



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **3 002 432**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 31/4725** (2006.01)  
**C07D 401/12** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**C07C 55/00** (2006.01)  
**A61K 31/551** (2006.01)  
**A61K 31/517** (2006.01)  
**A61P 9/08** (2006.01)  
**A61P 9/10** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2017 PCT/US2017/031836**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2018 WO18118109**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2017 E 17882341 (5)**

⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024 EP 3558314**

⑮ Título: **Inhibidor de la Rho Quinasa BA-1049 (R) y sus metabolitos activos**

⑯ Prioridad:

**21.12.2016 US 201662437181 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.03.2025**

⑯ Titular/es:

**BIOAXONE BIOSCIENCES, INC. (100.00%)**  
90 Canal Street, 4th Floor  
Boston, MA 02114, US

⑯ Inventor/es:

**ROSEN, KENNETH, M.;**  
**ABBINANTI, MATTHEW, D.;**  
**RUSCHEL, JOERG;**  
**MCKERRACHER, LISA y**  
**MORITZ, LISA, BOND**

⑯ Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

### Observaciones:

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

**ES 3 002 432 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

- Inhibidor de la Rho Quinasa BA-1049 (R) y sus metabolitos activos
- 5 **REFERENCIA CRUZADA A APLICACIONES RELACIONADAS**
- [0001] La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional n.º 62/437.181 depositada el 21 de diciembre de 2016.
- 10 **CAMPO DE LA INVENCIÓN**
- [0002] La presente divulgación está relacionada con la medicina y la neurología. Más particularmente, se relaciona con compuestos inhibidores específicos de ROCK2 útiles para tratar afecciones neurológicas.
- 15 **FONDO DE LA INVENCIÓN**
- [0003] La Rho quinasa (ROCK) es una serina/treonina quinasa que desempeña un papel fundamental en la regulación del citoesqueleto, la motilidad y los contactos de unión en diversos tejidos. ROCK se activa cuando se activa la pequeña GTPasa Rho, y ROCK se encuentra aguas abajo de Rho y desempeña un papel clave en la fosforilación de otras quinasas en una compleja cascada de señalización intracelular. Existen dos isoformas de Rho quinasa, ROCK1 y ROCK2, ambas activadas por Rho. ROCK1 tiene una amplia distribución tisular (pero menos en cerebro y músculo esquelético). ROCK2 se expresa en el sistema nervioso central (Patente de EE. UU. N.º 7.572.013), cerebro, corazón y pulmón, pero es relativamente baja en hígado, bazo, riñón y testículos. Estas dos formas diferentes pueden presentar diferencias en cuanto a actividad y funciones biológicas (Shi et al. (2013) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 62:341-354; Mertsch et al. (2014) *Mol. Neurobiol.* 49:900-915; Xin et al. (2015) *Biosci. Rep.* 35:1-13).
- 20
- [0004] Tanto Rho como ROCK se activan anormalmente en muchos tipos de neurotraumatismos y enfermedades neurovasculares. Los inhibidores de ROCK favorecen el crecimiento de las neuritas y la regeneración de los axones tras una lesión, y también son eficaces para reducir la activación de ROCK en las células endoteliales tras un accidente cerebrovascular y en enfermedades neurovasculares como aneurismas o angiomas.
- 25
- [0005] Cuando un accidente cerebrovascular, causado por un coágulo sanguíneo o tromboembolia, bloquea el flujo sanguíneo a través de un vaso sanguíneo (isquemia), se produce una disminución de la oxigenación del tejido (hipoxia), incluidas las células de la propia pared del vaso sanguíneo. Esta lesión de las células de la pared del vaso sanguíneo provoca un aumento de la permeabilidad de la pared, lo que permite que los componentes plasmáticos se filtren al tejido cerebral circundante. En muchos casos, pueden producirse hemorragias manifiestas en el cerebro en la zona del coágulo sanguíneo debido a problemas funcionales de la pared del vaso sanguíneo. La señalización ROCK es un elemento fundamental de este aumento de la permeabilidad vascular inapropiada (Shi et al. (2016) *Nature Comm.* 7:10523).
- 30
- [0006] La hemorragia subaracnoidea es una afección que requiere una intervención de tratamiento emergente y con frecuencia se asocia a malos resultados en los pacientes. Los abordajes quirúrgicos abiertos o endovasculares se aplican habitualmente para detener o minimizar la hemorragia con el fin de limitar los daños. Una característica importante en el tratamiento de los pacientes con este trastorno es controlar el vasoespasmo y los cambios en el tono vascular que a menudo se producen como comorbilidad. Los bloqueantes de los canales de calcio, como el nimodipino, se han utilizado clínicamente, al igual que el inhibidor de ROCK Fasudil (Satoh et al. (2014) *Curr. Vasc. Pharmacol.*: 12(5):758-765). Aunque Fasudil se ha utilizado para controlar el vasoespasmo en este contexto, sus efectos no selectivos sobre ROCK1 y ROCK2, y probablemente sus efectos no diana sobre otras quinasas, han hecho que su uso se limite a las dos primeras semanas tras la hemorragia.
- 35
- [0007] Del mismo modo, cuando se produce una lesión cerebral traumática (TBI), numerosas fuerzas (p. ej., fuerzas de percusión o corte) pueden causar lesiones directas y primarias no sólo a las neuronas y la glía, sino también a la vasculatura del cerebro induciendo hemorragias. Tras una TBI, también pueden producirse lesiones secundarias. Muchas de estas lesiones son el resultado de la disminución de la perfusión sanguínea en la zona de la lesión, como consecuencia de la coagulación vascular, y de la aparición de edema tisular debido al aumento de la permeabilidad vascular a través de la barrera hematoencefálica (Chodobski et al. (2011) *Transl. Stroke Res.* 2(4):492-516).
- 40
- [0008] En las lesiones medulares, se produce una alteración de la barrera hematoencefálica. Además, los axones rotos no se regeneran espontáneamente debido a la sobreactivación de la Rho quinasa. La inactivación de la Rho quinasa favorece la reparación funcional tras una lesión medular (Watzalawick et al. (2013) *JAMA Neurol.* 71:91-99).
- 45
- [0009] Las malformaciones cavernosas cerebrales (CMM) son otro trastorno que afecta a la vasculatura del sistema nervioso. Las CMM son malformaciones vasculares que se desarrollan exclusivamente en el lecho vascular venoso (de baja presión) del sistema nervioso. La disfunción de cualquiera de las tres proteínas genéticamente relacionadas con este trastorno en las células que forman las paredes de los vasos sanguíneos, provoca una menor adhesión entre las células y la hiperactivación de ROCK. En última instancia, esto conduce a un aumento de la permeabilidad en las paredes de estos vasos sanguíneos, lo que permite que las células sanguíneas y otros componentes del plasma entren en el cerebro
- 50
- 55
- 60

- de una manera no regulada (Clatterbuck et al. (2001) *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 71:188-192). La barrera hematoencefálica suele ser una estructura muy resistente y altamente regulada y se forma entre las células de los pequeños vasos sanguíneos (células endoteliales vasculares capilares, pericitos) y otras células del sistema nervioso, incluidos los astrocitos. La función de la barrera hematoencefálica es regular en gran medida la entrada de moléculas transportadas por la sangre en el cerebro y la capacidad de las células presentes en el plasma sanguíneo para entrar en el cerebro (Ballabh et al. (2004) *Neurobiol. Dis.* 16:1-13). La liberación no regulada de proteínas plasmáticas y otras moléculas en el tejido cerebral suele provocar problemas funcionales en el cerebro, y la acumulación de glóbulos rojos puede causar depósitos patológicos de hierro.
- 5 [0010] Los inhibidores de quinasas de moléculas pequeñas normalmente compiten con el ATP para unirse al bolsillo de ATP de la quinasa. Dado que la estructura de las bolsas de ATP está conservada, los inhibidores de quinasas pueden tener una unión inespecífica a múltiples quinasas, causando una inhibición no deseada de la quinasa fuera del objetivo. Algunas quinasas causan toxicidad debido a sus efectos sobre el objetivo, en cuyo caso el análisis riesgo-beneficio impulsará las decisiones de desarrollo de fármacos. Los efectos fuera de diana pueden causar toxicidad, incluida la cardiotoxicidad, y pueden detectarse mediante el cribado cinómico. La inactivación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) contribuye a la cardiotoxicidad porque es un regulador del metabolismo celular y su activación es necesaria cuando los cardiomocitos sufren estrés energético (Chen et al. (2010) *Progr. Cardiovasc. Dis.* 53:114-120.) Varios inhibidores de la quinasa están aprobados para uso humano a pesar del mayor riesgo de cardiotoxicidad.
- 10 [0011] La mayoría de los inhibidores de la Rho quinasa se dirigen tanto a ROCK1 como a ROCK2 y, por lo tanto, no son selectivos. Por ejemplo, Fasudil, un inhibidor no selectivo de ROCK, inhibe tanto ROCK1 como ROCK2. Fasudil se desarrolló para el tratamiento a corto plazo del vasoespasmo cerebral tras un accidente cerebrovascular hemorrágico (Rikitake et al. (2005) *Stroke* 36(10):2251-2257). El fasudil también se ha estudiado en lesiones de la médula espinal (Hara et al. (2000) *J. Neurosurg. (Spine 1)* 93:94-101). Lamentablemente, el Fasudil causa toxicidad que incluye náuseas, 15 hemorragia subcutánea, hemorragia subaracnoidea, pirexia, insuficiencia renal e hipotensión, por lo que su uso a largo plazo provoca complicaciones graves (Fukumoto et al. (2005) *Heart* 91:391-392; Shi et al. (2013) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 62:341-354) ([http://www.ehealthme.com/drug\\_side\\_effects/Fasudil-Hydrochloride-1268381](http://www.ehealthme.com/drug_side_effects/Fasudil-Hydrochloride-1268381)).
- 20 [0012] Otro ejemplo es SLx-2119, que es un inhibidor de Rho quinasa específico de ROCK2 cuya eficacia en el tratamiento de la psoriasis se está probando clínicamente (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02317627?term= kd025&rank=2>). Lamentablemente, SLx-2119 debe utilizarse a una dosis más alta para mostrar eficacia en la neuroprotección en un modelo de accidente cerebrovascular en ratón (Lee et al. (2014) *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 1(1):2-14), y estas dosis efectivas probadas eran superiores a la dosis humana tolerada, cuando se convertían a una dosis humana basada en la superficie corporal (FDA (2005) Guidance for Industry "Estimating the maximum safe dose in Initiating Clinical trials for Therapeutics in Healthy Volunteers"). Estas comparaciones ponen de relieve la dificultad de desarrollar inhibidores terapéuticos de ROCK que sean seguros para uso sistémico y que puedan utilizarse para tratar afecciones neurológicas.
- 25 [0013] Los inhibidores de la Rho quinasa que tienen más selectividad para ROCK2 disminuyen la incidencia del efecto secundario asociado de hipotensión (Xin et al. (2015) *Biosci. Rep.* 35:1-13). Esto se debe probablemente a que ROCK1 es la Rho quinasa predominante en el músculo liso (Pelosi et al. (2007) *Mol. Cell. Biol.* 27(17):6163-6176), y es la relajación del tono del músculo liso vascular lo que provoca el efecto secundario de hipotensión, lo que impide el uso sistémico crónico de inhibidores no selectivos de ROCK como Fasudil para tratar trastornos neurológicos.
- 30 [0014] FSD-C10 es un ejemplo de un inhibidor que se dirige a ROCK2 más selectivamente que a ROCK1 (Xin et al. (2015) *Biosci. Rep.* 35:1-13). Este inhibidor causa menos hipotensión que Fasudil, lo que indica que reducir la afinidad de ROCK1 en comparación con ROCK2 es mejor para el desarrollo de fármacos. Sin embargo, el FSD-C10 no tiene una alta afinidad por ROCK2 y con una  $IC_{50}$  de 1141  $\mu$ M para ROCK1 y 711  $\mu$ M para ROCK2 el compuesto no tiene propiedades apropiadas de fármaco. Cuando se comparó el FSD-C10 con el Fasudil, no fue tan eficaz como éste para inducir la expresión del factor neurotrófico en un modelo experimental de esclerosis múltiple, y los animales tratados con FSD-C10 tendieron a 35 perder peso, lo que sugiere posibles problemas de eficacia frente a los de seguridad.
- 40 [0015] Por lo tanto, lo que se necesita es más terapéutica, inhibidores de ROCK de alta afinidad con selectividad, pero no especificidad completa, para ROCK2. El documento US 2016/213664 A1 divulga "métodos para tratar una malformación cavernosa cerebral (CCM) y métodos para tratar un aneurisma cerebral en un mamífero con determinados inhibidores de la Rho quinasa".
- 45 [0016] La invención se expone en el juego de reivindicaciones adjunto. Se ha descubierto que la forma enantiomérica (R) del compuesto inhibidor de la Rho quinasa, BA-1049 (BA-1049 (R)), y sus metabolitos hidroxilados, se dirigen a ROCK2 y tienen la capacidad de revertir la activación de ROCK en las células endoteliales cerebrales tras un traumatismo neurovascular. También se ha descubierto que BA-1049 (R) promueve el crecimiento de las neuritas de las neuronas 50 después de un trauma neurológico y tiene el potencial de revertir la activación de ROCK en las neuronas después de un trauma en el CNS.
- 55 [0017] Estos descubrimientos se han explotado para desarrollar la presente divulgación, que, en parte, está dirigida a una

## RESUMEN DE LA INVENCIÓN

- 60 [0016] La invención se expone en el juego de reivindicaciones adjunto. Se ha descubierto que la forma enantiomérica (R) del compuesto inhibidor de la Rho quinasa, BA-1049 (BA-1049 (R)), y sus metabolitos hidroxilados, se dirigen a ROCK2 y tienen la capacidad de revertir la activación de ROCK en las células endoteliales cerebrales tras un traumatismo neurovascular. También se ha descubierto que BA-1049 (R) promueve el crecimiento de las neuritas de las neuronas después de un trauma neurológico y tiene el potencial de revertir la activación de ROCK en las neuronas después de un trauma en el CNS.
- 65 [0017] Estos descubrimientos se han explotado para desarrollar la presente divulgación, que, en parte, está dirigida a una

5 formulación farmacéutica que comprende una sal de adipato de BA-1049 (R), y metabolitos activos de la misma, y a la formulación farmacéutica para su uso en métodos de prevención y tratamiento de CCM, accidente cerebrovascular, vasoespasmo tras hemorragia subaracnoidea, aneurismas cerebrales, lesión medular y lesión cerebral traumática utilizando la misma.

10 [0018] La divulgación proporciona una sal de adipato del enantiómero R de BA-1049, y formas deuteradas del mismo.

15 [0019] También se divulga en el presente documento, pero no se recita en el texto de las reivindicaciones, un metabolito hidroxilo activo de BA-1049 (R), (1-hidroxi-BA-1049 (R)) y formas deuteradas del mismo, y sales de adipato del mismo.

20 [0020] La divulgación también proporciona formulaciones farmacéuticas para su uso en métodos de tratamiento de accidentes cerebrovasculares, vasoespasmo después de hemorragia subaracnoidea, aneurismas cerebrales, lesión de la médula espinal o lesión cerebral traumática, en un paciente que sufre de los mismos que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica que comprende, BA-1049 (R). También se describen en el presente documento, pero no se mencionan en el texto de las reivindicaciones, métodos para tratar el accidente cerebro-vascular, el vasoespasmo tras una hemorragia subaracnoidea, los aneurismas cerebrales, las lesiones medulares o las lesiones cerebrales traumáticas, en un paciente que las sufre, que comprenden la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica que comprende un metabolito hidroxilo activo de BA-1049 (R), o BA-1049 (R) y un metabolito hidroxilo activo del mismo. También divulgado en el presente documento, pero no recitado por el texto de las reivindicaciones, el metabolito hidroxilo es el 1-hidroxi-BA-1049 (R). En algunas realizaciones, BA-1049 (R) está deuterado. El metabolito hidroxilado de BA-1049 (R) es deuterado y/o es una sal de adipato.

25 [0021] La divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden BA-1049 (R), activan metabolitos hidroxilados del mismo tales como 1-hidroxi-BA-1049, o mezclas de los mismos. Opcionalmente, BA-1049 (R) y/o sus metabolitos activos están deuterados. Opcionalmente, BA-1049 (R) y/o sus metabolitos activos son sales de adipato. Opcionalmente, la formulación farmacéutica comprende además un inhibidor de la rho quinasa que no es BA-1049 (R) ni 1-hidroxi-RA-1049 (R).

30 [0022] Revelado aquí pero no recitado por el texto de las reivindicaciones, el metabolito hidroxilo es 1-hidroxi-BA-1049 (R).

35 [0023] También se describen en el presente documento, pero no se mencionan en el texto de las reivindicaciones, métodos para tratar la CCM en un paciente que la padece, que comprenden la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación farmacéutica que comprende 1-hidroxi-BA-1049 (R), y/o sales deuteradas y/o adipatadas de la misma. Opcionalmente, la formulación farmacéutica comprende además un segundo inhibidor de la rho quinasa que no es el 1-hidroxi-BA-1049 (R). Opcionalmente, el método comprende además la administración de una segunda formulación farmacéutica que comprende un inhibidor de la rho quinasa que no es 1-hidroxi-BA-1049 (R).

40 [0024] Opcionalmente, el metabolito hidroxilado es 1-hidroxi-BA-1049 (R).

45 [0025] En otro aspecto más, la divulgación proporciona una formulación farmacéutica para su uso en el tratamiento de CCM, aneurismas cerebrales, accidente cerebrovascular, vasoespasmo tras hemorragia subaracnoidea o lesión medular en un paciente que la sufre, que comprende la administración de una formulación farmacéutica que comprende al menos un inhibidor de rho quinasa que no es BA-1049 (R) o un metabolito activo del mismo. En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende un segundo inhibidor de la rho quinasa que no es BA-1049 (R) ni 1-hidroxi-BA-1049 (R). En algunas realizaciones, el método comprende además la administración de una segunda formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la rho quinasa que no es BA-1049 (R) ni un metabolito activo del mismo.

## 50 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

55 [0026] Los anteriores y otros objetos de la presente divulgación, las diversas características de la misma, así como la propia divulgación pueden comprenderse mejor a partir de la siguiente descripción, cuando se lee junto con los dibujos adjuntos en los que:

60 La **Figura 1A** es una representación esquemática de una sal de clorhidrato de BA-1049, un compuesto selectivo de piperidinilo, donde el asterisco identifica el carbono quiral. BA-1049 (R) es el enantiómero R;

La **Figura 1B** es una representación esquemática de Fasudil;

La **Figura 1C** es una representación esquemática de SLx-2119 (también denominado KD-025);

La **Figura 1D** es una representación esquemática de la 1-hidroxi-BA-1049 (R).

65 La **Figura 2** es una representación esquemática de la síntesis racémica del BA-1049, en la que el enantiómero R puede purificarse a partir de la mezcla racémica mediante cromatografía en columna;

La **Figura 3** es una representación de un esquema sintético para preparar BA-1049 (R) ópticamente puro utilizando la introducción diastereoselectiva de un grupo metilo con un ácido de Lewis añadido para mejorar la selectividad;

70 La **Figura 4** es una representación esquemática de un esquema sintético alternativo para preparar una sal

clorhidrato de BA-1049 (R) ("NT-000077");

La **Figura 5** es una representación esquemática de un esquema sintético para preparar el 1-hidroxi-BA-1049 (R) ópticamente puro comenzando con el penúltimo compuesto protegido con Boc de la síntesis del BA-1049 (R) enantiopuro;

5 La **Figura 6A** es una representación gráfica de una curva de disociación de unión frente a ROCK1 para BA-1049 (S);

La **Figura 6B** es una representación gráfica de una curva de disociación de unión frente a ROCK1 para BA-1049 (R);

10 La **Figura 6C** es una representación gráfica de una curva de disociación de unión frente a ROCK2 para BA-1049 (S);

La **Figura 6D** es una representación gráfica de una curva de disociación de unión frente a ROCK2 para BA-1049 (R);

15 La **Figura 7A** es una representación gráfica de la curva de inhibición para el análisis de  $IC_{50}$  de BA-1049 (S) contra ROCK1;

La **Figura 7B** es una representación gráfica de la curva de inhibición para el análisis de  $IC_{50}$  de BA-1049 (S) contra ROCK2;

La **Figura 7C** es una representación gráfica de la curva de inhibición para el análisis de  $IC_{50}$  de BA-1049 (R) contra ROCK1;

20 La **Figura 7D** es una representación gráfica de la curva de inhibición para el análisis de  $IC_{50}$  de BA-1049 (R) contra ROCK2;

La **Figura 8** es una representación de una Transferencia de Western de homogeneizados cerebrales de un ratón que recibió una oclusión transitoria de la arteria cerebral media (accidente cerebro-vascular) en comparación con un ratón normal (sin accidente cerebro-vascular), donde homogeneizados de tejido de los hemisferios izquierdo (L) y derecho (R) del cerebro fueron sondeados con anticuerpos contra la fosfo-cofilina, una diana aguas abajo de la actividad de ROCK, y el lado izquierdo del cerebro de la accidente cerebro-vascular es el lado afectado y muestra un aumento de la expresión de fosfo-cofilina;

25 La **Figura 9** es una representación gráfica que muestra la relación izquierda-derecha de la expresión de fosfo-cofilina entre el hemisferio cerebral afectado y el hemisferio cerebral de control tras la MCAO y el tratamiento con BA-1049 racémico o Fasudil, en el que BA-1049 redujo fuerte y significativamente la relación de expresión de fosfo-cofilina, como es visible en el desplazamiento de la relación cerca de 0, donde 0 indica igual expresión en ambos lados del cerebro;

30 Las **Figuras 10A - 10D** son representaciones de fotomicrografías de la corteza insular del lado del accidente cerebro-vascular de un cerebro con accidente cerebro-vascular tratado con BA-1049 (D), Fasudil (C) o vehículo solo (A) y (B); **lado del accidente cerebro-vascular del cerebro** (A) comparado con el lado contralateral (B) no afectado por el accidente cerebro-vascular en animales inyectados con vehículo solo, donde las secciones cerebrales fueron sometidas a inmunohistoquímica utilizando anticuerpos contra fosfo-MLC2.

35 Las **Figuras 10E - 10F** son representaciones de microfotografías de microglía activada detectada mediante inmunotinción con el anticuerpo Iba-1, donde la microglía se activa en el lado del accidente cerebrovascular (E) y la activación se invierte con BA-1049 (F);

40 La **Figura 11A** es una representación gráfica de un experimento dosis-respuesta utilizando diferentes concentraciones de BA-1049 (R) administradas por inyección intraperitoneal en ratones adultos, donde el análisis de la fosfo-cofilina en el cerebro izquierdo frente al derecho como biomarcador de la activación de ROCK muestra que la dosis mínima eficaz para revertir la activación de ROCK a la normalidad (valor de 1) es de 1 mg/kg (A).

45 La **Figura 11B** es una representación gráfica que muestra los niveles de fosfo-cofilina en el cerebro derecho (contralateral) frente al izquierdo (accidente cerebrovascular) para animales individuales, donde los valores del cerebro derecho e izquierdo para un animal dado están conectados por una línea;

La **Figura 12A** es una representación gráfica de la reducción de la fosfo-cofilina en el cerebro de ratón 4 horas después del tratamiento con BA-1049 (R) o vehículo (control) inmediatamente después de la oclusión de la arteria cerebral media y el inicio de la reperfusión;

50 La **Figura 12B** es una representación gráfica de la reducción de la fosfo-cofilina en el cerebro de ratón 24 horas después del tratamiento con BA-1049 (R) o vehículo (control) inmediatamente después de la oclusión transitoria de la arteria cerebral media y el inicio de la reperfusión;

La **Figura 12C** es una representación gráfica del pretratamiento de ratones con 10 mg/kg de BA-1049 (R) administrado I.P. 24 horas, 72 horas y 168 horas antes de la oclusión de la arteria cerebral media;

55 La **Figura 13A** muestra representaciones fotográficas de la corteza izquierda (L) y derecha (R) de ratones tratados con BA-1049 (R) o vehículo (control) tras MCAO y luego inyectados con azul de Evans, que aparece rojo en la imagen fluorescente;

La **Figura 13B** muestra una representación gráfica de los resultados de la Figura 13A;

60 La **Figura 14** es una representación gráfica de la penetración de BA-1049 (R) detectada en el cerebro tras la administración intraperitoneal (I.P.), intravenosa (I.V.) u oral (PO), medida como ng/g de tejido;

Las **Figuras 15A - 15D** son representaciones de microfotografías de células neuronales NG-108 colocadas en cultivo celular y tratadas con (A) DMSO como control, (B) BA-1049 racémico, (C) BA-1049 (S), y (D) BA-1049 (R);

65 Las **Figuras 16A - 16C** son representaciones de microfotografías de células NG-108 tratadas con (A) 5  $\mu$ M SLx-2119, (B) 5  $\mu$ M BA-1049 (R), o (C) 50  $\mu$ M BA-1049 (R);

La **Figura 17** es una representación de una Transferencia de Western de homogeneizados de neuronas corticales primarias de rata tratadas durante 3 días con ARNi contra PTEN para silenciar la expresión de PTEN después de

7 días en cultivo (D7) o después de un día en cultivo (D1), mostrando la expresión de ROCK2, PTEN y GAPDH; Las **Figuras 18A - 18B** son representaciones de microfotografías que muestran el efecto del ácido lisofosfatídico (LPA), (un compuesto conocido por inducir la activación de ROCK), en las células endoteliales (B); en comparación con el control, células no tratadas (A);

5 La **Figura 19A** es una representación de una microfotografía de células endoteliales tratadas con LPA para inducir la activación de Rho, luego tratadas con BA-1049 (R), y luego teñidas con faloidina para mostrar las fibras de estrés;

10 La **Figura 19B** es una representación de una microfotografía de células endoteliales tratadas con LPA para inducir la activación de Rho, luego tratadas con Fasudil, y luego teñidas con faloidina para mostrar las fibras de estrés;

La **Figura 19C** es una representación de una microfotografía de células endoteliales tratadas con LPA para inducir la activación de Rho, luego tratadas con BA-1049 (R), y luego teñidas con vinculina para mostrar los complejos de unión;

15 La **Figura 19D** es una representación de una microfotografía de células endoteliales tratadas con LPA para inducir la activación de Rho, luego tratadas con Fasudil, y luego teñidas con vinculina para mostrar los complejos de unión;

En la **Figura 20** se representan los perfiles cromatográficos del BA-1049 (R) y sus metabolitos generados por el tratamiento de hepatocitos de rata, humano, mono, perro y ratón, demostrando que el perro no produce ningún metabolito y la rata produce un metabolito menor, (M336a) no observado en otras especies, mientras que el pico a los 7,4 minutos representa el 1-hidroxi-BA-1049 (R), y todos los picos que eluyen después de los 7,6 minutos son picos de fondo;

20 La **Figura 21A** es una representación esquemática de la estructura de BA-1049 (R);

La **Figura 21B** es una representación esquemática de la estructura del 1-hidroxi-BA-1049 (R);

La **Figura 21C** es una representación esquemática de la estructura del N-óxido-BA-1049 (R);

25 La **Figura 22A** es una representación gráfica del curso temporal de la concentración de BA-1049 (R) (líneas discontinuas) y de 1-hidroxi-BA-1049 (R) (línea continua) en el cerebro tras la administración intravenosa de 5 mg/kg de BA-1049 (R) a ratones;

La **Figura 22B** es una representación gráfica de la concentración de BA-1049 (R) (barras abiertas) y de 1-hidroxi-BA-1049 (R) (barras rellenas) en el cerebro y en el tejido vascular (derivado de la vena cava inferior) de ratas, 30 minutos después de la administración intravenosa de 2,5 mg/kg de BA-1049 (R);

30 La **Figura 23** es una representación gráfica de las curvas de inhibición relativa de ROCK2 purificado por BA-1049 (R) y dos metabolitos 1-hidroxi-BA-1049 (R) y N-óxido BA-1049 (R).

En la **Figura 24** se representan inmunoblot de pMLC2 T18/S19 comparados con el control de carga GAPDH cuando se trataron células endoteliales de vena umbilical humana con estereoisómeros purificados de BA-1049 (R) y BA-1049 (S) y los dos metabolitos de BA-1049 (R), 1-hidroxi-BA-1049 (R) y N-óxido de BA-1049 (R);

35 Las **Figuras 25A - 25F** son representaciones de microfotografías de células endoteliales de vena umbilical humana tratadas con LPA para inducir la activación de ROCK, seguidas de tratamiento con 1  $\mu$ M BA-1049 (R) (FIG. 25B), 10  $\mu$ M BA-1049 (R) (FIG. 25C), 1  $\mu$ M BA-1049 (S) (FIG. 25E), o 10  $\mu$ M BA-1049 (S) (FIG. 25F), donde FIG. 25A muestra la célula no tratada (control) mientras que FIG. 25D muestra las células tratadas sólo con LPA.

La **Figura 26A** son representaciones de inmunoblot de pMLC2 T18/S19 en comparación con el control de carga GAPDH cuando las células endoteliales de vena umbilical humana se trataron con BA-1049 (R) o 1-hidroxi-BA-1049 (R);

40 La **Figura 26B** son representaciones gráficas de las mediciones densitométricas de los inmunoblot (mostrados en la Figura 25A) resultantes del tratamiento con BA-1049 (R) o 1-hidroxi-BA-1049 (R), donde los valores densitométricos de pMLC2 se normalizan y se trazan como % del control no tratado, y donde se calcula la concentración inhibitoria (IC<sub>50</sub>).

45 La **Figura 27** es una representación gráfica de trazas de análisis de difracción de polvo de rayos X de la forma de adipato de BA-1049 (R) antes de someterse a la prueba de absorción dinámica de vapor (DVS) y después de someterse a la prueba DVS, que muestra que la exposición a la humedad y luego el secado no alteran la red cristalina según lo detectado por difracción de rayos X del adipato de BA-1049 (R); y

50 La **Figura 28** es una representación esquemática que muestra las mediciones del resultado conductual (locomoción en campo abierto y presión de extremidades posteriores) obtenidas de cohortes de ratones con LME que no recibieron tratamiento, o bien recibieron tratamiento diario con BA-1049 (R) durante las 2 primeras semanas tras la lesión, o bien recibieron tratamiento diario con BA-1049 (R) durante la 3<sup>ª</sup> y 4<sup>ª</sup> semanas tras la lesión.

## DESCRIPCIÓN

55 [0027] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece esta divulgación. La definición inicial proporcionada para un grupo o término aquí se aplica a ese grupo o término a lo largo de la presente especificación individualmente o como parte de otro grupo, a menos que se indique lo contrario.

60 [0028] La invención se expone en el juego de reivindicaciones adjunto. La presente divulgación proporciona el enantiómero R del BA-1049 (BA-1049 R), metabolitos activos del mismo, como el 1-hidroxi-BA1049(R), formas deuteradas del BA-1049 (R) y/o sus metabolitos activos, y sales de adipato del BA-1049 (R) y/o sus metabolitos activos. La presente divulgación también proporciona formulaciones farmacéuticas para su uso en métodos de tratamiento de diversos trastornos y lesiones del CNS utilizando estos compuestos en formulaciones farmacéuticas.

Síntesis de BA-1049 (R) así como la síntesis de su sal clorhidrato

5 [0029] Sal clorhidrato de BA-1049 (FIG. 1A), un derivado de piperidina 4-sustituido que existe como una mezcla racémica puede hacerse en cualquier método conocido en el mismo, y ha sido descrito y su modo de preparación establecido en las Patentes de EE.UU. N.º 7.572.913 y 8.957.093 (FIG. 2).

10 [0030] La sal clorhidrato de BA-1049 (R) (fig. 2) puede prepararse tras purificación a partir de la mezcla racémica de los enantiómeros (R) y (S), *p. ej.*, mediante cromatografía en columna. Alternativamente, BA-1049 (R) puede sintetizarse *de novo* como un compuesto quiralmente puro como se muestra en la FIG. 3 o por cualquier método conocido en la técnica.

15 [0031] Alternativamente, se puede realizar la síntesis estereocontrolada de la sal clorhidrato de BA-1049, como se muestra en las FIGS. 4, y como se describe en el EJEMPLO 1. Brevemente, en este método, la condensación de la 1-benciloxicarbonil-4-formilpiperidina (1) disponible comercialmente con (S)-(-)-2-metil-2-propanosulfonamida en condiciones estándar, agitación durante 18 horas a temperatura ambiente, filtración a través de celita, separación de la capa orgánica, concentración y purificación mediante cromatografía en columna, proporciona la imina quiral 2 requerida. A continuación, este último se transformó en el diastereómero (R, S) 3 mediante adición selectiva de metil Grignard a baja temperatura. La eliminación del auxiliar quiral, las manipulaciones del grupo protector y la introducción de la isoquinolina 8 dan como resultado el mismo intermediario 7 utilizado en la síntesis racémica de la sal clorhidrato de BA-1049 (R) (véase la FIG. 2).

Síntesis de 1-Hidroxi-BA-1049(R)

20 [0032] El metabolito 1-hidroxi-BA-1049 (R) se aisló de cultivos de hepatocitos después de que se expusieran al BA-1049 (R) y se caracterizó mediante métodos de LC-MS como se describe en el EJEMPLO 2.

25 [0033] La FIG. 5 muestra un método no limitante de síntesis química de 1-hidroxi-BA-1049 (R) a partir del compuesto 9 ilustrado en la FIG. 2.

Especificidad de Unión de BA-1049 (R)

30 [0034] Para determinar la especificidad/selectividad del BA-1049 (R) para ROCK1 y ROCK2, los valores de la constante de disociación ( $K_D$ ) para el BA-1049 racémico y sus enantiómeros individuales fueron determinados como sigue:

35 [0035] Se sintetizó BA-1049 y la mezcla racémica se separó en sus enantiómeros en una columna quiral. También se sintetizaron otros seis inhibidores de la Rho quinasa con similitud estructural con BA-1049 (*es decir*, BA-1041, BA-1042, BA-1043, BA-1050, BA-1050A y BA-1050B). Los  $K_D$  de estos compuestos fueron entonces medidos para determinar su selectividad para ROCK2 (ver EJEMPLO 2, Tabla 5).

40 [0036] La FIG. 6A, FIG. 6D y la Tabla 1 ilustran los  $K_D$  para la unión a ROCK1 (FIG. 6A y FIG. 6B) o ROCK2 (FIG. 6C, y FIG. 6D) por los isómeros BA-1049 (R) y (S). La Tabla 1 también muestra los  $K_D$  para la unión a ROCK1 o ROCK2 por Fasudil y SLx-2119 y la relación de las constantes de disociación de estos compuestos para cada quinasa (*es decir*, selectividad para la unión a ROCK2).

Tabla 1

Inhibidor	$K_D$ de ROCK1 (nM)	$K_D$ de ROCK2 (nM)	Selectividad fraccional para ROCK2
BA-1049 (R)	110	59	1,86
BA-1049 (S)	120	130	0,92
Fasudil	50	45	1,11
SLx-2119	7400	65	113,85

50 [0037] Estos resultados revelan que BA-1049 (R) se unió más fuertemente a ROCK2. Por el contrario, el enantiómero (S) de BA-1049 se unió a ROCK1 y ROCK2 con afinidades similares.

D. Determinación de la  $IC_{50}$  de BA-1049

55 [0038] La potencia (valores  $IC_{50}$ ), o la capacidad de los enantiómeros de BA-1049 para inhibir ROCK1 o ROCK2, fue entonces determinada. Se utilizaron dos ensayos similares de unión competitiva que midieron la capacidad de cada compuesto para competir con un ligando inmovilizado dirigido al sitio activo de la enzima para realizar determinaciones para ROCK1 y ROCK2 utilizando una concentración estándar de ATP de 10  $\mu$ M.

60 [0039] Los resultados mostrados en las FIGS. 7A - 7D y la Tabla 2 se obtuvieron utilizando un ensayo de quinasa radiométrico de unión directa a filtro (véase el EJEMPLO 2). Las  $IC_{50}$  contra ROCK1 y ROCK2 para BA-1049 (S) (FIG. 7A, y FIG. 7B) y BA-1049 (R) (FIG. 7C, y FIG. 7D) se determinaron utilizando 10  $\mu$ M de ATP para ambas reacciones enzimáticas.

Tabla 2

5	Compuesto	Compuesto IC <sub>50</sub> (μM):		Diferencia de Multiplicación
		ROCK1	ROCK2	
BA-1049 (S)	10,2	0,73		14,1
BA-1049 (R)	3,9	0,24		16,2

10 [0040] Los resultados muestran que BA-1049 (R) y (S) son selectivos de ROCK2 y que BA-1049 (R) tiene la mejor IC<sub>50</sub> de ROCK2 (0.24 μM).

15 [0041] Obtenidos por el protocolo descrito en el EJEMPLO 2, los resultados en la Tabla 3 muestran la IC<sub>50</sub> contra ROCK1 y ROCK2 para BA-1049 (S) y BA-1049 (R) con reacciones realizadas a la concentración Km para ATP específica para cada isoforma dada de ROCK (ROCK1 a 70 μM y ROCK2 a 15 μM ATP).

Tabla 3

20	Compuesto	Compuesto IC <sub>50</sub> (μM):		Diferencia de Multiplicación
		ROCK1 70 μM ATP	ROCK2 15 μM ATP	
BA-1049 (S)	57,9	1		57,9
BA-1049 (R)	29,6	0,34		86,2

25 [0042] Estos resultados muestran que BA-1049 (R) tiene una selectividad 86 veces mayor para ROCK2 que para ROCK1. La variabilidad en la selectividad de ROCK utilizando diferentes concentraciones de ATP puede deberse al hecho de que a 10 μM de ATP, ROCK1 está por debajo de su Km y por lo tanto tardaría más en alcanzar V<sub>max</sub>, requiriendo menos BA-1049 para competir e inhibir la actividad enzimática. Por lo tanto, BA-1049 (R) tiene una alta potencia para ROCK2 en tejido isquémico o enfermo donde las concentraciones de ATP se reducen en comparación con el tejido sano.

#### Usos Terapéuticos de BA-1049 (R) y 1-Hidroxi-BA-1049 (R)

30 [0043] BA-1049 (R) y 1-hidroxi-BA-1049 (R) son selectivos para ROCK2, la isoforma de ROCK altamente expresada en el sistema nervioso central. ROCK2 está hiperactivado en las neuronas en varias enfermedades neurológicas en parte debido al componente inflamatorio de la enfermedad y la entrada de moléculas como el factor de necrosis tumoral y LPA que se sabe que actúan como activadores de ROCK. Entre estas enfermedades se encuentran la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington y la atrofia muscular espinal (SMA). Dado que la liberación de proteínas inhibidoras del crecimiento derivadas de la mielina en el neurotrauma provoca la hiperactivación de ROCK2, BA-1049 (R) y 1-hidroxi-BA-1049 (R) son útiles en el tratamiento de lesiones de la médula espinal, lesiones cerebrales traumáticas, lesiones del nervio óptico y lesiones de los nervios periféricos.

40 [0044] Dado que la isquemia provoca la hiperactivación de ROCK en las células endoteliales cerebrales, el BA-1049 (R) es útil para tratar el accidente cerebrovascular, el vasoespasmo tras la hemorragia subaracnoidea, la malformación cavernosa cerebral, la telangiectasia hemorrágica hereditaria, las malformaciones arteriovasculares cerebrales y la enfermedad de Behcet.

45 [0045] El BA-1049 (R) y el 1-hidroxi-BA-1049 (R) son útiles para tratar el autismo y enfermedades como el síndrome X frágil, el síndrome de Rett y otros trastornos en los que hay anomalías en las espinas dendríticas. Esto se debe a que ROCK es un regulador crítico del citoesqueleto y de la formación de espinas dendríticas, y la sobreactivación de ROCK que conduce a espinas dendríticas anormales se ha reportado en varias formas de autismo.

50 [0046] Además, debido a que ROCK2 es la forma predominante de ROCK expresada en las células epiteliales del colon grande, BA-1049 es útil en el tratamiento de enfermedades en las que ROCK2 está hiperactivado en las células epiteliales enfermas. Al igual que en las células endoteliales, ROCK2 regula las uniones célula-célula entre las células epiteliales. Por lo tanto, BA-1049 (R) y 1-hidroxi-BA-1049 (R) son útiles en el tratamiento de la enfermedad de Crohn y la enfermedad inflamatoria intestinal.

55 [0047] Debido a que ROCK se activa en las células epiteliales tras la irradiación, BA-1049 (R) es útil en la protección de las células de los efectos nocivos de la radiación ionizante utilizada en la quimioterapia, o la radiación resultante de los riesgos ambientales. Esto es útil para los efectos gastrointestinales del síndrome de radiación.

60 [0048] En varias células epiteliales ROCK también juega un papel en la regulación de la expresión de colágeno. BA-1049 (R) es eficaz en el tratamiento de diversas enfermedades fibróticas, *p. ej.*, en el riñón y el hígado, y especialmente la fibrosis del pulmón, porque ROCK2 es altamente expresado en el pulmón.

65 [0049] El metabolito activo 1-hidroxi-BA-1049 (R) muestra eficacia contra ROCK2 y por lo tanto tiene utilidad en muchas de las mismas funciones que para BA-1049 (R) como se describió anteriormente. La aldehído oxidasa es una enzima bien conocida por su importancia en el metabolismo de xenobióticos, especialmente aquellos que son N-heterociclos como el

BA-1049 (R), y es la enzima probablemente implicada en la generación de 1-hidroxi-BA-1049 (R) cuando se administra BA-1049 (R) por vía oral. Como tal, el 1-hidroxi-BA-1049 (R) se utiliza preferentemente por vía intravenosa cuando un paciente en un contexto agudo muestra niveles alterados o reducidos de conciencia, y por lo tanto la administración oral de un fármaco es difícil o imposible. En algunos casos, la genética o la patología pueden guiar la elección del compuesto.

5 Debido a que existen polimorfismos naturales en el gen de la aldehído oxidasa en humanos que pueden conducir a una actividad reducida de esta enzima (Hartmann et al. (2012) *Drug Metab. Disposition*; 40(5): 856-864), esta población se beneficia de la administración de 1-hidroxi-BA-1049 (R) para las enfermedades, trastornos o lesiones descritos anteriormente. Además, la identificación del uso o abuso crónico de alcohol en una historia social favorece la elección de 10 1-hidroxi-BA-1049 (R) para su uso en el tratamiento de enfermedades, trastornos o lesiones como las enumeradas anteriormente, ya que una historia de abuso de alcohol puede causar reducciones significativas de la actividad de la aldehído oxidasa en los hepatocitos del hígado (Hutzler et al. (2014) *Drug Metab. Disposition*; 42(6): 1090-1097). En consecuencia, para el tratamiento de la lesión medular aguda y la lesión cerebral traumática, el metabolito hidroxi es útil porque la intoxicación es una comorbilidad común con el neurotrauma en poblaciones civiles.

## 15 Formulaciones Farmacéuticas Terapéuticas

20 [0050] Las formulaciones farmacéuticas útiles en los métodos terapéuticos según la invención se definen en las reivindicaciones adjuntas. Las formulaciones farmacéuticas útiles en los métodos terapéuticos incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de BA-1049 (R) y/o metabolitos activos del mismo, tales como 1-hidroxi-BA-1049 (R), y/o sales de adipato del mismo y/o forma deuterada del mismo. Otras formulaciones farmacéuticas para su uso en el tratamiento de CCM, aneurisma y los trastornos enumerados anteriormente incluyen cantidades terapéuticamente eficaces de inhibidores de la rho quinasa distintos de BA-1049 (R) o 1-hidroxi-BA-1049 (R).

25 [0051] Una "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a aquella cantidad que proporciona un efecto terapéutico y/o profiláctico terapéutico para tratar un traumatismo neurológico como una CCM, un aneurisma cerebral, un accidente cerebrovascular, un vasoespasmo tras una hemorragia subaracnoidea o una lesión de la médula espinal. Si otro compuesto inhibidor de Rho forma parte de la formulación farmacéutica de BA-1049 (R), o si se va a administrar en una formulación farmacéutica separada, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser diferente para cada uno de ellos, y la adición de uno o más de estos fármacos en la formulación puede alterar la relación de la 30 quinasa inhibida.

35 [0052] Tales formulaciones se preparan con un portador farmacéuticamente aceptable de acuerdo con técnicas conocidas, por ejemplo, las descritas en Remington, *The Science And Practice of Pharmacy* (9th Ed. 1995). El término "portador farmacéuticamente aceptable" debe entenderse aquí como referido a cualquier sustancia que pueda, médicalemente, administrarse aceptablemente a un paciente, junto con un compuesto de esta invención, y que no afecte indeseablemente a la actividad farmacológica del mismo; un "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede ser, por ejemplo, un miembro o miembros farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que comprende o consiste en diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes, agentes modificadores de la tonicidad, tampones, así como cualquier otro vehículo fisiológicamente aceptable. Esta formulación farmacéutica puede contener además otros 40 inhibidores de Rho.

45 [0053] La formulación farmacéutica puede prepararse para uso inyectable, para uso oral, para uso por inhalación, para uso transdérmico, para uso transmembrana y similares.

50 [0054] Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden presentarse en unidades discretas o formas de dosificación, como cápsulas, cachés, pastillas, comprimidos, comprimidos sublinguales, píldoras, polvos, gránulos, goma de mascar, suspensiones, soluciones y similares. Cada forma galénica contiene una cantidad predeterminada de compuesto inhibidor de la Rho quinasa. Si está en forma de solución, el portador farmacéuticamente aceptable puede ser un líquido acuoso, como tamponado con un tampón de pH farmacéuticamente aceptable, o en líquido no acuoso como DMSO, o prepararse como una emulsión de aceite en agua o agua en aceite.

55 [0055] Las formas de dosificación inyectables pueden esterilizarse de una manera farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, mediante esterilización por vapor de una solución acuosa sellada en un vial bajo una atmósfera de gas inerte a 120°C durante unos 15 minutos a 20 minutos, o mediante filtración estéril de una solución a través de un filtro de 0,2 µM o menor tamaño de poro, opcionalmente seguido de una etapa de liofilización, o mediante irradiación de una composición que contiene un compuesto de la presente invención por medio de emisiones de una fuente de radionucleidos.

60 [0056] Una dosis terapéuticamente eficaz de BA-1049 (R) o de un metabolito hidroxilado activo del mismo puede variar de un paciente a otro, y puede depender de factores tales como la edad del paciente, la genética del paciente, y la condición diagnosticada del paciente, y la vía de administración de la forma de dosificación al paciente. La dosis terapéuticamente eficaz y la frecuencia de administración de una forma farmacéutica pueden determinarse de acuerdo con los procedimientos farmacológicos habituales conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, las cantidades de dosificación y la frecuencia de administración pueden variar o cambiar en función del tiempo y de la gravedad del traumatismo neurológico. Puede ser adecuada una dosis de aproximadamente 0,1 mg/kg a 1000 mg/kg, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de BA-1049 (R), 1-hidroxi-BA-1049 (R), o sales deuteradas o adipatadas de los mismos.

[0057] La administración puede realizarse mediante inyección en el líquido cefalorraquídeo como solución o como suspensión adecuada para la liberación sostenida de la forma farmacéutica inyectada, como por ejemplo a partir de una vesícula. La administración puede realizarse alternativamente en el lugar de la lesión mediante inyección estereotáctica.

5

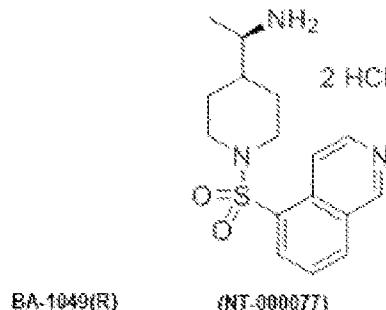
## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### 10 Síntesis de una sal clorhidrato de BA-1049 (R)

[0058] El siguiente esquema describe la síntesis de 50 mg a 100 mg de una sal de clorhidrato del enantiómero R de BA-1049 (NT-000077) e incluye un método de síntesis quiral que permite la identificación de la configuración absoluta ((R) o (S)) de la molécula.

15



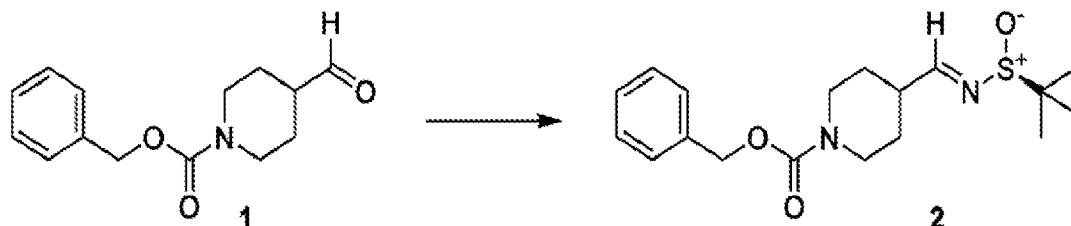
20

25

[0059] A una solución de 1-benciloxicarbonil-4-formilpiperidina (1) (2,0 g, 8,1 mM) en THF (20 ml) se añadió (S)-2-metilpropano-2-sulfinamida (1,0 g, 8,5 mM) seguida de Ti(O*i*Pr)<sub>4</sub> (4,45 ml, 16,2 mM). La solución resultante se dejó agitar a temperatura ambiente (TA) durante 18 h, y después se extinguió con NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado y se diluyó con EtOAc. La mezcla se filtró a través de una almohadilla de celita y se lavó con EtOAc. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con salmuera, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró para dar el residuo bruto que se purificó mediante cromatografía en columna (Isco 40 g) eluyendo con un gradiente de Hexanos/EtOAc (70/30 a 30/60) para obtener la imina 2 deseada (2,2 g, 78%).

35

40



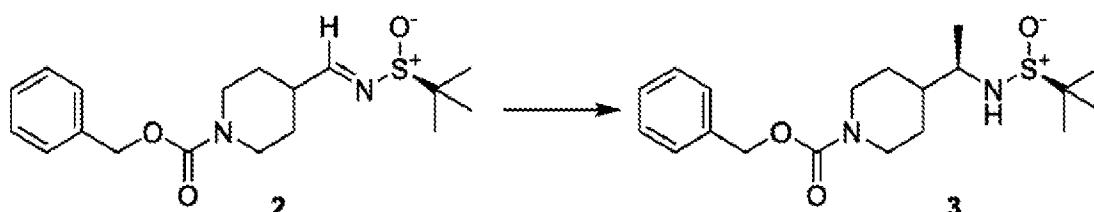
45

50

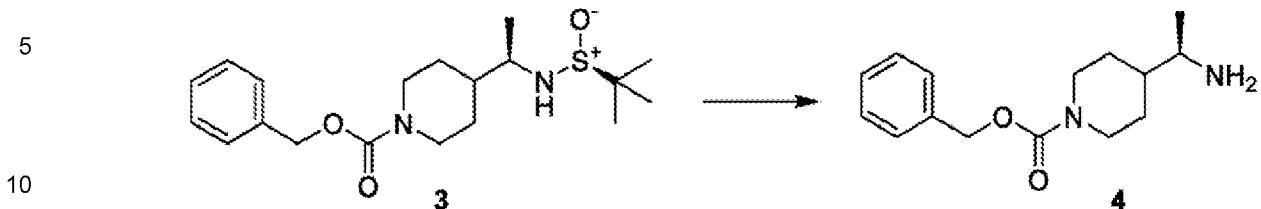
[0060] A una solución de imina 2 (2,2 g, 6,3 mM) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 ml) a -78°C se añadió MeMgBr (3,1 ml, 3,0 M en Et<sub>2</sub>O, 9,3 mM). La reacción se mantuvo a -78°C durante 1 hora y, a continuación, se dejó calentar lentamente hasta RT durante toda la noche. La reacción se extinguió con NH<sub>4</sub>Cl acuoso saturado, se diluyó con EtOAc y se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado, salmuera, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo bruto se purificó mediante cromatografía en columna (Isco 80 g) eluyendo con un gradiente de Hexanos/EtOAc (70/30 a 10/90) para obtener el material deseado 3 (1,67 g, 73%).

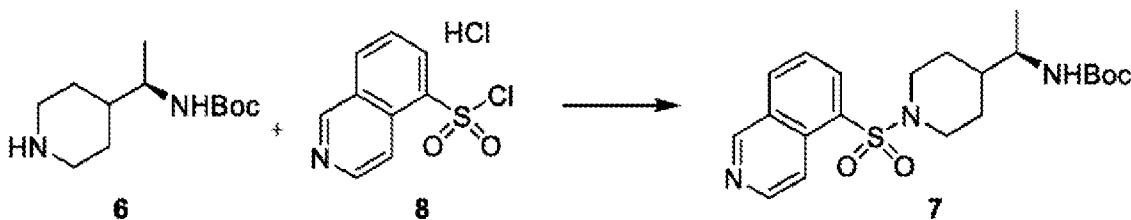
55

60

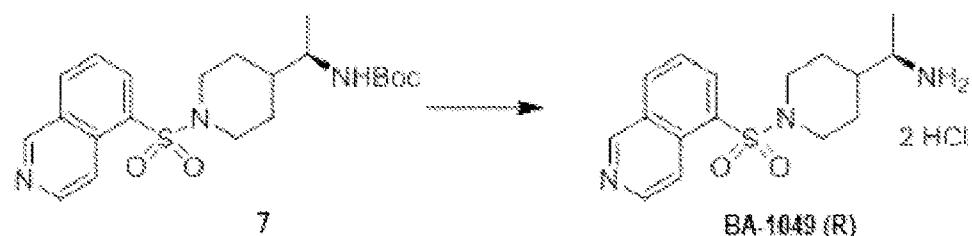


[0061] A una solución de sulfinamida 3 (1,67 g, 4,56 mM) en MeOH (50 ml) se añadió HCl (25 ml, 4 M en dioxano, 6,25 mM). La reacción se envejeció a RT controlando la desaparición del material de partida mediante HPLC analítica en fase inversa. Una vez consumido el material de partida, la reacción se concentró *in vacuo*. El residuo bruto se diluyó con EtOAc y la capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado, salmuera, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró. El residuo bruto 4 se utilizó como tal en la siguiente etapa. (1,16 g, 97%).





- 10 [0066] A una solución del derivado Boc 7 (0,75 g, 1,8 mM) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (15 ml) se añadió HCl (4 M en dioxano, 5 ml, 20 mM). La reacción se agitó a RT durante toda la noche. A continuación, la reacción se concentró *in vacuo*. El residuo bruto se diluyó con un mínimo de MeOH y se añadió lentamente a un matraz que contenía  $\text{Et}_2\text{O}$ . La mezcla heterogénea se agitó durante 5 min y luego se filtró para proporcionar una sal clorhidrato de BA-1049 (R) como sólido blanco (650 mg, 93%).  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CH}_3\text{OH}-d_4$ , 400 MHz):  $\delta$  9.97 (1H, s), 9.18 (1H, d,  $J$  = 6.9 Hz), 8.76-8.81 (3H, m), 8.18 (1H, t,  $J$  = 7.9 Hz), 3.98-4.01 (2H, br d,  $J$  = 12 Hz), 3.15 (1H, p,  $J$  = 6.6 Hz), 2.62 (2H, t,  $J$  = 12 Hz), 1.79-1.84 (2H, m), 1.57-1.61 (1H, m), 1.40 (2H, qd,  $J$  = 12, 4.1 Hz), 1.24 (3H, d,  $J$  = 6.7 Hz).

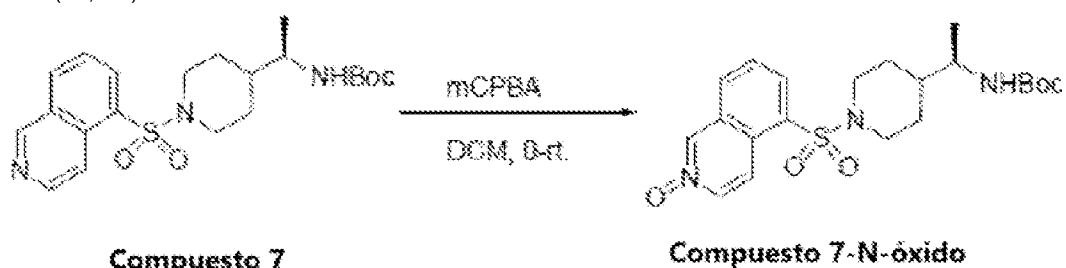


### EJEMPLO 2

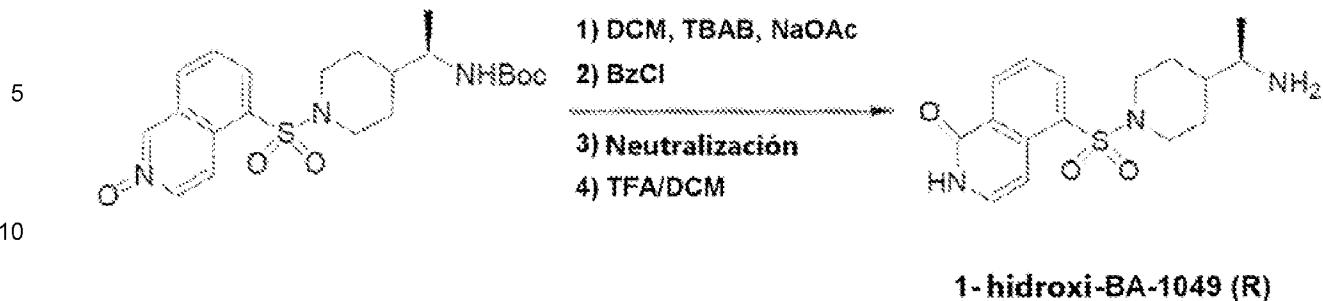
- ### 30 Síntesis de 1-hidroxi-BA-1049 (R)

**[0067]** El siguiente esquema describe la síntesis de 1-hidroxi-BA-1049 (R) comenzando con el mismo compuesto derivado de Boc 7 mostrado anteriormente en el EJEMPLO 1. La síntesis produce un compuesto ya seleccionado quiralmente, de modo que se conoce la estereoquímica absoluta.

- 35 [0068] A un matraz que contenía el derivado Boc **7** (arriba) (1,2 g) se añadieron 72 ml de DCM en atmósfera purgada con nitrógeno. La solución se agitó y se enfrió a 0-5° C. A la solución se añaden porciones divididas de ácido metacloroperoxibenzoico (mCPBA; 0,9 g en total) y la reacción se agitó durante la noche (ON) mientras se dejaba calentar a RT. Se añadieron 30 ml de una solución acuosa al 10% de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> y se agitó durante 30 min. El producto se purificó por cromatografía en columna (Isco 80 g; Fisher Scientific; Pittsburgh, PA)) para obtener el material deseado: N-óxido-  
40 Compuesto **7** (99.2%).



- [0069] Se cargó un matraz purgado con nitrógeno con 0,9 g de N-óxido de Compuesto 7 y se añadieron 9 ml de DCM con agitación. A esta solución se añadieron 0,2 g del catalizador de transferencia de fase bisulfato de tetrabutilamonio (TBAB) y acetato sódico (NaOAc) en agua (4,5 ml) con agitación. Tras otros 10 minutos de agitación, se añadió lentamente cloruro de benzoilo (BzCl) a la mezcla con agitación. Las capas se separaron y la fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado, salmuera, se secó (MgSO<sub>4</sub>) y se concentró para dar el derivado bruto. El material se purificó mediante cromatografía en columna (98,9%) (Isco 80 g; Fisher Scientific).

15 **EJEMPLO 3****Determinación de la Especificidad del Enantiómero BA-1049 para ROCK1 y ROCK2**20 **A. Procedimientos**

25 **[0070]** Los compuestos BA-1049 (R), BA-1049 (S) y otros inhibidores adicionales de Rho quinasa (BA-1041, BA-1042, BA-1043, BA-1050, BA-1050A y BA-1050B) se sintetizaron de acuerdo con protocolos establecidos (Patente de EE.UU. No. 7,572,913). Los compuestos 1050 A y B son enantiómeros que se purificaron mediante cromatografía en columna, pero no se identificó la orientación exacta, por lo que se denominan A y B. Las soluciones madre de cada compuesto se prepararon a 100 mM en DMSO al 100% y se almacenaron en un recipiente hermético a -20°C. Se prepararon alícuotas de trabajo de 10 mM diluyendo las soluciones madre 1:10 en DMSO al 100%. Para las determinaciones de  $K_D$ , se prepararon alícuotas de 50  $\mu$ l a 10 mM para cada compuesto ensayado. Para las determinaciones de  $IC_{50}$ , los compuestos se prepararon en alícuotas de 20  $\mu$ l o 100  $\mu$ l a 10 mM.

30 **[0071]** BA-1049 y BA-1050 existen como mezclas racémicas con un centro quiral cada una. BA-1049 y BA-1050 se resolvieron en sus respectivos enantiómeros, (S) y (R) para BA-1049; los enantiómeros de BA-1050 se denominan A y B porque no se determinó su estereoquímica absoluta. Se prepararon soluciones madre de 10 mM en DMSO antes de almacenar las soluciones madre a -20°C.

35 **[0072]** Las determinaciones de  $IC_{50}$  para BA-1049 se realizaron utilizando un ensayo de quinasa radiométrico de unión directa a filtro como se describe a continuación. En un caso, las determinaciones de  $IC_{50}$  de ROCK1 y ROCK2 se hicieron utilizando una concentración de ATP de 10  $\mu$ M. En otro caso, las determinaciones de  $IC_{50}$  de ROCK1 y ROCK2 se hicieron usando concentraciones de ATP de 10  $\mu$ M, o el  $K_m$  ATP de 70  $\mu$ M y 15  $\mu$ M para ROCK1 y ROCK2, respectivamente. Se probaron variaciones en las concentraciones de ATP para comprender mejor la selectividad potencial en tejidos isquémicos y enfermos, donde las concentraciones de ATP pueden ser bajas y afectar a la selectividad.

40 1. Determinación de la Constante de Disociación de Equilibrio ( $K_D$ )

45 **[0073]** Los valores de  $K_D$  para los compuestos a ensayar y los artículos de control para ROCK1 y ROCK2 se determinaron utilizando el KINOMEscan™ Profiling Service (DiscoverX Corp, Freemont, CA). KINOMEscan™ se basa en un ensayo de unión competitiva que mide cuantitativamente la capacidad de un compuesto para competir con un ligando inmovilizado dirigido al sitio activo. El ensayo se realiza combinando la quinasa marcada con ADN, el ligando inmovilizado y un compuesto de ensayo. La capacidad del compuesto de ensayo para competir con el ligando inmovilizado se mide mediante PCR cuantitativa de la etiqueta de ADN.

50 **[0074]** Los compuestos se probaron utilizando una curva de 11 puntos con diluciones seriadas de 3 veces. La concentración máxima probada fue de 30  $\mu$ M. Los compuestos de ensayo se prepararon en DMSO al 100% a una concentración final de ensayo de 100x y se diluyeron a 1x en el ensayo con una concentración final de DMSO del 1%.

55 **[0075]** Las perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina se trajeron con ligandos de moléculas pequeñas biotinilados durante 30 min a RT para generar resinas de afinidad para ensayos de quinasa. Las esferas unidas al ligando se bloquearon con un exceso de biotina y se lavaron con tampón de bloqueo (SeaBlock (Pierce), 1% BSA, 0,05 % Tween 20, 1 mM DTT) para eliminar el ligando no unido y reducir la unión no específica. Las reacciones de unión se ensamblaron combinando quinasas, perlas de afinidad unidas a ligandos y compuestos de prueba en tampón de unión 1x (20% SeaBlock, 0,17x PBS, 0,05 % Tween 20, 6 mM DTT). Todas las reacciones se realizaron en placas de poliestireno de 96 pocillos en un volumen final de 0,135 ml. Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora. Las esferas de afinidad se lavaron con tampón de lavado (1x PBS, 0,05% Tween 20). A continuación, las microesferas se volvieron a suspender en tampón de elución (1x PBS, 0,05% Tween 20, 0,5  $\mu$ M de ligando de afinidad no biotinilado) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. La concentración de quinasa en los eluidos se midió mediante qPCR.

5 [0076] Las curvas se ajustaron en GraphPad Prism 6.07 utilizando un ajuste de mínimos cuadrados no lineales con el algoritmo de Levenberg-Marquardt. Las constantes de unión (valores  $K_D$ ) se calcularon con una curva dosis-respuesta estándar utilizando la ecuación de Hill con la pendiente de Hill establecida en 1:

$$10 \text{ Respuesta} = \text{Fondo} + \frac{\text{Señal} - \text{Fondo}}{1 + \left( \frac{K_D}{\text{Dosis}} \right)^{\text{Coeficiente de Hill}}}$$

2. Determinación de la constante inhibitoria media máxima ( $IC_{50}$ )

10 [0077] Los valores  $IC_{50}$  para los artículos de prueba y los artículos de control para ROCK1 y ROCK2 se determinaron utilizando el Kinase HotSpot™ Profiling Service (Reaction Biology Corp., Malvern, PA), y  $IC_{50}$  Profiler™ (Eurofins Pharma Discovery Services, St. Charles, MO). Ambos servicios utilizan un ensayo de quinasa radiométrico de unión directa al filtro con ligeras variaciones en el protocolo.

15 [0078] Los compuestos se probaron utilizando una curva de 11 puntos con diluciones seriadas de 3 veces. La concentración máxima probada fue de 100  $\mu\text{M}$  para ambos servicios. Los compuestos de ensayo se prepararon en DMSO al 100% a una concentración final de ensayo de 50x y se diluyeron a 1x en el ensayo con una concentración final de DMSO del 2%.

20 [0079] Para un ensayo, el sustrato EAKEKRQEIQAKRRRLSSLRASTSKSGGSQK (SEQ ID N.º 1) (30  $\mu\text{M}$ ) se mezcló con el tampón de reacción (Tabla 4) y el dominio quinasa de ROCK1 o ROCK2 (como se indica en la Tabla 4). A continuación, los compuestos (en DMSO) se introdujeron en la mezcla mediante tecnología de mezcla acústica (Echo550, gama de nanolitros) (SelectScience, Waltham, MA), y se incubaron a RT durante 20 min. Se añadió  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP radiomarcado (10  $\mu\text{M}$ ) y la reacción se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, las reacciones se mancharon en papel de intercambio iónico P81 y se procedió al recuento por centelleo.

25 [0080] Para el otro ensayo, ROCK1 o ROCK2, fue incubado con buffer de reacción, substrato, 10 mM Mg acetato y  $\gamma$ -<sup>33</sup>P-ATP (10  $\mu\text{M}$  o concentraciones  $K_m$ ) (ver Tabla 4) e incubado por 40 min a RT. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido fosfórico al 3% y 10  $\mu\text{l}$  de la reacción se mancharon en un filtro P30, se lavaron 3 veces en ácido fosfórico 75 mM y una vez en metanol antes del recuento por centelleo.

30 Tabla 4

35	<b>Dominio quinasa</b>	<b>CRO</b>	<b>Secuencia Quinasa Expresada*</b>	<b>Sistema de Expresión</b>	<b>Marcador</b>	<b>Tampón de Prueba</b>
40	ROCK1	RBC	1-535	Insectos	GST	20 mM Hepes (pH 7,5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EGTA, 0,02% Brij35, 0,02 mg/ml BSA, 0,1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 1% DMSO
45	ROCK1	Eurofins	14-535	Insectos	His	20 mM MOPS, 1 mM EDTA, 0,01% Brij-35, 5% Glicerol, 0,1% 6-mercaptopetanol, 1 mg/mL BSA
50	ROCK2	RBC	5-554	Insectos	GST	20 mM Hepes (pH 7,5), 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM EGTA, 0,02% Brij35, 0,02 mg/ml BSA, 0,1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 2 mM DTT, 1% DMSO
	ROCK2	Eurofins	11-552	Insectos	His	50 mM TRIS, 0,1 mM EGTA, 0,1% 6-mercaptopetanol, 1 mg/mL BSA

\* Gama de aminoácidos de las proteínas producidas recombinantemente utilizadas en el ensayo en comparación con las cifras de la enzima humana de longitud completa.

55 [0081] Los recuentos por minuto (cpm) se convirtieron en porcentaje de actividad de la siguiente manera:

$$\% \text{ Actividad} = \frac{(A - B) * 100}{C}$$

60 A = cpm para el artículo de ensayo

B = cpm de blanco (reacción sin dominio quinasa)

C = Promedio de cpm del control (reacción con dominio quinasa solo)

65 [0082] Las curvas se ajustaron en GraphPad Prism 6.07 utilizando regresión logística no lineal de 4 parámetros.

[0083] Los valores  $IC_{50}$  se calcularon a partir de las curvas dosis-respuesta con pendientes variables de la siguiente manera:

$$Y = \text{Inferior} + \frac{(\text{Superior}-\text{Inferior})}{1+10^{(\text{Log IC}_{50} - x)^*}}$$

$$* \text{Coeficiente de Hill}$$

5

**[0084]** Los datos brutos se capturaron en Microsoft Excel 2013. Los datos de Microsoft Excel se transfirieron a GraphPad Prism 6.07 para derivar curvas dosis-respuesta y calcular los valores  $K_D$  e  $IC_{50}$ . El error estándar de la media (SEM) se calculó con Microsoft Excel 2013. Los datos se presentaron como el valor medio más o menos el SEM.

10 B. Resultados

11 1. Determinaciones  $K_D$

15 **[0085]** Las determinaciones se realizaron por duplicado y los resultados se presentan como determinaciones medias en la Tabla 5.

Tabla 5

ID del Compuesto	$K_D$ de ROCK1 (nM)	$K_D$ de ROCK2 (nM)	Diferencia de Multiplicación
BA-1041	760	800	1,0
BA-1042	370	280	1,3
BA-1043	270	230	1,2
BA-1049 Racémico: Lote 1*	54	46	1,2
BA-1049A*	155	160	0,9
BA-1049B*	99	63	1,6
BA-1049 Racémico: Lote 2	89	66	1,3
BA-1050	150	160	0,9
BA-1050A	210	190	1,1
BA-1050B	370	280	1,3
Fasudil	50	45	1,1
SLX-2119 (KD025)	7400	65	113,8

\*Realización de determinaciones repetidas

**[0086]** Las constantes de disociación de equilibrio (valores  $K_D$ ) se realizaron en diferentes lotes racémicos de BA-1049 (Lotes 1 y 2), así como los enantiómeros, R y S. El análisis también incluyó otros seis inhibidores de Rho quinasa seleccionados en base a su similitud estructural con BA-1049 y su capacidad para inhibir selectivamente ROCK2. Entre estos compuestos se encontraban BA-1041, BA-1042, BA-1043, BA-1050 y sus enantiómeros, A y B.

**[0087]** Como se muestra en la Tabla 5, BA-1049 y sus enantiómeros mostraron la más fuerte unión a ambos ROCK1 y ROCK2 (rango nM) en relación a los otros inhibidores de Rho quinasa y los datos confirmaron que BA-1049 permaneció como el más fuerte inhibidor selectivo de Rho quinasa II. Los valores de  $K_D$  de ROCK2 fueron similares a los de Fasudil, un conocido inhibidor de la quinasa ROCK1/2 y un inhibidor selectivo de ROCK2, SLx-2119 (KD025). Se repitieron las determinaciones para el lote recién sintetizado de BA-1049 y sus enantiómeros (Lote 2) y confirman los resultados de las primeras determinaciones. Los valores de  $K_D$  para estos compuestos representan la media de 2 determinaciones duplicadas (es decir, 4 determinaciones).

45

2. Determinaciones de la  $IC_{50}$

**[0088]** Usando BA-1049, los valores  $IC_{50}$  para ambos ROCK1 y ROCK2 fueron determinados usando una concentración de ATP de 10  $\mu$ M. Aunque la mayoría de los inhibidores de la quinasa compiten con la unión del ATP, a menudo se utilizan 10  $\mu$ M para el cribado, a pesar de que los niveles fisiológicos se sitúan en el rango de los mM. Se utilizaron dos variaciones diferentes del ensayo de quinasa radiométrico de unión directa a filtro, como se ha detallado anteriormente. Los resultados figuran en la Tabla 6.

55

60

65

Tabla 6

ID del Compuesto	CRO	Compuesto IC <sub>50</sub> (μM)		Diferencia de Multiplicación
		ROCK1	ROCK2	
BA-1049 Racémico: Lote 1	Biología de la Reacción	1,28	0,60	2,1
	Señalización celular	10,2	0,80	12,8
BA-1049 Racémico: Lote 2	Biología de la Reacción*	1,02 (±0,28)	1,02 (±0,28)	2,8
	Eurofins	6,80	0,55	12,4
BA-1049A	Biología de la Reacción*	1,44 (±0,25)	0,72 (±0,18)	2,0
	Eurofins	10,2	0,73	14,1
BA-1049B	Biología de la Reacción*	0,69 (±0,05)	0,34 (±0,02)	2,0
	Eurofins	3,90	0,24	16,2

15 \*Realización de determinaciones repetidas

20 [0089] Estos resultados muestran que el BA-1049 y sus enantiómeros inhiben selectivamente a ROCK2. En un caso, hubo una diferencia de 2-3 veces en la selectividad de ROCK2, mientras que en otro caso los datos mostraron una diferencia aproximada de 12-13 veces en la selectividad de ROCK2. BA-1049B tuvo el valor IC<sub>50</sub> más bajo (0,24 μM) para ROCK2 y mostró la mejor selectividad ROCK2. Lo más probable es que las diferencias en la selectividad de ROCK2 se deban a diferencias en la preparación de los dominios de quinasa individuales utilizados en los ensayos respectivos. La pureza del dominio quinasa puede tener un impacto significativo en la capacidad del compuesto para unirse y, por tanto, para inhibir. Además, estos compuestos incluyen una pequeña etiqueta His 6x para la purificación que permanece en el dominio quinasa, mientras que la biología de reacción utiliza una proteína GST de 26 kDa fusionada al dominio quinasa.

25 [0090] Los valores de IC<sub>50</sub> para BA-1049 (S) y BA-1049 (R) fueron determinados a la concentración de Km ATP para ambos ROCK1 (70 μM) y ROCK2 (15 μM), un ensayo artificial para entender que podría pasar si la concentración de ATP cayera por debajo del Km de ROCK1. En este caso la velocidad máxima de la reacción sería más lenta, y BA-1049 (R) continuaría siendo activo contra ROCK2. Los resultados figuran en la Tabla 7.

Tabla 7

ID del Compuesto	Compuesto IC <sub>50</sub> (μM)	
	ROCK1	ROCK2
	70 μM ATP	15 μM ATP
BA-1049 (S)	57,9	1,00
BA-1049 (R)	29,8	0,34

30 [0091] Los datos muestran una selectividad de 50 a 60 veces mayor para ROCK2 en relación con ROCK1.

#### EJEMPLO 4

##### Determinación de la Dosis y Vía de Administración de BA-1049 (R)

40 [0092] En este estudio se utiliza en ratones el modelo monofilamento intraluminal murino de oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). La MCAO consiste en la inserción de un filamento quirúrgico en la arteria carótida externa y su avance hacia la arteria carótida interna hasta que la punta ocluye el origen de la MCA, lo que provoca el cese del flujo sanguíneo y el consiguiente infarto cerebral en el territorio de la MCA. La técnica se utiliza aquí para modelar la oclusión transitoria. Si se retira el filamento después de 1 h, se consigue la reperfusión (MCAO transitoria). Este estudio determina la dosis y la vía de administración más eficaces para reducir la activación de la Rho-quinasa 2 (ROCK2) tras un accidente cerebrovascular transitorio inducido por MCAO en ratones. En este estudio también se determina la respuesta farmacodinámica. Este modelo detecta rápidamente la eficacia de BA-1049 (mezcla racémica) y BA-1049 (R) en células endoteliales mediante el uso de biomarcadores bien caracterizados de la actividad de ROCK2, adducina fosforilada (p-adducina), cadena ligera de miosina 2 fosforilada (pMLC2), cofilina fosforilada (fosfo-cofilina), LIMK1/2 fosforilada y ROCK2 autofosforilado. Tras la selección de la vía eficaz y la dosis, se realiza un curso temporal para evaluar la duración del efecto de BA-1049 (mezcla racémica) en función de la duración de la expresión del biomarcador.

45 A. Experimentación con animales

50 [0093] En este estudio se utilizaron 28 C57BL/6 (Charles River Laboratories) de 9 semanas de edad. Para la cirugía, se colocó al ratón en posición supina sobre una almohadilla térmica de infrarrojos. Se afeitó el pelaje del cuello ventral y se desinfectó la piel con etanol al 70% y povidona yodada. Bajo un microscopio estereoscópico de disección, se practicó una incisión de 1 cm en la línea media del cuello y se utilizaron retractores para exponer la arteria carótida común izquierda (CCA), la arteria carótida externa (ECA) y la arteria carótida interna (ICA). Las arterias se disecaron cuidadosamente para liberarlas de los nervios y la fascia circundantes. La ECA se disecó más distalmente y se ataron dos suturas de seda 8-0 alrededor del muñón de la ECA y se aplicó una pinza vascular en la bifurcación de la CCA en la ECA y la ICA. Se realizó una pequeña incisión en el extremo del muñón de la ECA con tijeras de resorte tipo Vannas. Se insertó una sutura roma de monofilamento 5-0 (Doccol) en la incisión y se avanzó desde el lumen de la ECA hacia la ICA hasta una distancia de

9-10 mm más allá de la bifurcación de la CCA para ocluir el origen de la MCA. Para el modelo de ratón, se inserta una distancia de 9 mm -11 mm rostral a la bifurcación CCA. Después de 60 min, se retiró el monofilamento. La incisión se suturó con puntos de prolene 4,0. Se inyectó un ml de solución salina por vía subcutánea y 0,1 mg/kg de buprenorfina por vía subcutánea cada 8-12 horas durante 48 horas para disminuir el dolor. Se deja que el ratón se recupere en una almohadilla térmica hasta que se restablezca la termorregulación.

5 [0094] Las soluciones de dosificación del compuesto inhibidor de Rho quinasa de prueba se prepararon disolviendo BA-1049 en polvo (mezcla racémica) y BA-1049 (R) en PBS estéril para lograr concentraciones de 10 mg/ml, 25 mg/ml y 50 mg/ml para los grupos B, C y D, respectivamente. El pH de las soluciones de dosificación de los compuestos de ensayo se ajustó a 7. Tras la preparación, las soluciones dosificadoras se conservaron a 4°C hasta su uso, las soluciones dosificadoras conservadas se almacenan a 4°C.

10 [0095] Las soluciones de dosificación del compuesto de prueba se prepararon disolviendo el polvo de Fasudil (Calbiochem) en PBS estéril para lograr concentraciones de 10 mg/ml, 25 mg/ml y 50 mg/ml. El pH de las soluciones de dosificación de los compuestos de ensayo se ajustó a 7. Una vez preparadas, las soluciones dosificadoras se conservan a 4°C hasta su utilización. Las soluciones dosificadoras retenidas se almacenaron a 4°C.

15 [0096] El estudio constaba de 3 partes, como se indica en las Tablas 8 a 11:

20

Tabla 8

Parte 1: Determinación de una dosis eficaz de BA-1049 frente a. Fasudil, intraperitoneal (I.P.) inj.				
Grupo	N	Procedimiento Quirúrgico	Vía	Tratamiento, Dosis
1	4	Transitorio (60 min.) MCAO	I.P.	PBS
2	4	Transitorio (60 min.) MCAO	I.P.	BA-1049 (racemato). 10 mg/kg
5	4	Transitorio (60 min.) MCAO	I.P.	Fasudil, 10mg/kg

Tabla 9

30

Parte 2a: Determinación del método óptimo de administración, I.P. vs. Alimentación Forzada Oral (PO)				
Grupo	N	Procedimiento Quirúrgico	Vía	Tratamiento, Dosis BA-1049 (racémico)
1	4	Transitorio (60 min.) MCAO	I.P.	10mg/kg
2	4	Transitorio (60 min.) MCAO	PO	10mg/kg
3	4	Transitorio (60 min.) MCAO	PO	25mg/kg
4	4	Transitorio (60 min.) MCAO	PO	50mg/kg

Tabla 10

35

Parte 2b: Determinación del método de entrega óptimo, IP frente a. SC				
Grupo	N	Procedimiento Quirúrgico	Vía	Tratamiento, Dosis BA-1049 (racémico)
1	4	Transitorio (60 min.) MCAO	I.P.	10mg/kg
4	4	Transitorio (60 min.) MCAO	SC	10mg/kg
5	4	Transitorio (60 min.) MCAO	SC	25mg/kg
6	4	Transitorio (60 min.) MCAO	SC	50mg/kg

Tabla 11

40

Parte 3: Evolución temporal de la eficacia de BA-1049 tras la selección de la mejor vía y dosis					
Grupo	N	Procedimiento Quirúrgico	Vía	Tratamiento, Dosis BA-1049 (racémico)	Recogida post-MCAO
Dosificar y realizar la cirugía MCAO en los Grupos 1-3					
1	4	Transitorio (60 min.) MCAO	TBD	TBD mg/kg	1 d
2	4	Transitorio (60 min.) MCAO	TBD	TBD mg/kg	2 d
3	4	Transitorio (60 min.) MCAO	TBD	TBD mg/kg	3 d

45

50 Analizar los Grupos 1-3, si los biomarcadores persisten dosis y realizar cirugía MCAO en el Grupo 4.

4	4	Transitorio (60 min.) MCAO	TBD	TBD mg/kg	7 d
---	---	----------------------------	-----	-----------	-----

55

55 Analizar Grupo 4, si biomarcadores persisten dosis y realizar cirugía MCAO en Grupo 5

5	4	Transitorio (60 min.) MCAO	TBD	TBD mg/kg	7 d
---	---	----------------------------	-----	-----------	-----

60

60 [0097] Para la Parte 1, los artículos de prueba (BA-1049 racémico, BA-1049 (R), Fasudil) y (solución salina) se

administraron a la dosis especificada en un volumen de aproximadamente 0,2 ml (el volumen se ajustó en función de los pesos corporales individuales) a todos los ratones como una dosis única I.P. 30 min después de la cirugía MCAO utilizando jeringas estériles de 1 ml provistas de una aguja 25 G 5/8. Se administró una dosis única I.P. a todos los ratones.

5 [0098] Para la Parte 2a/2b, los artículos de prueba y vehículo se administraron a la dosis especificada en un volumen de aproximadamente 0,2 ml (el volumen se ajusta en función de los pesos corporales individuales) a todos los ratones por sonda oral (PO) (< 10 mg/kg) 30 min después de la cirugía de MCAO (2a) o inyección subcutánea (SC) en el flanco derecho 30 min después de la cirugía de MCAO (2b) utilizando jeringas estériles de 1 ml provistas de una aguja 25 G 5/8. Se administró la dosis especificada a todos los ratones.

10 [0099] A las 24 horas después de la cirugía de MCAO, los ratones fueron eutanasiados y se recogen los cerebros para el análisis de biomarcadores mediante una Transferencia de Western o inmunohistoquímica. Para el análisis de Transferencia de Western, los ratones fueron anestesiados con isoflurano y decapitados. Las arterias cerebrales medias derecha e izquierda irrigan la superficie lateral de sus respectivos lóbulos en el territorio de las cortezas motora y sensorial.

15 15 Se recogió el cerebro rostral al cerebelo (excluido el bulbo olfatorio) ipsilateral (hemisferio izquierdo) y contralateral (hemisferio derecho) a la oclusión. Los hemisferios ipsilateral y contralateral se recogen en 2 tubos separados. El tejido cerebral congelado se procesó posteriormente en lisados tisulares siguiendo el protocolo experimental que se documenta a continuación.

20 [0100] Para la inmunohistoquímica, los ratones fueron anestesiados utilizando isoflurano y perfundidos intracardialmente utilizando paraformaldehído (4% PFA), se registraron el cerebro y los pesos. Las muestras de cerebro de los animales fijados se congelaron en OCT y se seccionaron con un criostato.

#### B. Preparación y cuantificación de lisados tisulares

25 [0101] Se añadieron 20 µl de inhibidor de proteasa (Halt, Protease, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) y 10 µl de inhibidor de fosfatasa (Fisher Scientific) a 1 ml de tampón RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). Se añadieron 0,5 ml de tampón de lisis a cada muestra de tejido y los tejidos se trituraron individualmente utilizando un tubo/pinza BioMasher II® limpio (Kimble Chase Life Science, Vineland, NJ) para cada muestra. La mezcla se agitó en vórtex para facilitar la lisis tisular y se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos a 13.000 rpm. Se recogieron los sobrenadantes de cada tubo. La concentración de proteínas de cada muestra se determinó utilizando el DC Protein Assay Kit y siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### C. Transferencia de Western

35 [0102] Los lisados de proteínas se analizaron por Transferencia de Western siguiendo el protocolo experimental que se indica a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
pCofilina polyclonal de conejo (Cell Signaling Cat# 3313, lote# 7)	1:500	HRP IgG anti-Conejo (Cell Signaling Cat# 7074, lote #26)	1:1500
pROCK2 polyclonal de conejo (Genetex Cat# GTx122651, lote# 42026)	1:500	HRP IgG anti-Conejo (Cell Signaling Cat# 7074, lote #26)	1:1500
Ciclofilina 40 polyclonal de conejo (Santa Cruz Cat# sc-66848, lote# H3103)	1:2000	HRP IgG anti-Conejo (Cell Signaling Cat# 7074, lote #26)	1:1500
pMLC2 (Thr18/Ser19) polyclonal de conejo (Cell Signaling Cat#3674, lote# 3)	1:1000	HRP IgG anti-Conejo (Cell Signaling Cat# 7074, lote #26)	1:1500
pMLC2 (Ser19) polyclonal de conejo (Cell Signaling Cat#3671, lote# 3)	1:500	HRP IgG anti-Conejo (Cell Signaling Cat# 7074, lote #26)	1:1500
pAdducina polyclonal de conejo (Santa Cruz Cat# sc-16738, lote# B0414)	1:200	HRP IgG anti-Conejo (Cell Signaling Cat# 7074, lote #26)	1:1500
pLINM1/2 polyclonal de conejo (Cell Signaling Cat#3841, lote# 6)	1:500	HRP IgG anti-Conejo (Cell Signaling Cat# 7074, lote #26)	1:1500

60 [0103] Los hemisferios izquierdo y derecho de cada cerebro se homogeneizaron y prepararon para Transferencia de Western, y la señal de fosfo-cofilina se midió cuantitativamente por densitometría en comparación con un estándar interno, la ciclofilina.

[0104] La FIG. 9 muestra los resultados de la Parte 1 del estudio descrito anteriormente y en la Tabla 3. BA-1049 (10 mg/kg) se comparó con Fasudil (10 mg/kg) y los controles con vehículo. Las inyecciones se realizaron por vía IP a los 30 minutos de la recuperación tras la MCAO. El tejido se recogió 24 horas después de la MCAO. La relación de la señal de fosfo-cofilina en los hemisferios izquierdo y derecho del cerebro se examinó mediante Transferencia de Western. En estos experimentos, una reducción de la relación de expresión de fosfo-cofilina entre el lado izquierdo (MCAO) y el derecho (no

lesionado) demuestra una reducción de la activación de ROCK y, por lo tanto, un aumento de la inhibición de ROCK por el tratamiento dado. LA FIG. 8 muestra que la expresión de fosfo-cofilina está fuertemente aumentada en el lado del cerebro afectado por el accidente cerebrovascular y actúa como un biomarcador eficaz de la activación de ROCK2.

- 5 [0105] Como se muestra en la FIG. 9, la relación de expresión de fosfo-cofilina se redujo fuertemente con BA-1049 racémico y se redujo en menor medida con Fasudil en comparación con los controles de sólo vehículo. Cuando se repite el experimento con BA-1049 (R), aumenta el efecto sobre la reducción de la fosfo-cofilina tras la MCAO. Estos experimentos muestran que 10 mg/kg de BA-1049 (R) es eficaz en la reducción de la activación de ROCK2 por MCAO, en comparación con Fasudil. Así pues, estos resultados muestran que BA-1049 (R) reduce la fosfo-cofilina con más fuerza 10 que Fasudil cuando se comparan ambos a 10 mg/kg.

#### D. Inmunohistoquímica

- 15 [0106] Se analizaron mediante inmunohistoquímica secciones de tejido congelado embebidas en OCT. El lado izquierdo del corte cerebral contiene tejido isquémico debido a la MCAO, mientras que el hemisferio derecho actúa como control sin isquemia. Los cortes cerebrales se trataron con los anticuerpos enumerados en la Tabla 13. La tinción con estos anticuerpos proporciona biomarcadores tanto de la zona isquémica como de la activación de ROCK2.

Tabla 13

Anticuerpo Primario	Dilución	Anticuerpo Secundario	Dilución
pCofilina polyclonal de conejo (Cell Signaling Cat# 3313, lote# 7)	1:100	Alexa 488 IgG Anti-Conejo (Molecular Probes Cat# A11008, lote #1622775)	1:500
Factor de Von Willebrand polyclonal de conejo (Millipore Cat#AB7356, lote# 2569161)	1:250	Alexa 488 IgG Anti-Conejo (Molecular Probes Cat# A11008, lote #1622775)	1:500
pMLC2 (Thr18/Ser19) polyclonal de conejo (Cell Signaling Cat#3674, lote# 3)	1:250	Alexa 488 IgG Anti-Conejo (Molecular Probes Cat# A11008, lote #1622775)	1:500
pMLC2 (Ser19) polyclonal de conejo (Cell Signaling Cat#3671, lote# 3)	1:100	Alexa 488 IgG Anti-Conejo (Molecular Probes Cat# A11008, lote #1622775)	1:500
pAdducina polyclonal de conejo (Santa Cruz Cat# sc-16738, lote# B0414)	1:250	Alexa 488 IgG Anti-Conejo (Molecular Probes Cat# A11008, lote #1622775)	1:500
IBA1 polyclonal de conejo (Wako chemicals Cat#019-1974, lote#SAN3725)	1:250	Alexa 488 IgG Anti-Conejo (Molecular Probes Cat# A11008, lote #1622775)	1:500

- 35 [0107] Las FIGS. 10A - 10D muestran tinción fosfo-MLC2 (Ser19) en pequeños vasos sanguíneos de la corteza insular. Los vasos sanguíneos se tiñen fuertemente en la corteza insular del lado izquierdo (MCAO) del cerebro (FIG. 10A), mientras que no hay tinción de vasos pequeños en el lado de control (sin MCAO) (FIG. 10B). La fosfo-MLC2 es un marcador aguas abajo de la activación de ROCK2. 10 mg/kg de Fasudil inyectados por vía intraperitoneal (I.P.) (FIG. 10C) reduce la cantidad de tinción, mientras que 10 mg/kg de BA-1049 (FIG. 10D) inyectada I.P. es incluso más eficaz que el 40 Fasudil para reducir la tinción de los vasos pequeños. Las FIGS. 10E y 10F muestran la inmunorreactividad de Iba-1 en el estriado cerebral izquierdo después de la MCAO y la inyección I.P. con vehículo (FIG. 10E) o BA-1049 (R) (FIG. 10F). La inmunorreactividad de Iba-1 es un marcador de microglía en el cerebro. La intensidad de tinción de Iba-1 aumenta en la microglía activada, en respuesta al daño isquémico en el cerebro. Estos resultados demuestran que BA-1049 (R) reduce la reacción microglial a la isquemia.

#### EJEMPLO 5

##### Dosis Efectiva de BA-1049 (R)

- 50 [0108] Para determinar la dosis eficaz para revertir la activación de ROCK, se utilizó el modelo MCAO descrito anteriormente en el EJEMPLO 4. En estos experimentos, ratones que han recibido la oclusión del vaso MCAO y una inyección intraperitoneal de dosis de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg, 3, mg/kg o 10 mg/kg o solución salina (vehículo) como control, la activación de ROCK se evalúa mediante la expresión de fosfo-cofilina en el cerebro izquierdo frente al derecho. En este modelo, tras una única aplicación de BA-1049 (R), la dosis mínima eficaz fue de 1 mg/kg, como se observa en la FIG. 11. 55 Los niveles mínimos eficaces son inferiores a 1 mg/kg con repetición diaria de la dosis.

- 60 [0109] En un conjunto separado de experimentos, se realizaron experimentos de repetición diaria de dosis para evaluar los efectos adversos. Los ratones normales recibieron 1 mg/kg o 10 mg/kg de BA-1049 (R) una vez al día mediante inyección intraperitoneal durante 2 semanas. Durante el transcurso del experimento, se vigiló diariamente a los animales para detectar la aparición de cualquier signo clínico. Al final del experimento se realizó un seguimiento hematológico, bioquímico e histopatológico.

- 65 [0110] En la repetición diaria de la dosificación durante 2 semanas, no se observaron hallazgos anormales relacionados con la dosificación diaria de BA-1049 (R) a 1 mg/kg y a 10 mg/kg. Por lo tanto, la dosis terapéutica de BA-1049 (R) mostrada en la Figura 11 está por debajo de la dosis de nivel sin efecto observado de 10 mg/kg determinada a partir de los experimentos de dosis repetidas de 2 semanas.

**EJEMPLO 6****Respuesta Farmacodinámica**

5 [0111] Para determinar la respuesta farmacodinámica, se sometió a los ratones a MCAO y luego se determinó la relación de los niveles de fosfo-cofilina del cerebro izquierdo con respecto al derecho, como se describió anteriormente en el EJEMPLO 4. Los ratones fueron examinados 4 ó 24 horas después de la reperfusión y la administración de 10 mg/kg de BA-1049 (R).

10 [0112] Como se muestra en las FIGS. 12A y 12B, ambos puntos temporales mostraron eficacia, demostrando la eficacia de BA-1049 (R) durante al menos 24 h. En otros experimentos, los ratones recibieron BA-1049 (R) durante 24, 72 o 168 horas antes de la MCAO. Los resultados mostrados en la FIG. 12C demuestran que 3 días de exposición previa a BA-1049 (R) previene la hiperactivación de ROCK después de MCAO.

**EJEMPLO 7****Permeabilidad Endotelial Revertida por BA-1049 (R)**

20 [0113] Este estudio demuestra la capacidad de BA-1049 (R) para revertir la permeabilidad de las células endoteliales que se produce en el modelo MCAO de accidente cerebrovascular de ratón.

25 [0114] Los ratones recibieron una lesión MCAO, como se describe en el EJEMPLO 4. Dos horas después de la reperfusión, se inyectó a los ratones por vía intravenosa una solución al 1,2% de colorante azul de Evans en PBS, que se une fuertemente a la albúmina sérica. Dos horas después de la MCAO, se inyectó azul de Evans, y 4 horas después de la reperfusión, los ratones fueron sacrificados, perfundidos, decapitados, y sus cerebros disecados como se describe en el EJEMPLO 4.

30 [0115] Los homogeneizados se prepararon como en el EJEMPLO 4 y luego se precipitaron en ácido tricloroacético al 50% para precipitar las proteínas y liberar el colorante azul de Evans de la albúmina. Tras centrifugar las proteínas (a 10.000 × g), los sobrenadantes se colocaron en una placa de 96 pocillos y se leyó la absorbancia a 595 nm y la fluorescencia (535 Ex/642 Em) utilizando un lector de placas Victor 2 Wallac (Perkin-Elmer; Branford, CT). La comparación con una curva estándar permite determinar la concentración de colorante azul de Evans en la muestra y, por tanto, medir la permeabilidad a la albúmina.

35 [0116] La FIG. 13A muestra micrografías de los cerebros de animales tratados con Vehículo o BA-1049 (R). El lado izquierdo (L) es el lado isquémico del cerebro y se compara con el córtex derecho (R). BA-1049 (R) reduce la señal fluorescente en comparación con el control del vehículo. La FIG. 13B muestra una representación gráfica de los resultados y muestra que el tratamiento con BA-1049 (R) es capaz de reducir la señal azul de Evans en comparación con el cerebro izquierdo del control del vehículo. Estos resultados demuestran que BA-1049 (R) es capaz de reducir la permeabilidad de las células endoteliales.

**EJEMPLO 8****Vías de administración de BA-1049 (R) en Ratones C57BL/6 (no BPG)**

45 [0117] Para determinar las concentraciones plasmáticas y la farmacocinética de los compuestos de ensayo y del artículo de ensayo tras una única administración intravenosa (IV) (5 mg/kg), intraperitoneal (IP) (10 mg/kg) u oral (PO) (30 mg/kg) a ratones macho C57BL/6, se realizaron las siguientes pruebas [WAS/IS] según las conductas establecidas en la Tabla 14.

**Tabla 14\***

Vía	Cantidad Administrada	Volumen	Concentración de la solución dosificadora	Volumen de PBS necesario	Peso del TA en el vial
IV	0,125 mg	0,1 mL	1,25 mg/mL	3 mL	3,75 mg
IP	0,25 mg	0,5 mL	0,5 mg/mL	15 mL	7,5 mg
PO	0,75 mg	0,2 mL	3,75 mg/mL	6 mL	22,5 mg

\*Esta tabla se generó sobre la base de proporcionar suficiente artículo de prueba para dosificar 30 ratones de cada vía.

60 [0118] En este estudio se utilizaron ratones C57BL/6 de 8-10 semanas de edad (Charles River Labs, Wilmington, MA). El fármaco de ensayo figura en la Tabla 15:

**Tabla 15**

Grupo #	Nº de ratones/Sexo	Vía de administración	Dosis (mg/kg)	Dosis Conc. (mg/mL)	Dosis Vol. (mL/kg)	Dosis Vol. (µL/g)
1	24M	IV	5	1.25	4.0	4
2	24M	IP	10	0.5	20.0	20
3	24M	PO	30	3.75	8.0	8
4*	5M	-	-	-	-	-

\*El grupo 4 es sólo para la recogida de cerebro entero ingenuo y no se dosificará.

5

[0119] El fármaco de prueba se suministra una vez de la siguiente manera: Cada jeringa dosificadora intravenosa se pesa cargada y descargada con una precisión mínima de 4 decimales. La dosis real (5 mg/kg) administrada al animal es la diferencia entre los pesos con y sin carga de la jeringa dosificadora. Cada jeringa dosificadora IP se pesa cargada y descargada con una precisión mínima de 4 decimales. La dosis real (10 mg/kg) administrada al animal es la diferencia entre los pesos con y sin carga de la jeringa dosificadora. La administración PO de 30 mg/kg se realiza utilizando una aguja de acero inoxidable con punta de bola para sonda unida a una jeringa de plástico.

10 15 A. Farmacocinética

1. Toma de muestras de sangre

[0120] Tras la administración de la dosis intravenosa, se recogen muestras de sangre terminal (aproximadamente de 1 ml a 2 ml cada una) de 4 animales en cada uno de los siguientes puntos temporales posteriores a la dosis: 0,083 h, 0,5 h, 2 h, 6 h, 12 h y 24 h. Tras la administración de la dosis I.P. u PO, se recogen muestras de sangre terminal (aproximadamente de 1 ml a 2 ml cada una) de cuatro animales en cada uno de los siguientes puntos temporales posteriores a la dosis por vía de administración: 0,25 h, 1 h, 4 h, 8 h, 12 h y 24 h. Cada animal es anestesiado por inhalación de CO<sub>2</sub> y se recogen muestras de sangre terminal mediante cardiocentesis y se transfieren a tubos preetiquetados que contienen heparina sódica como anticoagulante. Tras la extracción de sangre por cardiocentesis, se devuelve el animal a la cámara de CO<sub>2</sub> y se le aplica la eutanasia por asfixia con CO<sub>2</sub>. Las muestras de sangre recogidas se invierten suavemente varias veces para mezclar el anticoagulante.

20 25 B. Recolección de Plasma

[0121] Las muestras de sangre se centrifugan a aproximadamente 3000 × g rpm durante 10 min a aproximadamente 4°C, [el plasma resultante se observa para detectar hemólisis]. Todas las muestras de plasma derivadas se almacenan congeladas a aproximadamente -80°C hasta su posterior procesamiento.

30 35 C. Recolección de Cerebro

[0122] Tras la administración de la dosis intravenosa, se recoge el cerebro entero por cardiocentesis de 4 animales en cada uno de los siguientes puntos temporales tras la dosis: 0,083 h, 0,5 h, 2 h, 6 h, 12 h y 24 h. Tras la administración de dosis I.P. y PO, se recoge el cerebro entero mediante cardiocentesis de 4 animales en cada uno de los siguientes puntos temporales postdosis por vía de dosis: 0,25 h, 1 h, 4 h, 8 h, 12 h y 24 h. Se enjuaga todo el cerebro en 1 X PBS, se registra el peso del tejido y se congela a presión en tubos preetiquetados utilizando nitrógeno líquido. Además, se recoge el cerebro entero de 5 ratones ingenuos a las 24 horas, se enjuaga en 1X PBS, se registra el peso del tejido y se congela en tubos preetiquetados utilizando nitrógeno líquido.

40 45 D. Análisis Bioanalíticos

[0123] Las muestras se analizan por LC/MS/MS utilizando un espectrómetro de masas Agilent 6410 acoplado a un HPLC Agilent 1200 y un automuestreador refrigerado CTC PAL, todo ello controlado por el software MassHunter (Agilent). Tras la separación en una columna HPLC X-Select (Waters, 130A, 3,5 µm, 2,1 × 50 mm) utilizando un sistema de gradiente acetonitrilo-agua (mostrado a continuación), los picos se analizaron por espectrometría de masas (EM) utilizando ionización ESI en modo MRM.

[0124] Para las muestras de calibración, se prepara una dilución de trabajo del artículo de prueba a 25 veces la concentración final y se diluye en serie (3 veces). Estas muestras se diluyen 25 veces en plasma blanco de ratón C57BL/6 y se mezclan con tres volúmenes de acetonitrilo que contiene un patrón analítico interno (propranolol), se incuban en hielo durante 10 min a 4°C y luego se centrifugan. El sobrenadante libre de proteínas se utiliza para el análisis LC-MS/MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem). Los resultados mostrados en la FIG. 14 muestran que BA-1049 (R) es capaz de penetrar en el cerebro por las tres vías de administración.

50 55 60 EJEMPLO 9

#### Efecto de BA-1049 (R) y BA-1049 (S) en el Crecimiento de Neuritas de Células NG108

[0125] Se comparó el efecto de BA-1049 (R) y BA-1049 (S) sobre el crecimiento de neuritas mediante un ensayo de cultivo celular con células NG-108. En primer lugar, se determinó la dosis eficaz para su uso con células NG-108 y, a continuación, se comparó BA-1049 (R) con un inhibidor específico de ROCK2, SLx-2119.

5 [0126] Se comparó el efecto de BA-1049 (S) y BA-1049 (R) sobre el crecimiento de neuritas en células NG-108. Como se muestra en la FIG. 15D, BA-1049 (R) fue el compuesto más potente para estimular el crecimiento de neuritas en comparación con el control DMSO (FIG. 15A), BA-1049 racémico (FIG. 15B), o BA-1049 (S) (FIG. 15C). Así, BA-1049 (R) produce el crecimiento de neuritas más robusto que el compuesto (S).

10 10 [0127] Como se muestra en las FIGS. 16A - 16C, 5  $\mu$ M SLx-2119 demostró ser tóxico para las células NG-108, y las células mostraron formación de vacuolas y comenzaron a morir (FIG. 16A). Por el contrario, BA-1049 (R) promovió el crecimiento de neuritas a 5  $\mu$ M (FIG. 16B) y 50  $\mu$ M (FIG. 16C); BA-1049 (R) no fue tóxico para las células NG-108 en las concentraciones más altas probadas (FIG. 16C).

#### EJEMPLO 10

##### Efecto del Silenciamiento de PTEN en la Expresión de ROCK2

15 20 [0128] Se aislaron células neuronales de la corteza cerebral en desarrollo de ratas embrionarias utilizando métodos de disruptión enzimática y mecánica y, a continuación, se colocaron sobre sustratos de crecimiento especializados que incluían laminina y poli-D-lisina en una placa de cultivo de tejidos. Estas mezclas celulares se cultivaron en un medio especializado en condiciones de bajo contenido de suero con adiciones de medios seleccionados especializados (NeuroBasal Medium con aditivo B27, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) diseñado para aumentar la supervivencia de las células neuronales en el plato. Los cultivos de células neuronales crecieron en la placa durante 1 d (D1) o 7 d (D7) antes de ser expuestos a una concentración de 1  $\mu$ M de moléculas de ARNsd (ARNsd = ARNi autodifusor) dirigidas a la secuencia PTEN o a una secuencia de ARN de control "no dirigida" no relacionada. A continuación, los cultivos neuronales se incubaron en presencia de estas moléculas de ARNsd durante otros 3 días. Las proteínas se extrajeron de los cultivos en una solución basada en tampón Tris que contenía NP-40 y detergentes de ácido desoxicólico mediante trituración y agitación en vórtex, seguida de centrifugación para eliminar los materiales no solubles. Las concentraciones de proteínas de los extractos se determinaron mediante el ensayo Bradford modificado y se analizaron cantidades equivalentes de extracto con proteínas mediante Transferencia de Western para determinar si había cambios específicos en la cantidad de proteínas PTEN, ROCK2 o GAPDH tras el tratamiento con los ARNsd indicados.

30 35 40 [0129] Los resultados mostrados en la FIG. 17 proceden de experimentos de Transferencia de Western en los que se analizaron los niveles de las proteínas PTEN, ROCK2 y GAPDH. En el caso de los cultivos de neuronas cultivadas durante 7 días antes del tratamiento con el ARNsd (D7), la reducción del ARNm de PTEN mediante el ARNsd específico de PTEN conduce a una reducción de los niveles de proteína PTEN en estas células, como era de esperar. La reducción de los niveles de proteína PTEN también conduce a una reducción sustancial de los niveles de proteína de la quinasa ROCK2. Estos datos muestran que las intervenciones que conducen a una disminución de la proteína PTEN pueden, en última instancia, conducir también a una disminución de la proteína ROCK2. La capacidad de reducir la actividad celular total de ROCK2 mediante la reducción de la expresión de PTEN también puede ser un componente de lo que se conoce actualmente con respecto a la implicación de la reducción de la actividad de PTEN en la regeneración neural. Esto indica que parte de los efectos que se observan cuando se inhibe la función de PTEN pueden deberse en última instancia a disminuciones en la expresión de ROCK2. Por lo tanto, la capacidad de inhibir ROCK2 selectivamente utilizando BA-1049 (R) y producir efectos regenerativos también puede ser parte de la vía que está implicada cuando la regeneración se produce como resultado de interferir con PTEN.

45 [0130] La expresión de ROCK2 es disminuida por el silenciamiento de PTEN, mostrando inesperadamente que ROCK2 es un objetivo prometedor aguas abajo de PTEN. Por lo tanto, BA-1049 que inactiva ROCK2 es un objetivo mejor que PTEN para provocar la regeneración de axones en el CNS.

50 55 60 [0131] Mediante lesión quirúrgica del tracto corticoespinal de la médula espinal en un grupo de 12 ratones (sistema nervioso central), del nervio óptico en un grupo de 12 animales, y del nervio ciático del sistema nervioso periférico en un grupo adicional de 12 ratones, se aplican 5  $\mu$ L de 1  $\mu$ M BA-1049 (R) o solución salina de control (por grupo de 6 ratones) durante la cirugía mediante inyección directa en el lugar de la lesión en el momento de la lesión experimental y los animales se recuperaron durante 2 a 4 semanas después de la lesión. En el momento del sacrificio, se miden los cambios en la extensión relativa de la regeneración mediante técnicas histológicas. Un día antes del sacrificio, se inyectan moléculas trazadoras fluorescentes, como la toxina del cólera marcada, en la corteza motora para teñir los axones que se proyectan hacia la médula espinal, en el ojo para medir la regeneración de los axones de las células ganglionares de la retina o, en el caso del nervio ciático, la inyección de dextrano amina marcada proximal a la médula espinal en la región de las raíces nerviosas permite caracterizar, mediante marcaje anterógrado, los axones de los nervios periféricos. Las secciones se preparan al día siguiente del sacrificio y la perfusión del animal con fijador. Las secciones se recogen en portaobjetos de vidrio y, a continuación, los marcadores fluorescentes se visualizan a través del microscopio y la distancia a la que crecen los axones regeneradores etiquetados se mide en una serie de fotografías tomadas de las secciones especificadas. Las longitudes de los axones marcados se comparan entre los animales tratados con BA-1049 (R) y los tratados simplemente con inyecciones salinas.

65 [0132] Los animales tratados con BA-1049 (R) muestran regeneración en el sistema nervioso central (p. ej., tracto corticoespinal y nervio óptico) en comparación con los animales no tratados; más axones en los nervios periféricos se

regeneran y alcanzan sus objetivos, en comparación con los controles.

#### EJEMPLO 11

##### 5 Efecto de BA-1049 (R) sobre las células endoteliales

[0133] Para determinar los efectos de BA-1049B (R) sobre la hiperactivación de ROCK y la función de barrera endotelial, se utilizan células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). La hiperactivación de ROCK se induce mediante la administración de ácido lisofosfatídico (LPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), un potente activador de la vía Rho/ROCK. 10 La eficacia de BA-1049 (R) se determina investigando la formación de fibras de tensión de actina, un biomarcador de la actividad de ROCK, y la distribución de la proteína del complejo de adhesión focal vinculina, un biomarcador de la integridad de la barrera endotelial.

##### 15 A. Cultivo celular y estimulación con LPA

[0134] Las células HUVEC primarias (Gibco®, Thermo Fisher, Waltham, MA) se cultivan en medios de crecimiento endotelial (Gibco® Medium 200 basal media Cat suplementado con Gibco® Large Vessel Endothelial Supplement). Para todos los experimentos se utilizan HUVEC entre el paso 1 y 4. Las HUVEC se cultivan en cubreobjetos de vidrio tratados con poli-D-lisina (Corning, Corning, NY) recubiertos con 70 µg/ml de colágeno I de rata (Corning, Corning, NY) y se cultivan 20 durante 4 días hasta que se establece una monocapa confluyente de células. Antes de la estimulación con LPA, las células se privan de suero durante 1 hora utilizando Medio 200 suplementado con 0,1% de albúmina de suero humano que contiene 50 µM BA 1049 (R), 50 µM Fasudil, o vehículo (DMSO) respectivamente. A continuación, se estimulan las HUVEC con 20 µM de LPA durante 10 minutos y, posteriormente, se fijan con una solución de paraformaldehído (PFA)/sacarosa al 4%.

##### 25 B. Inmunocitoquímica y microscopía

[0135] Tras la fijación con PFA, las células en cubreobjetos se permeabilizan con TBS-Triton-X100 (0,1%), se bloquean con albúmina de suero bovino al 1% y se incuban con el anticuerpo primario de vinculina de ratón (Tabla 16). El inmunomarcaje de la vinculina se visualiza utilizando un anticuerpo fluorescente secundario anti-ratón (Tabla 16). El citoesqueleto de actina se visualiza mediante tinción con faloidina fluorescente (Tabla 16), un compuesto que se une específicamente a los filamentos de F-actina. La microscopía de epifluorescencia se utiliza para adquirir imágenes de la fluorescencia de inmuno y faloidina, respectivamente.

35 Tabla 16

Anticuerpo/Tinte	Dilución
Vinculina ratón mAb IgG (Becton Dickinson)	1:400
pAb antirratón de cabra conjugado con Alexa 488 (Becton Dickinson)	1:500
Faloidina conjugada con Alexa 568 (Thermo Fisher)	1:100

40 [0136] Los resultados mostrados en la FIG. 18 demuestran que la estimulación con LPA induce una pronunciada formación de fibras de tensión de actina en HUVEC (FIG. 18B) en comparación con las células antes de la estimulación (Fig 18A).

45 [0137] Como se muestra en la FIG. 19, el tratamiento con BA-1049 (R) (FIGS. 19A y 19C) o Fasudil (FIGS. 19B y 19D) impide dicha formación de fibra de tensión. Además, la reducción de las fibras de tensión de actina es más pronunciada en las HUVEC tratadas con BA-1049 (R) (FIG. 19A) en comparación con las células tratadas con Fasudil (FIG. 19B). Además, la inmunofluorescencia de vinculina revela que BA-1049 (R) (FIG. 19C) es superior en la preservación de la integridad de la monocapa HUVEC tras la estimulación con LPA en comparación con Fasudil (FIG. 19D). Mientras que las células tratadas con BA-1049 (R) muestran una banda fina y periférica de inmunofluorescencia de vinculina (FIG. 19C), característico de una monocapa celular confluyente, las células tratadas con Fasudil muestran una regulación al alza de los complejos de adhesión focal vinculina-positivos asociada a una disminución de la confluencia celular (FIG. 19D).

#### EJEMPLO 12

##### 55 Metabolitos de BA-1049 (R) Generados en Hepatocitos Cultivados

[0138] Para investigar el metabolismo de BA-1049 (R) en diferentes especies de mamíferos se utilizó un sistema *in vitro*. Se añadió BA-1049 (R) a cultivos de hepatocitos de rata, humano, ratón, mono cynomolgus y canino para investigar el metabolismo en diferentes especies.

60 [0139] Primero se diluyó una solución madre de BA-1049 en acetonitrilo a una concentración 100x de la concentración final deseada. Los artículos de prueba se incubaron en hepatocitos de rata por duplicado a 37°C. La reacción contenía 106 hepatocitos viables/ml de tampón KHB, a pH 7,4. A los tiempos indicados (0 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min), 65 se extrajo una alícuota de cada reacción experimental y de control y se mezcló con un volumen igual de metanol helado. Las reacciones detenidas se incubaron al menos diez minutos a -20°C. Las muestras se centrifugaron para eliminar las

proteínas precipitadas, y los sobrenadantes se analizaron por LC-MS/MS.

5 [0140] Los resultados de la FIG. 20 muestran que la semivida de BA-1049 (R) es diferente en las distintas especies y que los hepatocitos de perro parecen no metabolizar el compuesto. La Tabla 17 indica además que la rata y el mono son buenas especies para modelizar el metabolismo de fármacos en preparación para estudios en humanos, debido a que sus tasas de metabolismo son más o menos similares.

10 [0141] Paralelamente, se incubaron hepatocitos en blanco en ausencia del agente de ensayo durante 120 min. Esta 15 incubación de hepatocitos en blanco se utilizó como control para mostrar la presencia de picos derivados de los propios hepatocitos. Se realizó un control negativo incubando los hepatocitos en ausencia del artículo de ensayo y añadiendo a continuación el artículo de ensayo al ensayo extinguido ( $T = 0$  min). Este control negativo se incluyó para mostrar la presencia de cualquier impureza en el artículo de prueba.

20 [0142] Se ejecutó un espectro de masas de barrido completo (100 mg-800 m/z) en modo de ionización positiva y negativa a través del gradiente para buscar la presencia de metabolitos. Las exploraciones de los hepatocitos en blanco y el control negativo ( $T = 0$  min) se compararon con las muestras incubadas ( $T = 120$  min). Se consideró que un pico era un metabolito potencial cuando estaba presente en ambos duplicados de la muestra problema a un nivel al menos 5 veces superior al de cualquiera de las muestras de control negativo. Se realizaron barridos de iones producto de los picos observados para confirmar si estos picos observados están realmente relacionados con los progenitores.

Tabla 17

Especie	1/2 vida (min.)
Humano	42.7
Mono	15.3
Perro	>450
Ratón	3.2
Rata	60

25 [0143] La Tabla 17 muestra la vida media de BA-1049 (R) en diferentes especies. Los resultados de FIG. 20 y la Tabla 17 muestran que el BA-1049 (R) añadido a hepatocitos cultivados de múltiples especies se metaboliza fácilmente a 1-hidroxi-BA-1049 (R) en hepatocitos humanos, de rata, de ratón y de mono, mientras que los hepatocitos de rata también 30 generan N-óxido-BA-1049 (R). La estructura del N-óxido-BA-1049 (R) se muestra representada en la FIG. 21C. Los 35 hepatocitos de perro no muestran ningún metabolismo detectable de BA-1049 (R), lo que indica que pueden ser una mala elección de especie para estudios del fármaco antes de probarlo en humanos.

#### EJEMPLO 13.

##### 45 Penetración de BA-1049 (R) y 1-Hidroxi-BA-1049 (R) en cerebro de ratón y rata y en tejido vascular

50 [0144] El siguiente experimento demuestra la penetración de BA-1049 (R) y su metabolito, 1-hidroxi-BA-1049 (R), en cerebros de rata y ratón mediante administración intravenosa (IV).

[0145] Se disecan cerebros de ratón en momentos específicos tras la administración IV de BA-1049 (R), y se determina 55 la concentración de BA-1049 (R) y 1-hidroxi-BA-1049 (R) en tejido cerebral homogeneizado mediante análisis LC-MS/MS. En ratas, se disecan cerebros y vasos sanguíneos en momentos específicos tras la administración IV de BA-1049 (R).

[0146] Los resultados del experimento demuestran que el BA-1049 (R) y el 1-hidroxi-BA-1049 (R) penetran en el tejido 60 cerebral para tratar o controlar enfermedades, trastornos o lesiones.

#### A. Animales y dosificación

[0147] En este estudio se utilizan ratones C57BL/6 machos adultos (Charles River Laboratories). Los ratones se dosifican 65 mediante administración intravenosa (IV) u oral (PO) por sonda. Los ratones dosificados por vía intravenosa reciben una dosis única de 5 mg/kg de BA-1049 (R) formulada en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Una cohorte adicional de ratones recibe una dosis oral única de 30 mg/kg de BA-1049 (R) formulada en PBS.

[0148] Los ratones se monitorizan tras la administración para detectar signos clínicos de efectos adversos del compuesto administrado.

- [0149] En este estudio se utilizan ratas Sprague-Dawley macho adultas (Charles River Laboratories). Se administra a las ratas una dosis única intravenosa (IV) de 2,5 mg/kg de BA-1049 (R) mediante inyección en la vena de la cola. Ambas dosis están formuladas en solución salina tamponada con fosfato (PBS).
- 5 [0150] Las ratas son monitorizadas tras la administración para detectar signos clínicos de efectos adversos del compuesto administrado.
- B. Recogida y análisis de muestras
- 10 [0151] Tras la dosificación IV, se recogen cerebros de 4 ratones en cada punto temporal: 0,083 h, 0,5 h, 2 h, 6 h, 12 h y 24 h después de la dosis. Cada ratón es eutanasiado con CO<sub>2</sub>. Se extraen los cerebros enteros, se pesan, se enjuagan con PBS, se colocan en tubos y se congelan en nitrógeno líquido.
- 15 [0152] Despues de la dosificación IV, se recogen cerebros de 3 ratas en cada punto temporal: 0,25 h, 0,5 h y 1 h después de la dosis. Las muestras de cerebro se pesan, se colocan en un tubo y se congelan en hielo seco. Los cerebros se conservan a -80°C hasta su análisis.
- 20 [0153] Se diseña una porción de la vena cava inferior, se pesa y se coloca en un tubo con hielo seco. Este tejido vascular se almacena a -80°C hasta su análisis.
- [0154] Se analizan muestras de cerebro de ratón para determinar la concentración plasmática de BA-1049 (R) y su metabolito 1-hidroxi-BA-1049 (R). El tejido cerebral se homogeneizó en 1 ml/g de PBS. Los homogeneizados cerebrales se precipitan pipeteando 200 µl de homogeneizado en un tubo utilizando puntas de pipeta de 1000 µl cortadas asépticamente para evitar que se obstruyan. Las muestras se diluyen con 100 µl de PBS para facilitar la precipitación. Se añaden 900 µl de metanol frío a cada muestra y se agitan en vórtex de 5 a 10 segundos. Las muestras se colocan a 4°C durante 30 min a 40 min y luego se centrifugan a 10.000 RPM durante 15 min a 4°C. Se recoge el sobrenadante y se almacena a -80°C hasta su análisis.
- 30 [0155] Estas muestras se inyectan en un sistema LC-MS/MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem) para la detección de BA-1049 (R) y 1-hidroxi-BA-1049 (R).
- [0156] Se analizan muestras de cerebro de rata para determinar la concentración plasmática de BA-1049 (R) y su metabolito 1-hidroxi-BA-1049 (R). El tejido cerebral se homogeneiza en 1 ml/g de PBS. Los homogeneizados cerebrales se precipitan pipeteando 200 µl de homogeneizado en un tubo utilizando puntas de pipeta de 1000 µl cortadas asépticamente para evitar obstrucciones. Las muestras se diluyen con 100 µl de PBS para facilitar la precipitación. Se añaden 900 µl de metanol frío a cada muestra y las muestras se agitan en vórtex durante 5-10 segundos. Las muestras se colocan a 4°C durante 30 min a 40 min, y luego se centrifugan a 10.000 RPM durante 15 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su análisis.
- 40 [0157] La vena cava inferior se homogeneizó añadiendo 2 ml/g de PBS y se machacó con un mortero biomasher (Kimbler). La precipitación se realizó añadiendo 3 ml/ml de metanol frío. Las muestras se agitaron en vórtex entre 5 y 10 segundos. Las muestras se colocaron a 4°C durante 60 min, luego se centrifugaron a 10.000 RPM durante 15 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se almacenó a -80°C hasta su análisis.
- 45 [0158] Estas muestras se inyectaron en un sistema LC-MS/MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem) para la detección de BA-1049 (R) y 1-hidroxi-BA-1049 (R).
- [0159] Las concentraciones de BA-1049 (R) y 1-hidroxi-BA-1049 (R) en cada muestra se ajustaron por dilución y peso del tejido para calcular la cantidad de cada compuesto por gramo de tejido cerebral. Estos valores se registraron, se promediaron y se trazaron en función del tiempo para determinar el curso temporal de la aparición y desaparición de BA-1049 (R) y del metabolito.
- C. Resultados
- 55 [0160] El BA-1049 (R) y su metabolito activo primario 1-hidroxi-BA-1049 (R) fueron detectables en cerebros de rata y ratón tras su administración IV (FIGS. 22A y B). En el ratón, el BA-1049 (R) permaneció detectable al menos 24 horas después de la administración, mientras que el 1-hidroxi-BA-1049 (R) era indetectable a las 12 horas. En el cerebro de las ratas, al igual que en el de los ratones, había más BA-1049 (R) que 1-hidroxi-BA-1049 (R) a los 30 min posadministración. Había una gran cantidad de ambos compuestos en el tejido vascular de las ratas 30 min después de la administración IV, con más cantidad de 1-hidroxi-BA-1049 (R) que de BA-1049 (R).
- 60 [0161] Estos resultados demuestran que el BA-1049 (R) y su metabolito 1-hidroxi-BA-1049 (R) están presentes y son detectables en sangre, cerebro y tejido vascular tras su administración IV. En peso, el tejido vascular, como la vena cava inferior, contiene incluso más de ambos compuestos que el tejido cerebral. Además, la administración intravenosa proporciona compuestos farmacológicamente activos al tejido cerebral y vascular para tratar o controlar enfermedades, trastornos o lesiones.

## EJEMPLO 14

**Actividad de los Metabolitos de BA-1049 (R)**

- 5 [0162] Para determinar si los metabolitos de BA-1049 (R), 1-hidroxi-BA-1049 (R) y el N-oxido-BA-1049 (R), muestran actividad inhibitoria para ROCK2, se determinan curvas de inhibición para cada compuesto en comparación con el compuesto padre BA-1049 (R).
- 10 [0163] Cada compuesto se disolvió a 100 mM en DMSO. Esta solución de compuesto-DMSO se diluye a 500  $\mu$ M en dH<sub>2</sub>O. Se prepararon diluciones seriadas de forma que, tras diluirlas 5 veces en otros reactivos de ensayo, se obtuviera un intervalo semilogarítmico del compuesto, desde 100  $\mu$ M hasta 1 nM.
- 15 [0164] 10  $\mu$ L de cada concentración de cada compuesto se añadieron por duplicado a pocillos individuales de una placa Maxisorp de 96 pocillos (ThermoFisher) pre-recubierta con el sustrato MYPT1 de ROCK2 (ThermoFisher). dH<sub>2</sub>O se añade como control negativo.
- 20 [0165] Usando un pipeteador multicanal, se hicieron 40  $\mu$ L de volumen final por pocillo añadiendo lo siguiente de cada solución para comenzar la reacción: 10  $\mu$ L 20 mM MOPS pH 7,2, 25 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 5 mM EGTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, y 1 mM DTT, 10  $\mu$ L 50  $\mu$ M ATP, 10  $\mu$ L 75 mM MgCl<sub>2</sub>, y 10  $\mu$ L 1 mU/ $\mu$ L solución ROCK2. Las soluciones se mezclaron por agitación y se incubaron en un agitador durante 10 min a 30 °C.
- 25 [0166] La reacción se detuvo vaciando la placa y lavando 3 veces durante 3 minutos cada una con 200  $\mu$ L de tampón de lavado (solución salina tamponada con Tris y 0,05% de Tween-20).
- 30 [0167] 100  $\mu$ L 0,5  $\mu$ g/ml de un anticuerpo anti MYPT1 fosforilado (Thr696) (EMD, Billerica, MA, Cat. CS205309) a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente en un agitador durante 1 hora y después se lavó 3 veces durante 3 minutos con 200  $\mu$ L de tampón de lavado.
- 35 [0168] 100  $\mu$ L de anticuerpo secundario IgG anti-conejo de cabra conjugado con peroxidasa de rábano (EMD; Billerica, MA; Cat. Nº 90276, dilución 1:2000). La placa se incubó a temperatura ambiente en un agitador durante 1 hora y después se lavó 3 veces durante 3 minutos con 200  $\mu$ L de tampón de lavado. La placa se lavó 2 veces más durante 3 minutos cada una con solución salina tamponada con Tris.
- 40 [0169] Se añadieron 100  $\mu$ L de solución de TMB/E a cada pocillo con una pipeta multicanal. Tras un desarrollo suficiente del color, se detuvo la reacción con 100  $\mu$ L de solución de parada y se leyó la absorbancia con un lector de placas Wallac Victor2 a 450 nm.
- 45 [0170] Debido a que los valores de absorbancia son proporcionales a la actividad de ROCK2, el trazado de la absorbancia a 450 nm versus la concentración final del metabolito y del compuesto madre proporciona curvas de inhibición. Los perfiles inhibitorios relativos se determinaron mediante el análisis 4PL de estas curvas. Las variaciones en la IC<sub>50</sub> calculada son comunes antes de la optimización del ensayo debido a variaciones en las variables experimentales.

- 50 [0171] Los resultados de la FIG. 23 muestran que el 1-hidroxi-BA-1049 (R) es ½ log más potente como inhibidor de la actividad de ROCK2 que el compuesto madre BA-1049 (R). El N-óxido-BA-1049 (R) no muestra ninguna actividad inhibitoria.

## EJEMPLO 15

- 50 **Efecto *In Vitro* de BA-1049 (R), BA-1049 (S) y sus Metabolitos en Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana Tras la Activación de Rho/Rock**
- 55 [0172] Las actividades de BA-1049 (R), BA-1049 (S) y metabolitos de BA-1049 (R) se investigaron utilizando células endoteliales vasculares humanas cultivadas.
- 55 1. Cultura Celular
- 60 [0173] Las HUVEC primarias (ATCC, Manassas, VA) se cultivaron en matraces de cultivo tisular de 75 cm<sup>2</sup> recubiertos de colágeno-1 (50  $\mu$ g/ml) utilizando Medium-200 suplementado con suplemento de crecimiento del endotelio de grandes vasos (ambos ThermoFisher, Waltham, MA). Una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células se extrajeron utilizando tripsina-EDTA al 0,25% (ThermoFisher, Waltham, MA) y se depositaron en sustrato de cultivo tisular como se describe a continuación.
- 65 2. Dosificación y Calendario de Análisis
- 65 [0174] Cinco dosis individuales (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, y 100  $\mu$ M) de BA-1049 (R), 1-Hidroxi-BA-1049 (R), N-Oxido-

BA-1049(R) y de BA-1049 (S) fueron evaluadas para la capacidad de restaurar la actividad normal de Rho/ROCK en HUVECs tratadas con LPA. Las líneas celulares se expusieron a cada dosis durante 1 hora y, a continuación, se estimularon con 20  $\mu$ M de LPA durante 5 minutos o 1 hora, tal como se describe a continuación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y fueron analizados por dos evaluadores independientes que no conocían la línea celular ni el tratamiento.

5 a. La Fosforilación de ROCK2 se Dirige Aguas Abajo a la Cadena Ligera de Miosina 2 (MLC2) y a la Cofilina

10 [0175] Las células se sometieron a un análisis bioquímico de MLC2 difosforilada (sitios de fosforilación de treonina 18/serina 19) y cofilina (sitio de fosforilación de serina 9) mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos recubiertos con 70  $\mu$ g/ml de colágeno-1 de rata (Corning; Corning, NY), y se cultivaron durante 2 d a 3 d a 37 °C/5% CO<sub>2</sub> hasta su confluencia. Las células se pretrataron con 5 dosis individuales (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) de BA-1049 (R), 1-hidroxi-BA-1049 (R), N-óxido-BA-1049 (R) y de BA-1049 (S) diluidas en medio 200 (ThermoFisher) suplementado con 0,1% de seroalbúmina humana (HSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 1 hora. A continuación, se cambió el medio por Medio 200 suplementado con 0,1% de HSA (Sigma-Aldrich) y 20  $\mu$ M de LPA (Santa Cruz Biotech; Santa Cruz, CA) y se incubó durante 5 min. Tras la estimulación con LPA, las proteínas se extrajeron de las células mediante lisis con tampón RIPA suplementado con inhibidor completo de proteasa/fosfatasa HALT (ThermoFisher, Waltham, MA), se redujeron y desnaturizaron utilizando tampón de muestra Laemmli (BioRad, Hercules, CA)/beta-mercaptoetanol y se sometieron a SDS-PAGE.

15 20 [0176] Las muestras desnaturizadas se electroforizaron en geles reductores de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (Novex; Thermo-Fisher, Waltham, MA) y se transfirieron a membranas de PVDF de 0,25  $\mu$ m (EMD Millipore, Billerica, MA). Las membranas se sondan utilizando anti-pMLC2 T18/S19 (1:500; Cell Signaling, Danvers, MA) o anti-pCofilina S9 (1:500, Cell Signaling, Danvers, MA) y control de carga anti-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:10000; Abeam). 25 Los niveles de proteína se detectaron utilizando un sustrato de quimioluminiscencia (Super Signal West, ThermoFisher, Waltham, MA) y las imágenes se capturaron con un sistema de captura de imágenes FluoroChem SP.

b. Integridad de la monocapa endotelial

30 [0177] Para examinar la integridad de la monocapa HUVEC, las células se colocaron en cubreobjetos recubiertos con PDL (Corning) recubiertos con fibronectina, colágeno-1 y gelatina. Se sembraron 50.000 células en cada cubreobjetos situado en una placa de 24 pocillos. Las células se cultivaron durante 3 días a 37 °C/5% de CO<sub>2</sub>. Se pretrataron diferentes muestras celulares con cinco dosis diferentes (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) de BA-1049 (R), 1-hidroxi-BA-1049 (R), N-óxido-BA-1049 (R) o BA-1049 (S) diluido en medio 200 (ThermoFisher, Waltham, MA) suplementado con 0,1% de albúmina de suero humano (HSA, Sigma) durante 1 hora. El medio se cambió por Medio 200 suplementado con 0,1% de HSA y 20  $\mu$ M de LPA (Santa Cruz) y se incubó durante 60 min.

35 40 [0178] Después de la estimulación con LPA, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron para actina-faloidina (ThermoFisher, Waltham, MA) y V-Cadherina (Cell Signaling, Danvers, MA) y se montaron en portaobjetos de microscopio. Se tomaron imágenes de los cubreobjetos mediante microscopía de fluorescencia y se midieron los huecos libres de células en la monocapa utilizando Image J (programa gratuito; <https://imagej.nih.gov/ij/>).

### 3. Resultados

45 [0179] En HUVEC tratadas con LPA, BA-1049 (R), BA-1049 (S) y 1-hydroxy-BA-1049 (R) reducen la difosforilación de MLC2, mientras que N-Oxide-BA-1049 (R) no mostró tal efecto (FIG. 24). BA-1049 (R) muestra una mayor potencia en la reducción de pMLC2 T18/S19 que BA-1049 (S) (FIG. 24). El 1-hidroxi-BA-1049 (R) muestra la mayor potencia de todos los compuestos ensayados, aboliendo completamente la difosforilación de MLC2 a una concentración de 10  $\mu$ M o superior (FIG. 24). Las HUVEC tratadas con LPA para estimular la activación de ROCK muestran un aumento de las fibras de tensión y cambios en las uniones célula-célula, lo que da lugar a agujeros libres de células en la monocapa (FIG. 25D), en comparación con los controles (FIG. 25A). Células tratadas con LPA y 1  $\mu$ M BA-1049 (R) (FIG. 25B) o 10  $\mu$ M de BA-1049 (R) (FIG. 25C) se asemejan a los cultivos de control con aspecto de monocapa normal. Cuando las células se tratan con LPA más 1  $\mu$ M de BA-1049 (S) (FIG. 25E) o 10  $\mu$ M BA-1049 (S) (FIG. 25F), ninguna de las dos concentraciones revierte el efecto del LPA. Así, BA-1049 (R) y 1-hidroxi-BA-1049 (R), pero no BA-1049 (S) ni N-óxido-BA-1049 (R), previene la activación de Rho/ROCK y restaura la integridad de la monocapa en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tras la exposición al ácido lisofosfatídico (LPA).

### EJEMPLO 16

60 65 **Efecto *In Vitro* de Activación Rho/Rock (R), BA-1049 (S), 1-Hidroxi-BA-1049 (R), y N-óxido BA-049 (R) en Células Endoteliales Microvasculares Cerebrales Tras Activación Rho/Rock**

[0180] Las actividades de BA-1049 (R), BA-1049 (S) y metabolitos de BA-1049 (R) se investigan utilizando células endoteliales microvasculares cerebrales humanas primarias.

1. Cultura Celular

5 [0181] Las hBMVEC primarias (Neuromics, Edina, MN) se cultivan en frascos de cultivo tisular de 75 cm<sup>2</sup> recubiertos de colágeno-1 (70 µg/ml, Coming) utilizando medios de crecimiento ENDO (medios ENDO-Basal + suplemento de crecimiento ENDO, ambos Neuromics, Edina, MN). Una vez alcanzado el 90% de confluencia, las células se extraen utilizando tripsina-EDTA al 0,25% y se colocan en sustrato de cultivo tisular como se describe a continuación.

## 2. Dosificación y Calendario de Análisis

10 [0182] Cinco dosis individuales de BA-1049 (R), 1-Hidroxi-BA-1049 (R), N-Oxido-BA-1049(R) y de BA-1049 (S) se evalúan para la capacidad de restaurar la actividad normal de Rho/ROCK en hBMVEC tratadas con LPA. Las células se exponen a cada dosis durante 1 hora y, a continuación, se estimulan con 20 µM de LPA durante 5 minutos o 1 hora, como se describe a continuación. Todos los experimentos se realizan por triplicado y son analizados por dos evaluadores independientes que no conocen la línea celular ni el tratamiento.

15 a. La Fosforilación de ROCK2 se Dirige Aguas Abajo a la Cadena Ligera de Miosina 2 (MLC2) y a la Cofilina

20 [0183] Las células se someten a análisis bioquímicos de MLC2 difosforilada (sitios de fosforilación de treonina 18/serina 19) y cofilina fosforilada (sitio de fosforilación de serina 9) mediante SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las células se colocan en placas de cultivo tisular de 24 pocillos recubiertas con 70 µg/ml de colágeno-1 de rata (Corning) y se cultivan en medios de crecimiento ENDO (Neuromics) durante 3 días a 37 °C/5% CO<sub>2</sub> hasta confluencia. Las células se pretratan con 5 dosis individuales (1 µM, 10 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM) de BA-1049 (R), 1-Hidroxi-BA-1049 (R), N-Oxido-BA-1049 (R) y de BA-1049 (S) diluidas en medio ENDO Basal (Neuromics) suplementado con 0,1% de albúmina de suero humano (HSA, Sigma-Aldrich) durante 1 hora. El medio se cambia por medio basal ENDO suplementado con 1% de HSA, 20 µM de LPA (Santa Cruz Biotech; Santa Cruz, CA) y la cantidad adecuada del compuesto que se está analizando. Tras 5 min, 25 se aspira el medio y se lavan brevemente las células con 1xPBS. Las proteínas se extraen de las células mediante lisis con tampón RIPA suplementado con inhibidor completo de proteasa/fosfatasa (HALT, Thermo Fisher Scientific), se reducen y desnaturalizan utilizando tampón de muestra Laemmli (BioRad; Hercules, CA, beta-mercaptoetanol y se someten a SDS-PAGE.

30 [0184] Las muestras desnaturalizadas se electroforizan en geles reductores de Bis-Tris-PA al 10% (Novex; Thermo-Fisher), y se transfieren a membranas de PVDF de 0,25 µm (EMD Millipore). Las membranas se sondan utilizando anti-pMI<sub>2</sub>C2 T18/S19 (1:500; Cell Signaling) o anti-pCofilina (1:500, Cell Signaling S9) y control de carga anti-gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:10000; Abcam, Cambridge, MA). Los niveles de proteínas se detectan utilizando un sustrato de quimioluminiscencia (Super Signal West, ThermoFisher) y las imágenes se capturan utilizando un sistema de captura de imágenes FluoroChem SP.

## b. Integridad de la monocapa endotelial

35 [0185] Para examinar la integridad de la monocapa de hBMVECs, las células se colocan en cubreobjetos recubiertos de PDL (Corning) con Fibronectina, Colágeno-1 y gelatina. Se siembran 50.000 células en cada cubreobjetos situado en una placa de 24 pocillos. Las células se cultivan durante 3 días en medios de crecimiento ENDO (Neuromics) a 37 °C/5% CO<sub>2</sub>. Diferentes muestras celulares se pretratan con cinco dosis diferentes de BA-1049 (R), 1-Hidroxi-BA-1049 (R), N-Oxido-BA-1049 (R) o BA-1049 (S) diluidas en medio ENDO-basal (Neuromics) suplementado con 0,1% de albúmina de suero humano (HSA, Sigma-Aldrich) durante 1 hora. El medio se cambia por medio basal ENDO suplementado con 1% de HSA, 20 µM de LPA (Santa Cruz Biotech; Santa Cruz, CA) y la cantidad adecuada del compuesto que se está analizando. 40 Después de 60 minutos, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% y se tiñeron para actina-faloidina (ThermoFisher) y V-Cadherina (Cell Signaling), y luego se montaron en portaobjetos de microscopio. Se tomaron imágenes de los cubreobjetos mediante microscopía de fluorescencia y se midieron los agujeros libres de células en la monocapa utilizando Image J.

## 50 3. Resultados

55 [0186] En hBMVEC tratadas con LPA, BA-1049 (R), BA-1049 (S) y 1-hydroxy-BA-1049 (R) reducen la difosforilación de MLC2, mientras que N-Oxido-BA-1049 (R) no muestran tal efecto. BA-1049 (R) muestra una mayor potencia en la reducción de pMLC2 T18/S19 que BA-1049 (S). El 1-hidroxi-BA-1049 (R) muestra la mayor potencia de todos los compuestos probados, aboliendo completamente la difosforilación de MLC2 a una concentración de 10 µM o superior. 60 Las hBMVEC tratadas con LPA para estimular la activación de ROCK muestran un aumento de las fibras de estrés y cambios en las uniones célula-célula, dando lugar a agujeros libres de células en la monocapa, en comparación con los controles. Las células tratadas con LPA y 1 µM de BA-1049 (R) o 10 µM de BA-1049 (R) se asemejan a los cultivos de control con aspecto de monocapa normal. Cuando las células se tratan con LPA más 1 µM BA-1049 (S) o 10 µM BA-1049 (S), ninguna de las dos concentraciones revierte el efecto del LPA.

65 [0187] BA-1049 (R) pero no BA-1049 (S) es capaz de revertir los cambios celulares inducidos por la estimulación de LPA de la activación de ROCK en células endoteliales.

[0188] Por lo tanto, de BA-1049 (R) y 1-Hydroxy-BA-1049 (R), pero no BA-1049 (S) o N-óxido-BA-1049 (R), prevenir la

activación de Rho/ROCK y para proteger la preservación de la unión estrecha en las células endoteliales microvasculares del cerebro humano (hBMVECs) después de la exposición al ácido lisofosfatídico (LPA).

#### EJEMPLO 17

5

##### Eficacia y Potencia de BA-1049 (R) y 1-Hidroxi-BA-1049 (R) en Células Endoteliales Humanas.

[0189] Se probó el 1-hidroxi-BA-1049 (R) para determinar su eficacia en células endoteliales humanas primarias. También se investigó la EC<sub>50</sub> para BA-1049 (R) y para 1-hidroxi-BA-1049 (R) en células endoteliales humanas cultivadas (HUVEC) para comparar la potencia de ambos compuestos y proporcionar información sobre la exposición requerida *in vivo*.

##### 1. Cultura Celular

[0190] Las células endoteliales primarias de la vena umbilical humana (HUVECs; ATCC) se cultivaron en frascos de cultivo tisular de plástico utilizando Medium-200 suplementado con suplemento de crecimiento del endotelio de grandes vasos (Thermo Fisher Scientific). Una vez alcanzado el 80% de confluencia, las células se extrajeron con tripsina-EDTA al 0,25% y se colocaron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos (Falcon) como se describe a continuación.

##### 2. Dosificación y Calendario de Análisis

20

[0191] Ocho dosis diferentes de BA-1049 (R) o 1-hidroxi-BA-1049 (R) (0 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, y 1 mM) fueron evaluadas por sus efectos en la actividad intracelular de ROCK. Las células se expusieron a cada dosis durante 1 h. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y fueron analizados por 2 evaluadores independientes que no conocían el compuesto ni su concentración.

25

##### a. La Fosforilación de ROCK2 se Dirige Aguas Abajo a la Cadena Ligera de Miosina 2 (MLC2).

[0192] Las células fueron sometidas a análisis bioquímico de proteínas de MLC2 di-fosforilada (sitios de fosforilación de Treonina 18/Serina 19) usando SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las células se sembraron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos, se recubrieron con 70 µg/ml de colágeno-1 de rata (Corning) y se cultivaron durante 2-3 días a 37°C/5% CO<sub>2</sub> hasta su confluencia. Las células se pretrataron con diferentes dosis de BA-1049 (R) o 1-hidroxi-BA-1049 (R) durante 1 hora. Los fármacos se diluyeron en medio 200 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con 0,1% de seroalbúmina humana (HSA, Sigma-Aldrich). Tras 1 h, las células se lisaron con tampón RIPA (Boston Bioproducts; Ashland, MA) complementado con inhibidores completos de proteasa/fosfatasa (HALT, Thermo Fisher Scientific), se redujeron y se desnaturizaron con tampón de muestras Laemmli (BioRad)/betamercaptoetanol. Las muestras desnaturizadas se electroforizaron en geles reductores de Bis-Tris-PA al 10% (Novex) y luego se transfirieron a membranas de PVDF de 0,25 µm (EMD Millipore). Las membranas se incubaron con una solución de seroalbúmina bovina al 4% para bloquear los sitios de unión inespecíficos de los anticuerpos y, a continuación, se immunomarcaban para ppMLC2 T18/S19 (1:500, Cell Signaling) y para el control de carga de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:500, Cell Signaling); 10.000; Abcam). Los niveles de proteínas se detectaron utilizando un sustrato de quimioluminiscencia (Super Signal West, ThermoFisher) y se capturaron con el sistema de imágenes FluoroChem SP. La quimioluminiscencia de ppMLC2 y GAPDH se midió mediante análisis densitométrico. La señal de ppMLC2 se normalizó frente a la señal de GAPDH y se representó como porcentaje del control sin tratamiento (0 µM). Los valores EC<sub>50</sub> se determinaron mediante análisis dosis-respuesta utilizando el software GraphPad.

45

##### 3. Resultados

[0193] Como se muestra en la FIG. 26 El análisis dosis-respuesta muestra que tanto el BA-1049 (R) como el 1-hidroxi-BA-1049 (R) redujeron la difosforilación de MLC2 de forma dosis-dependiente (FIG. 2A). Ambos fármacos mostraron una eficacia similar con una reducción máxima de los niveles de ppMLC2 del 89% para el BA-1049 (R) y del 94% para el 1-hidroxi-BA-1049 (R) en la dosis más alta probada (= 1 mM). Sin embargo, el 1-hidroxi-BA-1049 mostró una potencia un logaritmo superior a la del BA-1049 (R), indicada por un valor EC<sub>50</sub> de 449,1 nM para el 1-hidroxi-BA-1049 (R) en comparación con un valor EC<sub>50</sub> de 3830 nM para el BA-1049 (R) (FIG. 2B).

55

[0194] Estos resultados sugieren que el 1-hidroxi-BA-1049 (R) es permeable a las células y biológicamente activo y que el 1-hidroxi-BA-1049 (R) tiene una eficacia similar pero mayor potencia en la inhibición de ROCK en HUVECs que su progenitor BA-1049 (R).

#### EJEMPLO 18

60

##### Efectos de BA-1049 (R) y BA-1049 (S) Sobre los Valores de Presión Arterial Sistólica en Ratones

[0195] El siguiente experimento demuestra la diferencia en el efecto de BA-1049 (R) y BA-1049 (S) en la disminución de la presión arterial sistólica en ratones. La Rho quinasa desempeña un papel importante en la regulación del tono vascular, pero la presión arterial depende más de los vasos sanguíneos periféricos, donde la expresión de ROCK1 es mayor que la de ROCK2. Se expone a los ratones a dosis crecientes de BA-1049 (R) o BA-1049 (S), administradas a través del agua

de bebida, y se controla su presión arterial. La menor selectividad de BA-1049 (S) para ROCK2 provoca una disminución de la presión arterial sistólica a una dosis significativamente menor que BA-1049 (R), que muestra una mayor selectividad para ROCK2.

- 5 [0196] Se alojan tres cohortes de ratones de prueba con acceso ilimitado a comida normal y agua potable. Durante los primeros 5 días, los ratones se manipulan a diario para habituarlos al contacto y se les mide la presión arterial con un aparato de pleismografía con manguito de cola para múltiples animales (MRBP Tail Cuff Blood Pressure System; IITC Life Science; Woodland Hills, CA). La presión arterial sistólica de cada ratón se registra varias veces durante una sesión de 5 min. los días 2 y 5. Estos valores sirven de referencia.
- 10 [0197] El día 5, una cohorte de ratones pasa a beber agua que contiene BA-1049 (R) a 0,5 mg/kg de peso corporal. Una segunda cohorte recibió agua con BA-1049 (S) a 0,5 mg/kg de peso corporal. La tercera cohorte recibe agua potable normal, no adulterada. El día 8, se mide la presión arterial de todos los ratones.
- 15 [0198] Despues de la medición de la presión arterial del día 8, la dosis del fármaco en las 2 cohortes de prueba se aumenta a 1 mg/kg de peso corporal y la cohorte continúa durante 3 días con la nueva dosis. El día 11, se vuelve a registrar la presión arterial de todos los ratones mediante pleismografía con manguito de la cola durante una sesión de registro de 5 min.
- 20 [0199] Tras el registro de la presión sanguínea, EL DÍA 11, las dosis del fármaco en el agua de bebida de los grupos de prueba se aumentan hasta 3 mg/kg de peso corporal y las cohortes continúan durante 3 días con la nueva dosis. El día 14, se registra la presión arterial de todos los ratones mediante pleismografía con manguito de la cola durante una sesión de registro de 5 minutos.
- 25 [0200] Una o más de las dosis de prueba de BA-1049 (S) reducen la presión arterial sistólica media dentro de una cohorte de tratamiento dada. Las dosis crecientes de BA-1049 (S) muestran mayores reducciones de la presión arterial sistólica. BA-1049 (R), debido a su mayor selectividad para ROCK2, muestra poco o ningún efecto sobre la presión arterial sistólica media.

### 30 EJEMPLO 19

#### Efecto *In Vitro* de BA-1049 (R) y BA-1049 (S) en Células Endoteliales Vasculares Desprovistas de Proteínas CCM

35 [0201] El siguiente experimento demuestra la capacidad de BA-1049 (R) pero no de BA-1049 (S) para restaurar características clave de tipo salvaje (WT) en células endoteliales vasculares desprovistas de proteínas CCM. Estos experimentos *in vitro* se llevan a cabo en líneas de células endoteliales derivadas de biopsias de lesiones de CCM en pacientes con mutaciones en *Ccm1*, *Ccm2* o *Ccm3*, y en una línea de células endoteliales microvasculares humanas (HMVEC).

#### 40 1. Preparación de líneas celulares

45 [0202] Las células HMVEC se vacían de cada una de las proteínas CCM mediante transfección con ARN de interferencia pequeño (ARNsi) específico para *Ccm1*, *Ccm2* o *Ccm3* (Dharmacon, Lafayette, Colorado); la línea celular de Tipo Salvaje consiste en células HMVEC no tratadas. Las líneas celulares de biopsia de pacientes (Tipo Salvaje, Mutación *Ccm1*; Mutación *Ccm2*; Mutación *Ccm3*) se generan a partir de células endoteliales obtenidas durante biopsias de pacientes con mutaciones específicas de *Ccm*; la línea celular de Tipo Salvaje se deriva de una muestra de biopsia de un sujeto sin mutaciones de *Ccm*.

#### 50 2. Dosificación y Calendario de Análisis

55 [0203] Se evalúan cinco dosis individuales (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) de BA-1049 (R) y de BA-1049 (S) para determinar la capacidad de restaurar un fenotipo de Tipo Salvaje en cada línea celular HMVEC de CCM y en cada línea celular de biopsia mutante de *Ccm*. Las líneas celulares se exponen a cada dosis como: (1) una dosis diaria repetida en medio de cultivo; (2) una exposición de 30 min. y lavado diario; y (3) tratamiento durante un periodo inicial de 24 h solamente.

60 [0204] Los criterios de valoración descritos a continuación se utilizan para evaluar la capacidad de cada dosis para restaurar un fenotipo endotelial Tipo Salvaje en cada línea celular en cada punto temporal. Cada criterio de valoración se evalúa a las 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 horas del tratamiento inicial. Todos los experimentos se realizan por triplicado y son analizados por dos evaluadores independientes que no conocen la línea celular ni el tratamiento.

#### a. Vasculogénesis de Células Endoteliales

65 [0205] Las células se suspenden en matrices de colágeno para permitir un análisis de su capacidad de formación de tubos similares a vasos. Las matrices se elaboran del siguiente modo: El colágeno se añade a tubos que contienen una mezcla de Medio 199 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) y NaOH a 0°C. Las células se añaden a una concentración final de

colágeno de 3,75 mg/ml, y la mezcla de células y colágeno se siembra en micropocillos de 4,5 mm. Se deja gelificar el colágeno y se equilibra a 37 °C en una incubadora de CO<sub>2</sub>. Tras una incubación de 3 horas en medio de cultivo sin suero (medio 199 que contiene suplemento de suero reducido II (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), bFGF (40 ng/ml), VEGF (40 ng/ml), éster de forbol (50 ng/ml) y ácido ascórbico (50 µg/ml), los cultivos se fijan con glutaraldehido al 3% durante 30 min.

5 [0206] Se realiza microscopía de fluorescencia de lapso de tiempo para recolectar imágenes de los cultivos a las 0, 3, 6, 9, 12, 16, 20 y 24 horas después de la fijación. El área de las vacuolas y los lúmenes a lo largo del tiempo se traza y 10 cuantifica utilizando el software de imágenes MetaMorph (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) (n = 5 campos independientes por punto temporal), y se cuenta el número de lúmenes por campo a las 24 horas (n = 5 campos independientes).

b. Migración de Células Endoteliales

15 [0207] La migración haptotáctica se examina como sigue: Se siembran 20.000 células en el pocillo superior de una cámara Boyden (Neuro Probe, Gaithersburg, MD) en medio de crecimiento endotelial-2 (Lonza, Walkersville, MD) y se deja que migren durante 3 h a una membrana de policarbonato (poros de 8 µm) (Sigma-Aldrich) recubierta en la superficie inferior con fibronectina humana (1 µg/ml) (Biomedical Technologies, Ward Hill, MA).

20 [0208] Tras eliminar las células no migradas, se fijan y tiñen las membranas (kit Hema3, Fisher Scientific, Waltham, MA), y se montan en portaobjetos de vidrio. Se cuantifica el número de células migradas por campo de microscopía de alta potencia (n = 10 campos por condición).

25 c. Permeabilidad de las Células Endoteliales

[0209] La permeabilidad de las células endoteliales a la peroxidasa de rábano picante se mide utilizando un ensayo trans-pocillo como sigue: Los insertos trans-pocillos (48 pocillos, 3 µm de poro) (Corning Inc., Corning, NY) se recubren con fibronectina humana y se siembran con 30.000 células por pocillo. Se añade peroxidasa de rábano picante (25 µg/ml) a la parte superior del inserto y se deja permeabilizar durante 6 h. Despues de 6 h, la solución del fondo de cada pocillo se mezcla con 0,1 ml de guayacol y 0,2 ml de peróxido de hidrógeno y se mide la absorbancia a A490 nm (n = 6 pocillos cada uno).

d. Actividad intraendotelial de la Rho quinasa

35 [0210] La actividad ROCK intraendotelial se evalúa midiendo los niveles de cadena ligera de miosina 2 fosforilada (fosfo-MLC2) de la siguiente manera: Se recogen las células subconfluentes y se lisan en tampón de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas). Los lisados celulares se analizan mediante SDS-PAGE (gel al 7%) y Transferencia de Western utilizando un anticuerpo específico de la cadena ligera de miosina difosforilada 2 (Cell Signaling Technology; Danvers, MA) (3674). Se utilizan anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) para 40 permitir el revelado y la obtención de imágenes; los niveles relativos de cadena ligera de miosina 2 fosforilada se cuantifican mediante una cuantificación densitométrica de la intensidad de la banda en ImageJ, de acuerdo con la Manual de instrucciones de ImageJ para el análisis de geles: <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html#gels>.

45 e. Relación Intra-Endotelial de ROCK1 a ROCK2

[0211] La relación de ROCK1 a ROCK2 dentro de las células endoteliales se evalúa de la siguiente manera: Se recogen las células subconfluentes y se lisan en tampón de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Los lisados celulares se analizan mediante SDS-PAGE (gel al 7%) y Transferencia de Western utilizando anticuerpos anti-ROCK1 y anti-ROCK2 (611136 y 610623) (BD Biosciences, San Jose, CA). Se utilizan anticuerpos secundarios conjugados con HRP para 50 permitir el revelado y la obtención de imágenes; los niveles relativos de ROCK1 y ROCK2 se cuantifican mediante una cuantificación densitométrica de la intensidad de las bandas en ImageJ, de acuerdo con las instrucciones del manual del usuario de ImageJ para el análisis de geles: <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/menus/analyze.html#gels>.

55 B. Resultados

[0212] Una o más de las dosis probadas de BA-1049 restaura la vasculogénesis, migración, permeabilidad, actividad Rho quinasa y ROCK1 de las células endoteliales: Relación ROCK2 a los niveles WT cuando se administra según un régimen de dosificación probado. Ninguna de las dosis probadas de BA-1049 (R), 1049 (S) restaura la vasculogénesis de las células endoteliales, la migración, la permeabilidad, la actividad Rho quinasa y ROCK1: Relación ROCK2 a los niveles WT cuando se administra según un régimen de dosificación probado.

EJEMPLO 20

Permeabilidad Endotelial Tras el Tratamiento con BA-1049 (R) o BA-1049 (S)

65 [0213] El transporte transvascular de albúmina marcada se utiliza para estudiar la permeabilidad endotelial. Se compara

el efecto de BA-1049 (R) y BA-1049 (S) en la reparación de la barrera hemato-retiniana en un modelo retiniano de extravasación. La extravasación en la retina se detecta tras la inyección intravenosa de un trazador fluorescente, albúmina-FITC. Normalmente, este trazador no puede atravesar la barrera hematoencefálica ni la hemorretiniana, pero se filtra a la retina cuando existe una permeabilidad de las células endoteliales. La extravasación del trazador puede detectarse en montajes completos de retina que permiten visualizar la vasculatura retiniana.

5 [0214] Para interrumpir la barrera hemato-retiniana en ratas adultas, se inyectan 4  $\mu$ l de 10  $\mu$ g de C3 transferasa permeable a las células (Cytoskeleton, Inc., Denver Colorado) en los ojos izquierdo y derecho de 8 ratas Sprague Dawley después de anestesiarlas con isoflurano. La inyección intravítreo se realiza en la cámara posterior con una jeringa 10 Hamilton de 10  $\mu$ l. Veinticuatro horas después, se inyecta 1  $\mu$ M de BA-1049 (R) en el ojo izquierdo de 4 ratas, y de 1  $\mu$ M de BA-1049 (S) en el ojo izquierdo de las 4 ratas restantes. El ojo derecho sirve como control no tratado para detectar la 15 extravasación inducida por la alta concentración de C3 transferasa permeable a las células. Veinticuatro horas más tarde, se inyecta intraarterialmente isotiocianato de fluoresceína (FITC, 300  $\mu$ g/ml) marcado con albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich St. Louis, MO) (0,2 ml/100 g de peso corporal), se deja circular durante 10 minutos y, a continuación, se extraen los ojos para preparar montajes completos de retina. Los ojos se fijan en paraformaldehído al 4% en tubos etiquetados durante 1 hora antes de preparar los montajes completos.

20 [0215] Los montajes completos de retina se preparan cortando alrededor de la esclerótica y retirando suavemente el cristalino. El ojo se fija en una placa de cera se corta en 4 cuadrantes en la copa del ojo con cortes limpios individuales. Los colgajos se fijan con alfileres, clavando los alfileres en la esclerótica, no en la retina, y luego los colgajos se pliegan hacia atrás para exponer la retina. Cuando los 4 están plegados, el nervio óptico se secciona en la fóvea para liberar la 25 retina del nervio óptico. Utilizando un pequeño pincel para transferir la retina a un portaobjetos, se coloca la capa de células ganglionares hacia arriba, se fija a un papel de filtro y se posfija (el ojo se curva de forma natural con la capa ganglionar dentro). La capa de células ganglionares se mantiene levantada (la retina se curva de forma natural con la capa de células ganglionares dentro y el papel de filtro para fijarla plana). La muestra se fija posteriormente en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato para aplanar la retina y se enjuaga durante la noche en PBS. La retina se separa del papel de filtro con un pincel. El exceso de vítreo se retira con mechas de papel. Los portaobjetos se cubren y los vasos sanguíneos marcados con FITC se detectan mediante microscopía de epifluorescencia.

30 [0216] Los resultados muestran que BA-1049 (R) es capaz de revertir la permeabilidad endotelial y la extravasación de FITC-BSA más eficazmente que BA-1049 (S).

35 [0217] También se investigó en 4 ratas el efecto de BA-1049 (R) y BA-1049(S) sobre la proteína de unión estrecha ocludina. La ocludina se regula a la baja en las células endoteliales de la retina en las primeras 24 horas tras la inyección de C3 transferasa permeable a las células. En cuatro ratas, se inyecta C3 transferasa permeable a las células como se ha descrito anteriormente, y 24 h después se inyecta BA-1049 (R) o BA-1049(S) como se ha descrito anteriormente. Tres días después se extraen las retinas y se procesan para Transferencia de Western para la determinación cuantitativa de la expresión de ocludina.

40 [0218] El aflojamiento de las uniones estrechas conduce a la interrupción de la barrera hemato-retiniana y da lugar a extravasaciones. La aplicación de BA-1049 (R) restaura la expresión de ocludina.

## EJEMPLO 21

### 45 Deuteración Selectiva de BA-1049R y Metabolitos

50 [0219] El deuterio es un isótopo estable del hidrógeno, que contiene un solo electrón, pero cuyo núcleo contiene un protón y un neutrón. Por consiguiente, el deuterio tiene una masa atómica (UMA) de 2,0, mientras que el hidrógeno, cuyo núcleo sólo contiene un protón, es de 1,0 UMA. La presencia de deuterio en un enlace carbono-deuterio, a diferencia de un enlace carbono-hidrógeno, requiere más energía para romper el enlace y afecta al perfil farmacocinético de un compuesto, haciendo que un compuesto deuterado dure más tiempo. Aunque la deuteración selectiva de un compuesto puede cambiar su metabolismo o su vida media en el organismo una vez administrado, el compuesto se prueba para asegurarse de que se ha producido un cambio en el comportamiento biológico en virtud de la deuteración en comparación con el compuesto no deuterado.

55 [0220] Los compuestos pueden deuterarse utilizando precursores químicos deuterados especiales, muchos de los cuales están ya disponibles comercialmente, o mediante métodos como la química de flujo en presencia de D<sub>2</sub>O (Ötvös *et al.* (2011) Molec. Diversity, 15(3): 605-11).

60 [0221] El siguiente experimento demuestra el curso temporal de la aparición y desaparición del BA-1049 (R) y del 1-hidroxi-BA-1049 (R), así como de sus homólogos deuterados, en el plasma de ratas tras su administración oral e intravenosa.

#### 1. Animales y dosificación

65 [0222] En este estudio se utilizan ratas macho adultas Sprague-Dawley (Charles River Laboratories) canuladas por doble

5 vena yugular. Las dosis se administran a las ratas por vía intravenosa (IV) o por vía oral (PO). Las ratas dosificadas por vía intravenosa reciben una dosis única de una mezcla 1:1 de 1 mg/kg de BA-1049 (R) y 1 mg/kg de BA-1049 (R) deuterado a través de una cánula de vena yugular implantada quirúrgicamente, mientras que las ratas dosificadas por vía oral reciben una dosis única de 10 mg/kg de la mezcla 1:1 de compuestos normales y deuterados por vía oral. Ambas dosis están formuladas en solución salina tamponada con fosfato (PBS). La presencia de deuterio en lugar de hidrógeno aumenta la masa de cada ion en 1 UMA por sitio de intercambio. Por lo tanto, por ejemplo, si se intercambiaron 4 sitios de deuterio por hidrógeno, los iones deuterados resultantes tendrían una masa total superior en 4 UMA.

10 [0223] Las ratas fueron monitorizadas después de la administración para detectar signos clínicos de efectos adversos del compuesto administrado.

15 [0224] Despues de la dosificación IV o PO, se recogen muestras de sangre a las 0.083 h, 0.25 h, 0.5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h, 16 h y 24 h. En cada momento, se extraen 0,3 ml de sangre de una cánula de la vena yugular y se colocan en un tubo que contiene EDTA dipotásico como anticoagulante. Inmediatamente después de cada extracción de muestra de sangre, se administran 0,3 ml de cloruro sódico estéril al 0,9% para inyección, USP, a través de la cánula para reponer el volumen de sangre extraído. Las muestras de sangre se colocan en hielo hasta que se centrifugan. Las muestras se centrifugan y el plasma se pipetea a un tubo nuevo y se coloca en hielo seco antes de transferirlo a -80°C para su almacenamiento antes de los análisis posteriores.

## 20 2. Análisis de Muestras

25 [0225] Se analizan muestras de plasma para determinar la concentración plasmática de BA-1049 (R) y 1-hidroxi-BA-1049 (R), y el equivalente deuterado de cada uno. 25 µl de cada muestra de plasma, así como estándares y muestras de control de calidad (QC) se mezclan con 200 µl de solución de estándar interno que contiene 10 ng/ml de propranolol en acetonitrilo/metanol (50/50 v/v). Las muestras se agitan en vórtex y se centrifugan a 4°C. Se mezclan 100 µl del sobrenadante resultante con 300 µl de agua/ácido fórmico (100/0,1 v/v) y se extrae una alícuota.

30 [0226] Estas muestras se inyectan en un sistema LC-MS/MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas en tandem) para la detección de BA-1049 (R) y 1-hidroxi-BA-1049 (R), y sus formas deuteradas.

## 35 3. Análisis de Datos

40 [0227] Las concentraciones plasmáticas de los analitos se identifican, promedian y trazan en función del tiempo para determinar diversos valores farmacocinéticos, como el tiempo de aparición y desaparición (T<sub>1/2</sub>), la concentración máxima en plasma (C<sub>máx</sub>) y el momento en que se produce el máximo plasmático (T<sub>máx</sub>), y el área bajo la curva de concentración (AUC) como indicación de la exposición sistémica global a los compuestos.

## 45 4. Resultados

40 [0228] BA-1049 (R), 1-hidroxi-BA-1049 (R) y sus homólogos deuterados son todos detectables en plasma sanguíneo después de la administración IV o PO, como se ve con el método representado en la FIG. 22. Tras la administración del BA-1049 (R) o de sus formas deuteradas por vía intravenosa, la tasa de tiempo durante la cual cada forma desaparece del plasma indica cómo la deuteración modifica el metabolismo o la eliminación del BA-1049 (R) del sistema circulatorio. La administración por vía oral muestra que la producción de la 1-hidroxi-BA-1049 (R) y su forma deuterada es detectable y es probable que las formas deuteradas tengan diferentes velocidades de desaparición de la circulación.

50 [0229] Estos resultados demuestran que la sustitución de deuterio por hidrógeno en diferentes lugares de la estructura química del BA-1049 (R) o del 1-hidroxi-BA-1049 (R) cambia la velocidad a la que tanto la forma deuterada del BA-1049 (R) como el 1-hidroxi-BA-1049 (R) desaparecen del plasma después de la dosificación. Los resultados indican que las formas deuteradas específicas tienen un perfil farmacocinético más ventajoso y, por tanto, efectos más duraderos para tratar o controlar enfermedades, trastornos o lesiones.

## EJEMPLO 22

### 55 Capacidad del Metabolito 1-Hidroxi-BA-1049 (R) para Provocar el Crecimiento de las Neuritas

60 [0230] Para determinar si el metabolito 1-hidroxi-BA-1049 (R) es activo en entornos específicos, se utiliza un ensayo de crecimiento de neuritas. Siguiendo los métodos descritos en el EJEMPLO 9, BA-1049 (S), BA-1049 (R), y 1-hidroxi-BA-1049 para comparar la capacidad de los diferentes compuestos para promover el crecimiento de neuritas.

65 [0231] El metabolito 1-hidroxi de BA-1049 (R) estimula el crecimiento de neuritas a una concentración menor que cualquiera de los otros compuestos de prueba.

## EJEMPLO 23

### 65 Ensayo de Inhibición de Quinasas con BA-1049 (R) y 1-Hidroxi-BA-1049 (R)

5 [0232] El siguiente experimento demuestra como el BA-1049(R) y el 1-hidroxi-BA-1049(R) fueron evaluados por un cribado del kinoma. La plataforma de cribado KINOMEscan™ (DiscoverX, Fremont, CA) emplea un novedoso ensayo de  
 10 unión de competencia dirigido al sitio activo para medir cuantitativamente las interacciones entre los compuestos de prueba y más de 450 quinasas humanas y variantes mutantes relevantes para la enfermedad. Estos ensayos no requieren ATP y, por lo tanto, informan de verdaderas afinidades termodinámicas de interacción, a diferencia de los valores IC<sub>50</sub>, que pueden depender de la concentración de ATP. Los compuestos que se unen al sitio activo de la quinasa e impiden directa (estéricamente) o indirectamente (alostéricamente) la unión de la quinasa al ligando inmovilizado, reducirán la cantidad de quinasa capturada en el soporte sólido. Por el contrario, las moléculas de prueba que no se unen a la quinasa no tienen ningún efecto sobre la cantidad de quinasa capturada en el soporte sólido. Los "hits" de cribado se identifican midiendo la cantidad de quinasa capturada en las muestras de ensayo frente a las de control mediante un método qPCR cuantitativo, preciso y ultrasensible que detecta la etiqueta de ADN asociada.

15 10 [0233] Las cepas de fago T7 marcadas con quinasa se cultivaron en paralelo en bloques de 24 pocillos en un huésped *E. coli* derivado de la cepa BL21. *E. coli* se cultivó hasta la fase logarítmica y se infectó con el fago T7 a partir de una cepa congelada (multiplicidad de infección = 0,4) y se incubó con agitación a 32 °C hasta la lisis (90-150 minutos). Los lisados se centrifugaron (6.000 x g) y se filtraron (0,2 µm) para eliminar los restos celulares. El resto de quinasas se produjeron en células HEK-293 y posteriormente se marcaron con ADN para su detección por qPCR (Wein, et al. (2016) Nat. Comm. 7). Las microesferas magnéticas recubiertas de estreptavidina se trataron con ligandos de moléculas pequeñas biotinilados durante 30 minutos a temperatura ambiente para generar resinas de afinidad para ensayos de quinasas (Pegoraro, et al. (2017) Nat. Comm. 8). Las microesferas ligadas se bloquearon con un exceso de biotina y se lavaron con tampón de bloqueo (SeaBlock, (Pierce Biochemical; Rockford, IL), 1 % BSA, 0,05 % Tween 20, 1 mM DTT) para eliminar el ligando no unido y reducir la unión inespecífica de los fagos. Las reacciones de unión se ensamblaron combinando quinasas, perlas de afinidad ligadas y compuestos de ensayo en tampón de unión 1x (20% SeaBlock, 0,17x PBS, 0,05% Tween 20, 6 mM DTT). Los compuestos de ensayo se prepararon como reservas 40x en DMSO al 100% y se diluyeron directamente en el ensayo. Todas las reacciones se realizaron en placas de polipropileno de 384 pocillos en un volumen final de 0,02 ml. Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 1 hora, y las esferas de afinidad se lavaron con tampón de lavado (1x PBS, 0,05 % Tween 20). A continuación, las microesferas se volvieron a suspender en tampón de elución (1x PBS, 0,05 % Tween 20, 0,5 µM de ligando de afinidad no biotinilado) y se incubaron a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. La concentración de quinasa en los eluidos se midió mediante qPCR.

20 25 30

35 [0234] La Tabla 18 muestra los resultados del estudio para un 1-hidroxi-BA-1049 y BA-1049 cribado contra quinasas y para quinasas implicadas en cardiotoxicidad.

Tabla 18

% Unión Negativa		
Quinasa	1-Hidroxi BA-1049 (R)	BA-1049 (R)
AMPK (1 y 2)	100	95
ALK	81	94
FGFR4	100	100
IRAK3	96	92
GCN	96	89
MARK1	89	67
MARK2	100	100
MARK3	81	100
MARK4	92	94
PRKCQ	66	74
MEK2	97	99
MEK1	100	99
SLK	100	70
ROCK1	0,15	0,65
ROCK1	0,35	0,6

55 [0235] Los valores representan el porcentaje de unión del control negativo (*i.e.* 100% equivale a ninguna interferencia con la unión por el compuesto; hay unión significativa cuando hay 30% o menos de control negativo). Ninguno de los compuestos interactuó con afinidad biológicamente relevante con ninguno de los compuestos. Sin embargo, en estas condiciones de ensayo se unen tanto a ROCK1 como a ROCK2.

#### EJEMPLO 24

##### Propiedades de la sal de adipato de BA-1049(R)

65 [0236] BA-1049(R) es un compuesto ionizable que, cuando está en forma de base libre, existe como catión en las condiciones apropiadas y forma una sal con un anión aceptable. Para identificar los contraíones adecuados con los que

emparejar la molécula para conseguir una buena cristalinidad y unas propiedades fisicoquímicas aceptables, se llevó a cabo el siguiente cribado de sales. La formación de un cristal, con una red estable, puede ayudar a proteger las impurezas del cristal de la sustancia farmacológica durante la producción y también a mejorar su estabilidad.

## 5 Método Experimental

**[0237]** Aproximadamente 100 mg de BA-1049(R) como base libre se disolvieron en 2 ml de alcohol isopropílico seguido de 0.5 ml de diclorometano, y la solución se agitó hasta que el BA-1049(R) se disolvió completamente. Se añadió una cantidad equivalente a 1 molar o 0,5 molar de un contraíón farmacéuticamente aceptable a la solución, que se agitó a 10 68 °C durante 2 a 6 horas para iniciar el proceso de formación de la sal. Los contraíones aceptables incluyen hidrocloruro, tosilato, adipato, mesilato, D-tartrato, L-tartrato, fumarato, malato, maleato, mandelato, succinato, fosfato y otros. La solución se enfrió a RT con agitación continua y la sal se recogió por filtración, y posteriormente se secó para su posterior 15 análisis de cristalinidad y propiedades físicas mediante difracción de rayos X en polvo (XRPD), absorción de agua por higroscopidad, punto de fusión y otros parámetros fisicoquímicos.

## 15 Resultados

**[0238]** Un porcentaje significativo de los contraíones probados generaron cristales estables con BA-1049(R) y fueron evaluados adicionalmente usando varios medios. Numerosas formas salinas diferentes de BA-1049(R) mostraron 20 aumentos sustanciales en los perfiles de temperatura de fusión, en comparación con la base libre, según se determinó mediante calorimetría dinámica de barrido y se evaluaron mediante análisis termogravimétrico (TGA) y sorción dinámica de vapor (DVS).

**[0239]** Mientras que muchas de las sales que formaron sólidos con buena cristalinidad por XRPD mostraron temperaturas 25 de fusión aumentadas, sus respectivos comportamientos en DVS fueron diferentes. Los ciclos repetidos de humidificación y deshumidificación identificaron específicamente la sal de adipato como capaz de absorber pequeñas cantidades de vapor de agua. Como se muestra en la FIG. 27, la forma de adipato BA-1049(R) fue capaz de desprenderse de agua al secarse, y lo hizo sin mostrar un cambio en el comportamiento de la red cristalina, y de hacerlo a lo largo de múltiples 30 ciclos de hidratación seguidos de deshidratación (FIG. 27). Junto con la capacidad de la sal de adipato para disolverse fácilmente en agua (>200 mg/ml a temperatura ambiente), al tiempo que conserva un bajo contenido de agua como sólido cristalino, estas propiedades identificaron la sal de adipato como una sal útil para indicaciones terapéuticas.

## EJEMPLO 25

### 35 Exploración de Seguridad No Direccionada

**[0240]** Los inhibidores de quinasas de molécula pequeña se dirigen contra una quinasa o grupo de quinasas específicas. Sin embargo, todos los inhibidores de quinasas presentan efectos no deseados contra otras quinasas, y también pueden 40 afectar a dianas no quinasas. Un ejemplo de actividad fuera de diana contra dianas no quinasas es el compuesto AR-13324, que también inactiva el transportador de norepinefrina (NET) y el transportador de serotonina (SERT) (Tabla 19) (Sturdivant et al. (2016) Bio-organic Med. Chem. Lett. 36: 2475). Parte de la dificultad con los efectos fuera del objetivo surge porque muchos inhibidores de la quinasa se sintetizan para interferir directa o indirectamente con la unión del trifosfato de adenosina (ATP). La detección de interacciones no diana entre un inhibidor de la quinasa y otras dianas 45 puede revelar si un inhibidor de la quinasa tiene propiedades farmacológicas adecuadas.

**[0241]** El siguiente experimento identifica potenciales interacciones fuera del objetivo del BA-1049(R) o del 1-hidroxi-BA-1049(R) usando ensayos que miden las actividades específicas de objetivos seleccionados de la superficie celular en líneas celulares de cultivo de tejidos o de enzimas purificadas. El SAFETYscan™ (DiscoverX) se utiliza para realizar pruebas rápidas de cualquier compuesto frente a un panel que incluye proteínas de membrana bien conocidas de importancia para el desarrollo de fármacos, como canales iónicos activados por voltaje seleccionados, receptores acoplados a proteínas G, transportadores de neurotransmisores y también un grupo seleccionado de enzimas celulares purificadas.

**[0242]** Las líneas celulares diseñadas para expresar proteínas receptoras transmembrana individuales, como el receptor 55 de acetilcolina muscarínico o el receptor de dopamina D1, se cultivaron en su medio de crecimiento estándar hasta alcanzar la confluencia. Se aplicaron BA-1049(R) y 1-hidroxi-BA-1049(R) a concentraciones de 10 µM y se incubaron los cultivos durante tiempos variables hasta que se midió la actividad del canal iónico específico utilizando reporteros fluorescentes para evaluar la activación o inhibición de los canales iónicos o transportadores de membrana diana. El experimento también contiene controles de comparación que incluyen agonistas y antagonistas conocidos de las proteínas de membrana objetivo.

**[0243]** Para los ensayos que utilizan enzimas purificadas, se prepara un ensayo enzimático en tampón de reacción 60 estándar y los indicadores necesarios para la actividad, como cofactores, tampones y sustratos sintéticos. A continuación, se realizan ensayos de actividad en presencia o ausencia de 10 µM de BA-1049(R) o de 1-hidroxi-BA-1049(R) y se mide el impacto de su presencia en la actividad enzimática. Como controles positivos, se incluyó en el panel un ensayo de unión utilizando Rho quinasa (ROCK). Otras dianas del panel incluían receptores acoplados a proteínas G, receptores de

hormonas nucleares, enzimas intracelulares no quinasas, canales iónicos y transportadores de neurotransmisores. Las dianas específicas se eligieron debido a sus asociaciones previas conocidas con el origen de efectos problemáticos fuera de diana en estudios celulares o con animales completos.

5 Resultados

**[0244]** Como se muestra en la Tabla 19, ni el BA-1049 (R) ni el 1-hidroxi-BA-1049(R) mostraron ningún impacto significativo en los dos objetivos no-ROCK listados. Además, BA-1049(R) no mostró actividad contra ninguna de las dianas del SAFETYscan™ total, con la excepción de una posible interacción antagonista con el receptor 5-HT2b.

10

15 **Tabla 19:**

% Inhibición de la Actividad del Transportador de Neurotransmisores			
Transportador	BA-1049(R)	1-Hidroxi-BA-1049(R)	AR-13324 (Sturdivant <i>et al.</i> , <i>ibid.</i> )
NET	12%	11%	96%
SERT	9%	14%	94%

NET = transportador de norepinefrina; SERT = transportador de serotonina

**[0245]** La ausencia de resultados significativos para el BA-1049(R) o para el 1-hidroxi-BA-1049(R) proporcionó una clara evidencia de la especificidad de estos compuestos y de su potencial desarrollo para tratar enfermedades, trastornos o lesiones.

20 **EJEMPLO 26**

25 **BA-1049(R) Mejora la Recuperación Funcional Tras una Lesión Medular el Efecto de BA-1049(A) en la Lesión Medular**

**[0246]** El siguiente experimento demuestra la capacidad de BA-1049 (R) para mejorar la recuperación funcional en ratones después de una lesión de la médula espinal (SCI).

30 **1. Animales y Cirugía**

**[0247]** En este estudio se utilizaron ratones BALB/c hembra adultos (Charles River Laboratories). Los ratones recibieron una sobrehemisección dorsal mediante el siguiente método. La inducción de la anestesia se realizó con isoflurano al 5% en O<sub>2</sub> al 100%. Los ratones permanecieron anestesiados con isoflurano al 1-2% en O<sub>2</sub> al 100% durante el resto de la cirugía. Los ratones recibieron Buprenorfina SR para aliviar el dolor. Se afeitó el lomo del ratón y se esterilizó con soluciones alternas de etanol al 70% y povidona. Se practicó una incisión por encima de la parte inferior de la columna torácica. Se realizó una laminectomía en el nivel espinal T9-T10. Se realiza un corte de 0,5 mm de profundidad en la médula espinal dorsal y transversalmente a través de ella, con lo que se logra la sobrehemisección dorsal.

40 **[0248]** Se suturaron los músculos y la piel y se suministró al ratón solución de cloruro sódico al 0,9% para ayudar a la reposición de líquidos. A los ratones se les proporcionó agua en gel, comida blanda, pienso normal para ratones y agua durante su recuperación. Se extrajo la vejiga del ratón dos veces al día hasta que recuperaron la capacidad de vaciarse por sí solos. A continuación, los ratones se pesaron diariamente y se controlaron a diario para detectar signos clínicos.

45 **2. Administración**

**[0249]** Los ratones SCI fueron asignados aleatoriamente a uno de tres grupos: BA-1049 (R) a partir de 2 días después de la cirugía y durante 2 semanas, BA-1049 (R) a partir de 14 días después de la cirugía y durante 2 semanas, y un grupo de control que no recibió BA-1049 (R).

50 **[0250]** Los ratones de los grupos de tratamiento recibieron 10 mg/kg de BA-1049 (R) por vía intraperitoneal (IP) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) diariamente durante el período de tratamiento correspondiente.

55 **3. Pruebas de comportamiento**

**[0251]** A los 28 días después de la lesión, los ratones de los 3 grupos fueron calificados por un experimentador enmascarado a la identidad del paradigma de tratamiento de cada ratón para el rendimiento en 2 pruebas de comportamiento. La primera es una prueba de locomoción en campo abierto y la segunda es una prueba de presión de las extremidades posteriores en la que se cuelga al ratón de forma segura con sus extremidades posteriores cerca de un objeto fino y cónico como un lápiz. Un ratón no lesionado extenderá las extremidades posteriores y agarrará el objeto; los ratones lesionados se clasifican en función de la similitud de su respuesta con la de un ratón no lesionado.

**[0252]** Las notas de comportamiento del experimentador "enmascarado" fueron consolidadas por otro científico y los ratones se clasifican según su rendimiento en cada prueba. Tras la clasificación, se "desenmascaró" la identidad de los ratones.

## 4. Resultados

5 [0253] Los ratones tratados con 10 mg/kg IP BA-1049 (R) diariamente durante las primeras 2 semanas después de la lesión demostraron un rendimiento en ambas pruebas de comportamiento más cercano al de los ratones no lesionados (FIG. 28). Esta recuperación incluía el apoyo del peso en las patas traseras y la elevación de la cola durante la locomoción en campo abierto, así como el agarre normal con las patas traseras durante la prueba de agarre. Los ratones que no recibieron el tratamiento BA-1049 (R) mostraron que arrastraban los miembros posteriores durante la locomoción en campo abierto y que las patas posteriores se volvían hacia fuera sin agarrar durante la prueba de prensión. Los ratones lesionados que recibieron 10 mg/kg de BA-1049 (R) por vía intraperitoneal a partir de 14 d después de la lesión y durante 10 14 d demostraron una recuperación intermedia en comparación con los otros grupos; soporte de peso esporádico en campo abierto y prensión lenta o débil durante la prueba de prensión.

15 [0254] Estos resultados mostrados en la Figura 28 demuestran que el BA-1049 (R) diario induce una recuperación significativa del control motor locomotor y de las extremidades posteriores después de una LME. También sugieren que puede haber una ventana para el tratamiento después de la lesión de la médula espinal, en concreto, que el tratamiento con BA-1049 (R) es más eficaz cuando se administra al principio de la recuperación frente a comenzar en puntos de tiempo posteriores.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

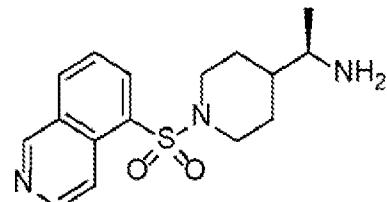
65

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica que comprende una sal de adipato de un compuesto que tiene la estructura:

5

10



15 2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto está deuterado.

3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de la malformación cerebral cavernosa.

20 4. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento del accidente cerebrovascular o el vasoespasmo tras una hemorragia subaracnoidea.

5. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de un aneurisma cerebral.

25 6. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de lesiones de la médula espinal o lesiones cerebrales traumáticas.

30

35

40

45

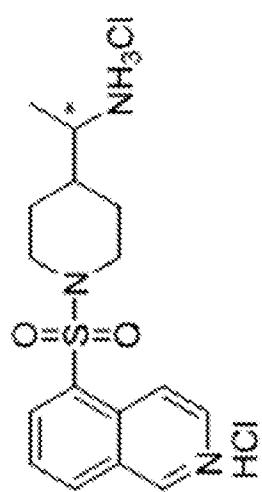
50

55

60

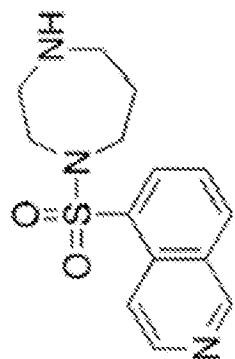
65

**Fig. 1A**



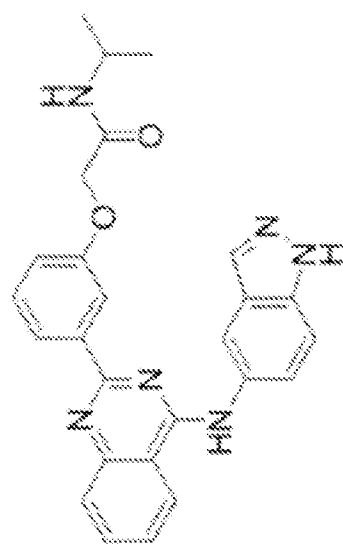
BA-1049 (R)

**Fig. 1B**



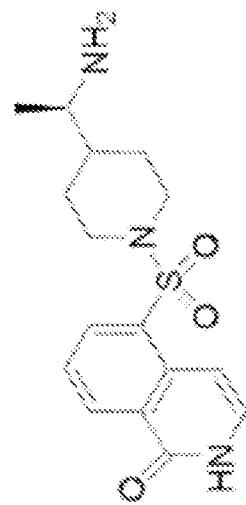
Fasudil

**Fig. 1C**



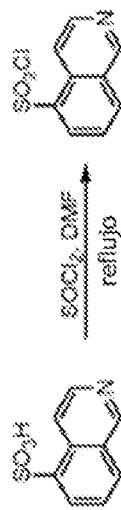
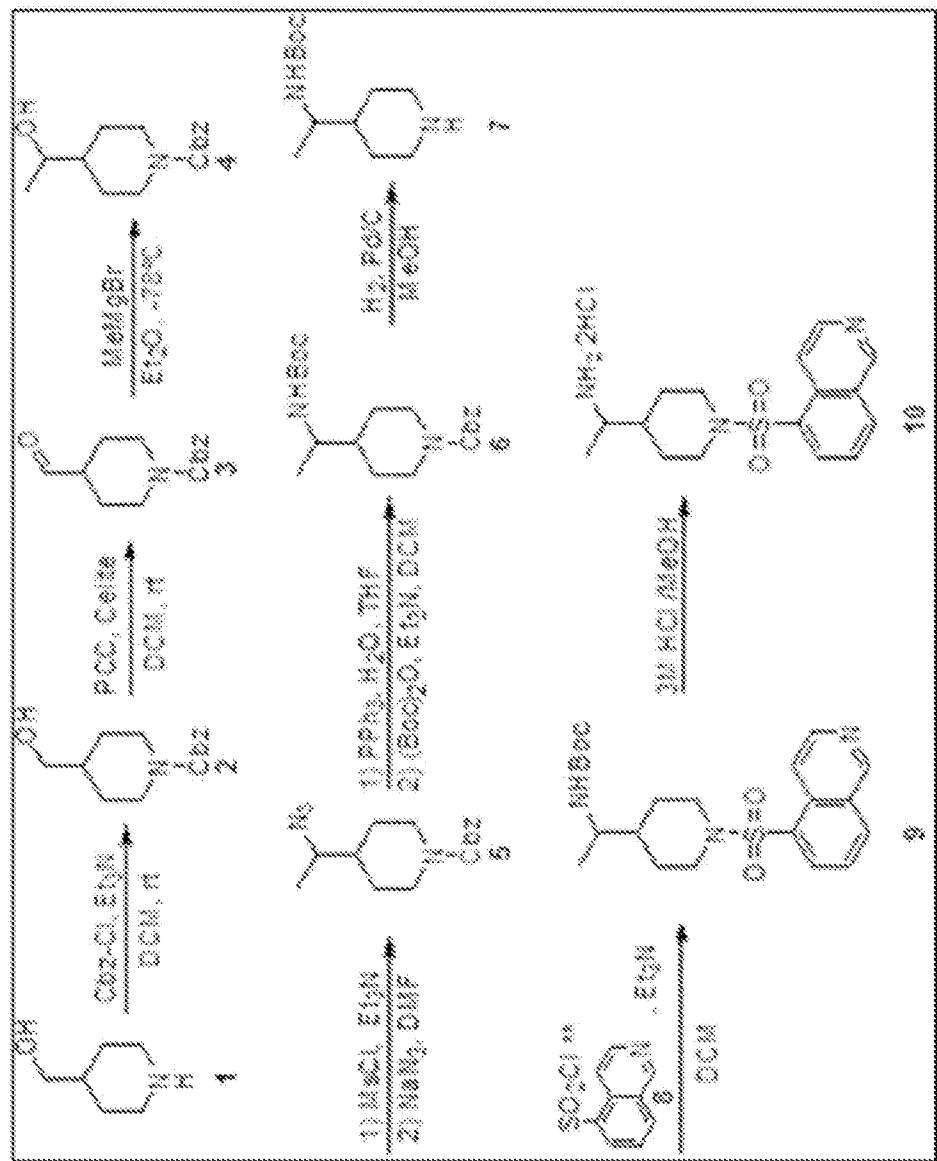
SLx-2119 (KD-025)

**Fig. 1D**



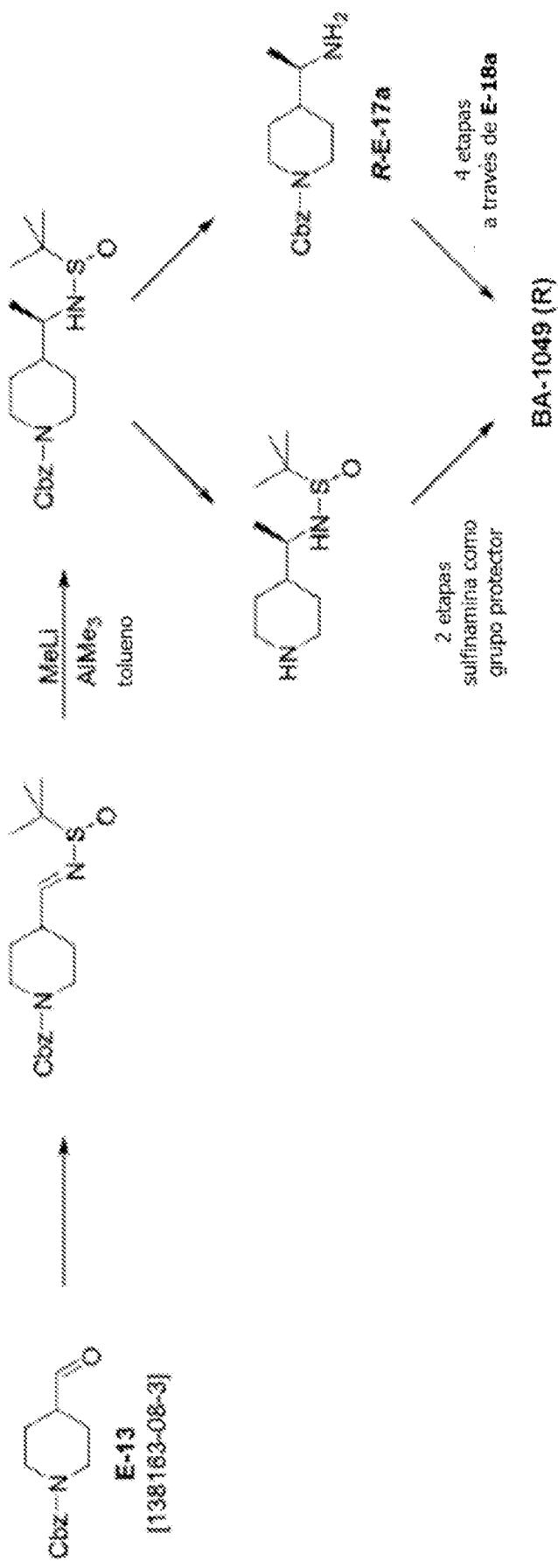
1-Hidroxi-BA-1049

Fig. 2:



\*\* El cloruro de 5-isoquinolinesulfónico se ha sintetizado a partir del ácido 5-isoquinolinesulfónico

Fig. 3



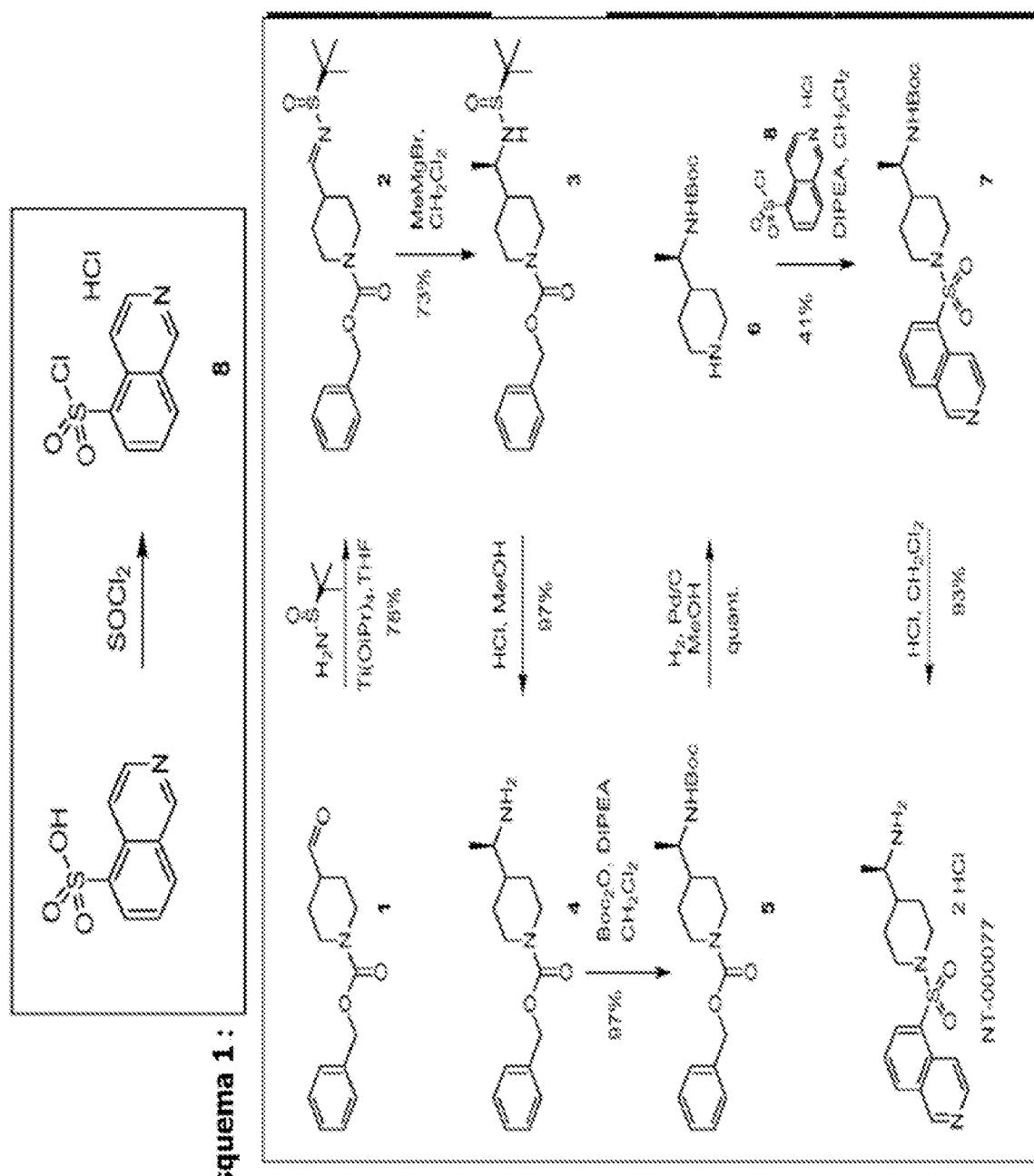
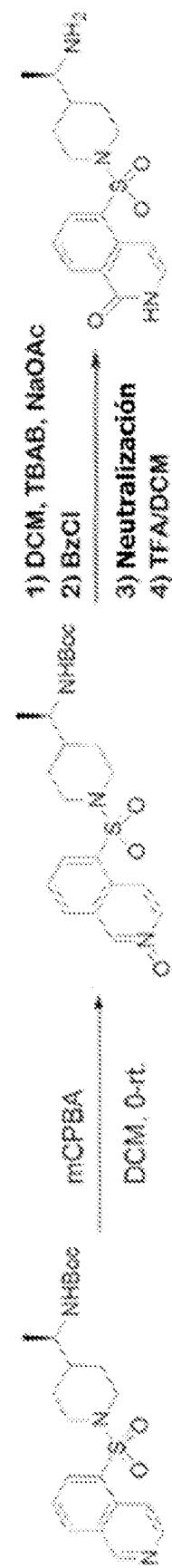


Fig. 5



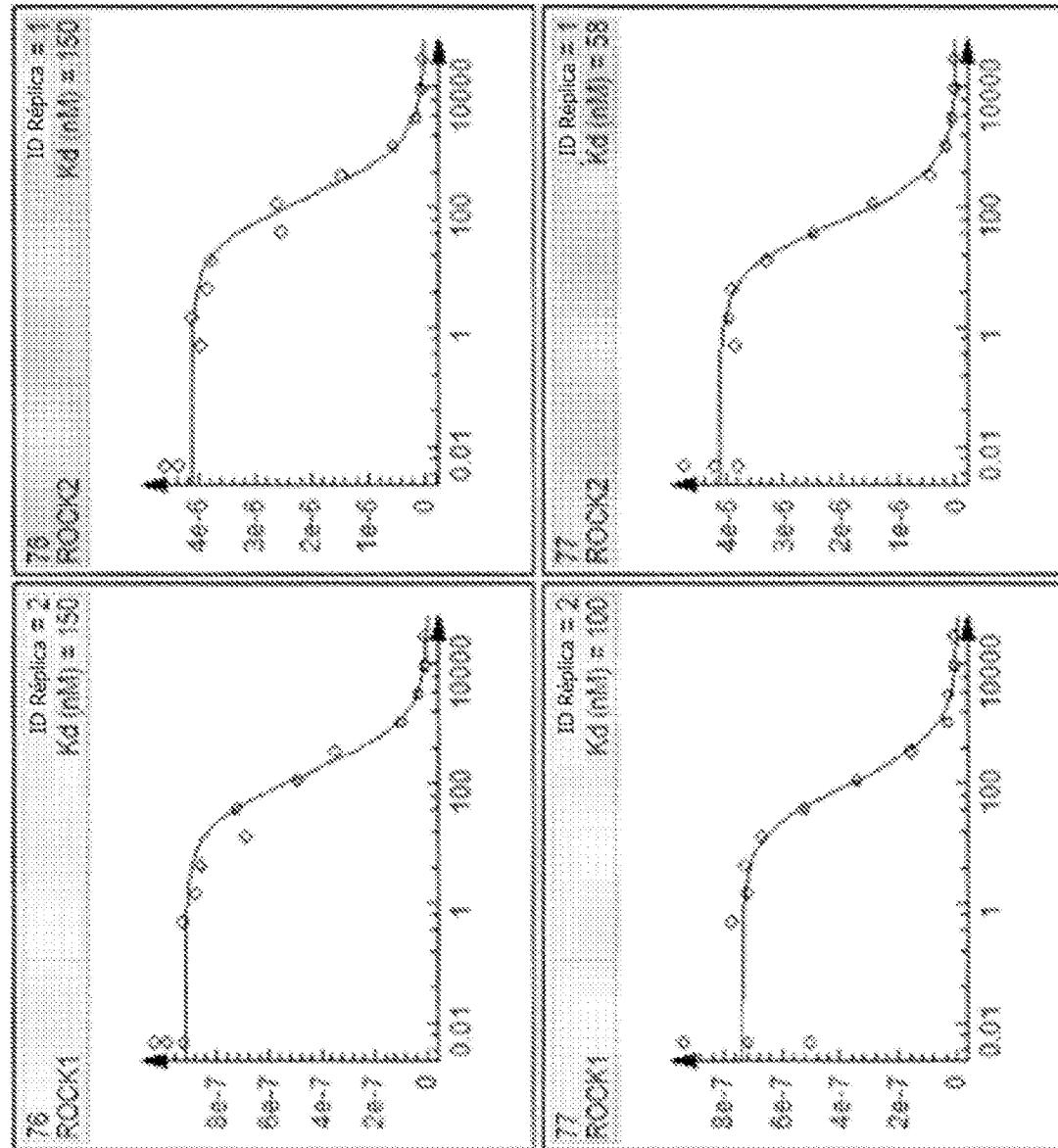
ROCK1  
ROCK2

Fig. 7A

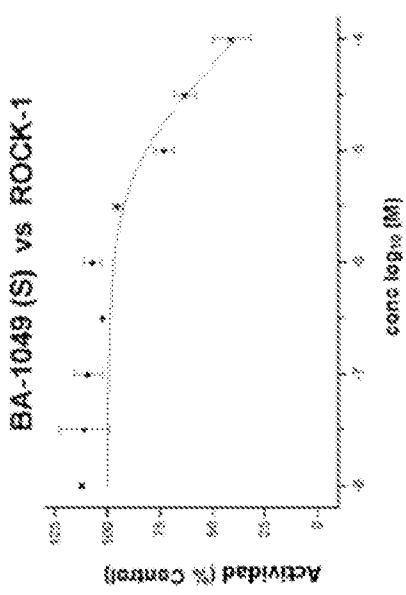


Fig. 7C

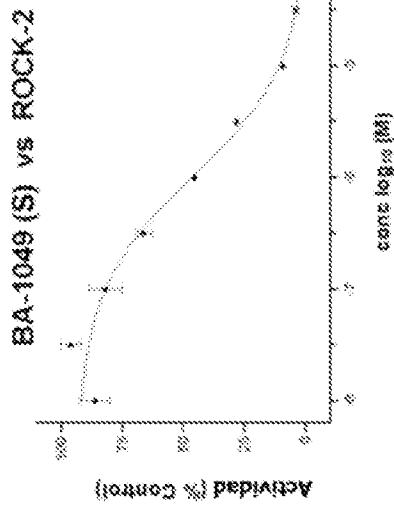
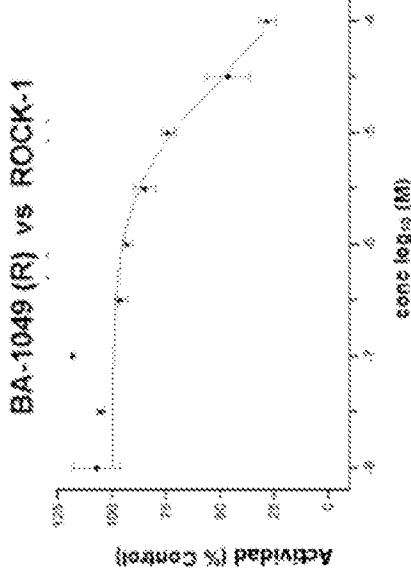


Fig. 7B

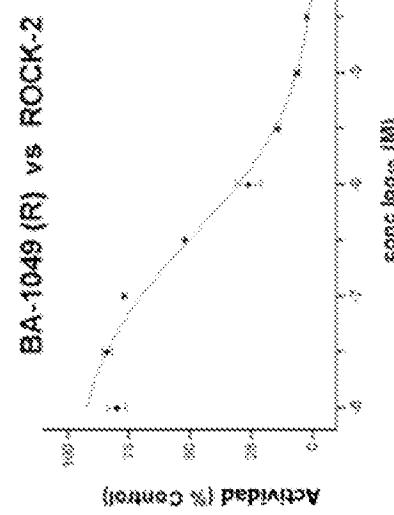


Fig. 7D

Fig. 8

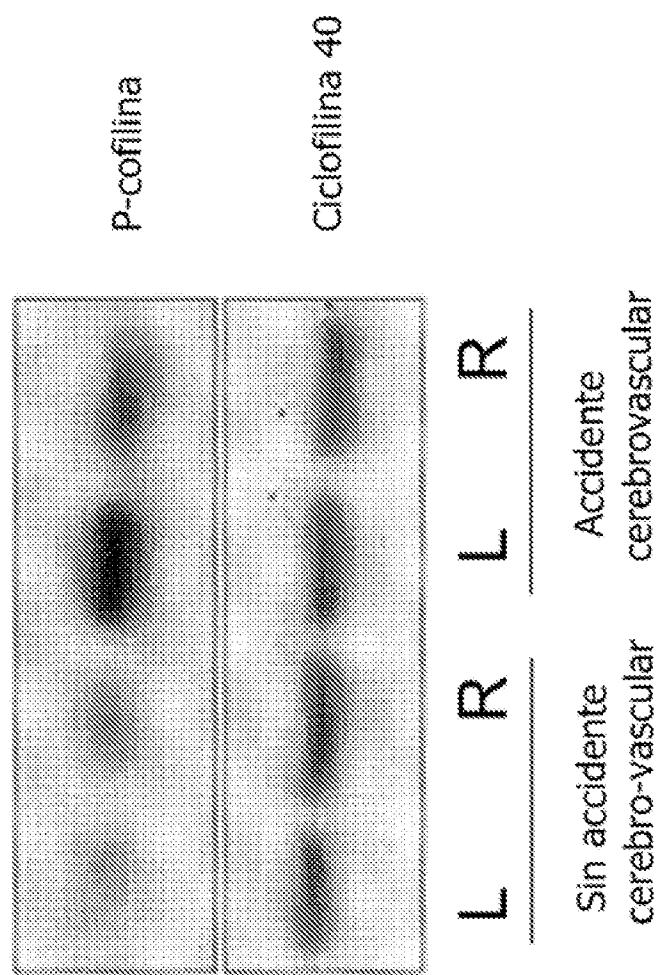
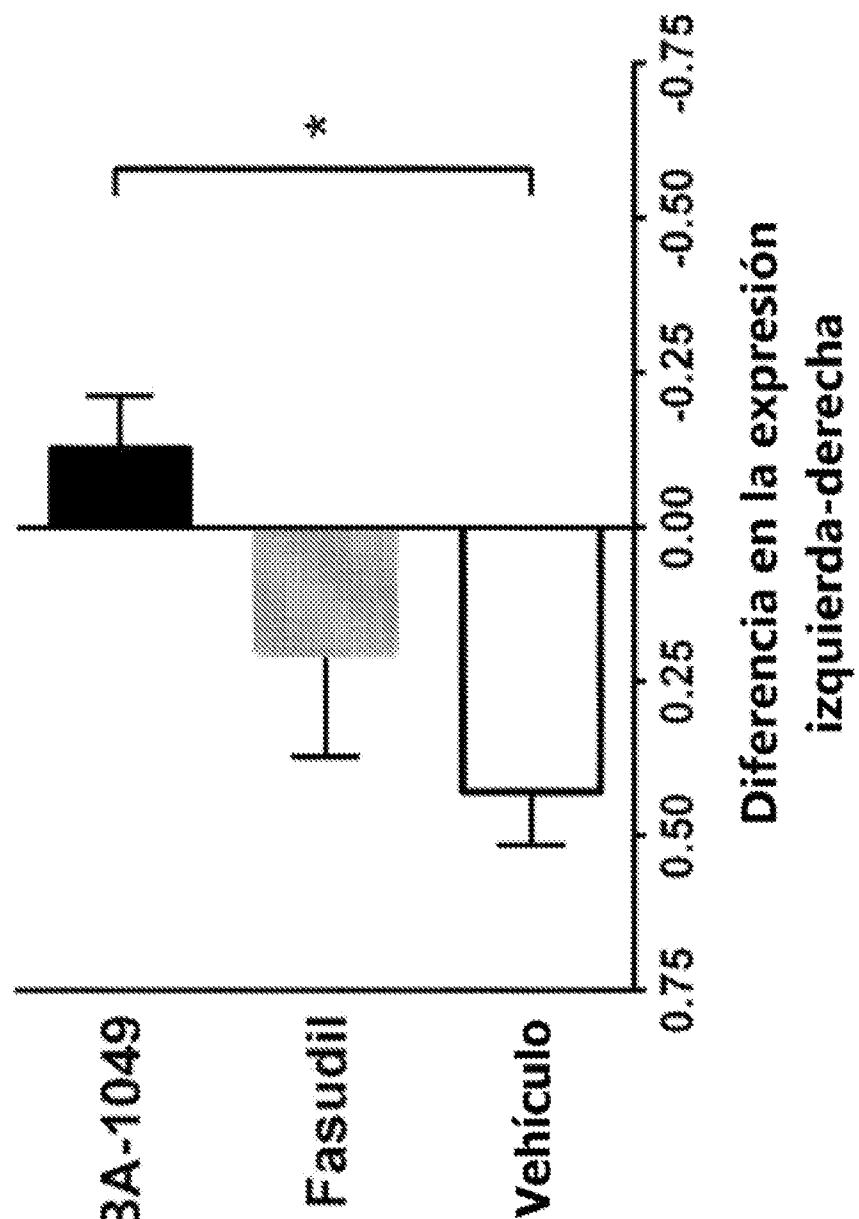


Fig. 9



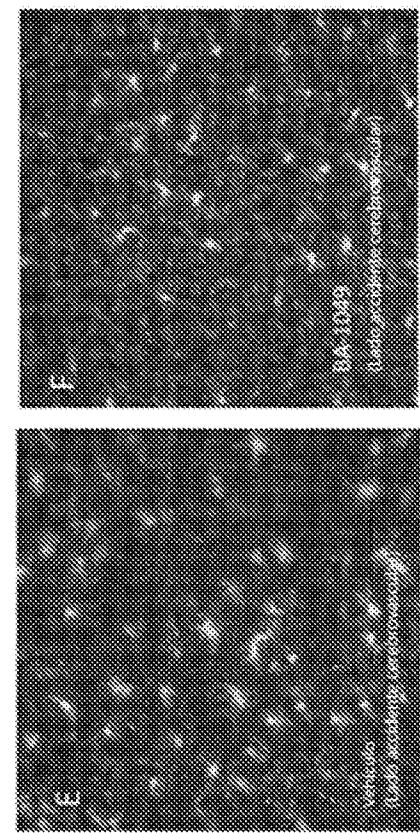
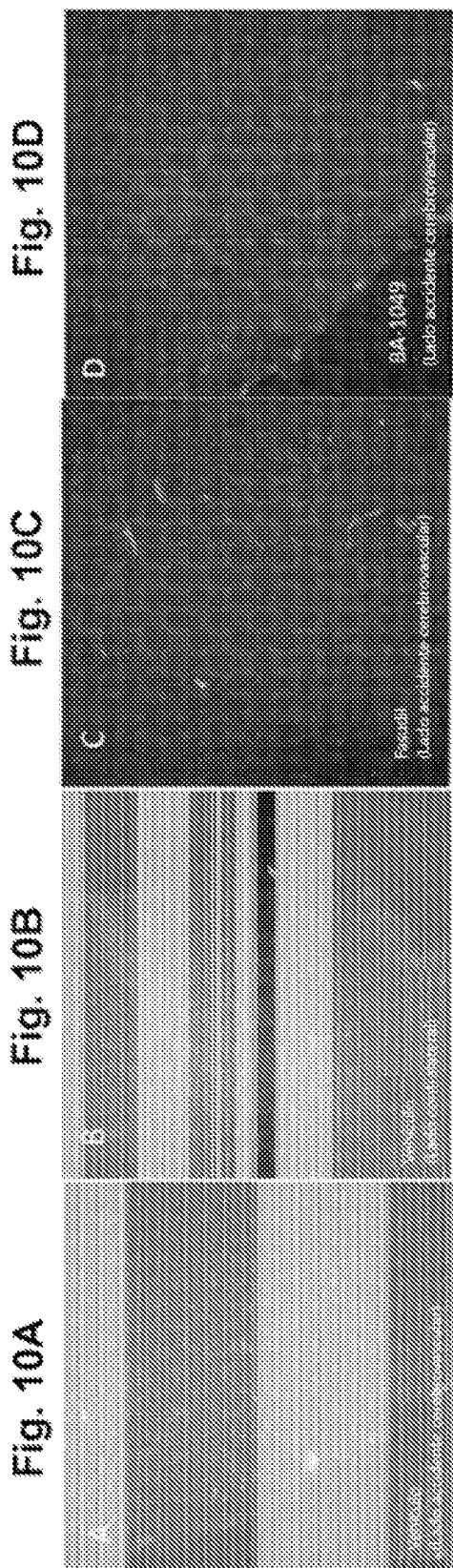


Fig. 11A

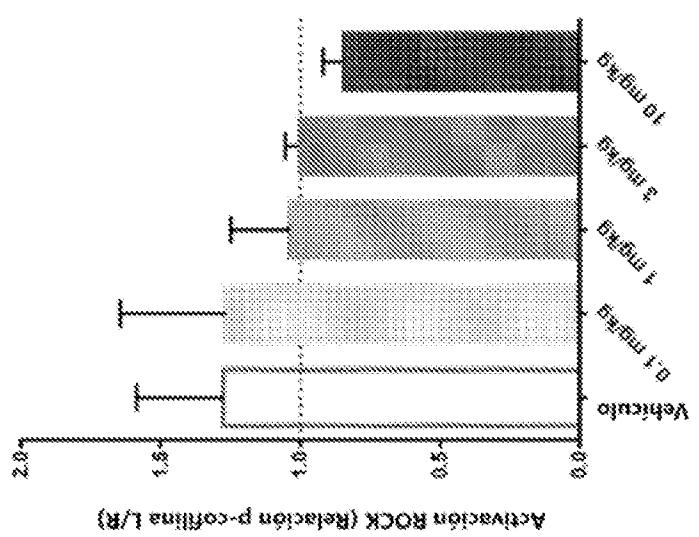
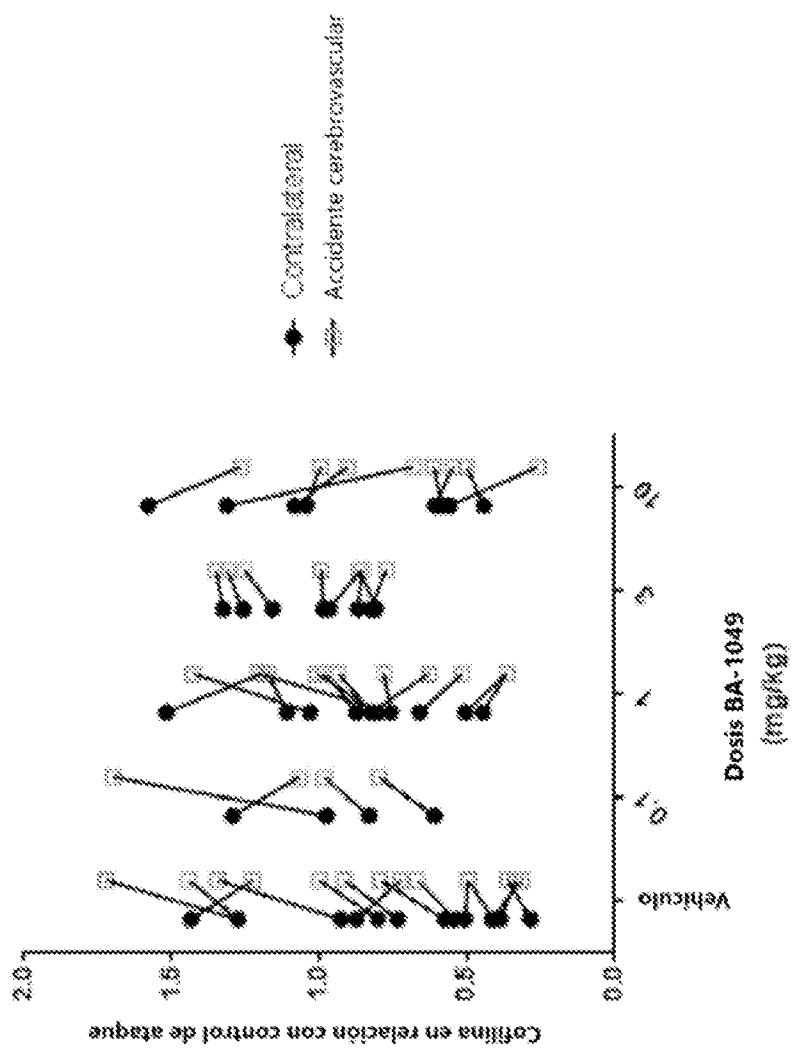
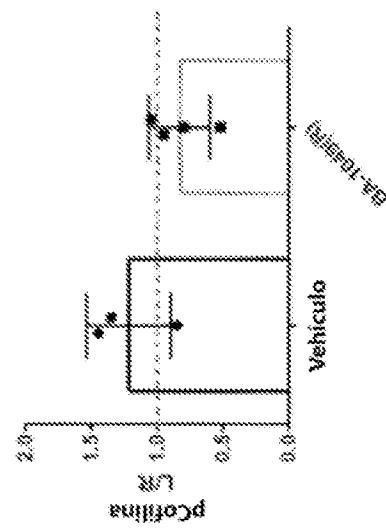


Fig. 11B

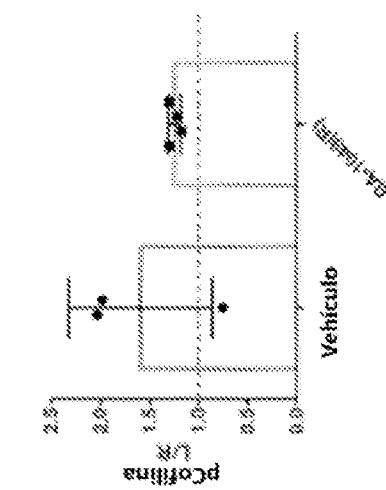


**Fig. 12A**



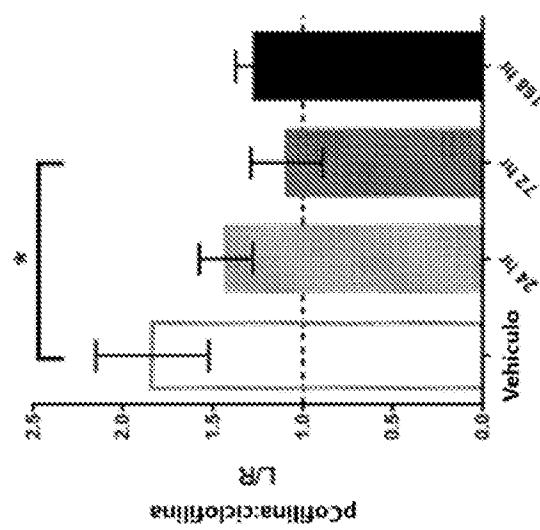
4 h de reperfusión

**Fig. 12B**



24 h de reperfusión

**Fig. 12C**



Pretratamiento

Fig. 13A

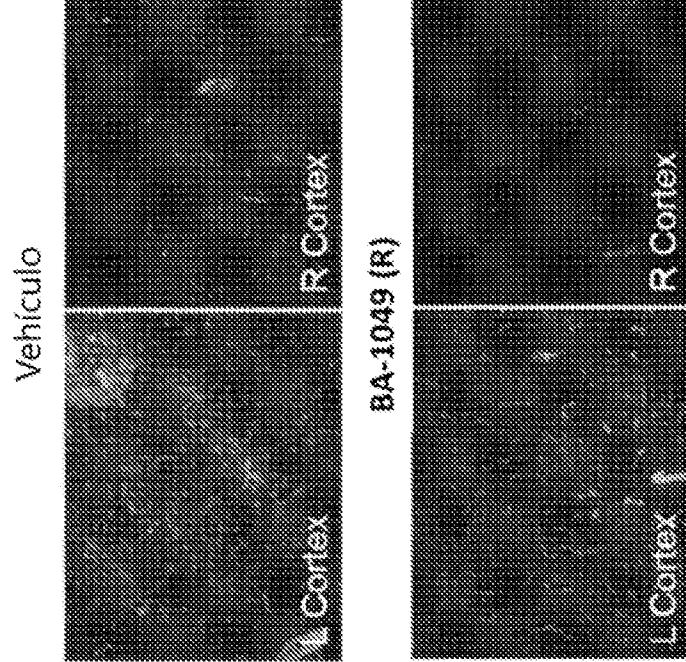


Fig. 13B

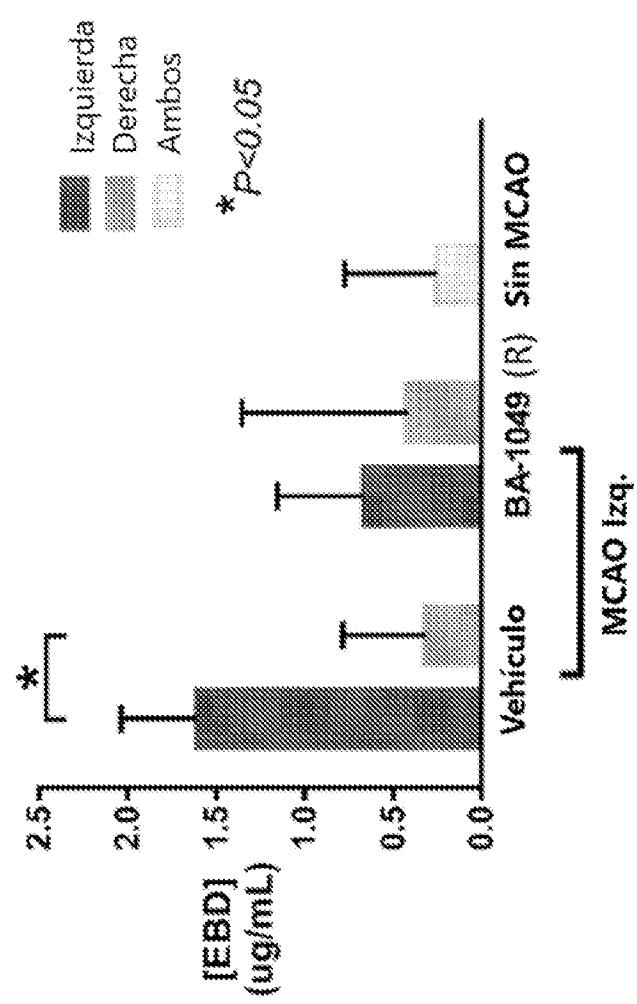


Fig. 14

Penetración cerebral de BA-1049 como ng/g de tejido

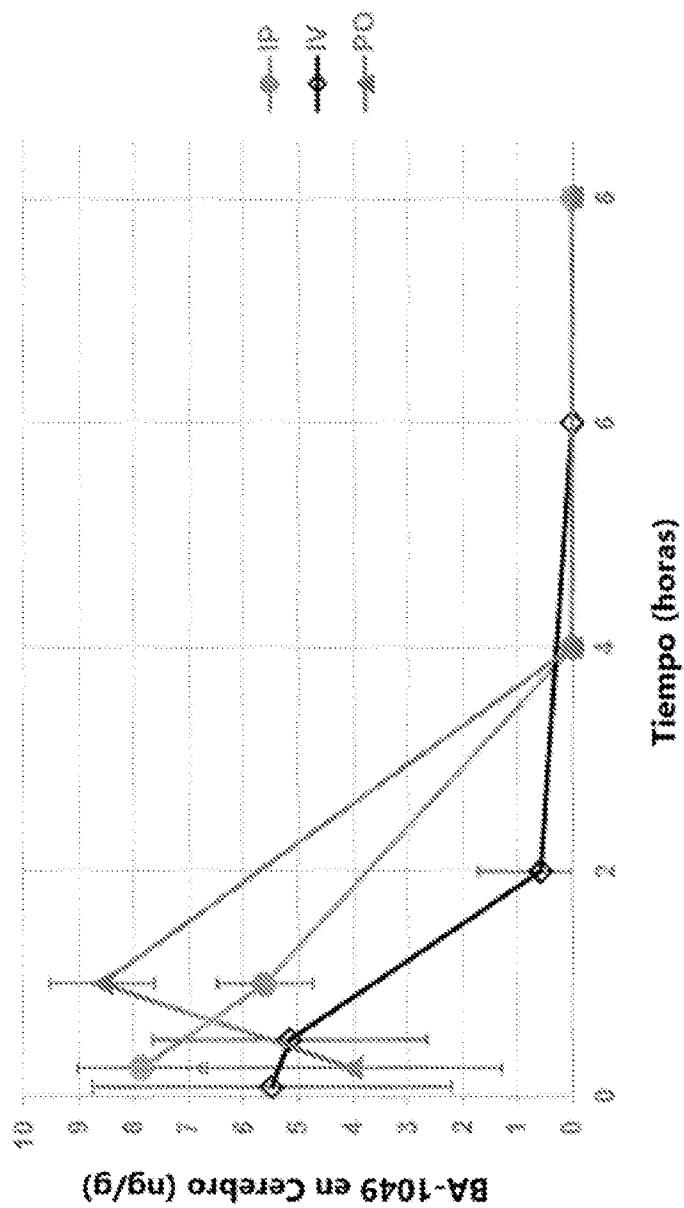


Fig. 15C

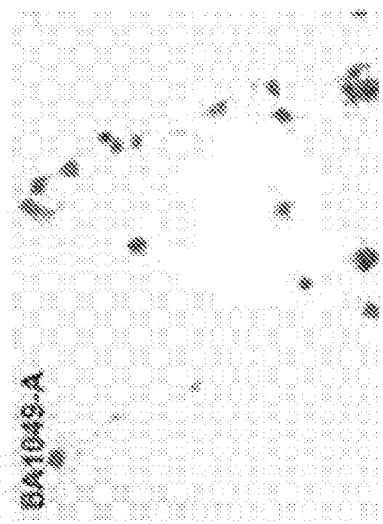


Fig. 15D

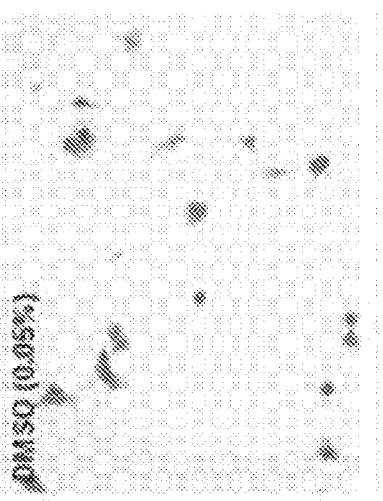
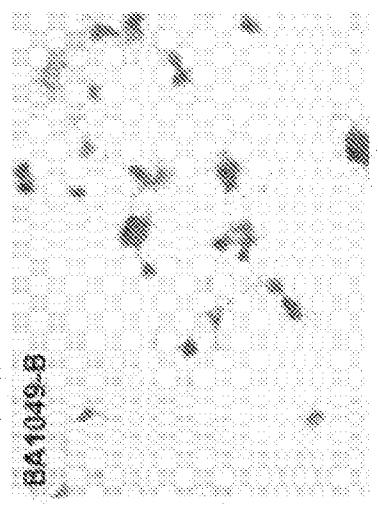


Fig. 15A

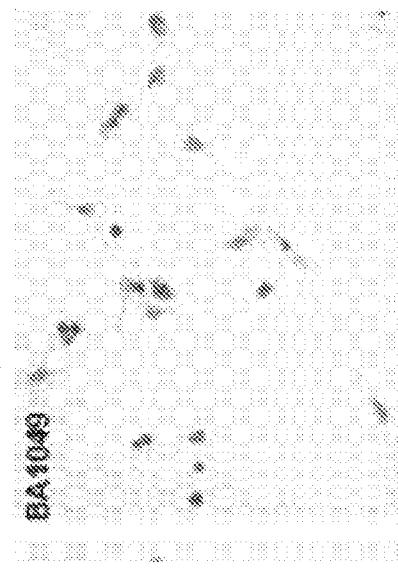
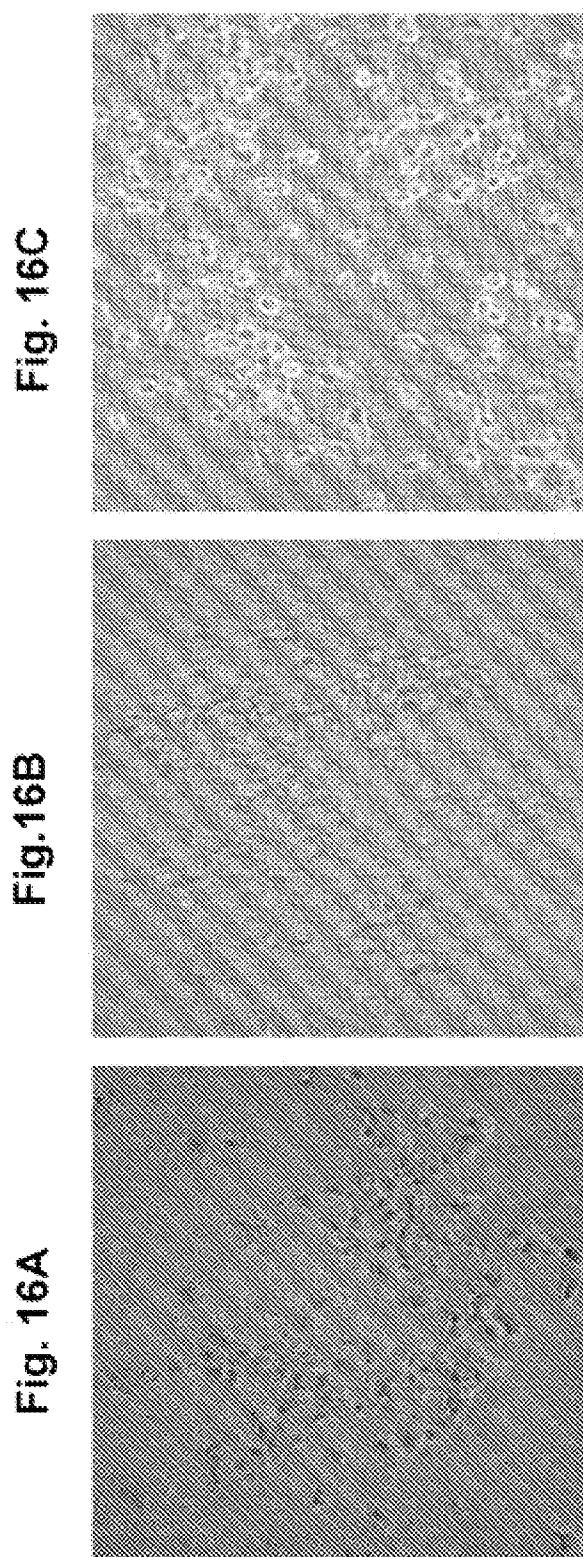


Fig. 15B



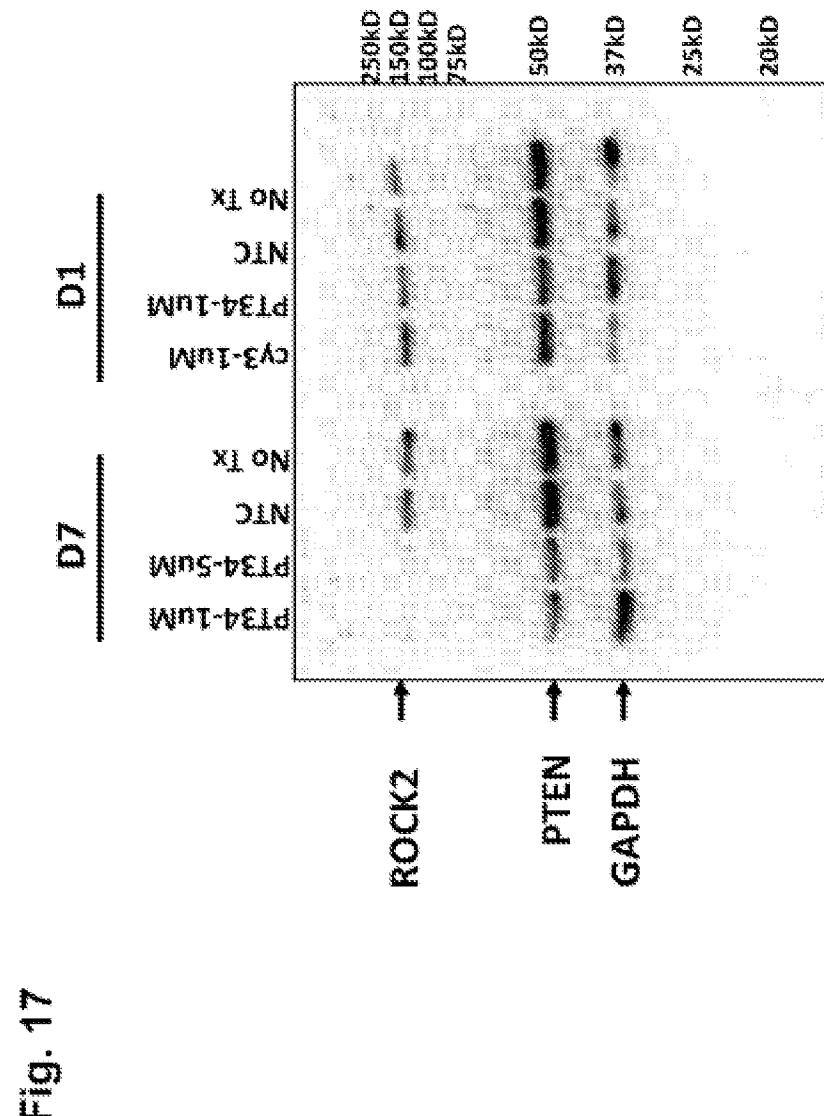


Fig. 17

Fig. 18A  
Fig. 18B

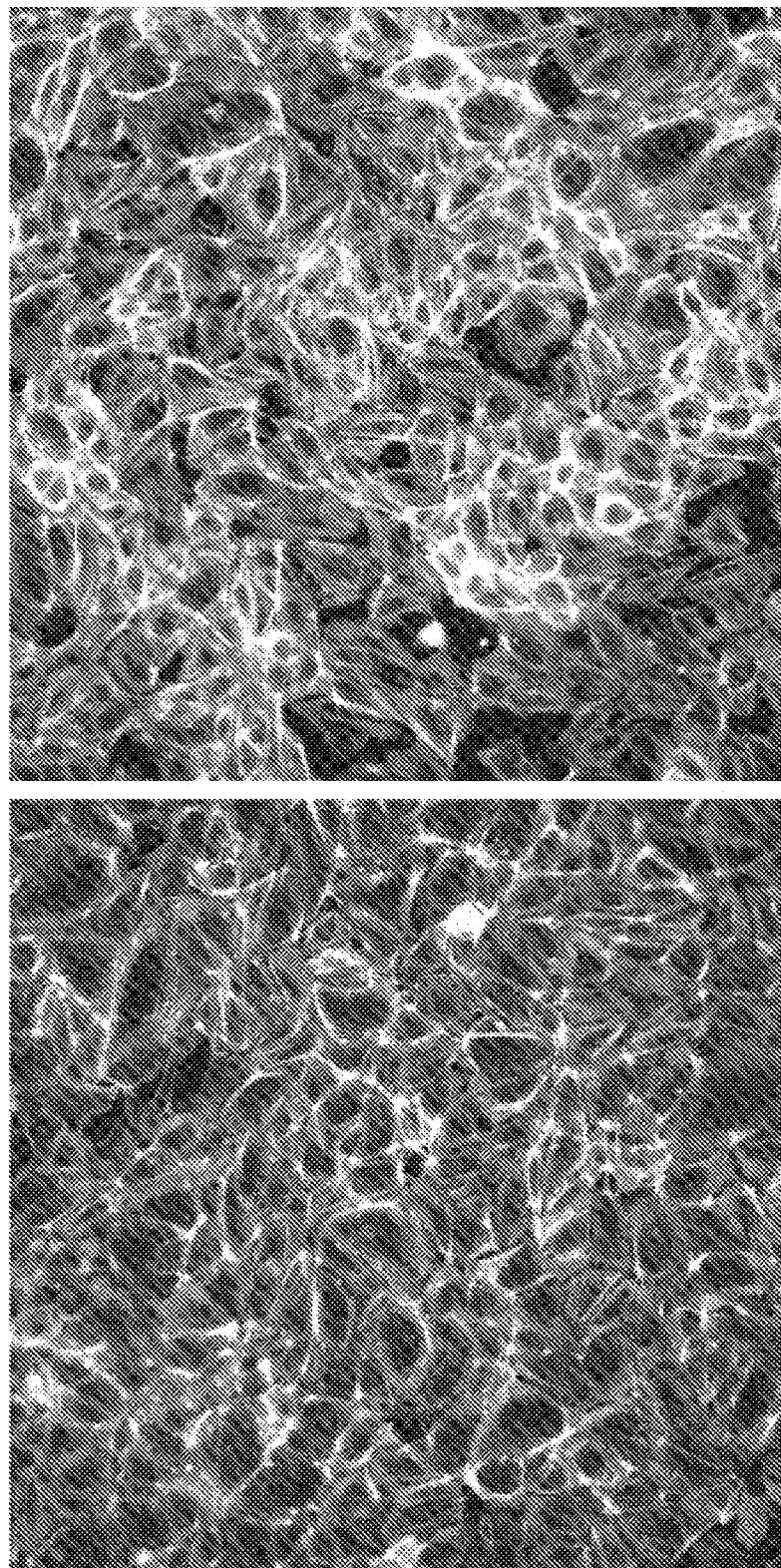


Fig. 19A

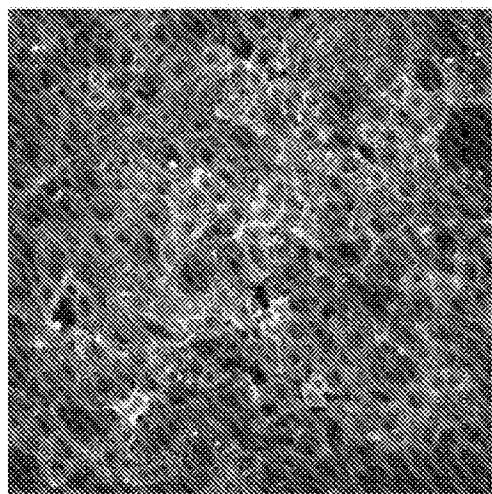


Fig. 19B

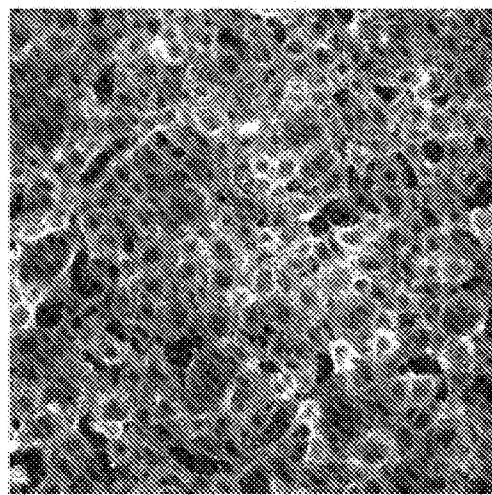


Fig. 19C

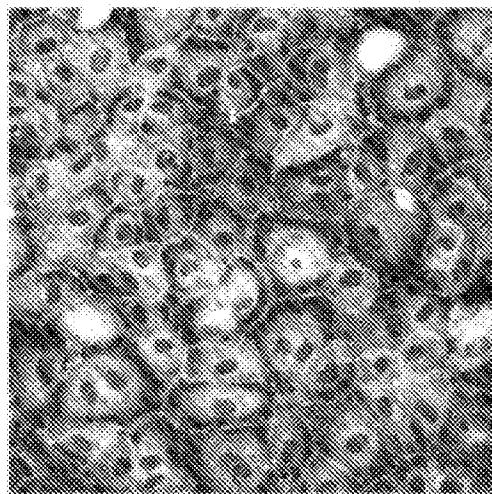
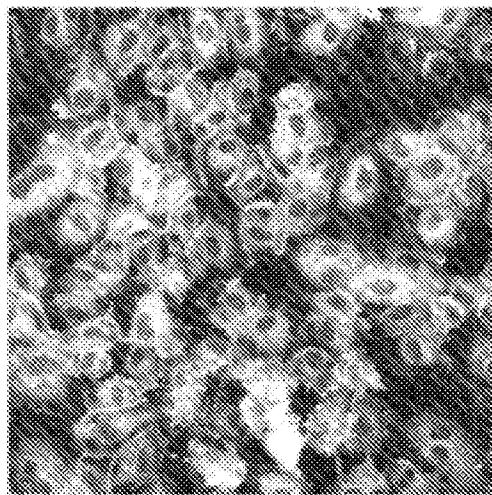


Fig. 19D



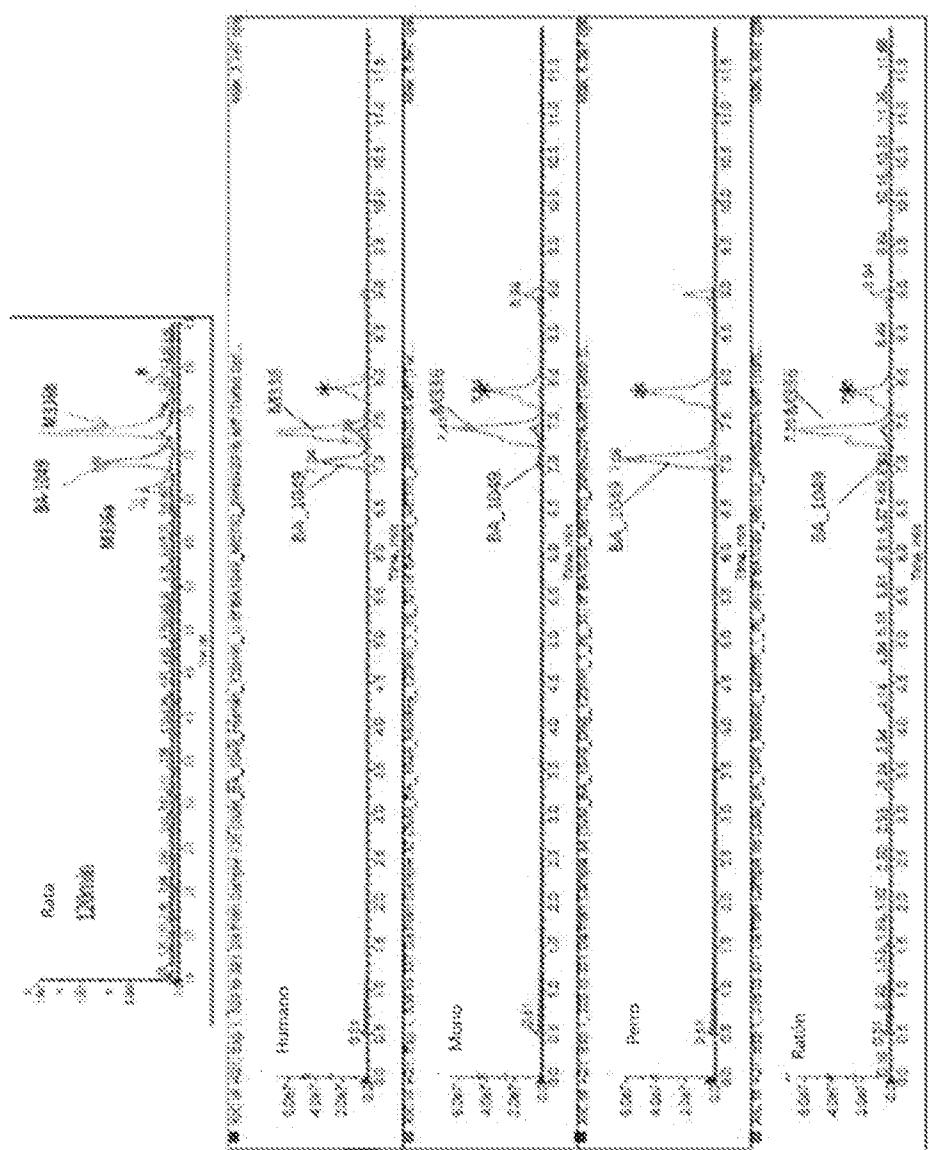


Fig. 20. Véase que aparece en todas las muestras (Blanco Y y Luz neta)

FIG. 20

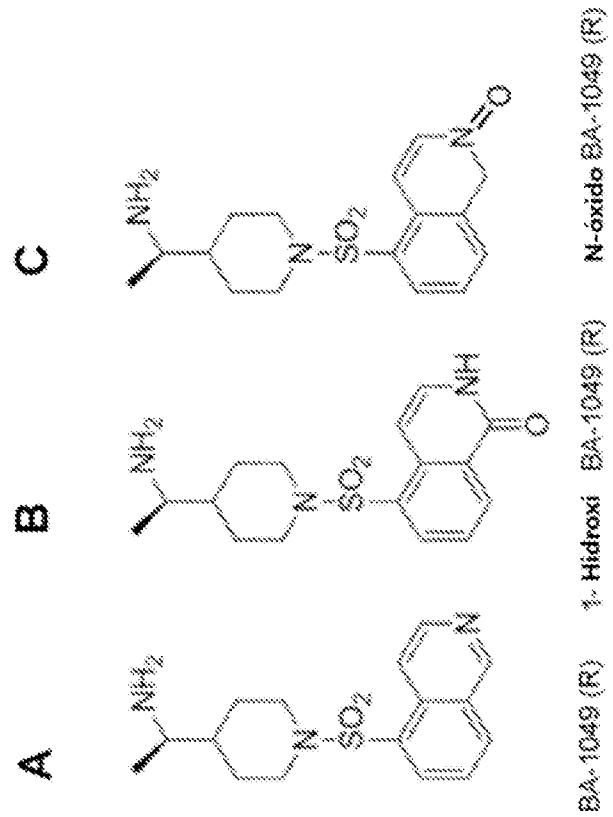


FIG. 21

Fig. 22A

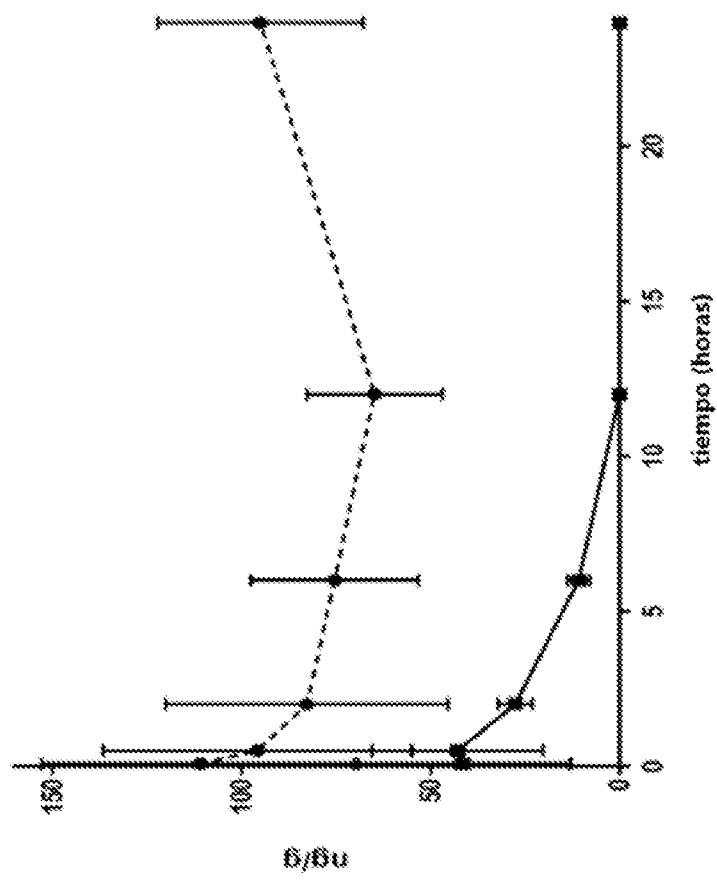
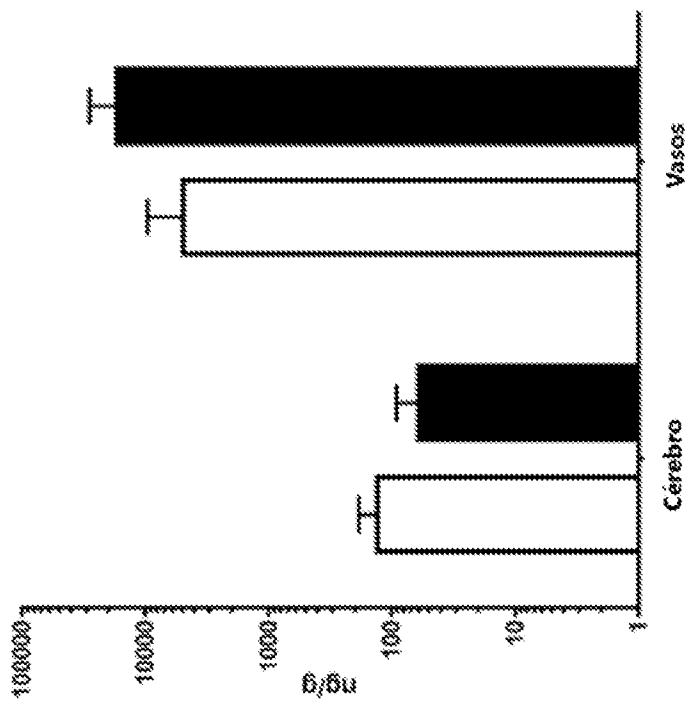


Fig. 22B



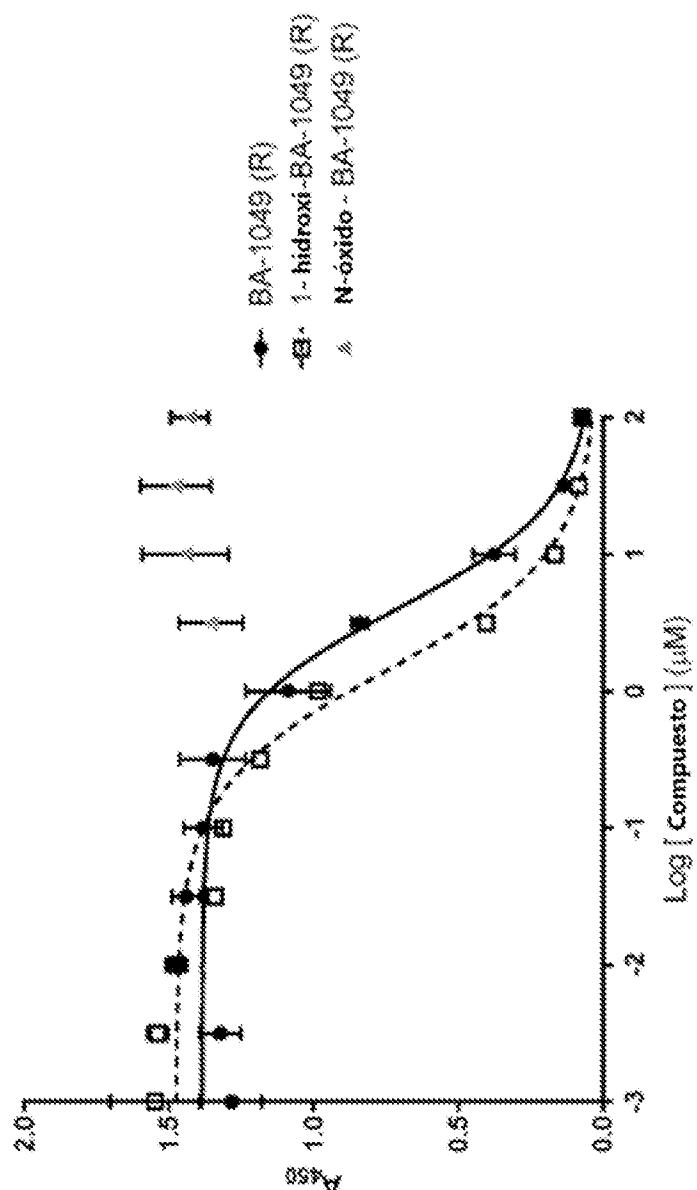


FIG. 23

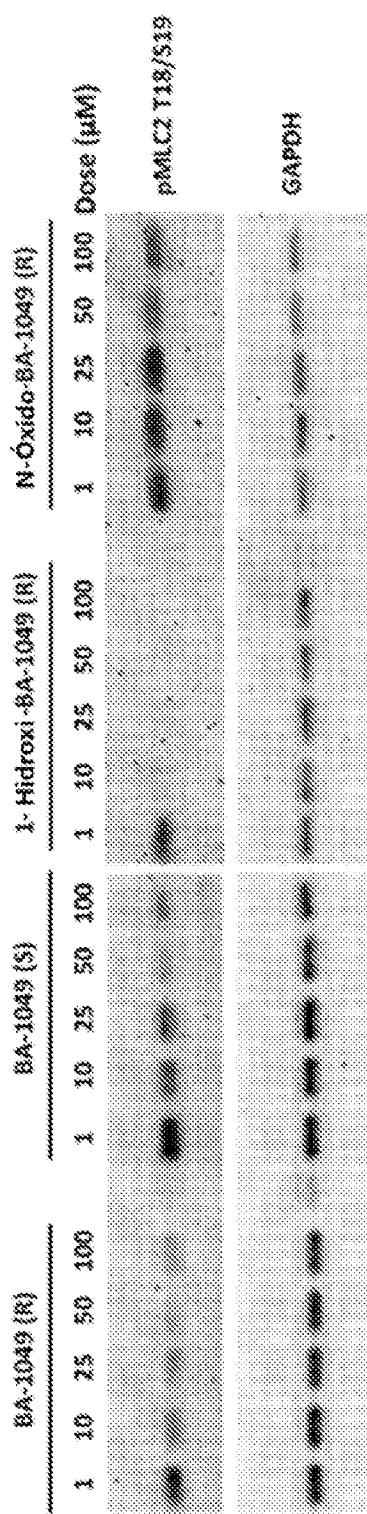


FIG. 24

Fig. 25A

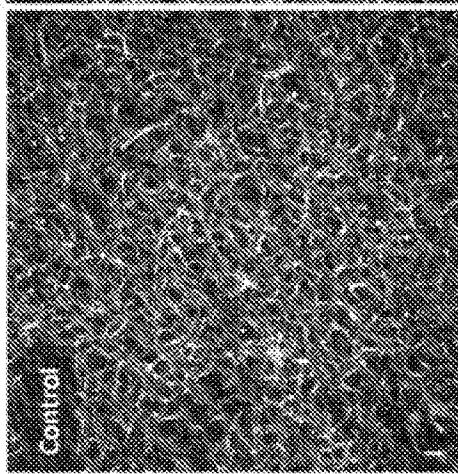


Fig. 25B

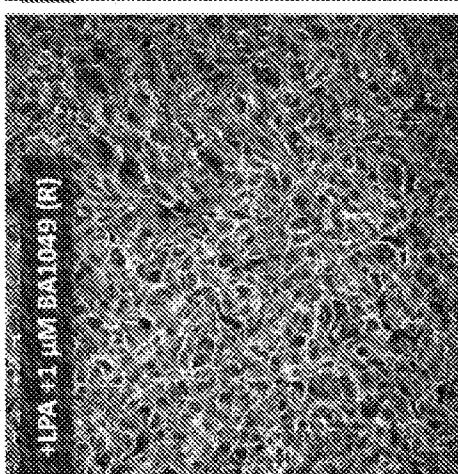


Fig. 25C

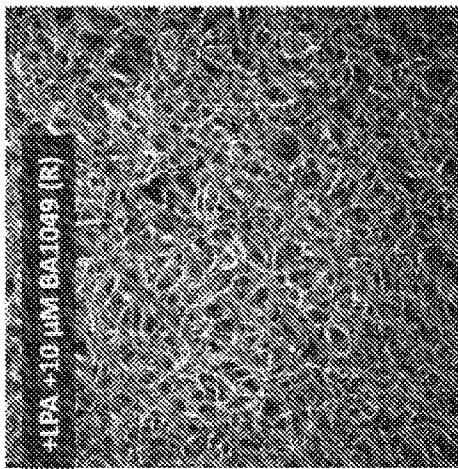


Fig. 25D

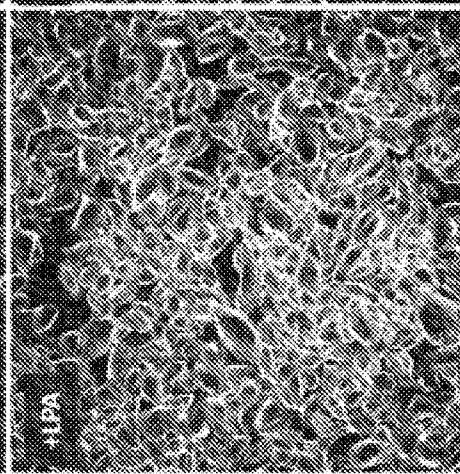


Fig. 25E

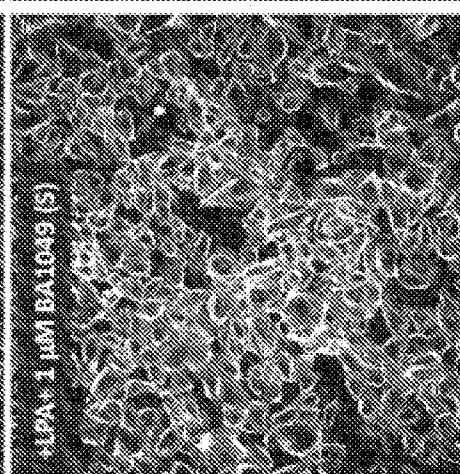


Fig. 25F

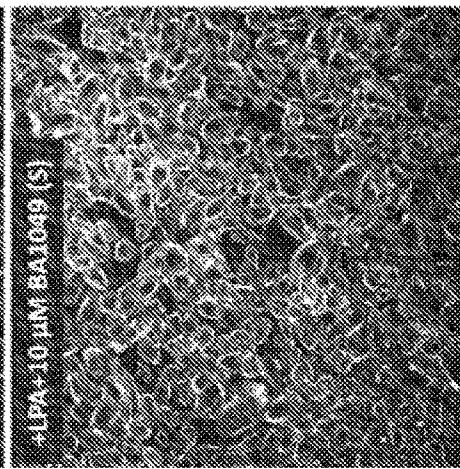


FIG. 26A

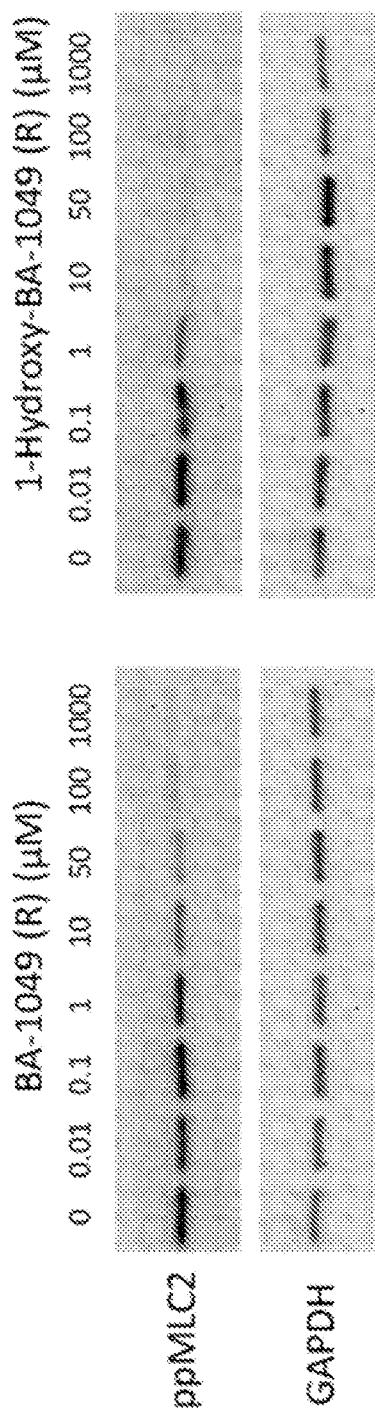


FIG. 26B

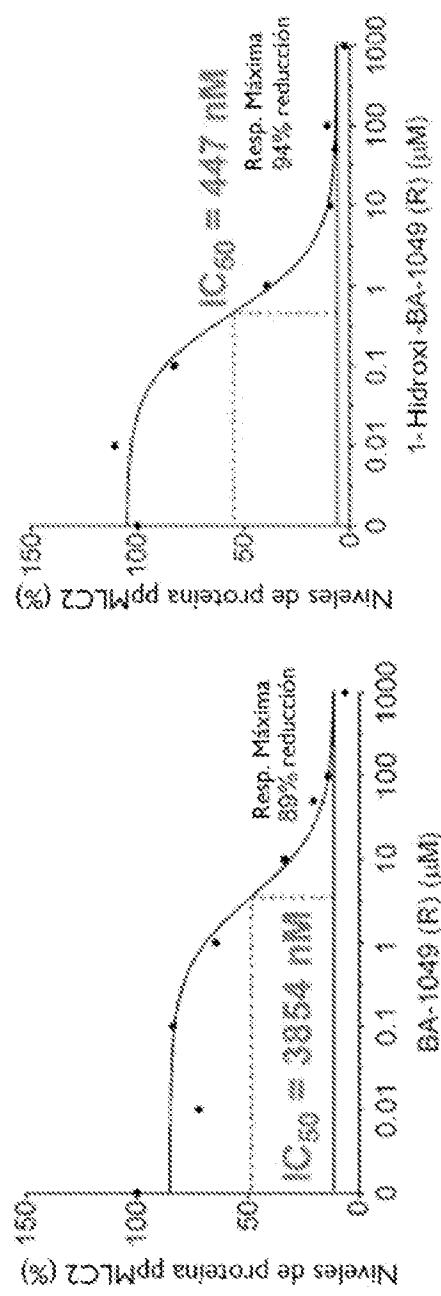


FIG. 27

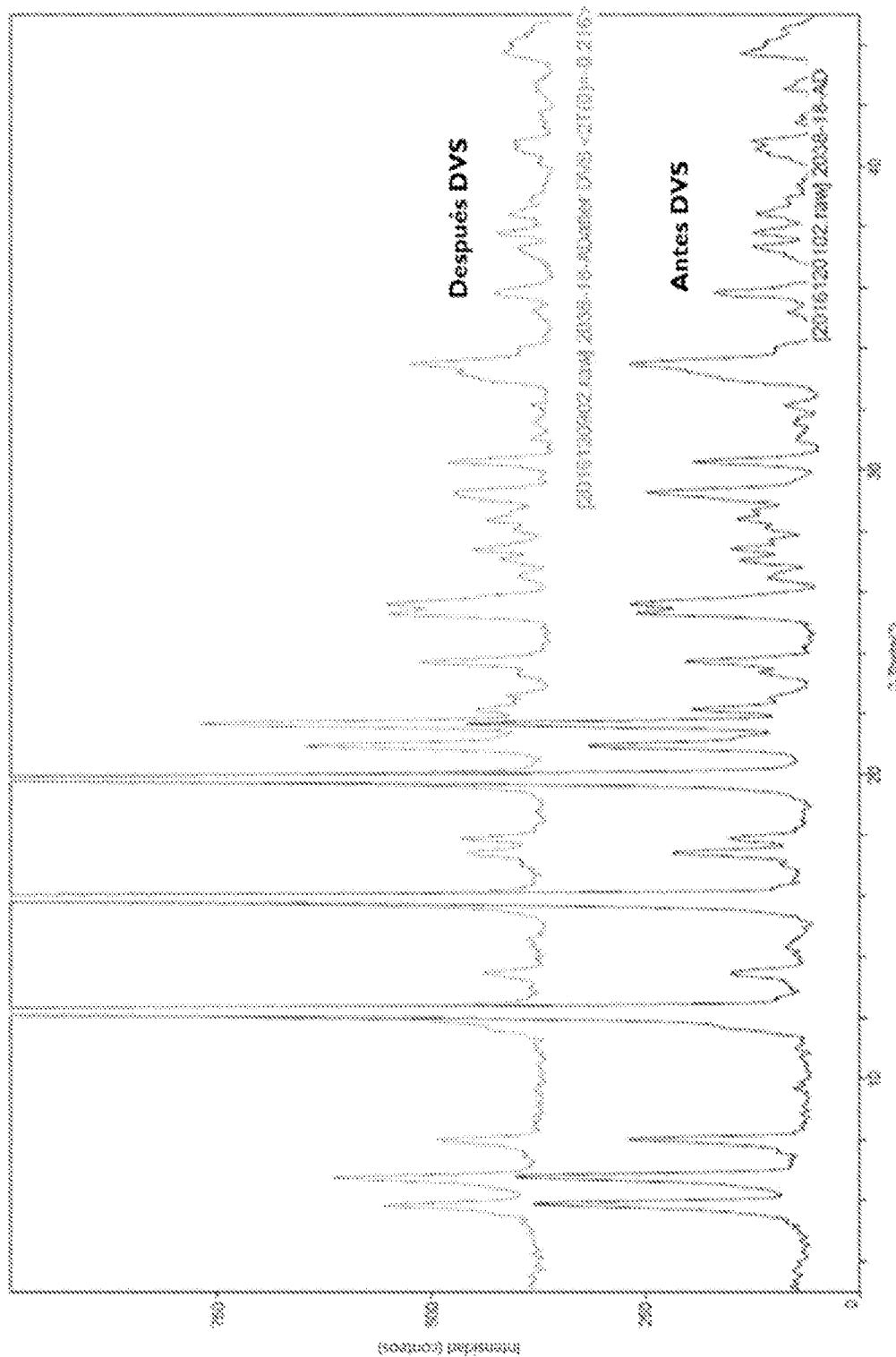


FIG. 28

Locomoción en Campo Abierto

Arrastre de las extremidades posteriores      Apoyo esporádico del peso, arrastre de la cola      Apoyo de peso, cola arriba

Agarre de extremidades posteriores

Pies traseros girados hacia fuera      Agarre lento y/o débil      Las patas traseras agarran normalmente

