. A modo de comparación, se analizan genes que han sido implicados en la literatura científica en la activación de microgliales y astrocitos, incluidos genes en la vía complementaria.

En este panel seleccionado que puede derivarse de experimentos de respuesta transcripcional, en términos generales, la mayoría de los genes se dividen en tres categorías generales:

10 aquellos fuertemente inducidos por LPS y atenuados o revertidos tras la inhibición de PDE1, aquellos predominantemente sensibles al Compuesto 214 y aquellos fuertemente inducidos por LPS y

responde débilmente al Compuesto 214, Estos patrones se muestran en gráficos de coordenadas paralelas en la Figura 9,

15 En un experimento, la Figura 10 demuestra cambios cuantificados en la expresión del gen diana después de tratar células BV2 con dosis variables de ITI-214. Una observación notable es que la modulación de las respuestas transcripcionales a LPS por ITI-214 depende de la dosis (Figura 10a). La Figura 10a muestra el cambio en los niveles de expresión de cada gen en células BV2 con 50 ng/ml de LPS y la dosis indicada de ITI-214. Los efectos dependientes de la dosis de ITI-214 en ausencia de estimulación con LPS se muestran en la Figura 10b. Todos los valores de la muestra se normalizan a un promedio de 3 genes de referencia y al control del vehículo ($\Delta\Delta Ct$). Las barras de error representan la media \pm SEM (n = 4). De izquierda a derecha, para cada grupo de citocinas, las barras indican muestras tratadas con: LPS, 214 0,1 μM + LPS, 214 0,4 μM + LPS, 214 1,1 μM + LPS, 214 3,3 μM + LPS, 214 10 μM + LPS, para cada gen particular que se muestra en el eje X. Cambios significativos entre LPS y ITI-214 10 μM + LPS

(A) y Vehículo e ITI-214 10 μ M (B) están marcados en los nombres de los genes del eje X y se calculan utilizando un ANOVA unidireccional. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$,

Efecto de AMPc y GMPc sobre la inhibición de LPS dependiente de ITI-214; activadores

5 Para investigar la actividad dependiente de GMPc del inhibidor de PDE1 de la presente invención (Compuesto 214), puede estimarse la actividad de guanilil ciclasa de partículas con péptido natriurético auricular (ANP) o la actividad de guanilil ciclasa soluble, con donante de óxido nítrico DEANO. En un experimento particular, las células BV2 se tratan con forskolina (FSK) 10 μ M para activar las adenilil ciclasas, DEANO 5 μ M para activar la guanilil ciclasa soluble o péptido natriurético atrial (ANP) 100 nM para activar la guanilil ciclasa en partículas. Solos, se cree que estos activadores tienen poco o ningún efecto sobre la inducción de LPS de los genes seleccionados. Al combinar forskoline con ITI-214, se pueden aumentar algunos de los efectos de la inhibición de ITI-214. Por ejemplo, los siguientes transcritos sensibles a ITI-214 se modulan más hacia abajo o hacia arriba por la forskolina concomitante: receptor de quimiocinas Cx3cr1, citocinas Csf2 y TNF, quimiocina Ccl4, cinasa MAPKAPK2, fosfatasa PtpN6, receptor de quimiocinas Ccr1, Citocina LIF, demuestra una mayor expresión con LPS y aumenta aún más con ITI-214. Sin embargo, LIF vuelve a la expresión de nivel LPS cuando se añade forskolina. Los datos se muestran en la Fig. 11a.

15 Las respuestas al tratamiento con DEANO junto con ITI-214 coinciden estrechamente con las respuestas observadas con forskoline e ITI-214, e indican que la mejora de ITI-214 de la señalización de GMPc o AMPc puede revertir la inducción de LPS. No se cree que haya respuestas equivalentes al tratamiento con ANP e ITI-214. Esto posiblemente indica que conjuntos distintos de GMPc (citósolico versus asociado a membrana) gobiernan ciertas respuestas transcripcionales a la inhibición de PDE1. Se cree que hay respuestas equivalentes tras la adición de DEANO, FSK o ANP a ITI-214 para las siguientes citocinas: Cx3cr1, Csf2, PtpN6 y Ccr1 y LIF. Ccl4, TNF y MAPKAPK2 muestran una respuesta débil o nula a la adición de ANP al inhibidor de PDE1. Finalmente, las respuestas de ARNm a ITI-214 para la lectina de tipo C CD72 y el factor de transcripción Ddit3 son mejoradas selectivamente por ANP. Los datos se muestran en la Fig. 11a.

25 Dos transcritos en el panel, Cx3cr1 y Tgm2, tienen el cambio más dramático tras el tratamiento con ITI-214. La inducción de Cx3cr1 por LPS se redujo significativamente con el tratamiento con ITI-214, al igual que la expresión basal de este marcador en ausencia de LPS.

Efecto de AMPc y GMPc sobre la inhibición de LPS dependiente de ITI-214; inhibidores

30 La influencia de cada nucleótido cíclico (AMPc o GMPc) en la respuesta de ITI-214 al combinar la estimulación con LPS, la inhibición de ITI-214 de PDE1 y el inhibidor de PKA AMPcS-Rp (100 μ M) o el inhibidor de PKG-8-Br-PET-GMPcS (100 μ M). Al unirse a moléculas de señalización dependientes de nucleótidos cíclicos, estos análogos no proporcionan activación y previenen la activación por nucleótidos cíclicos auténticos. La reducción moderada del impacto de ITI-214 es la norma para estos inhibidores (Figura 11b). Tenga en cuenta que los niveles de expresión génica tras la adición de inhibidor de PKA o PKG a ITI-214 10 μ M son del orden de los relativos al tratamiento con LPS solo y se redujeron a niveles equivalentes a ITI-214 3,3 μ M. Los datos se muestran en la Fig. 11b.

35 **EJEMPLO 9 - Efecto sobre la inflamación inducida por el estrés**

Este experimento compara el impacto del estrés crónico en el perfil de citocinas/quimiocinas del cerebro en ratones de tipo salvaje frente a ratones knockout condicionales para PDE1B. Evaluar el efecto de un inhibidor de PDE1 de la presente invención (Compuesto 214) sobre los cambios de citocinas inducidos por estrés en este modelo en ratones de tipo salvaje y knockout para PDE1B nos permite confirmar que el efecto del inhibidor de PDE1 es específico para PDE1B.

40 Los ratones knockout condicionales para PDE1B se describen en Siuciak JA, et al. "Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the phosphodiesterase-1B (PDE1B) enzyme." *Neuropharmacology*. julio de 2007; 53(1):113-24. Los protocolos para CUS y otros modelos de estrés crónico se describen en Monteiro, et al., "An Efficient Chronic Unpredictable Stress Protocol to Induce Stress-Related Responses in C57BL/6 Mice", *Front Psychiatry*. 2015; 6: 6 y en Mann et al., "Chronic social defeat, but not restrain stress, alters bladder function in mice" *Physiol. Behav.* 2015; 150: 83-92,

45 Generalmente, los ratones de tipo salvaje (control) y los ratones knockout condicionales para PDE1B, según corresponda, se exponen al estrés crónico mediante el uso de un modelo de restricción de estrés en aguas poco profundas (RSSW) como se describe anteriormente por Mann et al (2015). Para RSSW (21 días), los ratones se tratan diariamente con vehículo o Compuesto 214 (10 mg/kg, i.p. o p.o.), luego se colocan en un tubo cónico perforado con las patas sumergidas en agua durante 4 horas y después se devuelven a jaulas individuales. Los ratones de control para estos experimentos también se mantienen en jaulas de alojamiento individuales. De acuerdo con el protocolo de estrés, los ratones son monitoreados para el perfil de comportamiento similar a la depresión. A continuación, se sacrifican los ratones y se recogen muestras de tejido. El cerebro se disecciona rápidamente (bajo condiciones para conservar el ARNm) y se congela a -80 °C para su envío a ITI. La sangre se recoge en el sacrificio, se prepara para el suero. El tejido cerebral y el suero se analizan en busca de un panel de marcadores, incluyendo citocinas y quimiocinas proinflamatorias y antiinflamatorias.

A) Efecto del protocolo CUS sobre marcadores neuroinflamatorios:

Los ratones C57B1/6 se someten al protocolo CUS (14d, como se describe) o al tratamiento simulado, se evalúan comportamientos similares a la depresión en puntos de tiempo específicos y se sacrifican para la recolección de sangre (preparación de suero) y recolección de cerebro. El suero se analiza para los niveles de corticosterona (CORT) y otros marcadores inflamatorios. El cerebro se analiza en busca de un panel de marcadores inflamatorios mediante qPCR (ARNm) y MSD (proteína). El protocolo CUS eleva significativamente los niveles séricos y del SNC de citocinas/quimiocinas proinflamatorias en paralelo con la inducción de comportamientos similares a la depresión en ratones normales.

B) Efecto de un inhibidor de PDE1 sobre marcadores inflamatorios séricos y cerebrales inducidos por estrés:

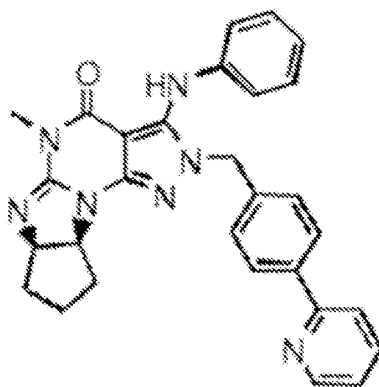
Las cohortes de ratones C57B1/6 (WT para PDE1B KO) se someten al protocolo CUS (14d, como se describe) o el tratamiento simulado recibirá una dosificación diaria con el Compuesto 214 (10 mg/kg, i.p.) o vehículo. Los ratones se evalúan en busca de comportamientos similares a la depresión en un punto de tiempo específico para probar el impacto del protocolo CUS y del tratamiento con inhibidores de PDE1 en el fenotipo similar a la depresión. Los ratones se sacrifican inmediatamente para la recogida de sangre (preparación de suero) y recogida de cerebro. El suero se analiza para determinar los niveles de CORT y otros marcadores inflamatorios. Las muestras de cerebro se analizan para un panel de marcadores inflamatorios mediante qPCR (ARNm) y MSD (proteína). El inhibidor de PDE1 suprime significativamente los marcadores séricos y del SNC inducidos por CUS (proinflamatorios) y la expresión de comportamientos similares a la depresión en ratones normales.

C) Efecto de PDE1B KO en marcadores cerebrales y séricos inducidos por estrés:

Se tratan cohortes de ratones WT y PDE1B KO y se someten al protocolo CUS o al tratamiento simulado, ya sea con dosificación diaria con el Compuesto 214 (10 mg/kg, i.p.) o vehículo. Los ratones se evalúan en busca de comportamientos similares a la depresión en un punto de tiempo específico para probar el impacto del protocolo CUS y el tratamiento del inhibidor de PDE1 en el fenotipo similar a la depresión. Los ratones se sacrifican inmediatamente para la recogida de sangre (preparación de suero) y recogida de cerebro. El suero se analiza para los niveles de CORT y otros marcadores inflamatorios, y las muestras de cerebro también se analizan para un panel de marcadores inflamatorios mediante qPCR (ARNm) y MSD (proteína). Los ratones PDE1B KO presentan marcadores séricos y del SNC inducidos por CUS significativamente suprimidos (proinflamatorios). Además, la expresión de comportamientos similares a la depresión que se observan en ratones normales (es decir, que han estado sujetos al protocolo CUS) se reducen en el KO. El inhibidor de PDE1 en estos marcadores y comportamientos tisulares y séricos no tiene un efecto significativo en los ratones PDE1B KO.

EJEMPLO 10 – Efectos en el modelo de lesión del nervio óptico

Se prueba un compuesto inhibidor de PDE1 en un modelo de lesión del nervio óptico (es decir, el modelo de “aplastamiento óptico”). Los estudios que se describen a continuación se llevan a cabo utilizando el inhibidor selectivo de la PDE1 IC200041, que tiene la siguiente estructura:



En este modelo, las cirugías del nervio óptico se llevan a cabo en ratones machos de 8 semanas de edad (peso corporal promedio, 20-26 g) bajo anestesia general, como se describió anteriormente (Yin Y, et al., *Oncomodulin links inflammation to optic nerve regeneration. Proc Natl Acad Sci U SA. 2009; 106:19587-19592*). Después de la lesión nerviosa, se extraen 3 µl de líquido del ojo y se inyecta intraocularmente una disolución que contiene el compuesto inhibidor de PDE1,

Se tratan un total de 4 retinas de ratón con el inhibidor de PDE1 y se administra disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a un total de 10 retinas de ratón como control. Los ratones normalmente se sacrifican con una sobredosis de anestesia 14 días después de la lesión del nervio óptico y se perfunden con solución salina y paraformaldehído al 4% (PFA). Estos ratones tienen 10 semanas cuando se sacrifican. Los nervios ópticos y los ojos se diseccionan y se fijan posteriormente en PFA. Los nervios se impregnan con sacarosa al 10% y después al 30%, se incluyen en OCT

5 Tissue Tek Medium (Sakura Finetek), se congelan, se cortan en el plano longitudinal con un espesor de 14 μm y se montan en portaobjetos recubiertos. Los axones en regeneración se visualizan mediante tinción con un anticuerpo de oveja contra GAP-43 seguido de un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. Los axones se cuentan manualmente en al menos 8 secciones longitudinales por caso a distancias predeterminadas del sitio de la lesión, y estos números se convierten en el número de axones en regeneración a varias distancias.

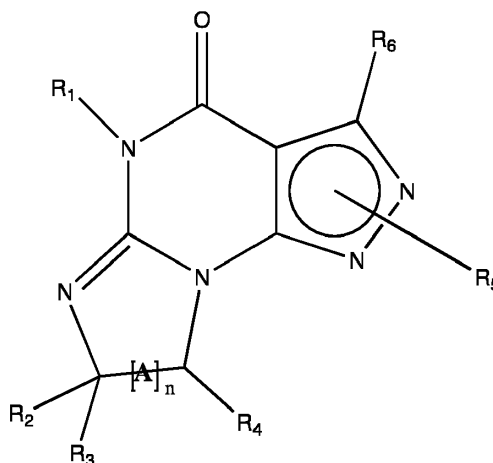
10 Después de la agresión retiniana, el análisis cuantitativo muestra que la expresión de PDE en las células ganglionares de la retina aumenta considerablemente. El ARN mensajero (ARNm) para PDE1B en particular se regula al alza unas cuatro veces después de la lesión. El ARN se extrae del tejido mediante métodos estándar y el ARNm se cuantifica mediante métodos de secuenciación cuantitativa de RNAseq. El ARNm estándar para beta actina y cuatro receptores de glutamato, denominados NMDA R1 y AMPAK R1, R2 y R3, se evalúan en paralelo y no muestran cambios significativos.

IC200041 es muy eficaz para aumentar la supervivencia de las células ganglionares de la retina en comparación con el control de PBS. Además, la diferencia en las células ganglionares de la retina de control y las tratadas con IC200041 es estadísticamente significativa. Los datos se muestran en la Figura 12.

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de PDE1 para uso en el tratamiento o profilaxis de neuroinflamación y/o enfermedades o trastornos asociados con neuroinflamación y/o función microglial que comprende la administración de un inhibidor de PDE1 a un paciente que lo necesite, en donde el inhibidor de PDE1 es:

5 A. un compuesto de Fórmula V:



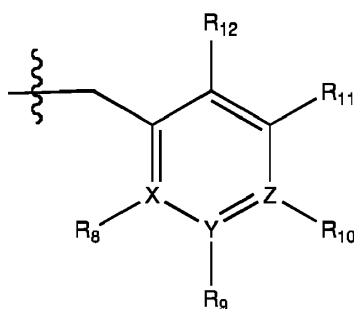
Fórmula V

en donde

(I) R₁ es H o alquilo C₁₋₄ (p. ej., metilo);

10 (ii) R₄ es H o alquilo C₁₋₄ y R₂ y R₃ son, independientemente, H o alquilo C₁₋₄ (p. ej., R₂ y R₃ ambos son metilo, o R₂ es H y R₃ es isopropilo), arilo, heteroarilo, (opcionalmente hetero)arilalcoxi u (opcionalmente hetero)arilalquilo; o R₂ es H y R₃ y R₄ juntos forman un puente di-, tri- o tetrametileno (pref. en donde el R₃ y R₄ juntos tienen la configuración *cis*, p. ej., donde los carbonos que llevan R₃ y R₄ tienen las configuraciones R y S, respectivamente);

15 (iii) R₅ es un heteroarilalquilo sustituido, p. ej., sustituido con haloalquilo o R₅ está unido a uno de los nitrógenos en la porción de pirazolo de Fórmula V y es un resto de Fórmula A:



Fórmula A

20 en donde X, Y y Z son, independientemente, N o C, y R₈, R₉, R₁₁ y R₁₂ son independientemente H o halógeno (p. ej., Cl o F), y R₁₀ es halógeno, alquilo, cicloalquilo, haloalquilo (p. ej., trifluorometilo), arilo (por ejemplo, fenilo), heteroarilo (por ejemplo, piridilo (p. ej., pirid-2-ilo) o tiadiazolilo (p. ej., 1,2,3-tiadiazol-4-il)), diazolilo, triazolilo, tetrazolilo, arilcarbonilo (p. ej., benzoílo), alquilsulfonilo (p. ej., metilsulfonilo), heteroarilcarbonilo o alcocarbonilo; siempre que cuando X, Y o Z sea nitrógeno, R₈, R₉, o R₁₀, respectivamente, no está presente; y

(iv) R₆ es H, alquilo, arilo, heteroarilo, arilalquilo (p. ej., bencilo), arilamino (p. ej., fenilamino), heteroarilamino, N,N-dialquilamino, N,N-diarilamino o N-aril-N-(arilalquil)amino (p. ej., N-fenil-N-(1,1'-bifen-4-ilmetil)amino); y

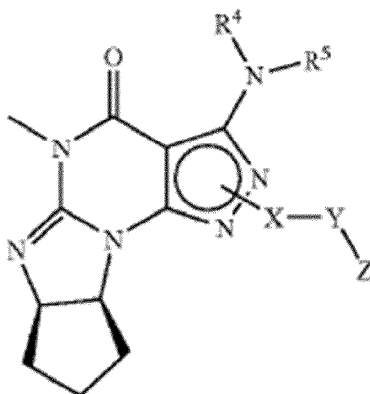
25 (v) n=0 o 1;

(vi) cuando n=1, A es -C(R₁₃R₁₄)-

en donde R₁₃ y R₁₄, son, independientemente, H o alquilo C₁₋₄, arilo, heteroarilo, (opcionalmente hetero)arilalcoxi o (opcionalmente hetero)arilalquilo;

en libre, sal o enantiómeros, diastereoisómeros y racematos;

B. un compuesto de Fórmula VII:



5

Fórmula VII

(i) X es alquileno C₁₋₆ (p. ej., metileno, etileno o prop-2-in-1-ileno);

(ii) Y es un enlace sencillo, alquileno (p. ej., -C≡C-), arileno (p. ej., fenileno) o heteroarileno (p. ej., piridileno);

10

(iii) Z es H, arilo (p. ej., fenilo), heteroarilo (p. ej., piridilo, p. ej., pirid-2-ilo), halo (p. ej., F, Br, Cl), halo alquilo C₁₋₆ (p. ej., trifluorometilo), -C(O)-R¹, -N(R²)(D³), o cicloalquilo C₃₋₇ que contiene opcionalmente al menos un átomo seleccionado de un grupo que consta de N u O (p. ej., ciclopentilo, ciclohexilo, tetrahidro-2H-piran-4-ilo o morfolinilo);

(iv) R¹ es alquilo C₁₋₆, halo alquilo C₁₋₆, -OH o -O alquilo C₁₋₆ (p. ej., -OCH₃);

(v) R₂ y R₃ son independientemente H o alquilo C₁₋₆;

15

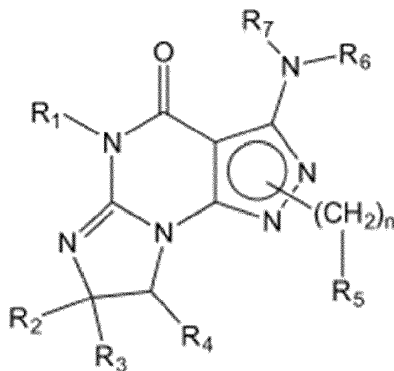
(vi) R⁴ y R⁵ son independientemente H, alquilo C₁₋₆ o arilo (p. ej., fenilo) opcionalmente sustituido con uno o más halo (p. ej., fluorofenilo, p. ej., 4-fluorofenilo), hidroxilo (p. ej., hidroxifenilo, p. ej., 4-hidroxifenilo o 2-hidroxifenilo) o alcoxi C₁₋₆;

20

(vii) en donde X, Y y Z están independientemente y opcionalmente sustituidos con uno o más halo (p. ej., F, Cl o Br), alquilo C₁₋₆ (p. ej., metilo), halo alquilo C₁₋₆ (p. ej., trifluorometilo), p. ej., Z es heteroarilo, p. ej., piridilo sustituido con uno o más halo (p. e., 6-fluoropirid-2-ilo, 5-fluoropirid-2-ilo, 6-fluoropirid-2-ilo, 3-fluoropirid-2-ilo, 4-fluoropirid-2-ilo, 4,6-dicloropirid-2-ilo), halo alquilo C₁₋₆ (p. ej., 5-trifluorometilpirid-2-ilo) o alquilo C₁₋₆ (p. ej., 5-metilpirid-2-ilo), o Z es arilo, p. ej., fenilo, sustituido con uno o más halo (p. ej., 4-fluorofenilo),

en forma de sal libre farmacéuticamente aceptable; o

C. un compuesto de Fórmula XII:



Fórmula XII

en donde

(i) R₁ es H o alquilo C₁₋₄ (p. ej., metilo o etilo);

(ii) R₂ y R₃ son independientemente H o alquilo C₁₋₆ (p. ej., metilo o etilo);

(iii) R₄ es H o alquilo C₁₋₄ (p. ej., metilo o etilo);

5 (iv) R₅ es arilo (p. ej., fenilo) opcionalmente sustituido con uno o más grupos seleccionados independientemente de -C(=O)- alquilo C₁₋₆ (p. ej., -C(=O)-CH₃) y hidroxialquilo C₁₋₆ (p. ej., 1-hidroxietilo);

10 (v) R₆ y R₇ son independientemente H o arilo (p. ej., fenilo) opcionalmente sustituidos con uno o más grupos seleccionados independientemente de alquilo C₁₋₆ (p. ej., metilo o etilo) y halógeno (p. ej., F o Cl), p. ej., fenilo no sustituido o fenilo sustituido con uno o más halógenos (p. ej., F) o fenilo sustituido con uno o más alquilo C₁₋₆ y uno o más halógenos o fenilo sustituido con un alquilo C₁₋₆ y un halógeno, p. ej., 4-fluorofenilo o 3,4-difluorofenilo o 4-fluoro-3-metilfenilo; y

(vi) n es 1, 2, 3 o 4,

en forma libre o de sal.

15 2. Un inhibidor de PDE1 para uso según la reivindicación 1, en donde el inhibidor de PDE1 inhibe la actividad de PDE1 con un IC₅₀ de menos de 10 nM, preferiblemente en donde el inhibidor de PDE1 no inhibe la actividad de tipos de PDE distintos de PDE1, preferiblemente en donde el inhibidor de PDE1 tiene un IC₅₀ al menos 1000 veces mayor para tipos de PDE distintos de PDE1,

20 3. Un inhibidor de PDE1 para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la neuroinflamación y/o las enfermedades o los trastornos asociados con la neuroinflamación y/o la función microglial, p. ej., se seleccionan entre:

a. afecciones neurodegenerativas tales como enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y afecciones desmielinizantes, por ejemplo, esclerosis múltiple (EM) y enfermedades priónicas;

b. hipoxia, hemorragia intracerebral o lesión cerebral traumática;

25 c. afecciones se caracteriza por la producción y/o respuesta anormal de neurotransmisores, incluyendo depresión, esquizofrenia, trastorno de estrés postraumático, ansiedad, trastorno por déficit de atención y enfermedad bipolar; p. ej., donde cualquiera de los anteriores está asociado con neuroinflamación; y

d. infecciones crónicas del SNC, p. ej., enfermedad de Lyme o infección del SNC como consecuencia de un estado inmunosupresor, por ejemplo, demencia por VIH; o

30 e. neuroinflamación consecuencia de la quimioterapia.

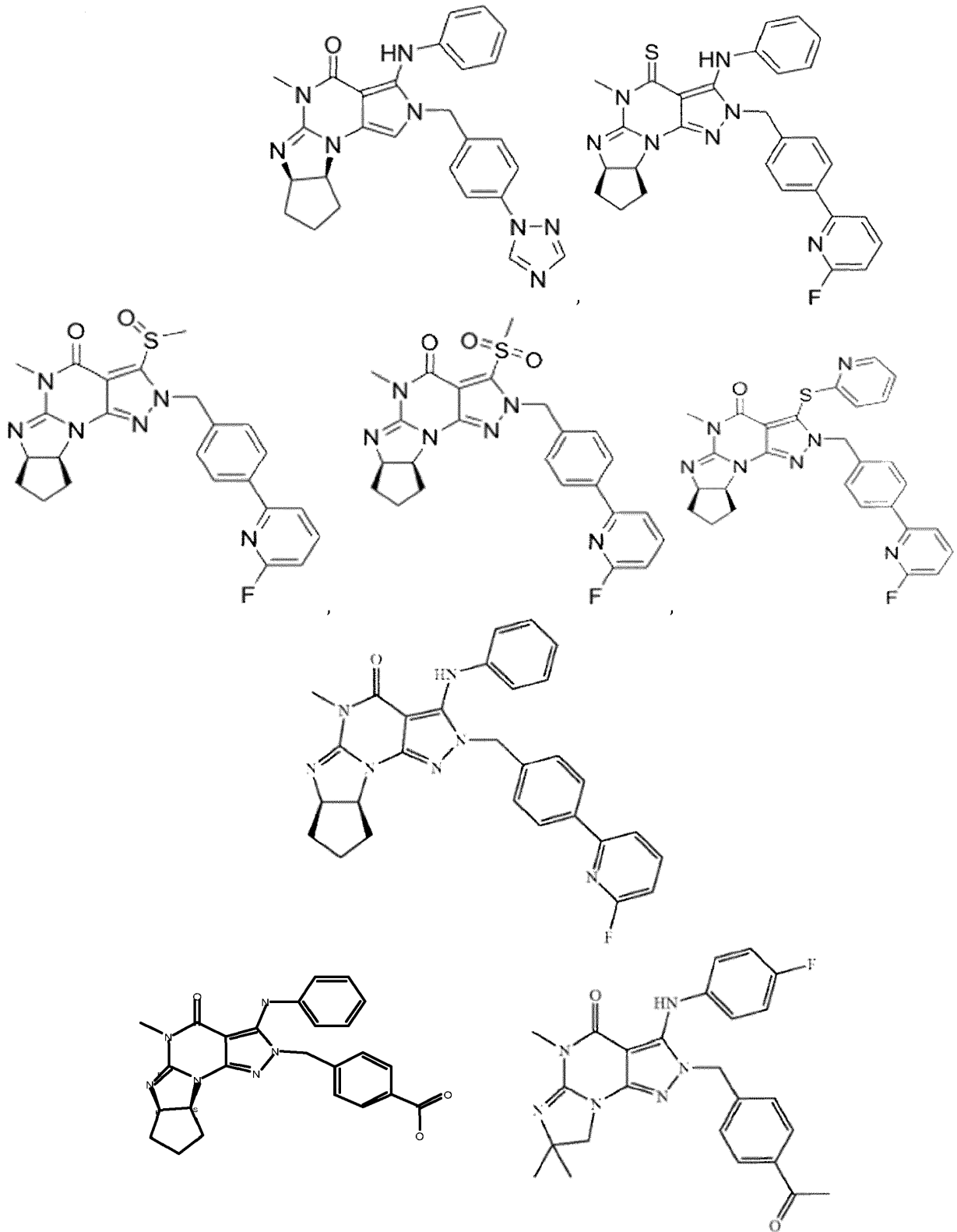
4. El inhibidor de PDE1 para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paciente tiene

a. niveles elevados de una o más citocinas proinflamatorias (p. ej., seleccionadas de IL1 β , TNF α , Ccl2, IL-6 y combinaciones de las mismas);

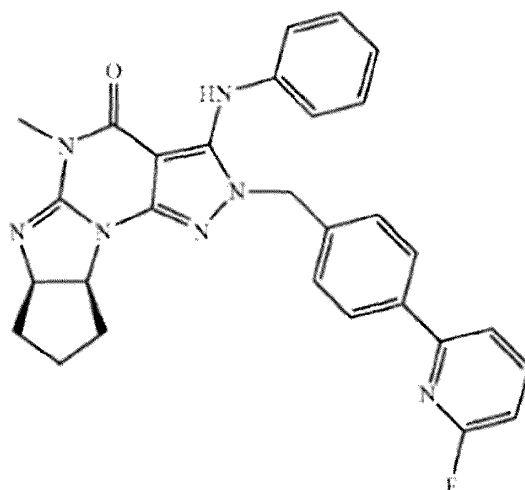
b. niveles reducidos de una o más citocinas antiinflamatorias (p. ej., IL-10); y/o

35 c. Niveles elevados de fenotipo microglial M1 en comparación con el fenotipo microglial M2,

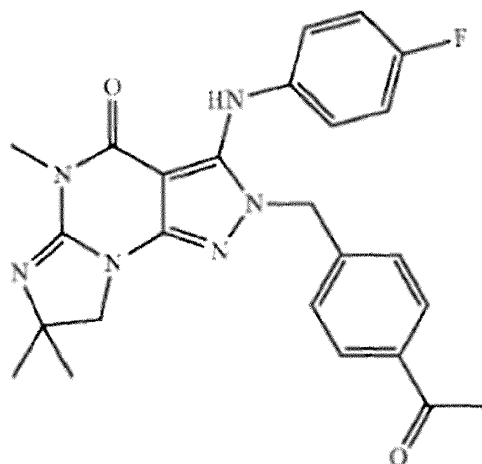
5. El inhibidor de PDE1 para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el inhibidor de PDE1 se selecciona de cualquiera de los siguientes:



5 6. El inhibidor de PDE1 para uso según la reivindicación 5, en donde el inhibidor de PDE1 es el siguiente:



7. El inhibidor de PDE1 para uso según la reivindicación 5, en donde el inhibidor de PDE1 es el siguiente:



8. El inhibidor de PDE1 para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde un inhibidor de PDE1 se administra en combinación con un inhibidor de PDE4 (p. ej., rolipram).

9. El inhibidor de PDE1 para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde un inhibidor de PDE1 se administra en combinación con uno o más agentes antidepresivos, en forma de sal libre o farmacéuticamente aceptable, seleccionados de inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS), inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN), antidepresivos tricíclicos (TCA) y agentes antipsicóticos atípicos; por ejemplo, un agente antipsicótico atípico, p. ej., lumateperona, en forma de sal libre o farmacéuticamente aceptable, o un ISRS, p. ej., fluoxetina, en forma de sal libre o farmacéuticamente aceptable.

10. El inhibidor de PDE1 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho tratamiento o profilaxis de la inflamación y/o una enfermedad o trastorno inflamatorio se caracteriza por la supervivencia de las células ganglionares de la retina.

11. El inhibidor de PDE1 para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inhibidor de PDE1 se administra en una cantidad eficaz para (i) reducir o inhibir la activación de la microglía M1 y/o (ii) para reducir los niveles de uno o más citocinas proinflamatorias (p. ej., IL1 β , TNF α , Ccl2, IL-6 o una combinación de las mismas) y/o (c) para aumentar los niveles de citocinas antiinflamatorias (p. ej., IL-10); a un paciente que lo necesite.

12. El inhibidor de PDE1 para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el inhibidor de PDE1 se administra en una cantidad eficaz para atenuar o inhibir la expresión y/o actividad de citocinas proinflamatorias en el cerebro, p. ej., seleccionadas del grupo que consiste en: IL1 β , IL-6, TNF α , Ccl2, óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS).

13. El inhibidor de PDE1 para uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la neuroinflamación y/o las enfermedades o los trastornos asociados con la neuroinflamación y/o la función microglial es neuroinflamación crónica o una enfermedad asociada con la neuroinflamación crónica.

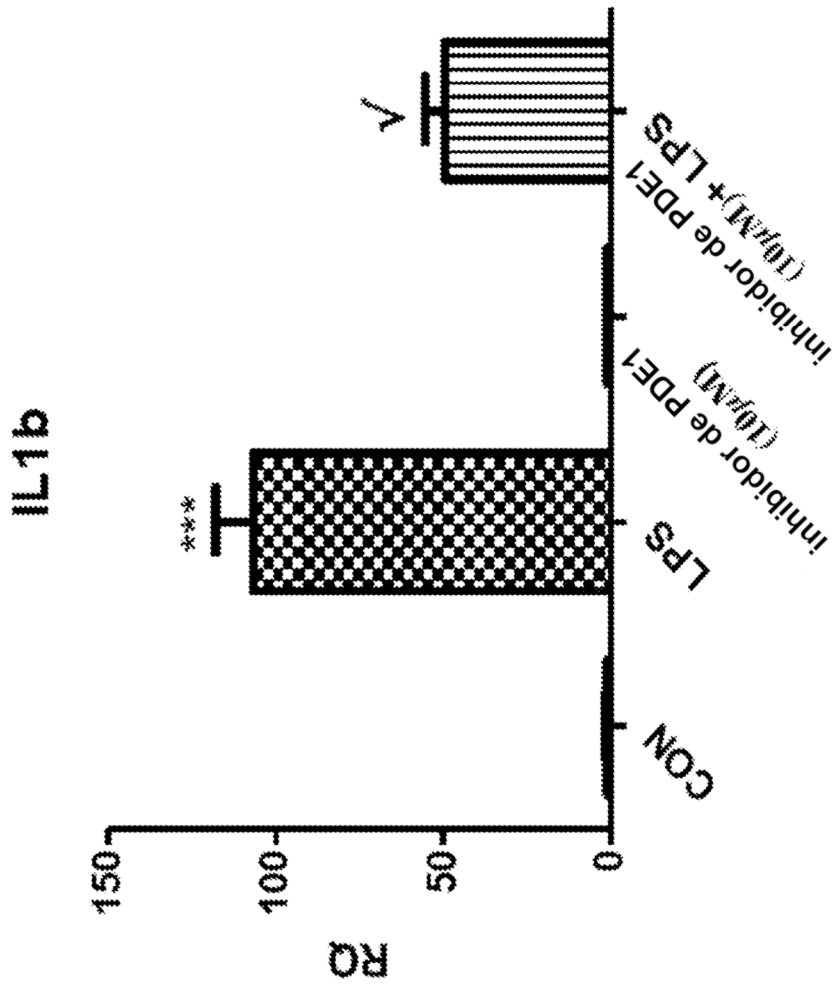


FIG. 2

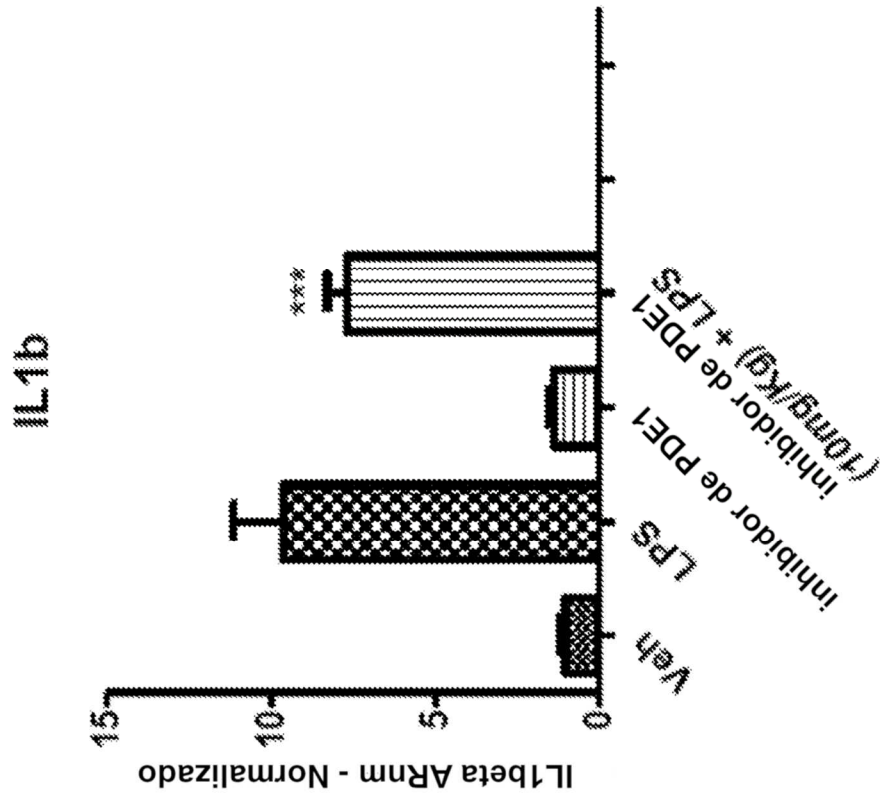
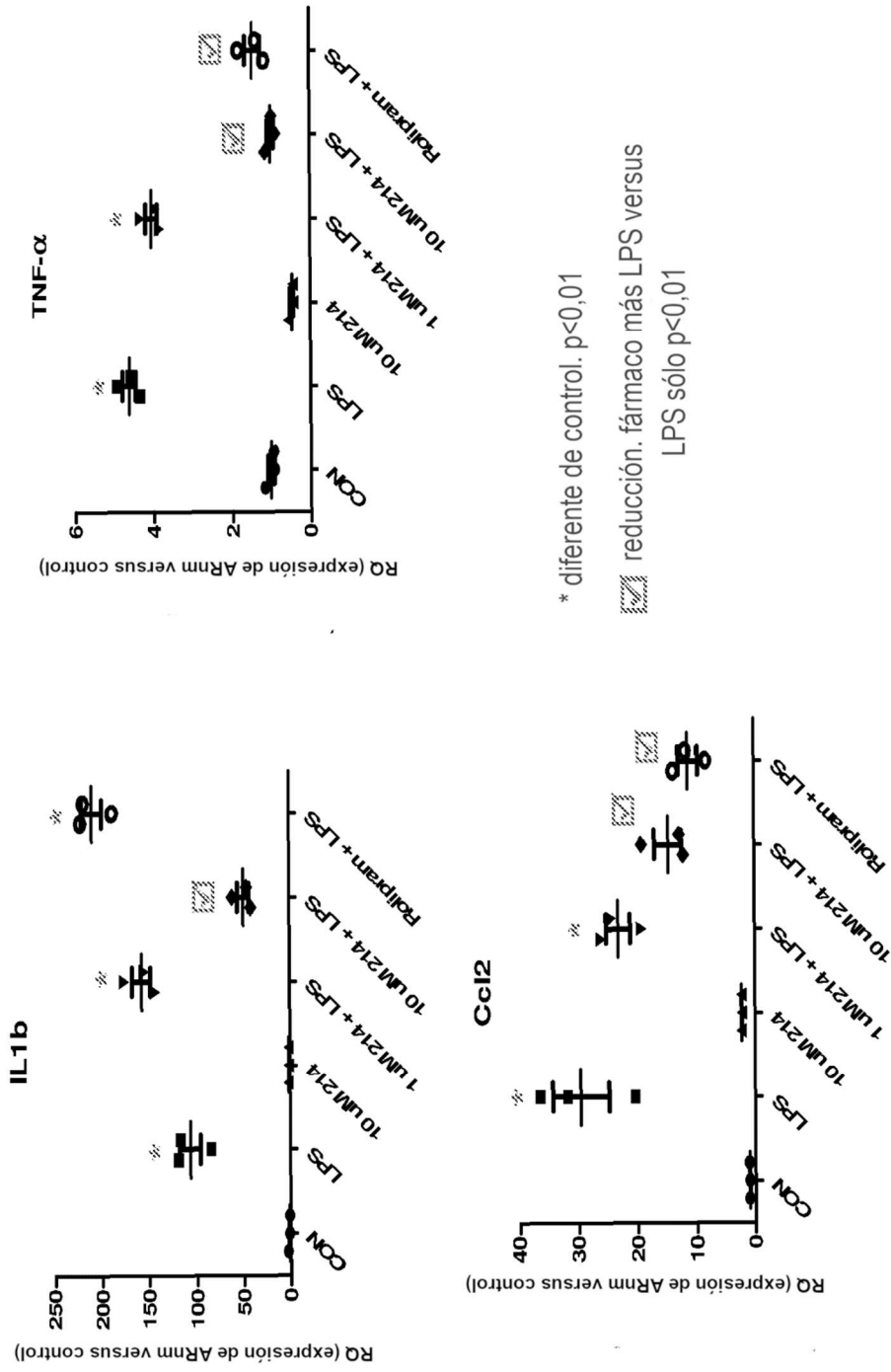


FIG. 3



* diferente de control. $p < 0,01$

▨ reducción. fármaco más LPS versus LPS sólo $p < 0,01$

FIG. 4a

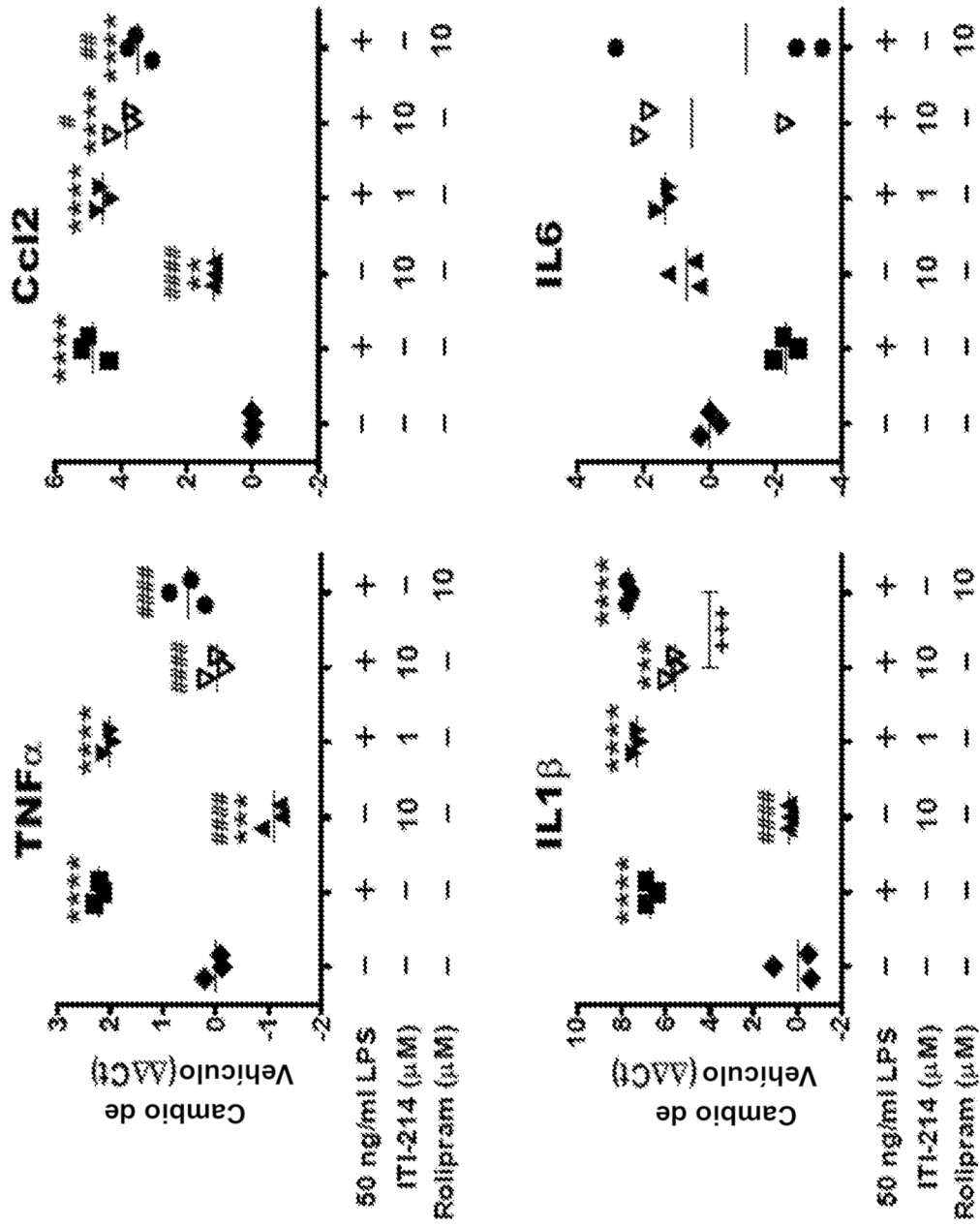


Fig. 4b

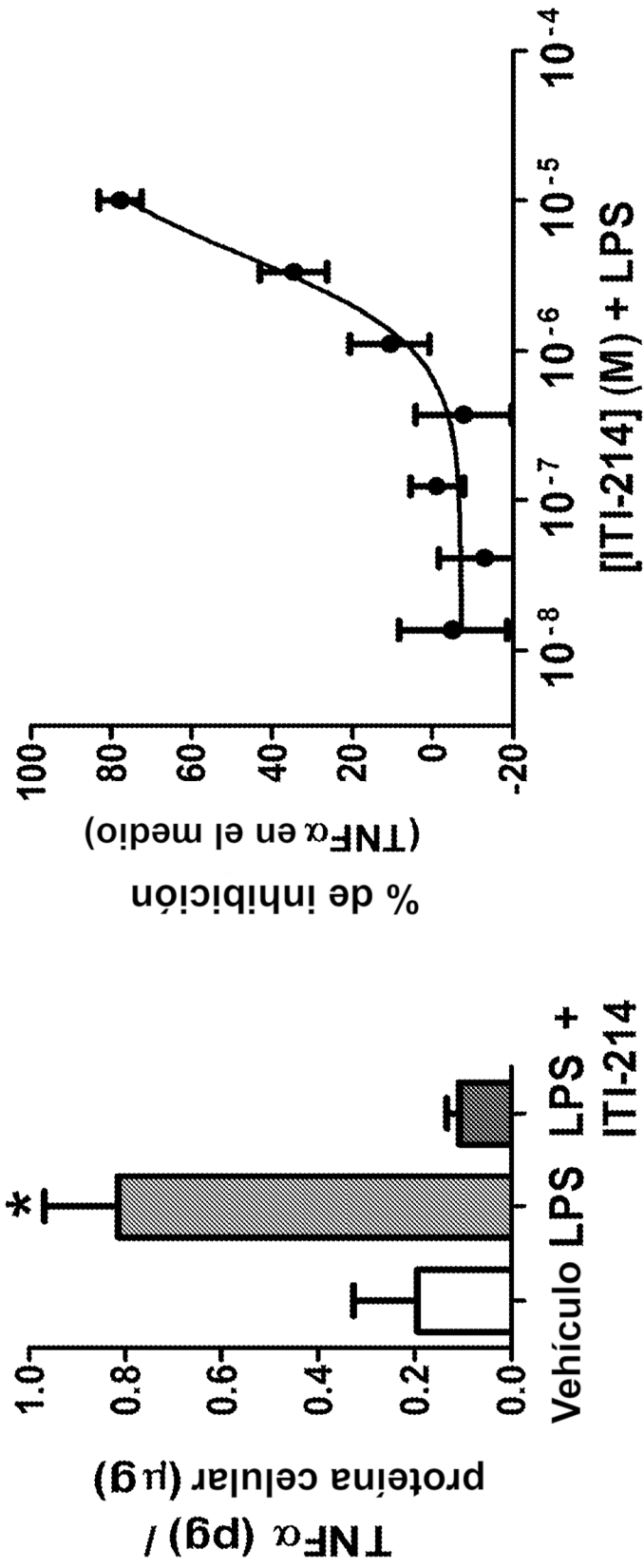


FIG. 5

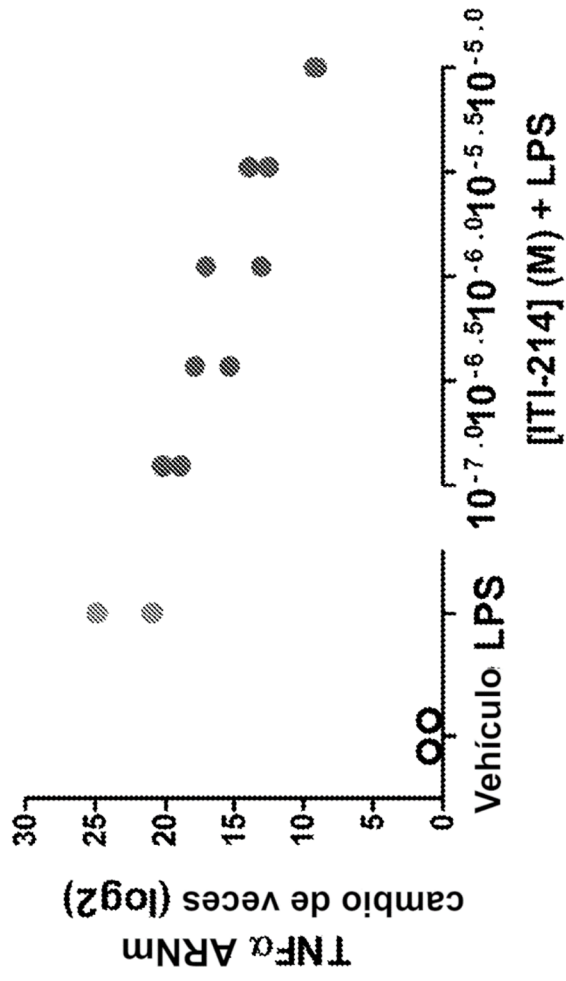


FIG. 6

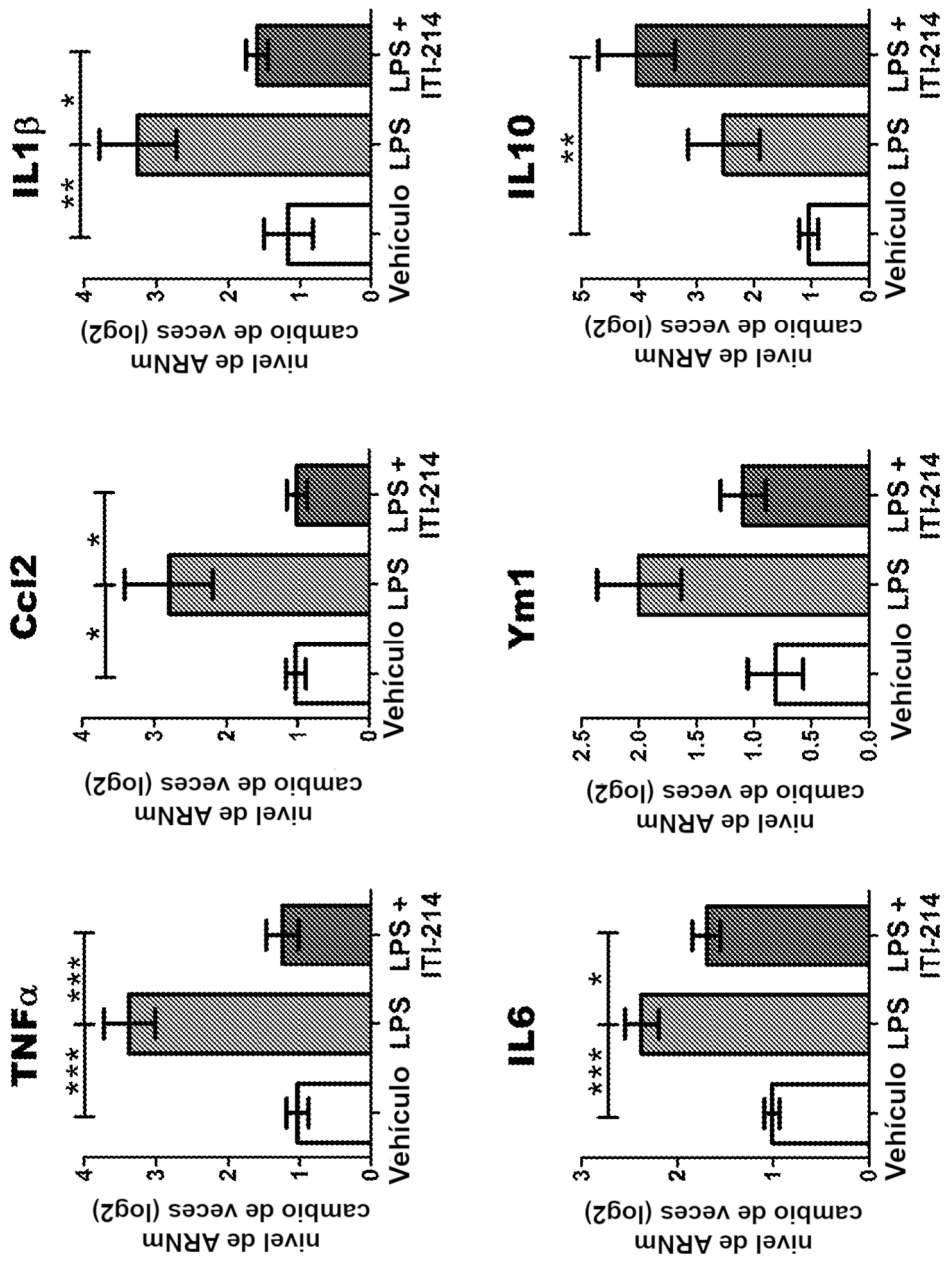


FIG. 7

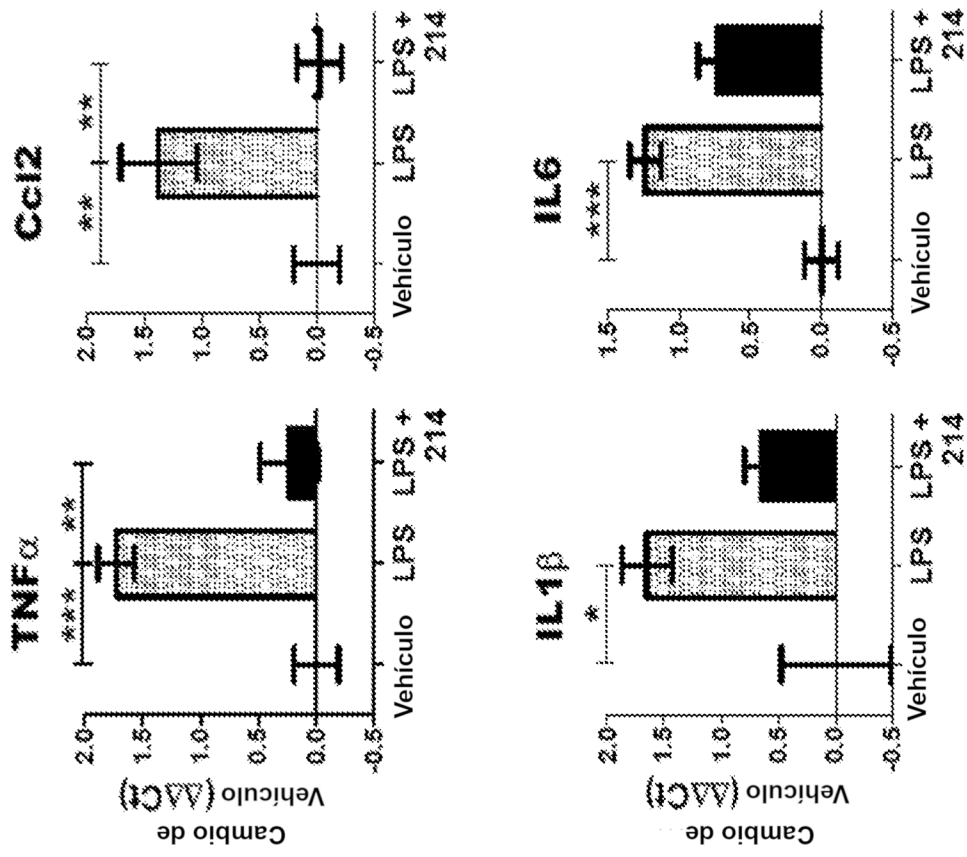


Fig. 8

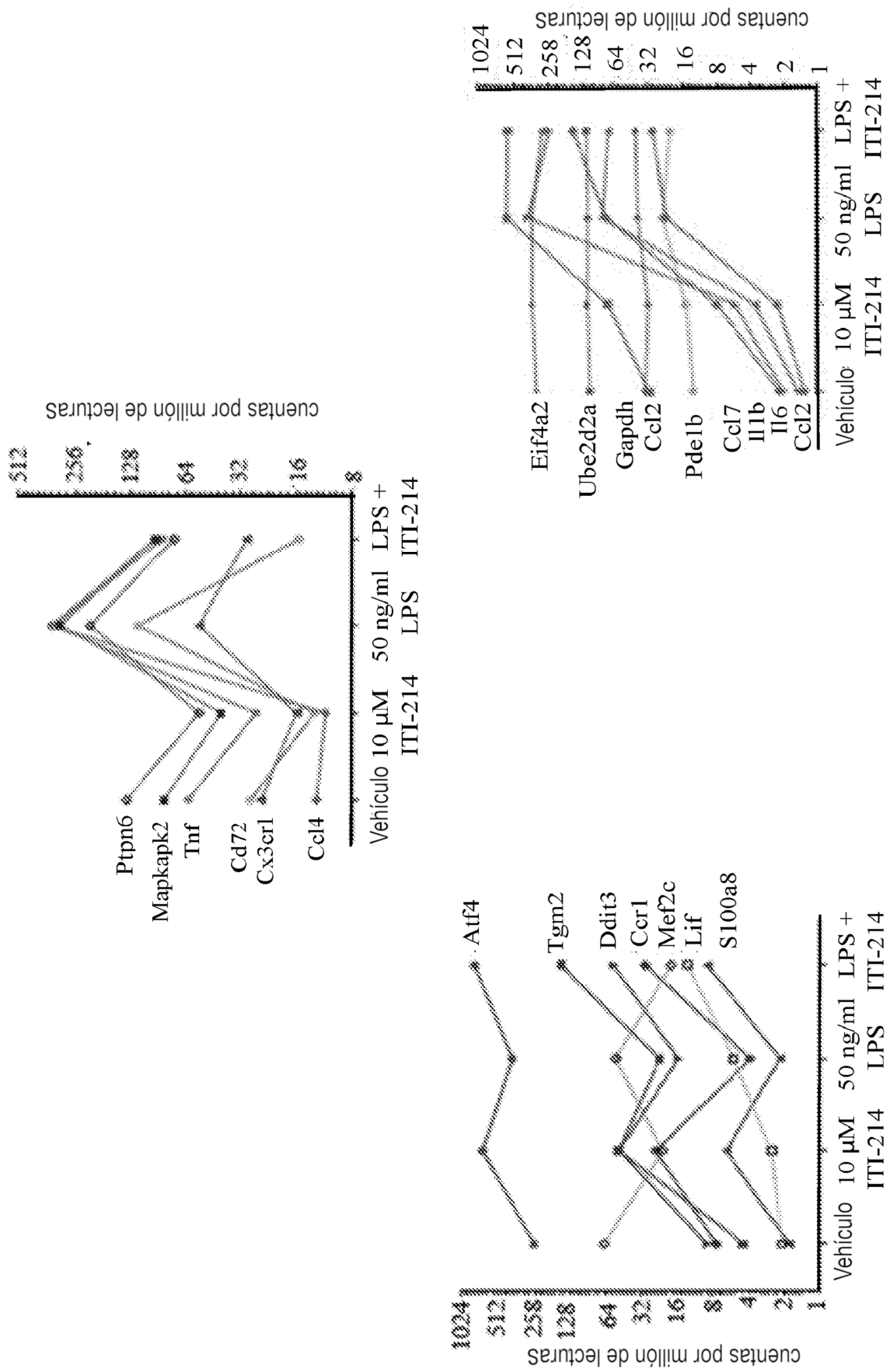


Fig. 9

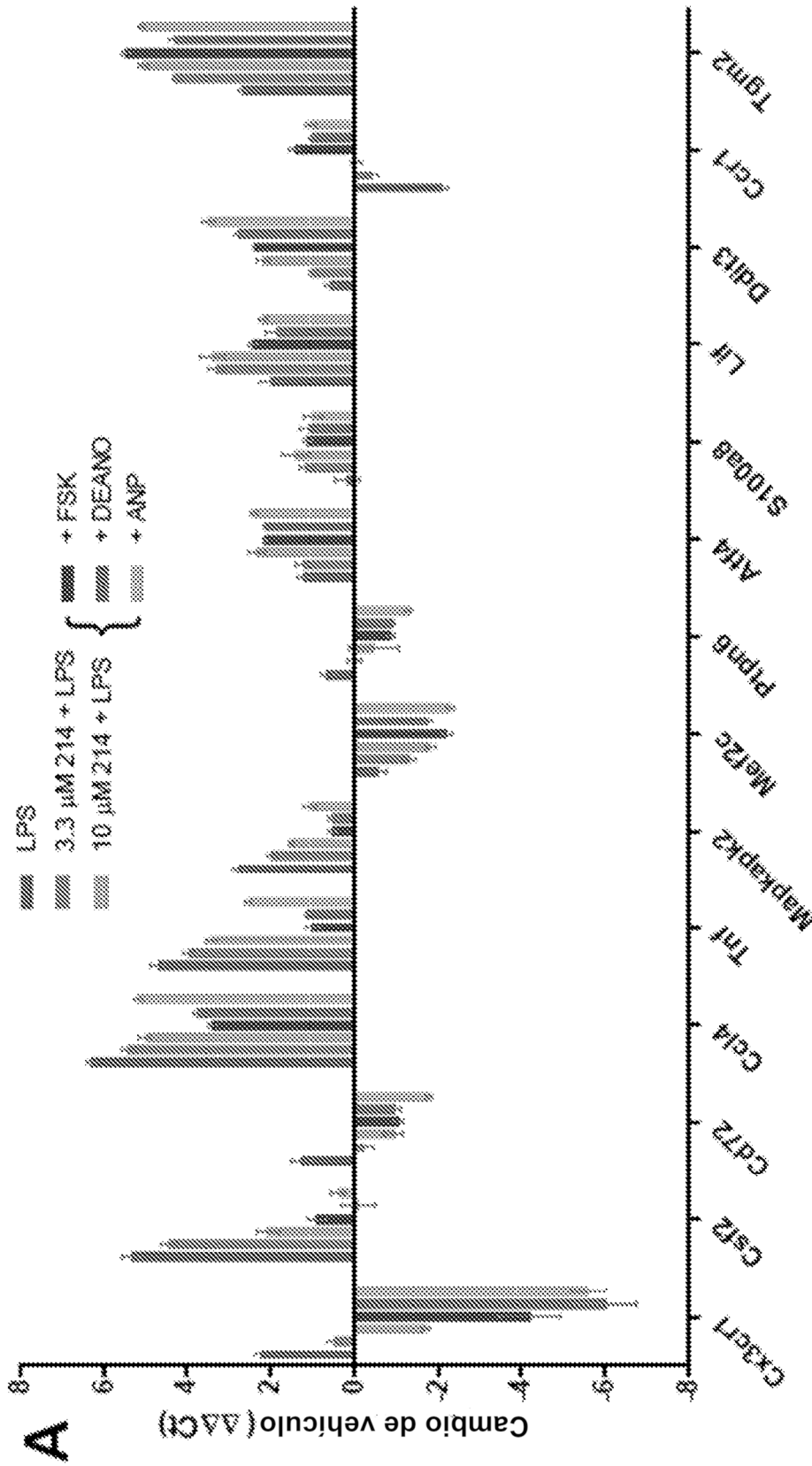


Fig. 11a

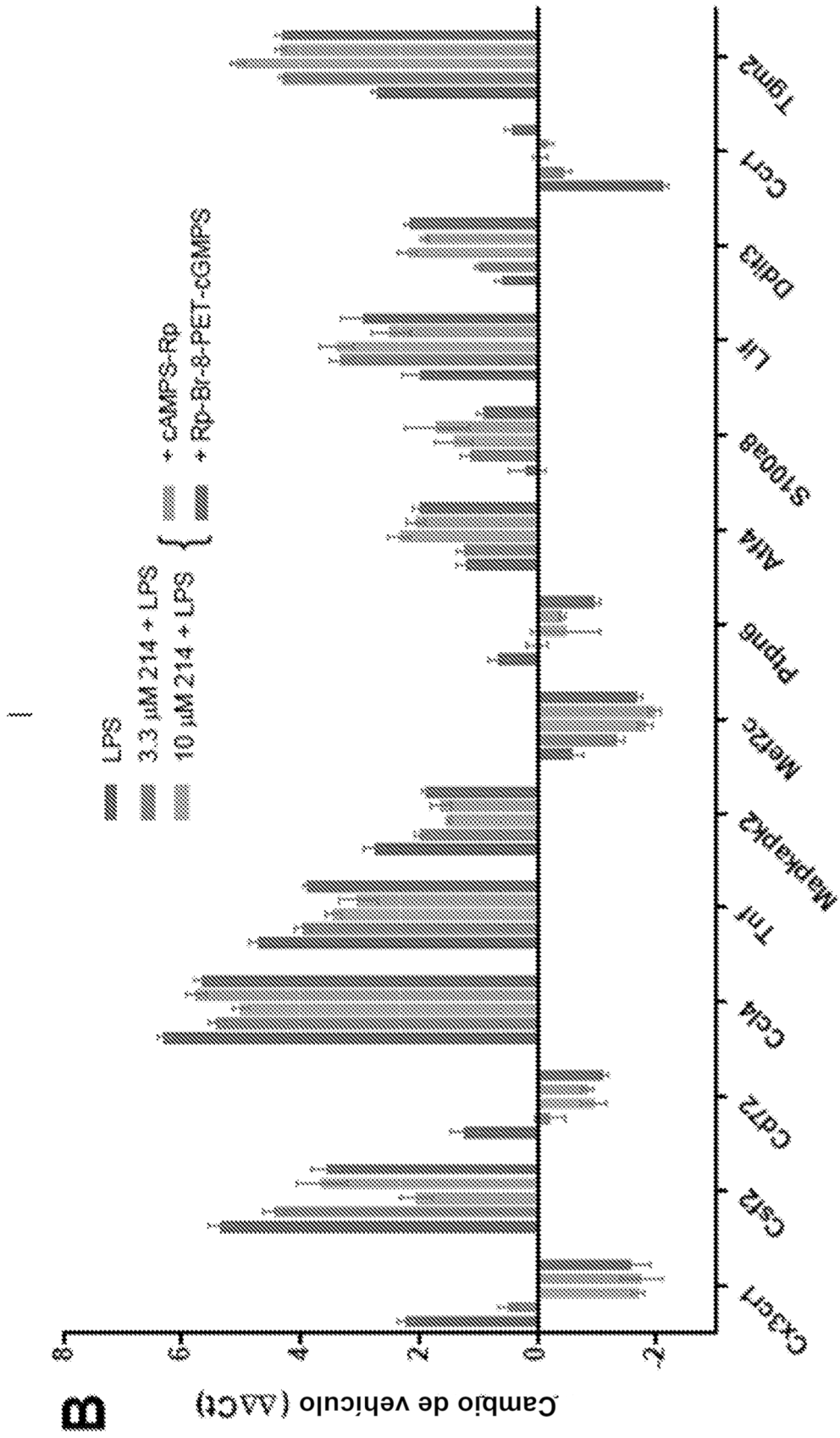
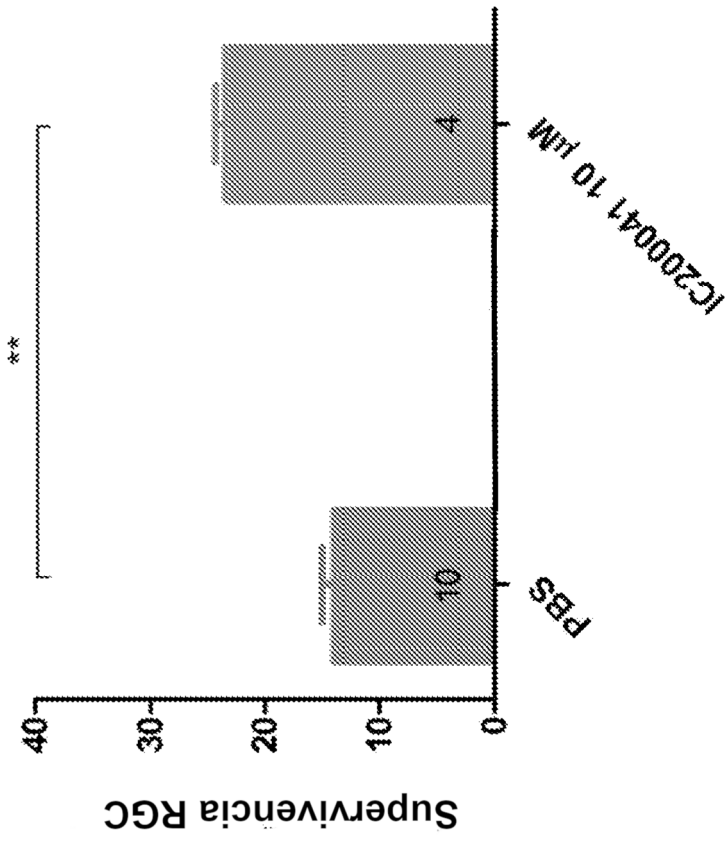


Fig. 11b



** p<0,001 ANOVA unidireccional
con la prueba posterior de Bonferroni

Fig. 12