



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 972 711**

⑯ Int. Cl.:

**A61K 31/437** (2006.01)  
**A61K 31/5025** (2006.01)  
**A61K 31/506** (2006.01)  
**A61K 31/519** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- ⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.11.2017** PCT/US2017/060299  
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **17.05.2018** WO18089328  
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2017** E 17804374 (1)  
⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.02.2024** EP 3538096

④ Título: **Tratamiento de enfermedades del CNS con estimuladores de la GCs**

⑩ Prioridad:

**08.11.2016 US 201662419059 P**

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.06.2024**

⑬ Titular/es:

**TISENTO THERAPEUTICS INC. (100.0%)**  
245 First Street, Riverview II, 18th Floor  
Cambridge, MA 02142, US

⑭ Inventor/es:

**JUNG, JOON;**  
**LEE, THOMAS WAI-HO;**  
**IYENGAR, RAJESH, R.;**  
**PERL, NICHOLAS, ROBERT;**  
**GERMANO, PETER;**  
**RIBADENEIRA, MARIA, D. y**  
**TANG, KIM**

⑮ Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

**ES 2 972 711 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

Tratamiento de enfermedades del CNS con estimuladores de la GCs

Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la fecha de presentación bajo 35 U.S.C. § 119(e) de la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 62/419,059, presentada el 8 de noviembre de 2016.

Campo de la invención

La presente divulgación se refiere a estimuladores de la guanilato ciclase soluble (GCs), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos y formulaciones farmacéuticas o formas de dosificación que los comprenden, solos o en combinación con uno o más agentes adicionales, para uso en el tratamiento de diversas enfermedades del CNS, en el que un aumento en la estimulación de la GCs, o un aumento en la concentración del óxido nítrico (NO) o guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc) o ambos, o una regulación positiva de la vía del NO es deseable.

Antecedentes de la invención

La guanilato ciclase soluble (GCs) es el receptor primario del óxido nítrico (NO) *in vivo*. La GCs se puede activar mediante mecanismos tanto dependientes del NO como independientes del NO. En respuesta a esta activación, la GCs convierte a la guanosina 5'-trifosfato (GTP) en el mensajero secundario guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc). El nivel aumentado de GMPc, a su vez, modula la actividad de los efectores río abajo, incluidas las proteínas cinasas, fosfodiesterasas (PDEs) y canales iónicos.

En el cuerpo, el NO se sintetiza a partir de arginina y oxígeno mediante varias enzimas de óxido nítrico sintasa (NOS) y mediante la reducción secuencial del nitrato inorgánico. Se han identificado tres isoformas distintas de NOS: NOS inducible (iNOS o NOS II) que se encuentra en células de macrófagos activados; NOS neuronal constitutiva (nNOS o NOS I), implicada en la neurotransmisión y potenciación a largo plazo; y NOS endotelial constitutiva (eNOS o NOS III), que regula la relajación del músculo liso y la presión sanguínea. La evidencia experimental y clínica indica que las concentraciones reducidas, la biodisponibilidad y/o la capacidad de respuesta al NO producido-endógenamente contribuyen al desarrollo de varias enfermedades.

Los estimuladores de la GCs independientes del NO, dependientes de hemo tienen varias características diferenciadoras importantes cuando se comparan con otros tipos de moduladores de la GCs, incluyendo una dependencia crucial de la presencia de la fracción hemo protésica reducida para su actividad, una fuerte activación enzimática sinérgica cuando se combinan con NO y estimulación de la síntesis del GMPc mediante la estimulación directa de la GCs, independiente del NO. El compuesto de bencilindazol YC-1 fue el primer estimulador de la GCs en ser identificado. Desde entonces se han desarrollado estimuladores de la GCs adicionales con potencia y especificidad mejoradas para la GCs.

Los compuestos que estimulan la GCs de forma independiente del NO ofrecen ventajas considerables sobre otras terapias alternativas actuales que se dirigen ya sea a la vía aberrante del NO o se dirigen a enfermedades que se pueden beneficiar de la regulación positiva de la vía del NO. Existe la necesidad de desarrollar nuevos estimuladores de la GCs. Estos compuestos son útiles para el tratamiento de diversas enfermedades, en el que las enfermedades o trastornos son aquellos que se beneficiarían de la estimulación de la GCs, o de un aumento en la concentración del NO o GMPc o ambos, o en el que es deseable una regulación positiva de la vía del NO. WO 2007/124854 divulga derivados de la pirazolo-piridina como estimuladores de la GCs para su uso en el tratamiento de trastornos del CNS.

Los estimuladores de la GCs que pueden cruzar la barrera hematoencefálica y penetrar el cerebro proporcionan beneficios adicionales para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central (CNS). Los estimuladores de la GCs descritos en la presente son útiles para el tratamiento de enfermedades del CNS debido a su capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica.

Sumario de la invención

Nótese que las referencias a métodos de tratamiento en esta descripción deben de interpretarse como referencias a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia.

La presente invención está dirigida a un método para tratar o prevenir una enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar solo o en terapia de combinación, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo al sujeto, en el que el compuesto se selecciona de los mostrados en la Tabla I.

La invención también se dirige a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Tabla I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, para el uso de la reivindicación 1. La invención también se dirige a una forma de dosificación que comprende dicha composición farmacéutica, para el uso de la reivindicación 1.

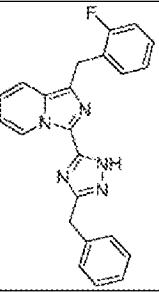
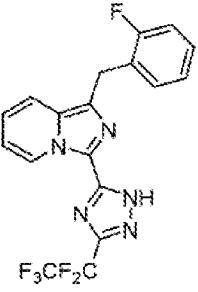
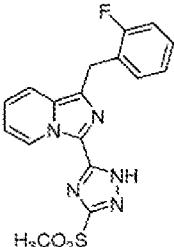
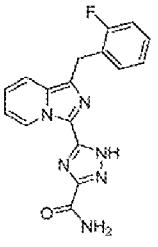
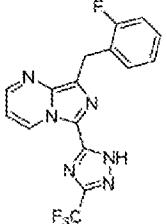
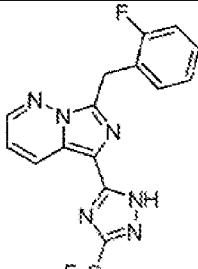
5 La invención también se dirige a un método para tratar o prevenir una enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar solo o en terapia de combinación, una composición farmacéutica o forma de dosificación que comprende un compuesto mostrado en la Tabla I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

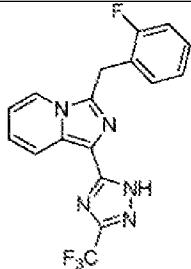
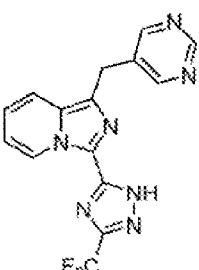
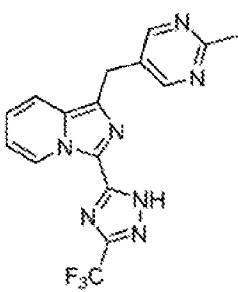
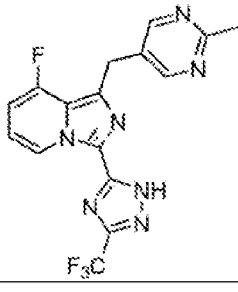
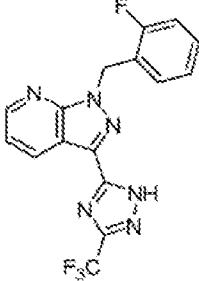
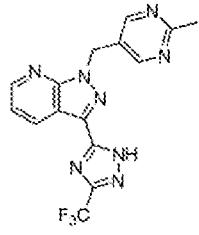
10 La invención se dirige además al uso de un estimulador de la GCs mostrado en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que lo comprende, para el tratamiento de una enfermedad del CNS.

La invención se dirige además a un estimulador de la GCs, o una composición farmacéutica o forma de dosificación que lo comprende, para uso en el tratamiento de una enfermedad del CNS, en el que el estimulador de la GCs es uno mostrado en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 Tabla I

Estructura	Número de Compuesto
	I-8
	I-9
	I-3
	I-11

	I-12
	I-13
	I-14
	I-15
	I-7
	I-6

	I-10
	I-5
	I-4
	I-16
	I-2
	I-1

En algunas realizaciones, la enfermedad, condición de salud o trastorno del CNS se selecciona de enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS o enfermedad de Lou Gehrig), síndrome de Down, demencia, demencia vascular (VD), deterioro cognitivo vascular, demencia mixta, demencia de Binswanger (encefalopatía arteriosclerótica subcortical), arteriopatía cerebral autosómica-dominante con infartos subcorticales y

- 5 leucoencefalopatía (CADASIL o síndrome de CADASIL), degeneración o demencia del lóbulo frontotemporal, demencia asociada al VIH (incluyendo el deterioro neurocognitivo asintomático (ANI), trastorno neurocognitivo menor (MND) y demencia asociada al VIH (HAD) (también llamada complejo de demencia del SIDA [ADC] o encefalopatía por VIH), demencia con cuerpos de Lewy, demencia pre-senil (deterioro cognitivo leve o MCI), enfermedad de Huntington (o corea de Huntington, HD), esclerosis múltiple (MS), atrofia de sistema múltiple (MSA), Enfermedad de Huntington (o corea de Huntington, HD), esclerosis múltiple (MS), atrofia de sistema múltiple (MSA), Enfermedad de 10 Parkinson (PD), Parkinsonismo Plus, ataxias espinocerebelosas, enfermedad de Steel-Richardson-Olszewski (parálisis supranuclear progresiva), trastorno por déficit de atención (ADD) y trastorno por déficit de atención con hiperactividad (ADHD).

En otras realizaciones, la enfermedad, condición de salud o trastorno es un trastorno o afección del CNS que se 15 selecciona de enfermedad de Alzheimer o enfermedad de pre-Alzheimer, enfermedad de Alzheimer de leve a moderada o enfermedad de Alzheimer de moderada a grave.

En otras realizaciones, el trastorno del CNS se selecciona de ya sea lesiones traumáticas (cerradas o abiertas) penetrantes en la cabeza, lesiones cerebrales traumáticas (TBI), lesiones no-traumáticas al cerebro (por ejemplo, accidente cerebrovascular (en particular, accidente cerebrovascular isquémico), aneurisma, hipoxia) o deterioro o disfunción cognitiva que resulta de lesiones cerebrales o trastornos neurodegenerativos.

- 20 En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno del CNS se selecciona de una distonía, que incluye, por ejemplo, distonía generalizada, focal, segmentaria, sexual, intermedia, genética/primaria o reacción distónica aguda; o una discinesia, que incluye, por ejemplo, discinesia aguda, crónica/tardía y no-motora e inducida por levodopa (LID).

En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno del CNS se selecciona de trastornos caracterizados por una 25 reducción relativa en la plasticidad sináptica y los procesos sinápticos que incluyen, por ejemplo, X frágil, trastorno de Rhett, síndrome de Williams, síndrome de Renpenning, trastornos del espectro autista (ASD), autismo, síndrome de Asperger, trastorno generalizado del desarrollo o trastorno desintegrativo infantil.

En otras realizaciones, el trastorno del CNS es dolor neuropático.

En otras realizaciones, el trastorno del CNS es un trastorno psiquiátrico, mental, del estado de ánimo o afectivo 30 seleccionado de un trastorno bipolar, esquizofrenia, psicosis general, psicosis inducida por fármacos, un trastorno delirante, un trastorno esquizoafectivo, trastorno obsesivo compulsivo (OCD), un trastorno depresivo, un trastorno de ansiedad, un trastorno de pánico o un trastorno de estrés postraumático (PTSD).

En otras realizaciones, el trastorno del CNS se selecciona del quimiocerebro, conducta adictiva inducida por levodopa, alcoholismo, dependencia de narcóticos (incluyendo, pero no limitado a anfetaminas, opiáceos u otras sustancias) y abuso de sustancias.

- 35 Descripción breve de las figuras

Figura 1 es una gráfica de la potenciación a largo-plazo de cortes de hipocampo de ratones de tipo silvestre (WT) (curva media), cortes de hipocampo de ratones R6/2 (curva inferior) y cortes de hipocampo de ratones R6/2 tratados con 855 nM del Compuesto I-5. (curva superior).

Descripción detallada de la invención

- 40 Ahora se hará referencia en detalle a ciertas realizaciones de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las estructuras y fórmulas adjuntas. Si bien la invención se va a describir en conjunto con las realizaciones enumeradas, se entenderá que no pretenden limitar la invención a esas realizaciones. Más bien, la invención pretende cubrir todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que puedan incluirse dentro del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención no está limitada a los métodos y materiales descritos en la presente, sino que incluye cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente que podría utilizarse en la práctica de la presente invención. En el caso de que una o más de las referencias bibliográficas incorporadas, patentes o materiales similares difieran de o contradigan esta solicitud, incluyendo, pero no limitado a, términos definidos, uso de términos, técnicas descritas o similares, esta aplicación controla.

Definiciones y terminología general

- 50 Para efectos de esta divulgación, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, y al Handbook of Chemistry and Physics, 75<sup>th</sup> Ed. 1994. Adicionalmente, los principios generales de química orgánica se describen en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books,

Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry", 5<sup>th</sup> Ed., Smith, M. B. and March, J., eds. John Wiley & Sons, New York: 2001.

Un compuesto, tal como los compuestos de la Tabla I u otros compuestos descritos en la presente, puede estar presente en su forma libre (por ejemplo, una forma amorfa, o una forma cristalina o un polimorfo). En determinadas 5 condiciones, los compuestos también pueden formar co-formas. Tal como se utiliza en la presente, el término co-forma es sinónimo con el término forma cristalina de multicomponente. La formación de una sal está determinada por qué tan grande es la diferencia en los pK<sub>a</sub>s entre las parejas que forman la mezcla. Para los fines de esta divulgación, los compuestos incluyen sales farmacéuticamente aceptables, incluso si el término "sales farmacéuticamente aceptables" no se señala explícitamente.

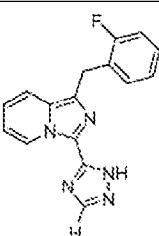
10 A menos que solo uno de los isómeros se dibuje o nombre específicamente, las estructuras representadas en la presente también pretenden incluir todas las formas estereoisoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas, atropoisoméricas e isoméricas *cis-trans*) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones *R* y *S* para cada centro asimétrico, configuraciones *Ra* y *Sa* para cada eje asimétrico, configuraciones de doble enlace (*Z*) y (*E*), e isómeros conformacionales *cis* y *trans*. Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos sencillos, así como los 15 racematos y mezclas de enantiómeros, diastereómeros e isómeros *cis-trans* (doble enlace o conformacional) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la presente divulgación. A menos que se indique lo contrario, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la presente divulgación también están dentro del alcance de la invención.

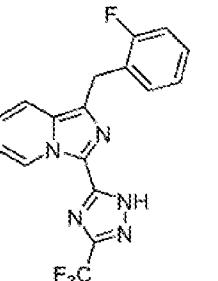
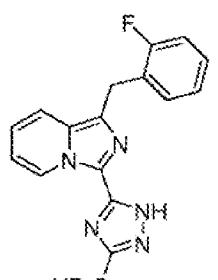
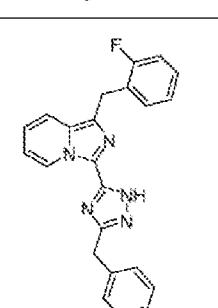
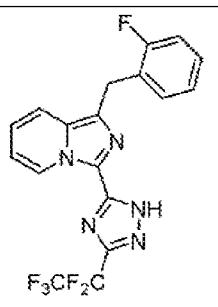
20 La presente divulgación también abarca compuestos marcados-isotópicamente que son idénticos a los mencionados en la presente, excepto por el hecho de que uno o más átomos son reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o un número de masa diferente de la masa atómica o el número de masa que generalmente se encuentra en la naturaleza. Todos los isótopos de cualquier átomo o elemento particular como se especifica se contemplan dentro del alcance de los compuestos de la invención y sus usos. Los isótopos ejemplares que pueden incorporarse a los compuestos de la invención incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, flúor, cloro 25 y yodo, tales como <sup>2</sup>H, <sup>3</sup>H, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>C, <sup>14</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>N, <sup>16</sup>O, <sup>17</sup>O, <sup>18</sup>O, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>18</sup>F, <sup>36</sup>Cl, <sup>123</sup>I y <sup>125</sup>I, respectivamente. Ciertos compuestos marcados-isotópicamente de la presente invención (por ejemplo, aquellos marcados con <sup>3</sup>H y <sup>14</sup>C) son útiles en ensayos de distribución de compuestos y/o sustratos en los tejidos. Los isótopos tritiados (es decir, <sup>3</sup>H) y de carbono-14 (es decir, <sup>14</sup>C) son útiles por su facilidad de preparación y detectabilidad. Además, la sustitución con 30 isótopos más pesados tal y como deuterio (es decir, <sup>2</sup>H) puede permitir ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica (por ejemplo, mayor vida-media *in vivo* o requisitos de dosificación reducidos) y, por lo tanto, puede preferirse en algunas circunstancias. Los isótopos emisores de positrones tal como <sup>15</sup>O, <sup>13</sup>N, <sup>11</sup>C y <sup>18</sup>F son útiles para estudios de tomografía por emisión de positrones (PET) para examinar la ocupación del receptor de sustrato. Los compuestos marcados isotópicamente de la presente invención generalmente se pueden preparar siguiendo procedimientos análogos a los descritos en los Esquemas y/o en los Ejemplos en la presente a continuación, 35 mediante la sustitución de un reactivo marcado isotópicamente por un reactivo marcado no-isotópicamente.

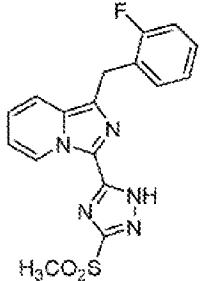
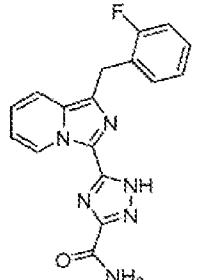
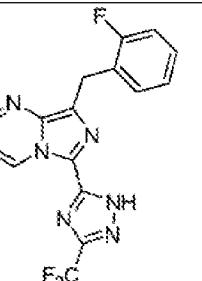
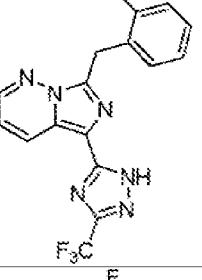
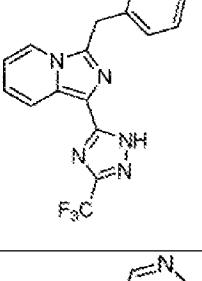
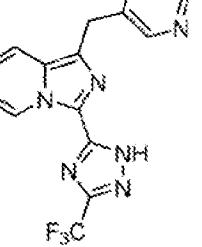
#### Compuestos

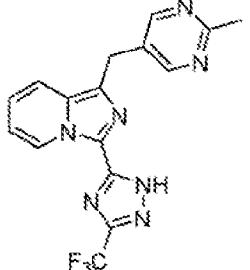
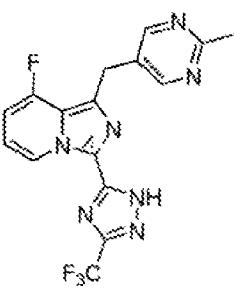
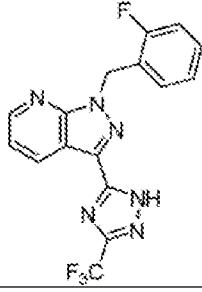
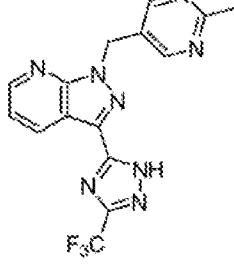
La presente invención está dirigida a usos médicos de compuestos de la Tabla I, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, composiciones farmacéuticas y formas de dosificación en el tratamiento de una enfermedad del CNS.

Tabla I

Estructura	Número de Compuesto
	I-8

	I-9
	I-3
	I-11
	I-12
	I-13

	I-14
	I-15
	I-7
	I-6
	I-10
	I-5

	I-4
	I-16
	I-2
	I-1

#### Sales farmacéuticamente aceptables

La frase "sal farmacéuticamente aceptable", como se utiliza en la presente, se refiere a sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de un compuesto descrito en la presente (por ejemplo, un compuesto de la Tabla I).

- 5 Las sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto descrito en la presente se utilizan en medicina. Sin embargo, las sales que no son farmacéuticamente aceptables pueden ser útiles en la preparación de un compuesto descrito en la presente o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Una sal farmacéuticamente aceptable puede involucrar la inclusión de otra molécula tal como un ion acetato, un ion succinato u otro contríon. El contríon puede ser cualquier resto orgánico o inorgánico que estabilice la carga en el compuesto parental. Además, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener más de un átomo cargado en su estructura. Casos en los que múltiples átomos cargados son parte de una sal farmacéuticamente aceptable pueden tener múltiples contraiones. Por lo tanto, una sal farmacéuticamente aceptable puede tener uno o más átomos cargados y/o uno o más contraiones.

- 10 15 Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos descritos en la presente incluyen aquellas derivadas de los compuestos con ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos, bases inorgánicas o bases orgánicas. En algunas realizaciones, las sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos. En otras realizaciones las sales se pueden preparar a partir de la forma libre del compuesto en una paso de síntesis separado.

Cuando un compuesto descrito en la presente es acídico o contiene un bioisóstero suficientemente acídico, las "sales farmacéuticamente aceptables" adecuadas se refieren a sales preparadas a partir de bases no-tóxicas farmacéuticamente aceptables que incluyen bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, mangánicas, 5 manganosas, potásicas, sódicas, zinc y similares. Realizaciones particulares incluyen sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales derivadas de bases orgánicas no-tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas incluyendo aminas sustituidas que ocurren naturalmente, aminas cíclicas y resinas de intercambio de iones básicas, tales como arginina, betaina, cafeína, colina, 10 N, N<sub>1</sub>-dibenciletilendiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etyl morfolina, N-etyl piperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, tripropilamina de trimetilamina, trometamina y similares.

Cuando un compuesto descrito en la presente es básico o contiene un bioisóstero suficientemente básico, se pueden preparar sales a partir de ácidos no-tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo ácidos inorgánicos y orgánicos.

15 Dichos ácidos incluyen acético, bencenosulfónico, benzoico, canforsulfónico, cítrico, etanosulfónico, fumárico, glucónico, glutámico, bromhídrico, clorhídrico, isetónico, láctico, maleico, málico, mandélico, metanosulfónico, mónico, nítrico, pamoico, pantoténico, fosfórico, succínico, sulfúrico, tartárico, ácido p-toluenosulfónico y similares. Realizaciones particulares incluyen ácidos cítrico, bromhídrico, clorhídrico, maleico, fosfórico, sulfúrico y tartárico. Otras sales ejemplares incluyen, pero no se limitan a, sales de sulfato, citrato, acetato, oxalato, cloruro, bromuro, 20 yoduro, nitrato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, lactato, salicilato, citrato ácido, tartrato, oleato, tanato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucuronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato (es decir, 1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3 naftoato)).

25 La preparación de las sales farmacéuticamente aceptables descritas anteriormente y otras sales farmacéuticamente aceptables típicas se describe más detalladamente por Berg et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977:66:1-19.

Además de los compuestos descritos en la presente, sus sales farmacéuticamente aceptables también se pueden emplear en composiciones para tratar o prevenir los trastornos identificados en la presente.

Composiciones farmacéuticas, formas de dosificación y métodos de administración.

30 Los compuestos descritos en la presente, y sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden formularse como composiciones o "formulaciones" farmacéuticas.

Una formulación típica se prepara mezclando un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador, diluyente o excipiente. Los portadores, diluyentes y excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como carbohidratos, ceras, polímeros solubles 35 en agua y/o hinchables, materiales hidrofílicos o hidrofóbicos, gelatina, aceites, solventes, agua y similares. El portador, diluyente o excipiente particular utilizado va a depender de los medios y el propósito para el cual se está formulando el compuesto descrito en la presente. Los solventes se seleccionan generalmente basándose en solventes reconocidos por los expertos en la técnica como seguros (GRAS: generalmente considerados como seguros) para ser administrados a un mamífero. En general, los solventes seguros son solventes acuosos no-tóxicos como el agua y otros solventes no-tóxicos que son solubles o miscibles en agua. Los solventes acuosos adecuados incluyen agua, 40 etanol, propilenglicol, polietilenglicoles (por ejemplo, PEG400, PEG300), etc. y mezclas de los mismos. Las formulaciones también pueden incluir otros tipos de excipientes tales como uno o más tampones, agentes estabilizantes, antiadherentes, tensioactivos, agentes humectantes, agentes lubricantes, emulsionantes, aglutinantes, agentes de suspensión, desintegrantes, rellenos, sorbentes, recubrimientos (por ejemplo, entéricos o de liberación lenta) conservantes, antioxidantes, agentes opacantes, deslizantes, coadyuvantes de procesamiento, colorantes, 45 edulcorantes, agentes perfumantes, agentes saborizantes y otros aditivos conocidos para proporcionar una presentación elegante del fármaco (es decir, un compuesto descrito en la presente o una composición farmacéutica del mismo) o ayuda en la fabricación del producto farmacéutico (es decir, medicamento).

50 Las formulaciones se pueden preparar utilizando procedimientos convencionales de disolución y mezclado. Por ejemplo, la sustancia farmacéutica a granel (es decir, un compuesto descrito en la presente, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo o una forma estabilizada del compuesto, tal como un complejo con un derivado de ciclodextrina u otro agente complejante conocido) se disuelve en un solvente adecuado en presencia de uno o más de los excipientes descritos anteriormente. Un compuesto que tiene el grado de pureza deseado se mezcla opcionalmente con diluyentes, portadores, excipientes o estabilizadores, en forma de formulación liofilizada, polvo molido o solución acuosa, farmacéuticamente aceptables. La formulación se puede realizar mezclando a temperatura ambiente al pH apropiado y el grado de pureza deseado, con portadores fisiológicamente aceptables. El pH de la 55

formulación depende principalmente del uso particular y de la concentración del compuesto, pero puede oscilar de alrededor de 3 a alrededor de 8. Cuando el agente descrito en la presente es una dispersión sólida amorfa formada mediante un proceso con solvente, se pueden añadir aditivos directamente a la solución de secado por pulverización cuando se forma la mezcla, tal como el aditivo se disuelve o suspende en la solución como una lechada que luego se

5 puede secar por pulverización. Alternativamente, los aditivos se pueden agregar después del proceso de secado por pulverización para ayudar en la formación del producto formulado final.

Un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, normalmente se formula en una forma de dosificación farmacéutica para proporcionar una dosificación fácilmente controlable del fármaco y para permitir que el paciente cumpla con el régimen prescrito. Se pueden preparar formulaciones farmacéuticas de un 10 compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para diversas rutas y tipos de administración. Pueden existir varias formas de dosificación para el mismo compuesto, ya que diferentes condiciones médicas pueden justificar diferentes vías de administración.

La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con el material portador para producir una forma de dosificación única va a variar dependiendo del sujeto tratado y del modo particular de administración. Por ejemplo, una 15 formulación de liberación prolongada destinada para la administración oral a seres humanos puede contener aproximadamente 1 a 1000 mg de material activo compuesto con una cantidad apropiada y conveniente de material portador que puede variar de alrededor de 5 a alrededor de 95% de las composiciones totales (peso:peso). La composición farmacéutica se puede preparar para proporcionar cantidades fácilmente medibles para la administración. Por ejemplo, una solución acuosa destinada para infusión intravenosa puede contener de alrededor de 3 a 500 µg del 20 ingrediente activo por mililitro de solución para que pueda ocurrir la infusión de un volumen adecuado a una velocidad de alrededor de 30 mL/h. Como proposición general, la cantidad farmacéuticamente eficaz inicial del inhibidor administrado estará en el intervalo de alrededor de 0.01-100 mg/kg por dosis, concretamente alrededor de 0.1 a 20 mg/kg de peso corporal del paciente por día, con el intervalo inicial típico del compuesto utilizado siendo de 0.3 a 15 mg/kg/día.

25 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se utiliza en la presente significa la cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal o humano que está siendo buscado por un investigador, veterinario, médico u otro clínico. La cantidad terapéutica o farmacéuticamente eficaz del compuesto que se va a administrar se regirá por dichas consideraciones, y es la cantidad mínima necesaria para mejorar, curar o tratar la enfermedad o trastorno o uno o más de sus síntomas.

30 Las composiciones farmacéuticas de los compuestos de la Tabla I se formularán, dosificarán y administrarán de una manera, es decir, cantidades, concentraciones, cronograma, ciclo, vehículos y vía de administración, consistentes con la buena práctica médica. Los factores para consideración en este contexto incluyen el trastorno particular que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el lugar de administración del agente, el método de administración, el cronograma de administración y otros factores 35 conocidos por los médicos practicantes, tales como la edad, peso y respuesta del paciente individual.

40 El término "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz para prevenir o disminuir sustancialmente las posibilidades de adquirir una enfermedad o trastorno o para reducir la gravedad de la enfermedad o trastorno antes de que se adquiera o reducir la gravedad de uno o más de sus síntomas antes de que los síntomas se desarrollen. A grandes rasgos, las medidas profilácticas se dividen entre profilaxis *primaria* (para prevenir el desarrollo de una enfermedad) y profilaxis *secundaria* (mediante la cual la enfermedad ya se ha desarrollado y el paciente está protegido contra el empeoramiento de este proceso).

45 Los diluyentes, portadores, excipientes y estabilizadores aceptables son aquellos que no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; 50 azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal tal como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no-iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). Los ingredientes farmacéuticos activos también pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente; en 55 sistemas de administración de fármaco coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's: The Science

and Practice of Pharmacy, 21<sup>st</sup> Edition, University of the Sciences in Philadelphia, Eds., 2005 (en adelante "Remington's").

- 5 Los "sistemas de administración controlada de fármacos" suministran el fármaco al cuerpo de una manera controlada con precisión para adaptarse al fármaco y a las condiciones que se están tratando. El objetivo principal es lograr una concentración terapéutica del fármaco en el sitio de acción por la duración de tiempo deseada. El término "liberación controlada" se utiliza a menudo para referirse a una variedad de métodos que modifican la liberación de un fármaco a partir de una forma de dosificación. Este término incluye preparados etiquetados como "liberación prolongada", "liberación retardada", "liberación modificada" o "liberación sostenida". En general, uno puede proporcionar para la liberación controlada de los agentes descritos en la presente mediante el uso de una amplia variedad de portadores 10 poliméricos y sistemas de liberación controlada que incluyen matrices erosionables y no-erosionables, dispositivos de control osmótico, diversos dispositivos de depósito, recubrimientos entéricos y dispositivos de control de múltiples partículas.
- 15 Las "preparaciones de liberación-sostenida" son las aplicaciones más comunes de liberación controlada. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación-sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el compuesto, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación-sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, polí(metacrilato de 2-hidroxietilo) o polí(alcohol vinílico)), polilactidas (tales como las descritas en la Pat. de EE. UU No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma- L-glutamato de etilo, acetato de etileno-vinilo no-degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.
- 20 20 Se preparan también "preparaciones de liberación-inmediata". El objetivo de estas formulaciones es hacer llegar el fármaco al torrente sanguíneo y al lugar de acción lo más rápido posible. Por ejemplo, para una disolución rápida, la mayoría de las tabletas están diseñadas para sufrir una desintegración rápida en gránulos y una posterior desagregación en partículas finas. Esto proporciona una mayor área de superficie expuesta al medio de disolución, lo que da como resultado una velocidad de disolución más rápida.
- 25 25 Los agentes descritos en la presente se pueden incorporar en una matriz polimérica de dispositivo de liberación controlada erosionable o no-erosionable. Por matriz erosionable se entiende erosionable en agua o hinchable en agua o soluble en agua en el sentido de ser ya sea erosionable o hinchable o soluble en agua pura o que requiere la presencia de un ácido o base para ionizar la matriz polimérica lo suficiente como para causar erosión o disolución. Cuando entra en contacto con el entorno acuoso de uso, la matriz polimérica erosionable absorbe agua y forma un gel hinchable en agua o matriz que atrapa el agente descrito en la presente. La matriz hinchable en agua se erosiona, hincha, desintegra o disuelve gradualmente en el ambiente de uso, controlando así la liberación de un compuesto descrito en la presente al ambiente de uso. Un ingrediente de esta matriz hinchable en agua es el polímero hinchable, erosionable o soluble en agua, el cual generalmente se puede describir como un osmopolímero, hidrogel o polímero hinchable en agua. Dichos polímeros pueden ser lineales, ramificados o entrecruzados. Los polímeros pueden ser 30 homopolímeros o copolímeros. En determinadas realizaciones, pueden ser polímeros sintéticos derivados de monómeros de vinilo, acrilato, metacrilato, uretano, éster y óxido. En otras realizaciones, pueden ser derivados de polímeros que ocurren naturalmente tales como polisacáridos (por ejemplo, quitina, quitosano, dextrano y pululano; goma agar, goma arábiga, goma karaya, goma garrofín, goma tragacanto, carragenanos, goma ghatti, goma guar, goma xantana y escleroglucano), almidones (por ejemplo, dextrina y maltodextrina), coloides hidrofilicos (por ejemplo, 35 pectina), fosfátidos (por ejemplo, lecitina), alginatos (por ejemplo, alginato de amonio, sodio, potasio o alginato de calcio, alginato de propilenglicol), gelatina, colágeno y celulósica. Los celulósicos son polímeros de celulosa que han sido modificados mediante la reacción de al menos una porción de los grupos hidroxilo en las unidades repetidas de sacárido con un compuesto para formar un sustituyente unido a un éster o a un éter.
- 40 Por ejemplo, la etilcelulosa celulósica tiene un éter unido al sustituyente de etilo unido a la unidad repetida de sacárido, mientras que el acetato de celulosa celulósica tiene un éster unido al sustituyente de acetato. En ciertas realizaciones, las celulósicas para la matriz erosionable comprenden celulósicas solubles en agua y erosionables en agua que 45 pueden incluir, por ejemplo, etilcelulosa (EC), metiletilcelulosa (MEC), carboximetilcelulosa (CMC), CMEC, hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), acetato de celulosa (CA), propionato de celulosa (CP), butirato de celulosa (CB), acetatobutirato de celulosa (CAB), CAP, CAT, hidroxipropilmetylcelulosa (HPMC), HPMCP, HPMCAS, acetato trimelitato hidroxipropilmetylcelulosa (HPMCAT) y etilhidroxietilcelulosa (EHEC). En determinadas 50 realizaciones, la celulósica comprende varios grados de baja viscosidad (MW inferior o igual a 50,000 daltons, por ejemplo, las series de Dow Methocel™ E5, E15LV, E50LV y K100LY) y alta viscosidad (MW superior a 50,000 daltons, por ejemplo, E4MCR, E10MCR, K4M, K15M y K100M y la serie K Methocel™) HPMC. Otros tipos de HPMC disponibles comercialmente incluyen la serie Shin Etsu Metolose 90SH.
- 55 55 Otros materiales útiles como material de matriz erosionable incluyen, pero no se limitan a, pululano, polivinilpirrolidona, alcohol polivinílico, acetato de polivinilo, ésteres de ácidos grasos de glicerol, poliacrilamida, ácido poliacrílico, copolímeros de ácido etacrílico o ácido metacrílico (EUDRAGIT®, Rohm America, Inc., Piscataway, New Jersey) y

otros derivados del ácido acrílico tales como homopolímeros y copolímeros de metacrilato de butilo, metacrilato de metilo, metacrilato de etilo, acrilato de etilo, metacrilato de (2-dimetilaminoetilo) y cloruro de metacrilato de (trimetilaminoetilo).

Alternativamente, los agentes de la presente invención se pueden administrar o incorporar en un dispositivo de matriz no-erosionable. En tales dispositivos, un agente descrito en la presente se distribuye en una matriz inerte. El agente se libera por difusión a través de la matriz inerte. Ejemplos de materiales adecuados para la matriz inerte incluyen plásticos insolubles (por ejemplo, copolímeros de metacrilato de metilo-acrilato de metilo, cloruro de polivinilo, polietileno), polímeros hidrofílicos (por ejemplo, etilcelulosa, acetato de celulosa, polivinilpirrolidona entrecruzada (también conocida como crospovidona)), y compuestos grasos (por ejemplo, cera de carnauba, cera microcristalina y triglicéridos). Dichos dispositivos se describen con más detalle en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th edition (2000).

Como se señaló anteriormente, los agentes descritos en la presente también se pueden incorporar en un dispositivo de control osmótico. Dichos dispositivos generalmente incluyen un núcleo que contiene uno o más agentes como se describe en la presente y un recubrimiento permeable al agua, que no se disuelve y no se erosiona, que rodea el núcleo y que controla la afluencia de agua al núcleo a partir de un ambiente acuoso de uso para provocar la liberación del fármaco mediante la extrusión de parte o la totalidad del núcleo al ambiente de uso. En determinadas realizaciones, el recubrimiento es polimérico, permeable al agua y tiene al menos un puerto de entrega. El núcleo del dispositivo osmótico incluye opcionalmente un agente osmótico que actúa para absorber agua del ambiente circundante a través de dicha membrana semipermeable. El agente osmótico contenido en el núcleo de este dispositivo puede ser un polímero hidrofílico hinchable en agua o puede ser un osmógeno, también conocido como osmagente. Se genera presión dentro del dispositivo la cual fuerza al o los agentes a salir del dispositivo a través de un orificio (de un tamaño diseñado para minimizar la difusión del soluto y al mismo tiempo evitar la acumulación de una cabeza de presión hidrostática). En la Solicitud de Patente de EE. UU. No. de Serie 09/495,061 se describen ejemplos no-limitantes de dispositivos de control osmótico.

La cantidad de polímeros hidrofílicos hinchables en agua presentes en el núcleo puede variar de alrededor de 5 a de alrededor de 80 en peso % (incluyendo, por ejemplo, de 10 a 50 en peso %). Ejemplos no-limitantes de materiales del núcleo incluyen vinilo hidrofílico y polímeros de acrílico, polisacáridos tales como alginato de calcio, óxido de polietileno (PEO), polietenglicol (PEG), polipropenglicol (PPG), poli (metacrilato de 2-hidroxietilo), ácido poli (acrílico), ácido poli (metacrílico), polivinilpirrolidona (PVP) y PVP entrecruzado, alcohol polivinílico (PVA), copolímeros de PVA/PVP y copolímeros de PVA/PVP con monómeros hidrofóbicos tales como metacrilato de metilo, acetato de vinilo y similares, poliuretanos hidrofílicos que contienen grandes bloques de PEO, croscarmelosa de sodio, carragenano, hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetylcelulosa (HPMC), carboximetilcelulosa (CMC) y carboxietilcelulosa (CEC), alginato de sodio, policarbófilo, gelatina, goma xantana y glicolato de almidón de sodio. Otros materiales incluyen hidrogeles que comprenden redes interpenetrantes de polímeros que pueden formarse mediante adición o mediante polimerización por condensación, los compuestos de los cuales pueden comprender monómeros hidrofílicos e hidrofóbicos tales como los que se acaban de mencionar. Los polímeros hidrofílicos hinchables en agua incluyen, pero no se limitan a, PEO, PEG, PVP, croscarmelosa de sodio, HPMC, glicolato de almidón sódico, ácido poliacrílico y versiones entrecruzadas o mezclas de los mismos.

El núcleo también puede incluir un osmógeno (u osmagente). La cantidad de osmógeno presente en el núcleo puede oscilar entre alrededor de 2 a alrededor de 70 en peso % (incluyendo, por ejemplo, de 10 a 50 en peso %). Las clases típicas de osmógenos adecuados son ácidos orgánicos, sales y azúcares solubles en agua que son capaces de absorber agua para efectuar de este modo un gradiente de presión osmótica a través de la barrera del recubrimiento circundante. Los osmógenos útiles típicos incluyen, pero no se limitan a, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de sodio, cloruro de litio, sulfato de potasio, carbonato de sodio, sulfito de sodio, sulfato de litio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, manitol, xilitol, urea, sorbitol, inositol, rafinosa, sacarosa, glucosa, fructosa, lactosa, ácido cítrico, ácido succínico, ácido tartárico y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, el osmógeno es glucosa, lactosa, sacarosa, manitol, xilitol, cloruro de sodio, incluyendo combinaciones de los mismos.

La tasa de administración del fármaco está controlada por factores tales como la permeabilidad y espesor del recubrimiento, la presión osmótica de la capa que contiene el fármaco, el grado de hidrofilitad de la capa del hidrogel y el área superficial del dispositivo. Los expertos en la técnica apreciarán que aumentar el espesor del recubrimiento reducirá la tasa de liberación, mientras que cualquiera de los siguientes va a aumentar la tasa de liberación: aumentar la permeabilidad del recubrimiento; aumentar la hidrofilitad de la capa del hidrogel; aumentar la presión osmótica de la capa que contiene el fármaco; o aumentar el área de la superficie del dispositivo.

En ciertas realizaciones, es deseable el arrastre de partículas de los agentes descritos en la presente en el fluido de extrusión durante el funcionamiento de dicho dispositivo osmótico. Para que las partículas sean bien arrastradas, la forma del fármaco agente se dispersa en el fluido antes de que las partículas tengan la oportunidad de sedimentarse en el núcleo de la tableta. Una forma de lograr esto es agregar un desintegrante que sirva para romper el núcleo

comprimido en sus compuestos partícula. Los ejemplos no-limitantes de desintegrantes estándar incluyen materiales tales como glicolato almidón de sodio (por ejemplo, Explotab<sup>TM</sup> CLV), celulosa microcristalina (por ejemplo, Avicel<sup>TM</sup>), celulosa silicificada microcristalina (por ejemplo, ProSolv<sup>TM</sup>) y croscarmelosa de sodio (por ejemplo, Ac-Di-Sol<sup>TM</sup>), y otros desintegrantes conocidos por los expertos en la técnica. Dependiendo de la formulación en particular, algunos desintegrantes funcionan mejor que otros. Varios desintegrantes tienden a formar geles a medida que se hinchan con agua, lo que dificulta la liberación del fármaco desde el dispositivo. Los desintegrantes que no-gelifican ni se hinchan proporcionan una dispersión más rápida de las partículas del fármaco dentro del núcleo a medida que el agua ingresa al núcleo. En determinadas realizaciones, los desintegrantes que no-gelifican ni se hinchan son resinas, por ejemplo, resinas de intercambio de iones. En una realización, la resina es Amberlite<sup>TM</sup> IRP 88 (disponible de Rohm and Haas, Philadelphia, PA). Cuando se utiliza, el desintegrante está presente en cantidades que oscilan de alrededor de 1-25% del agente del núcleo.

Otro ejemplo de un dispositivo osmótico es una cápsula osmótica. La cubierta de la cápsula o porción de la cubierta de la cápsula puede ser semipermeable. La cápsula puede llenarse con ya sea un polvo o un líquido que consiste en un agente descrito en la presente, excipientes que absorben agua para proporcionar potencial osmótico y/o un polímero hinchable en agua, u opcionalmente excipientes solubilizantes. El núcleo de la cápsula también puede fabricarse de modo que tenga un agente bicapa o multicapa análogo a las geometrías bicapa, tricapa o concéntricas descritas anteriormente.

Otra clase de dispositivo osmótico útil en esta invención comprende comprimidos hinchables recubiertos, por ejemplo, como se describe en EP378404. Los comprimidos hinchables recubiertos comprenden un núcleo de la tableta que comprende un agente descrito en la presente y un material hinchable, preferiblemente un polímero hidrofílico, recubierto con una membrana, que contiene hoyos o poros a través de los cuales, en el ambiente de uso acuoso, el polímero hidrofílico puede extruir y llevar fuera al agente. Alternativamente, la membrana puede contener porosígenos solubles en agua poliméricos o de bajo peso molecular. Los porosígenos se disuelven en el ambiente de uso acuoso, proporcionando poros a través de los cuales el polímero hidrofílico y el agente pueden extruirse. Ejemplos de porosígenos son polímeros solubles en agua como HPMC, PEG y compuestos de bajo peso molecular tales como glicerol, sacarosa, glucosa y cloruro de sodio. Además, se pueden formar poros en el recubrimiento perforando hoyos en el revestimiento utilizando un láser u otros medios mecánicos. En esta clase de dispositivos osmóticos, el material de la membrana puede comprender cualquier polímero formador de película, incluyendo polímeros que son permeables al agua o impermeables, siempre que la membrana depositada sobre el núcleo de la tableta sea porosa o contenga porosígenos solubles en agua o posea un hoyo macroscópico para el ingreso de agua y liberación de fármacos. Las realizaciones de esta clase de dispositivos de liberación sostenida también pueden ser multicapa, como se describe, por ejemplo, en EP378404.

Cuando un agente descrito en la presente es un líquido o aceite, tal como una formulación de vehículo lipídico, por ejemplo como se describe en WO0S/011634, el dispositivo osmótico de liberación-controlada puede comprender un gel-blando o una cápsula de gelatina formada con una pared compuesta y que comprende la formulación líquida donde la pared comprende una capa de barrera formada sobre la superficie externa de la cápsula, una capa expandible formada sobre la capa de barrera y una capa semipermeable formada sobre la capa expandible. Un puerto de entrega conecta el líquido de la formulación con el ambiente de uso acuoso. Dichos dispositivos se describen, por ejemplo, en US6419952, US6342249, US5324280, US4672850, US4627850, US4203440 y US3995631.

Como se indicó anteriormente, los agentes descritos en la presente se pueden proporcionar en forma de micropartículas, que generalmente varían en tamaño de alrededor de 10 µm hasta alrededor de 2 mm (incluyendo, por ejemplo, desde alrededor de 100 µm a 1 mm de diámetro). Tales multipartículas pueden empacarse, por ejemplo, en una cápsula tal como una cápsula de gelatina o una cápsula formada a partir de un polímero soluble en agua tal como HPMCAS, HPMC o almidón; dosificado como una suspensión o lechada en un líquido; o se pueden formar en una tableta, comprimido o píldora mediante compresión u otros procesos conocidos en la técnica. Tales multipartículas se pueden preparar mediante cualquier proceso conocido, tal como procesos de granulación-húmeda y seca-, extrusión/esferonización, compactación con rodillo, fusión-congelación o mediante recubrimiento por pulverización de núcleos de semillas. Por ejemplo, en procesos de granulación-húmeda y seca-, el agente descrito en la presente y los excipientes opcionales se pueden granular para formar multipartículas del tamaño deseado.

Los agentes pueden incorporarse en micro emulsiones, que generalmente son dispersiones, termodinámicamente estables, isotrópicamente claras de dos líquidos inmiscibles, tales como aceite y agua, estabilizadas mediante una película interfacial de moléculas tensioactivas (Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, New York: Marcel Dekker, 1992, volume 9). Para la preparación de microemulsiones son necesarios, un tensioactivo (emulsionante), un co-tensioactivo (co-emulsionante), una fase oleosa y una fase acuosa. Los tensioactivos adecuados incluyen cualquier tensioactivo que sea útil en la preparación de emulsiones, por ejemplo, emulsionantes que se utilizan normalmente en la preparación de cremas. El co-tensioactivo (o "co-emulsionante") generalmente se selecciona del grupo de derivados de poliglicerol, derivados de glicerol y alcoholes grasos. Las combinaciones de emulsionante/co-emulsionante

preferibles generalmente, aunque no necesariamente, se seleccionan del grupo que consiste en: monoestearato de glicerilo y estearato de polioxietileno; polietilenglicol y palmitoestearato de etilenglicol; y triglicerídos caprílicos y cápricos y oleoil macrogol glicerídos. La fase acuosa incluye no solamente agua sino también, típicamente, tampones, glucosa, propilenglicol, polietilenglicos (preferiblemente polietilenglicos de menor peso molecular, por ejemplo, PEG 300 y PEG 400), y/o glicerol, y similares, mientras que la fase oleosa comprenderá generalmente, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos, aceites vegetales modificados, aceites de silicona, mezclas de mono- di- y triglicerídos, mono- y di-ésteres de PEG (por ejemplo, oleoil macrogol glicerídos).

Los compuestos descritos en la presente se pueden incorporar en formulaciones de nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas farmacéuticamente aceptables (Delie and Blanco-Prieto, 2005, Molecule 10:65-80). Las nanocápsulas generalmente pueden atrapar compuestos de forma estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debido a la sobrecarga polimérica intracelular, se pueden diseñar partículas ultrafinas (con un tamaño de alrededor de 0.1  $\mu\text{m}$ ) utilizando polímeros capaces de degradarse *in vivo* (por ejemplo, nanopartículas de polialquil-cianoacrilato biodegradables). Tales partículas se describen en la técnica existente.

Los dispositivos implantables recubiertos con un compuesto de esta invención son otra realización de la presente invención. Los compuestos también pueden recubrirse sobre dispositivos médicos implantables, tales como perlas, o co-formularse con un polímero u otra molécula, para proporcionar un "depósito de fármacos", permitiendo así que el fármaco se libere durante un período de tiempo más largo que la administración de una solución acuosa del fármaco. Los recubrimientos adecuados y la preparación general de los dispositivos implantables recubiertos se describen en Pat. de EE. UU. Nos. 6,099,562; 5,886,026; y 5,304,121. Los recubrimientos son típicamente materiales poliméricos biocompatibles tales como un polímero de hidrogel, polimetildisiloxano, policaprolactona, polietilenglicol, ácido poliláctico, etilenvinilacetato y mezclas de los mismos. Los recubrimientos pueden ser opcionalmente cubiertos además por una capa superior adecuada de fluorosilicona, polisacáridos, polietilenglicol, fosfolípidos o combinaciones de los mismos para impartir características de liberación controlada en la composición.

Las formulaciones incluyen aquellas adecuadas para las vías de administración detalladas en la presente. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Las técnicas y formulaciones generalmente se encuentran en Remington's. Dichos métodos incluyen el paso de asociar el ingrediente activo con el portador, el cual constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima el ingrediente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Los términos "administrar", "administrando" o "administración" en referencia a un compuesto, composición o formulación de la invención significan introducir el compuesto en el sistema del animal en necesidad del tratamiento. Cuando un compuesto de la invención se proporciona en combinación con uno o más agentes activos diferentes, se entiende que "administración" y sus variantes incluyen la introducción concurrente y/o secuencial del compuesto y los otros agentes activos.

Las composiciones descritas en la presente se pueden administrar sistémicamente o localmente, por ejemplo, por vía oral (por ejemplo, utilizando cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, tabletas, tabletas sublinguales y similares), por inhalación (por ejemplo, con un aerosol, gas, inhalador, nebulizador o similares), al oído (por ejemplo, utilizando gotas para los oídos), típicamente (por ejemplo, utilizando cremas, geles, linimentos, lociones, ungüentos, pastas, parches transdérmicos, etc.), oftálmicamente (por ejemplo, con gotas para los ojos, geles oftálmicos, ungüentos oftálmicos), por vía rectal (por ejemplo, utilizando enemas o supositorios), por vía nasal, bucal, vaginal (por ejemplo, utilizando duchas, dispositivos intrauterinos, supositorios vaginales, anillos vaginales o tabletas, etc.), por vía de un reservorio implantado o similar, o por vía parenteral dependiendo de la gravedad y tipo de enfermedad que se está tratando. El término "parenteral" como se utiliza en la presente incluye, pero no se limita a, técnicas de inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intra-sinovial, intraesternal, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía oral, intraperitoneal o intravenosa.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden administrar por vía oral en cualquier forma de dosificación oralmente aceptable que incluye, pero no se limita a, cápsulas, tabletas, suspensiones acuosas o soluciones. Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen, pero no se limitan a, emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, maní, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicos y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes

tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, saborizantes y agentes perfumantes.

Las formas de dosificación sólidas para la administración oral incluyen cápsulas, tabletas, píldoras, polvos y gránulos. En tales formas de dosificación sólida, el compuesto activo se mezcla con al menos un excipiente o portador inerte y

5 farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) rellenos o extensores tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidinona, sacarosa y acacia, c) humectantes tales como, glicerol, d) agentes desintegrantes tales como, agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la solución tales como parafina, f) aceleradores de la 10 absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla bentonita, y i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los 15 mismos. Las tabletas pueden estar sin recubrir o pueden estar recubiertas mediante técnicas conocidas que incluyen microencapsulación para enmascarar un sabor desagradable o para retrasar la desintegración y la adsorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un período más largo. Por ejemplo, se puede emplear un material retardador tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo solo o con una cera. Se puede emplear un material enmascarador del sabor soluble en agua tal como hidroxipropil-metilcelulosa o hidroxipropil-celulosa.

20 Las formulaciones de un compuesto descrito en la presente que son adecuadas para la administración oral se pueden preparar como unidades discretas tales como tabletas, píldoras, trozos, pastillas para chupar, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, cápsulas duras o blandas, por ejemplo, cápsulas de gelatina, jarabes o elixires. Las formulaciones de un compuesto destinado para uso oral se pueden preparar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica para la fabricación de composiciones farmacéuticas.

25 Las tabletas comprimidas se pueden preparar mediante compresión del ingrediente activo en una máquina adecuada en una forma de flujo-fluido tal como polvo o gránulos, opcionalmente mezclado con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, tensioactivo o agente dispersante. Las tabletas moldeadas se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del ingrediente activo en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

30 Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el ingrediente activo se mezcla con portador soluble en agua tal como polietilenglicol o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva.

Los compuestos activos también pueden estar en forma microencapsulada con uno o más excipientes como se indicó anteriormente.

35 Cuando se requieren suspensiones acuosas para uso oral, el ingrediente activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes y/o saborizantes. Se pueden formular jarabes y elixires con agentes edulcorantes, por ejemplo, glicerol, propilenglicol, sorbitol o sacarosa. Tales formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante, agentes saborizantes y colorantes y antioxidante.

40 Las formas inyectables estériles de las composiciones descritas en la presente (por ejemplo, para administración parenteral) pueden ser una suspensión acuosa u oleaginosa. Estas suspensiones se pueden formular de acuerdo con técnicas ya conocidas en la técnica utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente no-tóxico aceptable-parenteralmente, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre 45 los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse se encuentran agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluidos mono- o di-glicéridos sintéticos. Los ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados glicéridos, son útiles en la preparación de un inyectable, al igual que los aceites naturales farmacéuticamente-aceptables, tales como el aceite de oliva o el aceite de ricino, 50 especialmente en sus versiones polioxietiladas. Estas soluciones o suspensiones oleosas también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena-larga, tal como carboximetilcelulosa o agentes dispersantes similares que se utilizan comúnmente en la formulación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables que incluyen emulsiones y suspensiones. También se pueden utilizar otros tensioactivos comúnmente utilizados, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad que se utilizan comúnmente en 55 la fabricación de formas farmacéuticas aceptables sólidas, líquidas u otras formas de dosificación para los fines de formulaciones inyectables.

Las suspensiones oleosas se pueden formular mediante la suspensión de un compuesto descrito en la presente en un aceite vegetal, por ejemplo, aceite de araque, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo, cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes tales como los expuestos

5 anteriormenete y agentes saborizantes para proporcionar una preparación oral comestible. Estas composiciones pueden conservarse mediante la adición de un antioxidante tal como hidroxianisol butilado o alfa-tocoferol.

Las suspensiones acuosas de un compuesto descrito en la presente contienen los materiales activos mezclados con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes incluyen un agente de suspensión, tal como carboximetilcelulosa de sodio, croscarmelosa, povidona, metilcelulosa,

10 hidroxipropilmelcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia, y agentes dispersantes o humectantes tales como un fosfátilo que ocurre naturalmente (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquíleno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etíleno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol),

15 un producto de condensación de óxido de etíleno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Las formulaciones inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que 20 se pueden disolver o dispersar en agua estéril u otro medio inyectable estéril antes de utilizar.

Para poder prolongar el efecto de un compuesto descrito en la presente, a menudo es deseable ralentizar la absorción del compuesto de inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfio con escasa solubilidad en agua. La tasa de absorción del compuesto depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina.

25 Alternativamente, la absorción retardada de la forma de compuesto administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el compuesto en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se elaboran formando matrices microencapsuladas del compuesto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la proporción del compuesto a polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la tasa de liberación del compuesto. Ejemplos de otros polímeros biodegradables 30 incluyen poli(orthoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el compuesto en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con los tejidos corporales.

Las soluciones o microemulsiones inyectables se pueden introducir en el torrente sanguíneo de un paciente mediante inyección local en bolo. Alternativamente, puede ser ventajoso el administrar la solución o microemulsión de tal manera que se mantenga una concentración constante de circulación del compuesto instantáneo. Para poder mantener dicha concentración constante, se puede utilizar un dispositivo de administración intravenosa continua. Un ejemplo de dicho dispositivo es la bomba intravenosa Deltec CADD-PLUS™ modelo 5400.

35 Las composiciones para administración rectal o vaginal son preferiblemente supositorios los cuales se pueden preparar mezclando los compuestos descritos en la presente con excipientes o portadores no-irritantes adecuados tales como manteca de cacao, cera de abejas, polietilenglicol o cera para supositorios que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a temperatura corporal y por lo tanto se derrieten en el recto o cavidad vaginal y liberan el compuesto activo. Otras formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, 40 tampones, cremas, geles, pastas, espumas o pulverizaciones.

45 Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente también se pueden administrar tópicamente, especialmente cuando la diana del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles mediante la aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, el oído, la piel o el tracto intestinal inferior. Se preparan fácilmente formulaciones tópicas adecuadas para cada una de estas áreas u órganos.

50 Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un compuesto descrito en la presente incluyen ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, polvos, soluciones, pulverizaciones, inhalantes o parches. El compuesto activo se mezcla bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y cualquier conservante o amortiguador necesario según sea requerido. También se contemplan dentro del alcance de esta invención formulaciones oftálmicas, gotas para los oídos y gotas para los ojos. Además, la presente invención contempla el uso de parches transdérmicos, los cuales tienen la ventaja adicional de proporcionar una administración controlada de un compuesto al cuerpo. Dichas formas de dosificación se pueden preparar disolviendo o dispensando el compuesto en el medio adecuado. También se pueden utilizar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo

55 del compuesto a través de la piel. La tasa se puede controlar mediante ya sea proporcionando una membrana controladora de la tasa o dispersando el compuesto en una matriz o gel polimérico. La aplicación tópica para el tracto

intestinal inferior se puede realizar en una formulación de supositorio rectal (véase anteriormente) o en una formulación de enema adecuada. También se pueden utilizar parches tópicos-transdérmicos.

Para aplicaciones tópicas, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en un ungüento adecuado que contiene el compuesto activo suspendido o disuelto en uno o más portadores. Los portadores para la administración

5 tópica de los compuestos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una loción o crema adecuada que contenga los compuestos activos suspendidos o disueltos en uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, monoestearato de sorbitán, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, 10 alcohol cetearílico, 2 octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Para uso oftálmico, las composiciones farmacéuticas se pueden formular como suspensión micronizada en salina isotónica estéril con pH ajustado o, preferiblemente, como soluciones en salina isotónica estéril con pH ajustado, con o sin un conservante tal como cloruro de bencilalconio. Alternativamente, para usos oftálmicos, las composiciones farmacéuticas se pueden formular en una ungüento tal como petrolato. Para el tratamiento del ojo u otros tejidos 15 externos, por ejemplo, boca y piel, las formulaciones se pueden aplicar como ungüento o crema tópica que contiene el ingrediente(s) activo en una cantidad de, por ejemplo, 0.075 a 20% p/p. Cuando se formulan en un ungüento, los ingredientes activos se pueden emplear con ya sea una base de ungüento a base de aceite, parafínica o miscible en agua.

Alternativamente, los ingredientes activos se pueden formular en una crema con una base de crema de aceite-agua. Si se desea, la fase acuosa de la base de crema puede incluir un alcohol polihídrico, es decir, un alcohol que 20 tiene dos o más grupos hidroxilo tales como propilenglicol, butano 1,3-diol, manitol, sorbitol, glicerol y polietilenglicol (incluyendo PEG 400) y mezclas de los mismos. Las formulaciones tópicas pueden incluir deseablemente un compuesto que mejore la absorción o penetración del ingrediente activo a través de la piel u otras áreas afectadas. Ejemplos de tales potenciadores de la penetración dérmica incluyen dimetilsulfóxido y análogos relacionados.

25 25 La fase oleosa de las emulsiones preparadas utilizando un compuesto descrito en la presente puede estar constituida a partir de ingredientes conocidos de una manera conocida. Si bien la fase puede comprender simplemente un emulsionante (también conocido como emulgente), deseablemente comprende una mezcla de al menos un emulsionante con una grasa o un aceite o con una grasa y un aceite. Se puede incluir un emulsionante hidrofílico junto con un emulsionante lipófilo que actúa como estabilizador. En algunas realizaciones, el emulsionante incluye tanto un aceite como una grasa. Juntos, el emulsionante(s) con o sin estabilizante(s) forman la llamada cera emulsionante, y la cera junto con el aceite y la grasa forman la llamada base de ungüento emulsionante la cual forma la fase oleosa dispersa de las formulaciones de la crema. Los emulgentes y estabilizadores de emulsión adecuados para uso en la formulación de un compuesto descrito en la presente incluyen Tween™-60, Span™-80, alcohol cetoestearílico, alcohol bencílico, alcohol miristílico, monoestearato de glicerilo y laurilsulfato de sodio.

30 35 Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse mediante aerosol nasal o mediante inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para mejorar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales. Las formulaciones adecuadas para administración intrapulmonar o nasal tienen un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo de 0.1 a 500 micrones (incluyendo partículas en un intervalo entre 0.1 y 500 micrones en incrementos de micrones tales como 0.5, 1, 30, 35 micrones, etc.) el cual se administra mediante inhalación rápida a través de las fosas nasales o mediante inhalación a través de la boca hasta llegar a los sacos alveolares.

40 45 La composición (o formulación) farmacéutica para uso puede empacarse de diversas maneras dependiendo del método utilizado para administrar el fármaco. Generalmente, un artículo para distribución incluye un contenedor en el que se ha depositado la formulación farmacéutica en una forma adecuada. Los contenedores adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen materiales tales como botellas (plástico y vidrio), bolsitas, ampolletas, bolsas de plástico, cilindros metálicos y similares. El contenedor también puede incluir un conjunto a prueba de manipulaciones para evitar el acceso indiscreto al contenido del paquete. Además, el contenedor tiene depositado sobre el mismo una etiqueta que describe los contenidos del contenedor. La etiqueta también puede incluir advertencias adecuadas.

50 55 Las formulaciones pueden empacarse en contenedores de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampolletas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición de congelamiento en seco (liofilizada) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyección inmediatamente antes de su uso. Se preparan soluciones y suspensiones para inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles del tipo descrito anteriormente. Las formulaciones de dosificación unitaria preferibles son aquellas que contienen una dosis diaria o

una sub-dosis unitaria diaria, como se menciona anteriormente en la presente, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente activo.

En otro aspecto, un compuesto descrito en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se puede formular en una composición veterinaria que comprende un portador veterinario. Los portadores veterinarios son materiales útiles para el propósito de administrar la composición y pueden ser materiales sólidos, líquidos o gaseosos que de otro modo son inertes. En la técnica veterinaria y son compatibles con el ingrediente activo. Estas composiciones veterinarias se pueden administrar por vía parenteral, oral o mediante cualquier otra vía deseada.

## Métodos terapéuticos

La presente invención está dirigida a un método para tratar o prevenir una enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar, sola o en terapia de combinación, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo al sujeto, en el que el compuesto se selecciona de los mostrados en la Tabla I.

La invención también se dirige a una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Tabla I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, para uso en el tratamiento de una enfermedad del CNS. La invención también se dirige a una forma de dosificación que comprende dicho compuesto farmacéutico para uso en el tratamiento de una enfermedad del CNS.

La invención también está dirigida a un método para tratar o prevenir una enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar, solo o en terapia de combinación, una composición farmacéutica o forma de dosificación que comprende un compuesto mostrado en la Tabla I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La invención se dirige además al uso de un estimulador de la GCs mostrado en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que lo comprende, para el tratamiento de una enfermedad del CNS.

La invención se dirige además a un estimulador de la GCs o una composición farmacéutica o forma de dosificación que lo comprende, para uso en el tratamiento de una enfermedad del CNS, en el que el estimulador de la GCs es uno mostrado en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otras realizaciones, los compuestos aquí divulgados son estimuladores de la GCs que pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por una mayor neuroinflamación. Una realización de la invención es un método para disminuir la neuroinflamación en un sujeto en necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de uno cualquiera de los compuestos mostrados en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismos, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que lo comprende.

En otras realizaciones, los compuestos aquí divulgados son estimuladores de la GCs que pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por una mayor neurotoxicidad. Una realización de la invención es un método para reducir la neurotoxicidad en un sujeto en necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de uno cualquiera de los compuestos mostrados en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que lo comprende.

En otras realizaciones, los compuestos aquí divulgados son estimuladores de la GCs que pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por neurodegeneración alterada. Una realización de la invención es un método para restaurar la neuroregeneración en un sujeto en necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de uno cualquiera de los compuestos mostrados en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismos, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que lo comprende.

En otras realizaciones, los compuestos aquí divulgados son estimuladores de la GCs que pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por una función sináptica alterada. Una realización de la invención es un método para restaurar la función sináptica en un sujeto en necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de uno cualquiera de los compuestos mostrados en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que lo comprende.

En otras realizaciones, los compuestos aquí divulgados son estimuladores de la GCs que pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por neurotransmisores regulados negativamente. Una realización de la invención es un método para normalizar un neurotransmisor en un sujeto en

necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de uno cualquiera de los compuestos mostrados en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que lo comprende. Específicamente, la enfermedad es enfermedad de Alzheimer. Específicamente, la enfermedad es Demencia Mixta.

- 5 En otras realizaciones, los compuestos aquí divulgados son estimuladores de la GCs que pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por un flujo sanguíneo cerebral alterado. Una realización de la invención es un método para restaurar el flujo sanguíneo cerebral en un sujeto en necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de uno cualquiera de los compuestos mostrados en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que lo comprende. Específicamente, la enfermedad es Demencia Vascular o Enfermedad de Alzheimer. Específicamente, la enfermedad es Demencia Mixta. En otras realizaciones, el trastorno del CNS se selecciona de lesiones traumáticas (cerradas o abiertas, penetrantes en la cabeza), lesiones cerebrales traumáticas (TBI), lesiones no traumáticas al cerebro (accidente cerebrovascular (en particular, accidente cerebrovascular isquémico), aneurisma, hipoxia) o deterioro o disfunción cognitiva que resulta de lesiones cerebrales o trastornos neurodegenerativos.
- 10 15 En otras realizaciones, los compuestos aquí divulgados son estimuladores de la GCs que pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y trastornos caracterizados por una mayor neurodegeneración. Una realización de la invención es un método para disminuir la neurodegeneración en un sujeto en necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de uno cualquiera de los compuestos mostrados en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que lo comprende.
- 20 25 En otras realizaciones, los compuestos aquí divulgados son estimuladores de la GCs y son neuroprotectores. En particular, los compuestos mostrados en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que los comprende, pueden ser útiles para proteger a las neuronas en un sujeto en necesidad de lo mismo.

- 30 35 40 45 50 55 En otras realizaciones, los compuestos aquí divulgados son estimuladores de la GCs que pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento de indicaciones de dolor huérfano. Una realización de la invención es un método para tratar una indicación de dolor huérfano en un sujeto en necesidad del mismo mediante la administración al sujeto de uno cualquiera de los compuestos mostrados en la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que lo comprende. En particular, la indicación de dolor huérfano se selecciona de Miotonía sensible a acetazolamida, Síndrome de sensibilización de autoeritrocitos, Enfermedad de Charcot Marie-Tooth autosómica dominante tipo 2V, Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth autosómica dominante intermedia con dolor neuropático, Distrofia muscular de cintura-extremidades autosómica recesiva tipo 2A, Insensibilidad congénita al dolor asociada a canalopatía, Dolor crónico que requiere analgesia intraespinal, Síndrome de dolor regional complejo, Síndrome de dolor regional complejo tipo 1, Síndrome de dolor regional complejo tipo 2, Insensibilidad congénita al dolor con hiperhidrosis, Insensibilidad congénita al dolor con discapacidad intelectual grave, Síndrome de insensibilidad congénita al dolor-hipohidrosis, Queratodermia palmoplantar difusa con fisuras dolorosas, Síndrome de dolor episódico familiar, Síndrome de dolor episódico familiar con afectación predominante de las extremidades inferiores, Síndrome de dolor episódico familiar con afectación predominante de la parte superior del cuerpo, Callosidades dolorosas hereditarias, Neuropatía hereditaria sensorial y autonómica de tipo 4, Neuropatía sensorial y autonómica hereditaria tipo 5, Neuropatía sensorial y autonómica hereditaria tipo 7, Cistitis intersticial, Síndrome de hábito marfanoide-neurofibromas orbital y sistémico doloroso, Trastorno de dolor extremo paroxístico, Dolor facial idiopático persistente, Defectos cualitativos o cuantitativos de la calpaína y Síndrome de Tolosa-Hunt.

- En otras realizaciones, los compuestos aquí divulgados son estimuladores de la GCs que pueden ser útiles en la prevención y/o tratamiento del mal de altura (montaña), enfermedad cerebral de vasos pequeños, vasculitis cerebral, vasoespasmo cerebral, encefalopatía hepática, moyamoya, Disfagia de Parkinson, ataxia telangiectasia, trastorno del espectro autista, fatiga crónica, encefalopatía traumática crónica (CTE), deterioro cognitivo asociado con la diabetes, deterioro cognitivo asociado con Esclerosis Múltiple, deterioro cognitivo asociado con la apnea del sueño obstructiva, deterioro cognitivo asociado con la esquizofrenia (CIAS), deterioro cognitivo asociado con anemia falciforme, contusión, retinopatía, retinopatía diabética (incluyendo proliferativa y no-proliferativa), disfagia, fibrosis ocular, Enfermedad de Fabry, Enfermedad de Gaucher, glioblastoma, inflamación cerebral causada por malaria cerebral (SoC), inflamación cerebral causada por enfermedades infecciosas, discapacidad intelectual, neovascularización coroidea miope, neuro mielitis óptica, dolor neuropático con Esclerosis Múltiple, dolor neuropático con herpes (herpes zoster), dolor neuropático con cirugía de columna, Demencia de Parkinson, neuropatías periféricas y autonómicas, degeneración periférica de la retina, síndrome de estrés postraumático, neuralgia post herpética, demencia postoperatoria, vitreoretinopatía proliferativa, fibrosis cerebral inducida por radiación, radiculopatía, epilepsia refractaria, oclusión de la vena retinal, lesión de la médula espinal, atrofia muscular espinal, subluxaciones espinales, taupatías y degeneración macular húmeda relacionada con la edad.

Las enfermedades del CNS que pueden beneficiarse del tratamiento con un estimulador de la GCs de la invención son aquellas enfermedades del CNS en las que podría ser deseable un aumento en la concentración del NO o un aumento en la concentración del GMPc o ambos, o una regulación positiva de la vía del NO.

Los compuestos descritos en la presente, así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, como estimuladores de la GCs que son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica, son útiles en la prevención y/o tratamiento de enfermedades, afecciones y trastornos del CNS que pueden beneficiarse de la estimulación de la GCs en el cerebro.

En algunas realizaciones, la enfermedad, condición de salud o trastorno del CNS se selecciona de enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS o enfermedad de Lou Gehrig), síndrome de Down, demencia, 10 demencia vascular (VD), deterioro cognitivo vascular, Demencia Mixta, demencia de Binswanger (encefalopatía arteriosclerótica subcortical), arteriopatía cerebral autosómica-dominante con infartos subcorticales y leucoencefalopatía (CADASIL o síndrome de CADASIL), degeneración o demencia del lóbulo frontotemporal, demencia asociada al VIH (incluido el deterioro neurocognitivo asintomático (ANI), trastorno neurocognitivo menor (MND) y demencia asociada al VIH (HAD) (también llamada complejo de demencia del SIDA [ADC] o encefalopatía 15 por VIH), demencia con cuerpos de Lewy, demencia pre-senil (deterioro cognitivo leve o MCI), glaucoma, enfermedades de Huntington (o corea de Huntington, HD), esclerosis múltiple (MS) (incluyendo Síndrome aislado clínico (CIS), MS remitente-recurrente (RRMS), MS primaria progresiva (PPMS) y MS secundaria progresiva (SPMS), atrofia de sistema múltiple (MSA), Enfermedad de Parkinson (PD), Parkinsonismo Plus, ataxias espinocerebelosas, enfermedad de Steel-Richardson-Olszewski (parálisis supranuclear progresiva), trastorno por déficit de atención 20 (ADD) y trastorno por déficit de atención con hiperactividad (ADHD).

En otras realizaciones, la enfermedad, condición de salud o trastorno es un trastorno o afección del CNS seleccionado de enfermedad de Alzheimer o enfermedad pre-Alzheimer, enfermedad de Alzheimer de leve a moderada o enfermedad de Alzheimer de moderada a grave.

En otras realizaciones, el trastorno del CNS se selecciona de ya sea lesiones traumáticas (cerradas o abiertas) penetrantes en la cabeza, lesiones cerebrales traumáticas (TBI), incluyendo, por ejemplo, contusiones y Encefalopatía traumática crónica (CTE), lesiones no-traumáticas al cerebro (por ejemplo, accidente cerebrovascular (incluyendo, accidente cerebrovascular isquémico), aneurisma, hipoxia) o deterioro o disfunción cognitiva que resulta de lesiones cerebrales o trastornos neurodegenerativos.

En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno del CNS se selecciona de una distonía, que incluyen, por ejemplo, distonía generalizada, focal, segmentaria, sexual, intermedia, genética/primaria o reacción distónica aguda; o una discinesia, que incluye, por ejemplo, discinesia aguda, crónica/tardía y no-motora e inducida por levodopa (LID).

En otras realizaciones, la enfermedad o trastorno del CNS se selecciona de trastornos caracterizados por una reducción relativa en la plasticidad sináptica y los procesos sinápticos que incluyen, por ejemplo, X frágil, trastorno de Rhett, síndrome de Williams, síndrome de Renpenning, trastornos del espectro autista (ASD), autismo, síndrome de 35 Asperger, trastorno generalizado del desarrollo o trastorno desintegrativo infantil.

En otras realizaciones, el trastorno del CNS es dolor neuropático.

En otras realizaciones, el trastorno del CNS es un trastorno psiquiátrico, mental, del estado de ánimo o afectivo seleccionado de un trastorno bipolar, esquizofrenia, psicosis general, psicosis inducida por fármacos, un trastorno delirante, un trastorno esquizoafectivo, trastorno obsesivo compulsivo (OCD), un trastorno depresivo, un trastorno de ansiedad, un trastorno de pánico, un trastorno de estrés posttraumático (PTSD).

En realizaciones adicionales, el trastorno del CNS se selecciona del deterioro de la memoria asociado a la edad, demencia mixta, trastornos del sueño y vigilia y síndrome de Sneddon.

En realizaciones adicionales, la enfermedad o afección se selecciona de dolor agudo, síndrome de dolor central, neuropatía inducida por quimioterapia y dolor neuropático, neuropatía diabética, fibromialgia, dolor inflamatorio, dolor neuropático, dolor neuropático asociado con una enfermedad del CNS, neuropatía periférica diabética dolorosa, dolor postoperatorio, dolor tónico y dolor visceral.

En otras realizaciones, el trastorno del CNS se selecciona del quimiocerebro, conducta adictiva inducida por levodopa, alcoholismo, dependencia de narcóticos (incluyendo, pero no limitado a, anfetaminas, opiáceos u otras sustancias) y abuso de sustancias.

50 Los términos "enfermedad", "trastorno", "condición de salud" y "afección" se pueden utilizar indistintamente aquí para referirse a una afección médica o patológica del CNS o a una enfermedad del CNS mediada por la GCs, GMPc y/o NO que de otro modo podrían beneficiarse de una regulación positiva de la vía del NO.

Como se utilizan en la presente, los términos "sujeto" y "paciente" se utilizan indistintamente. Los términos "sujeto" y "paciente" se refieren a un animal (por ejemplo, un ave tal como un pollo, codorniz o pavo, o un mamífero), específicamente un "mamífero" que incluye un no-primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, oveja, conejo, conejillo de indias, rata, gato, perro y ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, chimpancé y un humano), y más

5 específicamente un humano. En algunas realizaciones, el sujeto es un animal no-humano tal como un animal de granja (por ejemplo, un caballo, vaca, cerdo u oveja) o una mascota (por ejemplo, un perro, gato, conejillo de indias o conejo). En algunas realizaciones, el sujeto es un humano.

La invención también proporciona un método para tratar una de las enfermedades, afecciones y trastornos anteriores en un sujeto, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto descrito en la 10 presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al sujeto en necesidad del tratamiento. Alternativamente, la invención proporciona el uso de un compuesto descrito en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de una de estas enfermedades, afecciones y trastornos en un sujeto en necesidad del tratamiento.

15 El término "muestra biológica", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una muestra *in vitro* o *ex vivo*, e incluye, sin limitación, cultivos celulares o extractos de los mismos; material de biopsia obtenido de un mamífero o extractos del mismo; sangre, saliva, orina, heces, semen, lágrimas, líquido linfático, líquido ocular, humor vítreo, líquido cefalorraquídeo (CSF) u otros fluidos corporales o extractos de los mismos.

20 "Tratar", "tratando" o "tratamiento" con respecto a un trastorno o enfermedad se refiere a aliviar o anular la causa y/o los efectos del trastorno o enfermedad. Tal como se utilizan en la presente, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la reducción o mejora de la progresión, gravedad y/o duración de una afección mediada por GCs, GMPc y/o NO, o una afección que se beneficiaría de la regulación positiva de la vía del NO, o la mejora de uno o más síntomas (preferiblemente, uno o más síntomas discernibles) de dicha afección (es decir, "manejar" sin "curar" la afección), resultante de la administración de una o más terapias (por ejemplo, uno o más agentes terapéuticos tales como un compuesto de la Tabla I o una composición o forma de dosificación del mismo). En realizaciones específicas, 25 los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la mejora de al menos un parámetro físico medible de una afección mediada por GCs, GMPc y/o NO o una enfermedad que se beneficiaría de la regulación positiva de la vía del NO. En otras realizaciones, los términos "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a la inhibición de la progresión de una afección mediada por GCs, GMPc y/o NO, o una enfermedad que se beneficiaría de la regulación positiva de la vía del NO, ya sea físicamente mediante, por ejemplo, la estabilización de un síntoma discernible, o fisiológicamente 30 mediante, por ejemplo, la estabilización de un parámetro físico, o ambos.

35 El término "prevenir", tal como se utiliza en la presente, se refiere a la administración de antemano de un medicamento para evitar o prevenir la aparición de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno. Una persona con habilidades ordinarias en la técnica médica reconoce que el término "prevenir" no es un término absoluto. En la técnica médica se entiende que se refiere a la administración profiláctica de un fármaco para disminuir sustancialmente la probabilidad o gravedad de una afección, o síntoma de la afección y este es el sentido que se pretende en esta divulgación. The Physician's Desk Reference, un texto estándar en el campo, utiliza el término "prevenir" cientos de veces. Tal como se utilizan en el mismo, los términos "prevenir", "previniendo" y "prevención" con respecto a un trastorno o enfermedad, se refieren a evitar la causa, efectos, síntomas o progresión de una enfermedad o trastorno antes de que la enfermedad o trastorno se manifieste completamente o antes de que el trastorno sea diagnosticado.

40 En una realización, los métodos de la invención son una medida de prevención o "preventiva" para un paciente, específicamente un humano, que tiene una predisposición (por ejemplo, una predisposición genética) a desarrollar una enfermedad, trastorno o síntoma relacionado con GCs, GMPc y/o NO.

45 En otras realizaciones, los métodos de la invención son una medida de prevención o "preventiva" para un paciente, específicamente un humano, que padece una enfermedad, trastorno o afección que lo pone en riesgo de desarrollar una enfermedad, trastorno o síntoma relacionado con GCs, GMPc o NO.

Los compuestos y composiciones aquí descritos también son útiles para el tratamiento veterinario de animales de compañía, animales exóticos y animales de granja, incluyendo, sin limitación, perros, gatos, ratones, ratas, hámsteres, jirbos, conejillo de indias, conejos, caballos, cerdos y ganado

50 En un aspecto no-reivindicado, la presente divulgación proporciona un método para estimular la actividad de la GCs en una muestra biológica, que comprende poner en contacto dicha muestra biológica con un compuesto de la Tabla I o una sal, composición o forma de dosificación farmacéuticamente aceptable del mismo. El uso de un estimulador de la GCs en una muestra biológica es útil para una variedad de propósitos conocidos por un experto en la técnica. Ejemplos de tales propósitos incluyen, sin limitación, ensayos biológicos y almacenamiento de muestras biológicas.

Los compuestos y composiciones farmacéuticas descritas en la presente se pueden utilizar solos o en terapia de combinación para el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno mediado, regulado o influenciado por GCs, GMPc y/o NO.

Terapias de combinación

- 5 Los compuestos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente se pueden utilizar en terapia de combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Para el tratamiento de combinación con más de un agente activo, donde los agentes activos están en formulaciones de dosificación separadas, los agentes activos se pueden administrar por separado o en conjunto. Además, la administración de un elemento puede ser anterior, simultánea o posterior a la administración del otro agente.
- 10 Cuando se "coadministra" con otros agentes, por ejemplo, cuando se coadministra con otro medicamento, una "cantidad eficaz" del segundo agente dependerá del tipo de fármaco utilizado. Se conocen dosis adecuadas para los agentes aprobados y el experto en la técnica puede ajustarlas de acuerdo con la afección del sujeto, el tipo de afección(es) que se están tratando y la cantidad de un compuesto descrito en la presente que se utiliza. En los casos en los que no se indique expresamente ninguna cantidad, deberá asumirse una cantidad efectiva. Por ejemplo, los 15 compuestos descritos en la presente se pueden administrar a un sujeto en un intervalo de dosificación de alrededor de 0.01 a alrededor de 10,000 mg/kg de peso corporal/día, alrededor de 0.01 a alrededor de 5000 mg/kg de peso corporal/día, alrededor de 0.01 a alrededor de 3000 mg/kg de peso corporal/día, alrededor de 0.01 a alrededor de 1000 mg/kg de peso corporal/día, alrededor de 0.01 a alrededor de 300 mg/kg de peso corporal/día, alrededor de 0.01 a alrededor de 100 mg/kg de peso corporal/día.
- 20 Cuando se emplea "terapia de combinación", se puede lograr una cantidad eficaz utilizando una primera cantidad de un compuesto de la Tabla I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y una segunda cantidad de un agente terapéutico adecuado adicional.
- 25 En una realización de esta invención, un compuesto de la Tabla I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el agente terapéutico adicional se administran cada uno en una cantidad eficaz (es decir, cada uno en una cantidad que sería terapéuticamente eficaz si se administraran solo). En otra realización, el compuesto de la Tabla I, o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y el agente terapéutico adicional se administran cada uno en una cantidad que por sí sola no proporciona un efecto terapéutico (una dosis sub-terapéutica). En otra realización más, el compuesto de la Tabla I se puede administrar en una cantidad eficaz, mientras que el agente terapéutico adicional se administra en una dosis sub-terapéutica. En aún otra realización, el compuesto de la Tabla I se puede administrar en una dosis 30 sub-terapéutica, mientras que el agente terapéutico adicional, por ejemplo, un agente terapéutico contra el cáncer adecuado se administra en una cantidad eficaz.
- 35 Como se utilizan en la presente, los términos "en combinación" o "coadministración" se pueden utilizar indistintamente para referirse al uso de más de una terapia (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos y/o terapéuticos). El uso de los términos no restringe el orden en el cual se le administran las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos) a un sujeto.
- 40 La coadministración abarca la administración de la primera y segunda cantidad de los compuestos de una manera esencialmente simultánea, tal como en una única composición farmacéutica, por ejemplo, cápsula o tableta que tienen una proporción fija de primera y segunda cantidad, o en múltiples, cápsulas separadas o tabletas para cada una. Además, dicha coadministración también abarca el uso de cada compuesto de manera secuencial en cualquier orden.
- 45 Cuando la coadministración implica la administración por separado de la primera cantidad de un compuesto de la Tabla I y una segunda cantidad de un agente terapéutico adicional, los compuestos se administran lo suficientemente cerca en tiempo para tener el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, el período de tiempo entre cada administración que puede dar como resultado el efecto terapéutico deseado, puede variar de minutos a horas y puede determinarse teniendo en cuenta las propiedades de cada compuesto tales como potencia, solubilidad, biodisponibilidad, vida-media en plasma y perfil cinético. Por ejemplo, un compuesto de la Tabla I y el segundo agente terapéutico se pueden administrar en cualquier orden dentro de alrededor de 24 horas de diferencia entre sí, dentro de alrededor de 16 horas de diferencia entre sí, dentro de alrededor de 8 horas de diferencia entre sí, dentro de alrededor de 4 horas de diferencia entre sí, dentro de alrededor de 1 hora de diferencia entre sí o dentro de alrededor de 30 minutos de diferencia entre sí.
- 50 Más, específicamente, se puede administrar una primera terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico tal como un compuesto descrito en la presente) antes de (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas antes), concomitantemente con, o posterior a (por ejemplo, 5 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 8 semanas o 12 semanas

semanas después) a la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un agente profiláctico o terapéutico tal como un agente anticancerígeno) a un sujeto.

Ejemplos de otros agentes terapéuticos que pueden combinarse con un compuesto de la Tabla I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, ya sea administrado por separado o en la misma composición farmacéutica, incluyen, pero no se limitan a:

(1) Factor de liberación derivado del endotelio (EDRF) o gas de NO.

(2) Donadores del NO tales como un nitrosotiol, un nitrito, una sidnonimina, un NONOato, una N-nitrosamina, una N-hidroxilnitrosamina, una nitrosimina, nitrotirosina, un dióxido de diazetina, un oxatriazol 5-imina, una oxima, una hidroxilamina, una N-hidroxiguanidina, una hidroxiurea o un furoxano. Algunos ejemplos de este tipo de compuestos incluyen: trinitrato de glicerilo (también conocido como GTN, nitroglicerina, nitroglicerina y trinitroglicerina), el éster nitrato de glicerol; nitroprusiato de sodio (SNP), en el que una molécula de óxido nítrico está coordinada con el metal hierro formando un complejo bipiramidal cuadrado; 3-morfolinosidnonimina (SIN-1), un compuesto zwitteriónico formado por la combinación de una morfolina y una sidnonimina; S-nitroso-N-acetylpenicilamina (SNAP), un derivado de aminoácido N-acetilado con un grupo funcional nitrosotiol; dietilentriamina/NO (DETA/NO), un compuesto de óxido nítrico unido covalentemente a dietilentriamina; un éster m-nitroximetilfenílico del ácido acetilsalicílico. Ejemplos más específicos de algunas de estas clases de donadores del NO incluyen: los nitrovasodilatadores clásicos, tales como nitrato orgánico y ésteres de nitrito, que incluyen nitroglicerina, nitrito de amilo, dinitrato de isosorbida, 5-mononitrato de isosorbida y nicorandil; isosorbida (Dilatrate®-SR, Imdur®, Ismo®, Isordil®, Isordil®, Titradose®, Monoket®), 3 morfolinosidnonimina; clorhidrato de linsidomina ("SIN-1"); S-nitroso-N-acetylpenicilamina ("SNAP"); S-nitrosoglutatión (GSNO), nitroprusiato de sodio, mono-etyl-éster de S-nitrosoglutatión (éster-GSNO), 6-(2-hidroxi-1-metil nitrosohidrazino)-N-metil-1-hexanamina o NONOato de dietilamina.

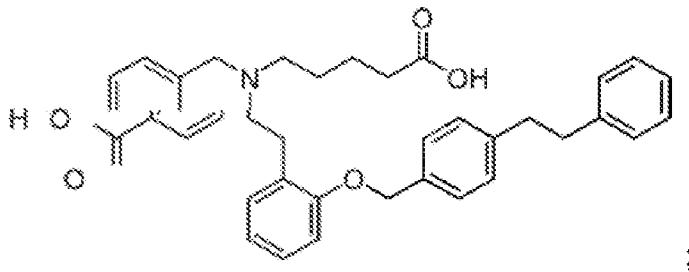
(3) Otras sustancias que aumentan las concentraciones del GMPc, como protoporfirina IX, ácido araquidónico y derivados de fenilhidrazina.

(4) Sustratos de la Óxido Nítrico Sintasa: por ejemplo, análogos basados en N-hidroxiguanidina, tales como N[G]-hidroxi-L-arginina (NOHA), 1-(3,4-dimetoxi-2-clorobencilidenamino)-3-hidroxiguanidina, y PR5 (1-(3,4-dimetoxi-2-clorobencilidenamino)-3-hidroxiguanidina); Derivados de L-arginina (tales como homo-Arg, homo-NOHA, N-tercbutiloxi- y N-(3-metil-2-butenil)oxi-L-arginina, canavanina, ácido guanidina-carpóico épsilon, agmatina, hidroxilagmatina y L-tirosil-L-arginina); N-alquil-N' hidroxiguanidinas (tales como N-ciclopropil-N'-hidroxiguanidina y N-butil-N'-hidroxiguanidina), N-aryl-N'-hidroxiguanidinas (tales como N-fenil-N'-hidroxiguanidina y sus derivados para-sustituidos que portan sustituyentes -F, -Cl, -metilo, -OH, respectivamente); derivados de guanidina tales como 3-(trifluorometil)propilguanidina.

(5) Compuestos que mejoran la transcripción del eNOS.

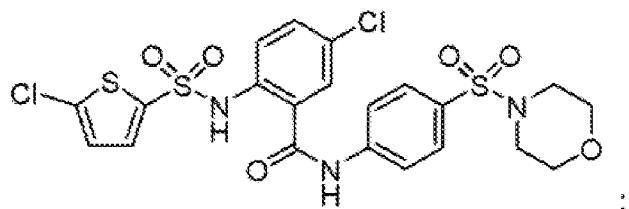
(6) activadores de la GCs independientes de hemo, independientes del NO, que incluyen, pero no se limitan a:

BAY 58-2667 (descrito en la publicación de patente DE19943635)

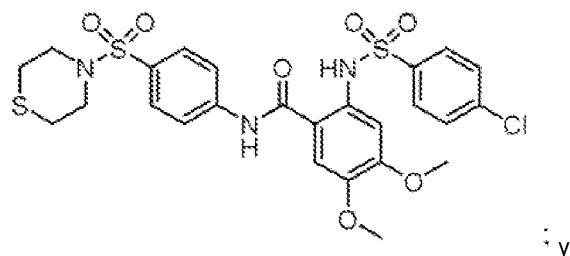


35

HMR-1766 (ataciguato de sodio, descrito en la publicación de patente WO2000002851)

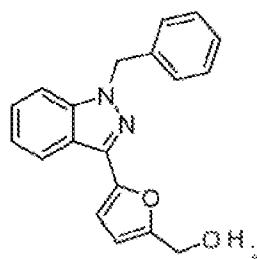


S 3448 (2-(4-cloro-fenilsulfonilamino)-4,5-dimetoxi-N-(4-(tiomorfolin-4-sulfonil)fenil)-benzamida (descrita en las publicaciones de patente DE19830430 y WO2000002851)

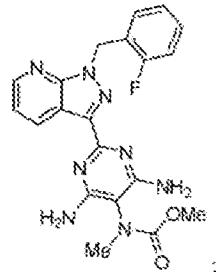


HMR-1069 (Sanofi-Aventis).

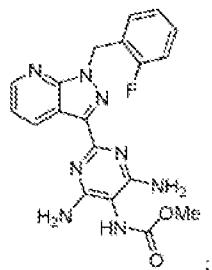
- 5 (7) Estimuladores de la GCs independientes del NO, dependientes de hemo, que incluyen, pero no se limitan a:  
YC-1 (véase las publicaciones de patente EP667345 y DE19744026)



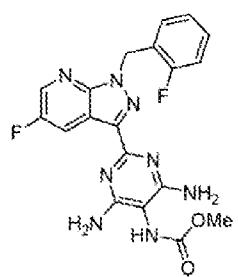
riociguat (BAY 63-2521, Adempas®, descrito en DE19834044)



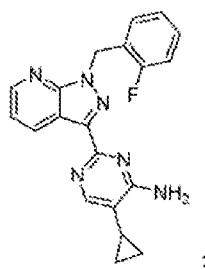
- 10 neliciguat (BAY 60-4552, descrito en WO 2003095451)



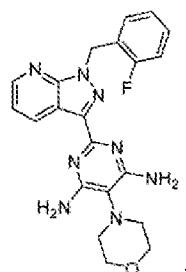
vericiguat (BAY 1021189)



BAY 41-2272 (descrito en DE19834047 y DE19942809)

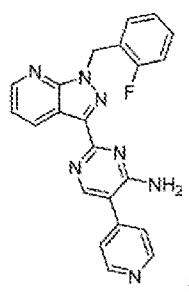


BAY 41-8543 (descrito en DE19834044)

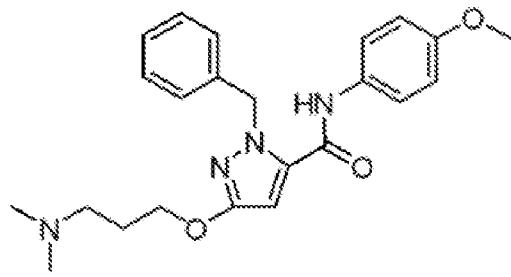


5

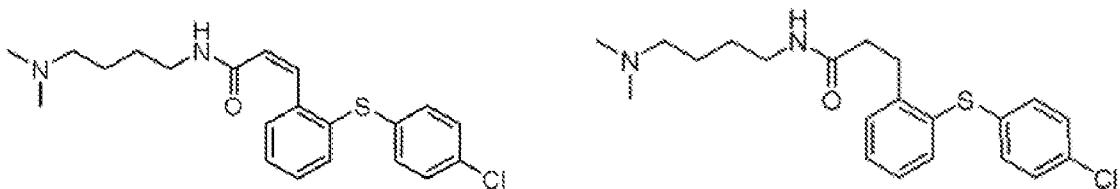
etriguac (descrito en WO 2003086407)



CFM-1571 (descrito en la publicación de patente WO2000027394)

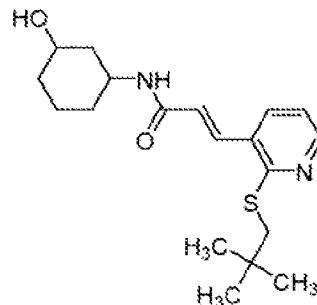


10 A-344905, su análogo de acrilamida A-350619 y el análogo de aminopirimidina A-778935



A-350619;

A-344905;



A-778935;

5 y otros estimuladores de la GCs descritos en una de las publicaciones US20090209556, US8455638, US20110118282 (WO2009032249), US20100292192, US20110201621, US7947664, US8053455 (WO2009094242), US20100216764, US8507512, (WO2010099054) US20110218202 (WO2010065275), US20130012511 (WO2011119518), US20130072492 (WO2011149921), US20130210798 (WO2012058132) y otros compuestos descritos en Tetrahedron Letters (2003), 44(48): 8661-8663.

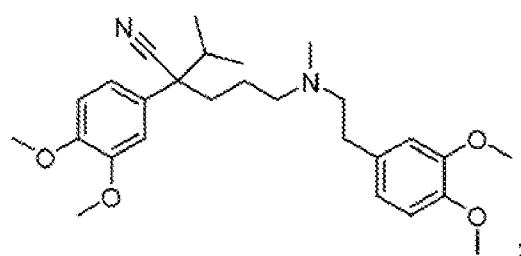
(8) Compuestos que inhiben la degradación del GMPc, tales como:

- 10 inhibidores de PDE5, tales como, por ejemplo, sildenafil (Viagra®) y agentes relacionados tales como avanafil, Iodenafil, mirodenafil, citrato de sildenafil (Revatio®), tadalafil (Cialis® o Adcirca®), vardenafil (Levitra®) y udenafil; alprostadilo; dipiridamol y PF-00489791;
- inhibidores de PDE9, tal como, por ejemplo, PF-04447943; e
- inhibidores de PDE10 tal como, por ejemplo, PF-02545920 (PF-10).

15 (9) Bloqueadores de los canales de calcio de los siguientes tipos:

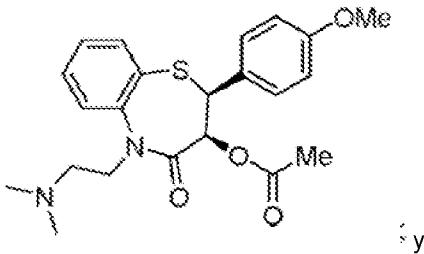
bloqueadores de los canales de calcio dihidropiridínicos tales como amlodipino (Norvasc®), aranidipino (Sapresta®), azelnidipino (Calblock®), barnidipino (HypoCa®), benidipino (Coniel®), cilnidipino (Atelec®, Cinalong®, Siscard®), clevidipina (Cleviprex®), diltiazem, efonidipina (Landel®), felodipina (Plendil®), lacidipina (Motens®, Lacipil®), lercanidipina (Zanidip®), manidipina (Calslot®, Madipine®), nicardipina (Cardene®, Carden SR®), nifedipina (Procardia®, Adalat®), nilvadipina (Nivadil®), nimodipina (Nimotop ®), nisoldipina (Baymycard ®, Sular ®, Syscor ®), nitrendipina (Cardif ®, Nitrepin®, Baylotensin®), pranidipina (Acalas®), isradipina (Lomir®);

bloqueadores de los canales de calcio de fenilalquilamina, tal como verapamilo (Calan®, Isoptin®)



y galopamilo (Procorum®, D600);

benzotiazepinas tal como diltiazem (Cardizem ®)



;

inhibidores no selectivos de los canales de calcio tales como mibefradil, bepridil, fluspirileno y fendilina.

5 (10) Antagonistas del receptor de endotelina (ERAs), tales como el receptor antagonista dual (ET<sub>A</sub> y ET<sub>B</sub>) de endotelina bosentán (Tracleer®), sitaxentán (Thelin®) o ambrisentán (Letairis®).

(11) Derivados o análogos de prostaciclina, tales como prostaciclina (prostaglandina I<sub>2</sub>), epoprostenol (prostaciclina sintética, Flolan®), treprostil (Remodulin®), iloprost (Ilomedin®), iloprost (Ventavis®); y formas orales e inhaladas de Remodulin® en desarrollo.

(12) Antihiperlipidémicos tales como los siguientes tipos:

10 secuestrantes de ácidos biliares como colestiramina, colestipol, colestilano, colesevelam o sevelamer; estatinas tales como atorvastatina, simvastatina, lovastatina, fluvastatina, pitavastatina, rosuvastatina y pravastatina; inhibidores de la absorción de colesterol tal como ezetimiba; otros agentes de disminución de lípidos tales como éster etílico de icosapento, ésteres etílicos de ácidos omega-3, reducol; derivados del ácido fíbrico tales como clofibrato, bezafibrato, clinofibrato, gemfibrozilo, ronifibrato, binifibrato, fenofibrato, ciprofibrato, fenofibrato de colina; derivados del ácido nicotínico tales como acipimox y niacina; combinaciones de estatinas, niacina y suplementos inhibidores de la absorción intestinal de colesterol (ezetimiba y otros) y fibratos; y terapias antiplaquetarias tal como el bisulfato de clopidogrel.

20 (13) Anticoagulantes, tales como los siguientes tipos:

cumarinas (antagonistas de la vitamina K) tales como warfarina (Coumadin ®), cenocumarol, fenprocumon y fenindiona;

heparina y derivados tales como heparina de bajo peso molecular, fondaparinux e idraparinux;

25 inhibidores directos de la trombina tales como argatroban, lepirudina, bivalirudina, dabigatran y ximelagatran (Exanta®); y

activadores del tejido-plasminógeno, utilizados para disolver coágulos y desbloquear arterias, tal como alteplasa.

(14) Medicamentos antiplaquetarios tales como, por ejemplo, topidogrel, ticlopidina, dipiridamol y aspirina.

(15) Inhibidores de la ACE, por ejemplo, los siguientes tipos:

agentes que contienen-sulfhidrilo tales como captopril (Capoten®) y zofenopril;

30 agentes que contienen-dicarboxilato tales como enalapril (Vasotec/Renitec®), ramipril (Altace®/Tritace®/Ramatec®/Ramiwin®), quinapril (Accupril®), perindopril (Coversyl®/Aceaon®), lisinopril (Lisodur®/Lopril®/Novatec®/Prinivil®/Zestri®) y benazepril (Lotensin®);

agentes que contienen-fosfonato tales como fosinopril;

35 inhibidores de la ACE que ocurren naturalmente, tales como casoquininas y lactoquininas, las cuales son productos de la descomposición de la caseína y el suero que se producen de naturalmente después de la ingestión de productos lácteos, especialmente leche cultivada;

los lactotripéptidos Val-Pro-Pro e Ile-Pro-Pro producidos por el probiótico *Lactobacillus helveticus* o derivados de la caseína que también tienen funciones inhibidoras de la ACE y antihipertensivas;

otros inhibidores de la ACE como alacepril, delapril, cilazapril, imidapril, trandolapril, temocapril, moexipril y pirapril.

(16) Terapia de oxígeno suplementaria.

5 (17) Bloqueadores beta, tales como los siguientes tipos:

agentes no-selectivos tales como alprenolol, bucindolol, carteolol, carvedilol, labetalol, nadolol, penbutolol, pindolol, oxprenolol, acebutolol, sotalol, mepindolol, celiprolol, arotinolol, tertatolol, amosulalol, nifradilol, propranolol y tirolool;

Agentes selectivos de  $\beta_1$  tales como cebutolol, atenolol, betaxolol, bisoprolol, celiprolol, clorhidrato de dobutamina, maleato de irsogladina, carvedilol, talinolol, esmolol, metoprolol y nebivolol; y

10 agentes selectivos de  $\beta_2$  tal como la butaxamina.

(18) Agentes antiarrítmicos tales como los siguientes tipos:

Tipo I (bloqueadores de los canales de sodio) tales como quinidina, lidocaína, fenitoína, propafenona;

Tipo III (bloqueadores de los canales de potasio) tales como amiodarona, dofetilida y sotalol; y

Tipo V tales como adenosina y digoxina.

15 (19) Diuréticos tales como diuréticos tiazídicos, por ejemplo, clorotiazida, clortalidona e hidroclorotiazida, bendroflumetiazida, ciclopentiazida, metilclotiazida, politiazida, quinetazona, xipamida, metolazona, indapamida, cicletanina; diuréticos de asa, tales como furosemida y toresamida; diuréticos ahorreadores de potasio tales como amilorida, espironolactona, canrenoato de potasio, eplerenona y triamtereno; combinaciones de estos agentes; otros diuréticos tales como acetazolamida y carperitida.

20 (20) Vasodilatadores de acción-directa tales como clorhidrato de hidralazina, diazóxido, nitroprusiato de sodio, cedralazina; otros vasodilatadores tales como dinitrato de isosorbida y mononitrato-5 de isosorbida.

(21) Vasodilatadores exógenos tales como Adenocard® y alfa bloqueadores.

(22) Antagonistas de los receptores adrenérgicos alfa-1 tales como prazosina, indoramina, urapidil, bunazosina, terazosina y doxazosina; péptido natriurético auricular (ANP), etanol, inductores de histamina, tetrahidrocannabinol (THC) y papaverina.

25 (23) Broncodilatadores de los siguientes tipos:

agonistas de  $\beta_2$  de acción corta, tales como albutamol o albuterol (Ventolin®) y terbutalina;

agonistas de  $\beta_2$  de acción prolongada (LABAs) tales como salmeterol y formoterol;

anticolinérgicos tales como pratropio y tiotropio; y

30 teofilina, un broncodilatador e inhibidor de la fosfodiesterasa.

(24) Corticosteroides tales como beclometasona, metilprednisolona, betametasona, prednisona, prednisolona, triamcinolona, dexametasona, fluticasona, flunisolida, hidrocortisona y análogos de corticosteroides tales como budesonida.

35 (25) Suplementos dietéticos tales como, por ejemplo, aceites omega-3; ácido fólico, niacina, zinc, cobre, raíz de ginseng rojo Coreano, ginkgo, corteza de pino, *Tribulus terrestris*, arginina, *Avena sativa*, hierba de cabra en celo, raíz de maca, muira puama, palma enana americana y polen de flores suecas; vitamina C, vitamina E, vitamina K2; suplementos de testosterona, parche transdérmico de testosterona; zoraxel, naltrexona, bremelanotida y melanotan II.

(26) Antagonistas del receptor PGD2.

40 (27) Inmunosupresores tales como ciclosporina (ciclosporina A, Sandimmune®, Neoral®), tacrolimus (FK-506, Prograf®), rapamicina (Sirolimus®, Rapamune®) y otros inmunosupresores tipo FK-506, micofenolato, por ejemplo, micofenolato de mofetilo (CellCept®).

(28) Antiasmáticos no-esteroides tales como agonistas de  $\beta_2$  tales como terbutalina, metaproterenol, fenoterol, isoetamina, albuterol, salmeterol, bitolterol y pirbuterol; combinaciones de corticosteroides agonistas de  $\beta_2$  tales como

5 salmeterol-fluticasona (Advair®), formoterol-budesonida (Symbicort®), teofilina, cromolín, cromolín sódico, nedocromil, atropina, ipratropio, bromuro de ipratropio e inhibidores de la biosíntesis de leucotrienos (zileutón, BAY1005).

10 (29) Agentes antiinflamatorios no-esteroides (NSAIDs) tales como derivados del ácido propiónico tales como alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, fenbufeno, fenoprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indoprofeno, ketoprofeno, miprofeno, naproxeno, oxaprozina, pirprofeno, pranoprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico y tioxaprofeno; derivados del ácido acético tales como indometacina, acemetacina, alclofenaco, clidanaco, diclofenaco, fenclofenaco, ácido fenclozico, fentiazaco, furofenaco, ibufenaco, isoxepaco, oxpinaco, sulindaco, tiopinaco, tolmetina, zidometacina y zomepirac; derivados del ácido fenámico tales como ácido flufenámico, ácido meclofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico y ácido tolfenámico; derivados del ácido bifenilcarboxílico tales como diflunisal y flufenisal; oxicam tales como isoxicam, piroxicam, sudoxicam y tenoxicam; salicilatos tales como ácido acetilsalicílico y sulfasalazina; y las pirazolonas tales como apazona, bezpiperilon, feprazona, mofebutazona, oxifenbutazona y fenilbutazona.

15 (30) Inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) tales como celecoxib (Celebrex®), rofecoxib (Vioxx®), valdecoxib, etoricoxib, parecoxib y lumiracoxib; analgésicos opioides tales como codeína, fentanilo, hidromorfona, levorfanol, meperidina, metadona, morfina, oxicodona, oximorfona, propoxifeno, buprenorfina, butorfanol, dezocina, nalbufina y pentazocina;

20 (31) Agentes antidiabéticos tales como insulina y miméticos de la insulina; sulfoníreas tales como gliburida, glibenclamida, glipizida, gliclazida, gliquidona, glimepirida, meglitinida, tolbutamida, clorpropamida, acetohexamida y olazamida; biguanidas tales como metformina (Glucophage®); inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa tales como acarbosa, epalrestat, voglibosa, miglitol; compuestos de tiazolidinona tales como rosiglitazona (Avandia®), troglitazona (Rezulin®), cigitazona, pioglitazona (Actos®) y englitazona; sensibilizadores de la insulina tales como pioglitazona y rosiglitazona; secretagogos de la insulina tales como repaglinida, nateglinida y mitiglinida; miméticos de la incretina tales como exanatida y liraglutida; análogos de la amilina tales como pramlintida; agentes que disminuyen la glucosa tales como picolinato de cromo, opcionalmente combinados con biotina; inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV tales como sitagliptina, vildagliptina, saxagliptina, alogliptina y linagliptina.

25 (32) Agentes que aumentan el colesterol HDL tales como anacetrapib y dalcetrapib.

30 (33) Medicamentos contra la obesidad tales como clorhidrato de metanfetamina, clorhidrato de anfepramona (Tenuate ®), fentermina (Ionamin ®), clorhidrato de benzofetamina (Didrex®), tartrato de fendimetrazina (Bontril®, Prelu-2 ®, Plegine ®), mazindol (Sanorex ®), orlistato (Xenical®), clorhidrato de sibutramina monohidrato (Meridia ®, Reductil ®), rimonabant (Acomplia ®), anfepramona, picolinato de cromo; combinaciones tales como fentermina/topiramato, bupropión/naltrexona, sibutramina/metformina, bupropión SR/zonisamida SR, salmeterol, xinafoato/propiónato de fluticasona; clorhidrato de lorcaserina, fentermina/topiramato, cetilistat, exenatida, liraglutida, clorhidrato de metformina, sibutramina/metformina, bupropión SR/zonisamida SR, CORT-108297, canagliflozina, picolinato de cromo, GSK-1521498, LY-377604, metreleptina, obineptida, P-57AS3, PSN-821, xinafoato de salmeterol/propiónato de fluticasona, tungstato de sodio, somatropina (recombinante), tesamorelin, tesofensina, velnheperita, zonisamida, hemioxalato de beloranib, insulinotropina, resveratrol, sobetirome, tetrahidrocannabivrina y beta-lapacona.

35 (34) Bloqueadores de los receptores de angiotensina tales como losartán, valsartán, candesartán, cilexetilo, eprosarán, irbesartán, telmisartán, olmesartán, medoxomilo, azilsartán y medoxomilo.

40 (35) Inhibidores de la renina tal como el hemifumarato de aliskiren.

(36) Agonistas de los receptores adrenérgicos alfa-2 de acción central tales como metildopa, clonidina y guanfacina.

(37) Bloqueadores de neuronas adrenérgicas tales como guanetidina y guanadrel.

(38) Agonistas del receptor de imidazolina I-1 tales como dihidrógenofosfato de rimenidina y clorhidrato de moxonidina hidrato.

45 (39) Antagonistas de la aldosterona tales como espironolactona y eplerenona.

(40) Activadores de los canales de potasio tal como el pinacidil.

(41) Agonistas de dopamina D1 tales como mesilato de fenoldopam; otros agonistas de la dopamina tales como ibopamina, dopexamina y docarpamina.

(42) Antagonistas de los 5-HT2 tal como ketanserina.

50 (43) Antagonistas de vasopresina tal como tolvaptán.

- (44) Sensibilizadores de los canales de calcio tal como levosimendan o activadores tal como nicorandil.
- (45) Inhibidores de la PDE-3 tales como amrinona, milrinona, enoximonona, vesnarinona, pimobendán y olprinona.
- (46) Activadores de la adenilato ciclase tales como clorhidrato de dapropato de colforsina.
- (47) Agentes inotrópicos positivos tales como digoxina y metildigoxina; agentes cardiotónicos metabólicos tales como ubidecarenona; péptidos natriuréticos cerebrales tal como nesiritida.
- 5 (48) Medicamentos utilizados para el tratamiento de la disfunción eréctil tal como alprostadil, aviptadil y mesilato de fentolamina.
- (49) Fármacos utilizados en el tratamiento de la obesidad, que incluyen, pero no se limitan a, clorhidrato de metanfetamina (Desoxyn®), clorhidrato de anfepramona (Tenuate®), fentermina (Ionamin®), clorhidrato de benzofetamina (Didrex®), clorhidrato de fendimetrazina (Bontril®, Prelu-2®, Plegine®), mazindol (Sanorex®) y orlistat (Xenical®).
- 10 (50) Fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y demencias tales como los siguientes tipos
- 15 inhibidores de la acetilcolinesterasa que incluyen galantamina (Razadyne®), rivastigmina (Exelon®), donepezilo (Aricept®) y tacrina (Cognex®);
- antagonistas del receptor de NMDA tal como memantina (Namenda®); e
- inhibidores de la oxidorreductasa tal como idebenona.
- (51) Medicamentos psiquiátricos tales como los siguientes tipos:
- 20 ziprasidona (Geodon™), risperidona (Risperdal™), olanzapina (Zyprexa™), valproato;
- antagonistas del receptor de dopamina D4 tal como clozapina;
- antagonistas del receptor D2 de dopamina tal como nemonaprida;
- antagonistas de los receptores mixtos de dopamina D1/D2 tal como zuclopentixol;
- moduladores del receptor GABA A tal como carbamazepina;
- 25 inhibidores de los canales de sodio tal como lamotrigina;
- inhibidores de la monoaminoxidasa tales como moclobemida e indeloxazina;
- pimavanserina, perospirona; e
- inhibidores de la PDE4 tal como rolumilast.
- (52) Fármacos utilizados para el tratamiento de trastornos o síntomas del movimiento tales como los siguientes tipos:
- inhibidores de la catecol-O-metiltransferasa tal como entacapona;
- 30 inhibidores de la monoaminoxidasa B tal como selegilina;
- moduladores del receptor de dopamina tal como levodopa;
- agonistas del receptor de dopamina D3 tal como pramipexol;
- inhibidores de la descarboxilasa tal como carbidopa;
- otros agonistas de los receptores de dopamina tales como pergolida, ropinirol, cabergolina;
- 35 ritigonida, istradefilina, talipexol; zonisamida y safinamida; e
- inhibidores del transportador de aminas vesiculares sinápticas tal como tetrabenazina.
- (53) Fármacos utilizados para el tratamiento de trastornos del estado de ánimo o afectivos u OCD, tales como los siguientes tipos
- 40 antidepresivos tricíclicos tales como amitriptilina (Elavil®), desipramina (Norpramin®), imipramina (Tofranil®), amoxapina (Asendin®), nortriptilina y clomipramina;

inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs) tales como paroxetina (Paxil®), fluoxetina (Prozac®), sertralina (Zoloft®) y citalopram (Celexa®);

doxepina (Sinequan®), trazodona (Desyrel®) y agomelatina;

inhibidores selectivos de la recaptación de norepinefrina (SNRIs) tales como venlafaxina, reboxetina y atomoxetina; 5 antidepresivos dopaminérgicos tales como bupropión y amineptina.

(54) Fármacos para mejorar la plasticidad sináptica, tales como los siguientes tipos:

antagonistas de los receptores nicotínicos tales como mecamilamina; y

agonistas mixtos de los receptores de 5-HT, dopamina y norepinefrina tal como lurasidona.

(55) Fármacos utilizados para el tratamiento del ADHD, tal como la anfetamina; moduladores del receptor de 5-HT tal 10 como vortioxetina y agonistas de los receptores adrenérgicos alfa -2 tal como clonidina.

(56) Inhibidores de la endopeptidasa neutral (NEP) tal como sacubitril, omapatrilat; y

(57) Azul de metileno (MB).

#### Kits

15 Los compuestos y formulaciones farmacéuticas descritos en la presente pueden estar contenidos en un kit. El kit puede incluir dosis únicas o múltiples de dos o más agentes, cada uno empaquetado o formulado individualmente, o dosis únicas o múltiples de dos o más agentes empaquetados o formulados en combinación. Por tanto, uno o más agentes pueden estar presentes en el primer contenedor, y el kit puede incluir opcionalmente uno o más agentes en un segundo contenedor. El contenedor o contenedores se colocan dentro de un paquete, y el paquete puede incluir opcionalmente instrucciones de administración o dosificación. Un kit puede incluir compuestos adicionales tales como

20 jeringas u otros medios para administrar los agentes, así como diluyentes u otros medios para la formulación. Por tanto, los kits pueden comprender: a) una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito en la presente y un portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; y b) un contenedor o embalaje. Los kits pueden comprender opcionalmente instrucciones que describen un método para utilizar las composiciones farmacéuticas en uno o más de los métodos descritos en la presente (por ejemplo, prevenir o tratar una o más de las

25 enfermedades y trastornos descritos en la presente). El kit puede comprender opcionalmente una segunda composición farmacéutica que comprende uno o más agentes adicionales descritos en la presente para uso de coterapia, un portador, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que comprende el compuesto descrito en la presente y la segunda composición farmacéutica contenida en el kit se pueden combinar opcionalmente en la misma composición farmacéutica.

30 Un kit incluye un contenedor o embalaje para contener las composiciones farmacéuticas y también puede incluir contenedores divididos tales como una botella dividida o un embalaje de aluminio dividido. El contenedor puede ser, por ejemplo, una caja de papel o cartón, una botella o frasco de vidrio o plástico, una bolsa resellable (por ejemplo, para contener una "recarga" de tabletas para su colocación en un contenedor diferente) o un paquete blíster con dosis individuales para exprimir del paquete de acuerdo con un programa terapéutico. Es factible que se pueda utilizar más 35 de un contenedor juntos en un solo paquete para comercializar una única forma de dosificación. Por ejemplo, las tabletas pueden estar contenidas en una botella que a su vez está contenida dentro de una caja.

40 Un ejemplo de un kit es el llamado paquete blíster. Los paquetes blíster son bien conocidos en la industria del embalaje y se están utilizando ampliamente para el embalaje de formas farmacéuticas unitarias de dosificación (tabletas, cápsulas y similares). Los paquetes blíster generalmente consisten en una hoja de material relativamente rígido cubierta con una lámina de un material plástico preferiblemente transparente. Durante el proceso de embalaje se

45 forman depresiones en la lámina de plástico. Las depresiones tienen el tamaño y la forma de tabletas o cápsulas individuales a embalar o pueden tener el tamaño y la forma para acomodar múltiples tabletas y/o cápsulas a embalar. A continuación, las tabletas o cápsulas se colocan en las depresiones de acuerdo con esto y la hoja de material relativamente rígido se sella contra la lámina de plástico en la cara de la lámina que es opuesta a la dirección en la que se formaron las depresiones. Como resultado, las tabletas o cápsulas se sellan individualmente o se sellan colectivamente, según se deseé, en las depresiones entre la lámina de plástico y la hoja. Preferiblemente, la resistencia de la hoja es tal que las tabletas o cápsulas se pueden extraer del paquete blíster aplicando presión manualmente sobre las depresiones, con lo que se forma una abertura en la hoja en el lugar de la depresión. Luego, la tableta o cápsula se puede extraer a través de dicha abertura.

50 Puede ser deseable proporcionar una ayuda para la memoria escrita que contenga información y/o instrucciones para el médico, farmacéutico o sujeto respecto de cuándo se debe tomar el medicamento. Una "dosis diaria" puede ser una sola tableta o cápsula o varias tabletas o cápsulas que se deben tomar en un día determinado. Cuando el kit contiene

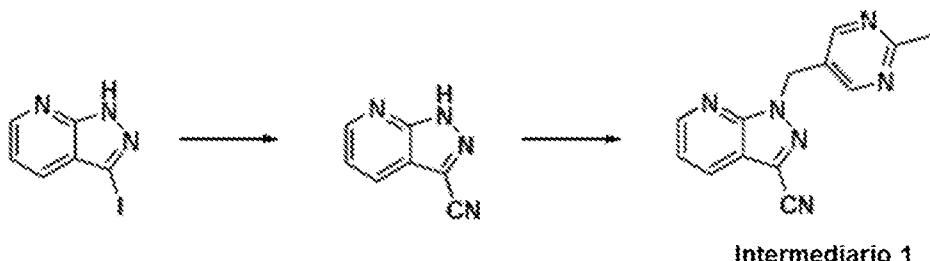
composiciones separadas, una dosis diaria de una o más composiciones del kit puede consistir de una tableta o cápsula mientras que una dosis diaria de otra o más composiciones del kit puede consistir en varias tabletas o cápsulas. Un kit puede tomar la forma de un dispensador diseñado para dispensar las dosis diarias una a la vez en el orden de uso previsto. El dispensador puede equiparse con un dispositivo de ayuda para la memoria, para facilitar aún más el cumplimiento con el régimen. Un ejemplo de este tipo de ayuda para la memoria es un contador mecánico que indica el número de dosis diarias que se han dispensado. Otro ejemplo de este tipo de ayuda para la memoria es una memoria de microchip alimentada por batería acoplada con una pantalla de cristal líquida o una señal recordatoria audible que, por ejemplo, lee en voz alta la fecha en la que se tomó la última dosis diaria y/o recuerda a uno cuándo se debe tomar la siguiente dosis.

5 10 Ejemplos

Tal como se utilizan en la presente, todas las abreviaturas, símbolos y convenciones son consistentes con los utilizados en la literatura científica contemporánea. Véase, por ejemplo, Janet S. Dodd, ed., *The ACS Style Guide: A Manual for Authors and Editors*, 2<sup>nd</sup> Ed., Washington, D.C.: American Chemical Society, 1997. Los compuestos descritos en la presente fueron preparados de acuerdo con: Roberts et al. (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 21, 6515-6518 (2011)).

15 15 Ejemplo 1: Síntesis de compuestos

Intermediario 1 (1-((2-Metilpirimidin-5-il)metil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-carbonitrilo):



El compuesto título se sintetizó en 2 pasos.

20 20 Paso 1: Síntesis de 1H-pirazolo[3,4-b]piridina-3-carbonitrilo

Se mezclaron en DMF (40 mL) cianuro de zinc (II) (1.0 g, 8.6 mmol) y 2-yodo-1H-pirazolo[3,4-b]piridina (1.4 g, 5.7 mmol) a temperatura ambiente y una corriente de nitrógeno se burbujeó a través de la solución durante 5 minutos. El complejo de diclorometano [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaladio (II) (Pd(dppf)Cl<sub>2</sub>·CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) (0.33 g, 0.40 mmol) se añadió y la solución se desgasificó durante otros 10 minutos. La reacción se mantuvo bajo una atmósfera de nitrógeno positivo y se calentó a 130°C durante 48 horas. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se filtró y el residuo se lavó con acetato de etilo. Los filtrados combinados se concentraron *in vacuo* sobre Celite® y se purificaron mediante cromatografía en columna (gradiente de EtOAc/hexanos del 20 al 70%) para proporcionar el compuesto título en forma de una sustancia ligera sólida amarilla (0.51 g, 62% de rendimiento).

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, metanol-*d*<sub>4</sub>) δ (ppm) 8.67 (dd, 1 H), 8.34 (dd, 1 H), 7.44 (dd, 1 H).

30 30 Paso 2: Síntesis de 1-((2-metilpirimidin-5-il)metil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-carbonitrilo

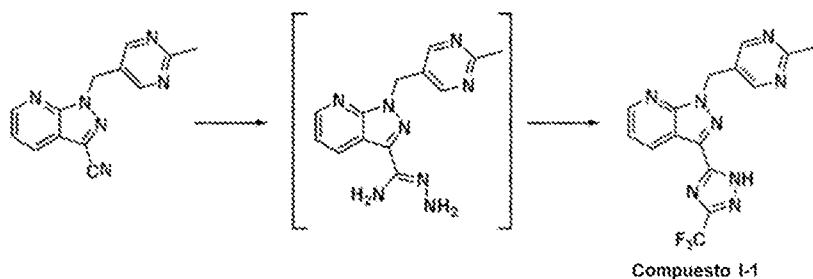
Se enfrió a 0°C una solución de trifenilfosfina (0.19 g, 0.72 mmol) en DCM/THF (1:1, 4.0 mL) y se añadió diisopropilazodicarboxilato (DIAD) (0.14 mL, 0.72 mmol) gota a gota durante 2 minutos. Despues de 30 minutos, la mezcla de la reacción se añadió a una solución de (2-metilpirimidin-5-il)metanol (0.09 g, 0.72 mmol) y 1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-carbonitrilo (0.08 g, 0.56 mmol) en THF (4.0 mL) a 0°C. La mezcla resultante se dejó calentar a temperatura ambiente durante 3 horas. La reacción se diluyó con acetato de etilo (100 mL) y se lavó con agua (3 x 10 mL) y salmuera. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró *in vacuo*. La purificación por cromatografía en columna (gradiente de EtOAc/hexanos del 25 al 100%) proporcionó el compuesto título en forma de un sólido blanco (89 mg, 64% de rendimiento).

40 <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, cloroformo-*d*) δ (ppm) 8.81 (s, 2H), 8.72 (dd, 1 H), 8.23 (dd, 1 H), 7.41 (dd, 1 H), 5.77 (s, 2 H), 2.74 (s, 3 H).

Los siguientes intermediarios relacionados estaban disponibles ya sea comercialmente o se sintetizaron de acuerdo con los métodos de la literatura (Roberts, L. R. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 6515-6518).

- 1-(2-Fluorobencil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridin-3-carbonitrilo;  
 8-(2-Fluorobencil)imidazo[1,5-a]pirimidin-6-carbonitrilo;  
 7-(2-Fluorobencil)imidazo[1,5-b]piridazina-5-carbonitrilo;  
 1-((2-Metilpirimidin-5-il)metil)imidazo[1,5-a]piridin-3-carbonitrilo;  
 5 1-(Pirimidin-5-ilmetil)imidazo[1,5-a]piridin-3-carbonitrilo; y  
 1-(2-Fluorobencil)imidazo[1,5-a]piridina-3-carbonitrilo.

## Compuesto I-1



10

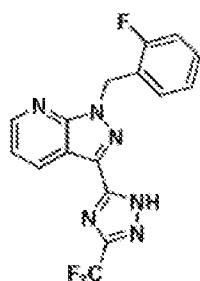
Este compuesto fue sintetizado mediante el Procedimiento General A:

A una solución de 1-((2-metilpirimidin-5-il)metil)-1H-pirazolo[3,4-b]piridina-3-carbonitrilo (Intermediario 1, 85 mg, 0.34 mmol) en etanol absoluto (3.0 mL) (nota: también se podría utilizar metanol anhídrico como solvente) se le añadió hidrazina anhídria (0.10 g, 3.2 mmol). Despues de agitar a temperatura ambiente durante 3 días y luego a 60 °C 1 día, 15 se observó la desaparición completa del material de partida. La reacción se concentró *in vacuo* y el residuo se secó *in vacuo* durante toda la noche. El residuo se recolectó en DCM (5.0 mL) y se añadió gota a gota anhídrido 2,2,2-trifluoroacético (0.05 ml, 0.34 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente hasta el consumo completo del intermediario de amidrazone. Se añadió tolueno (5.0 mL) seguido de la adición gota a gota de tricloruro de fosforilo (0.10 mL, 1.0 mmol).

20 La mezcla resultante se calentó a 65 °C durante 30 minutos en un vial sellado. La mezcla de reacción se vertió en EtOAc (100 mL) y se lavó con solución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> al 10% (2 x 10 mL) y salmuera (10 mL). La capa orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró *in vacuo*. La purificación por cromatografía en columna (gradiente de EtOAc/hexanos del 30 al 100%) proporcionó el compuesto título en forma de un sólido blanco (74 mg, 60% de rendimiento).

25 <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, cloroformo-*d*) δ (ppm) 14.5 (br s, 1 H), 9.03 (s, 2 H), 8.83 (dd, 1 H), 8.72 (dd, 1 H), 7.40 (dd, 1 H), 5.84 (s, 2 H), 2.87 (s, 3 H).

## Compuesto I-2

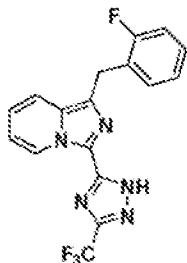


Compuesto I-2

Sintetizado de acuerdo con el Procedimiento General A como un sólido blanco (54 mg, 40% de rendimiento). Las condiciones de reacción (tales como proporción de reactivos, temperatura y tiempo de reacción) se modificaron según fue necesario.

5  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 15.7 (br s, 1 H), 8.76 (dd, 1 H), 8.67 (dd, 1 H), 7.50 (dd, 1 H), 7.37 (m, 1 H), 7.24 (m, 1 H), 7.21 (m, 1 H), 7.16 (app. t, 1 H), 5.90 (s, 2 H).

Compuesto I-3

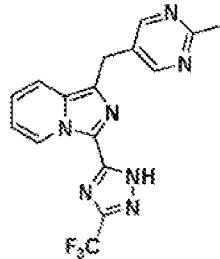


Compuesto I-3

10 Sintetizado de acuerdo con el Procedimiento General A como un sólido blanco (85 mg, 58% de rendimiento). Las condiciones de reacción (tales como proporción de reactivos, temperatura y tiempo de reacción) se modificaron según fue necesario.

15  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, metanol- $d_4$ )  $\delta$  (ppm) 9.29 - 9.35 (m, 1 H), 7.63 - 7.69 (m, 1 H), 7.29 - 7.35 (m, 1 H), 7.19 - 7.26 (m, 1 H), 6.92 - 7.11 (m, 4 H), 4.35 (d, 2 H).

Compuesto I-4



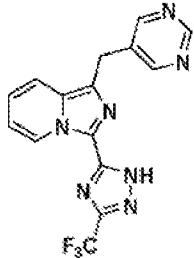
15

Compuesto I-4

Sintetizado de acuerdo con el Procedimiento General A como un sólido blanco (34 mg, 58% de rendimiento). Las condiciones de reacción (tales como proporción de reactivos, temperatura y tiempo de reacción) se modificaron según fue necesario.

20  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm) 15.6 (br s, 1 H), 9.22 (d, 1 H), 8.67 (s, 2 H), 7.96 (d, 1 H), 7.10 (m, 2H) 4.33 (s, 2H), 2.56 (s, 3H).

Compuesto I-5

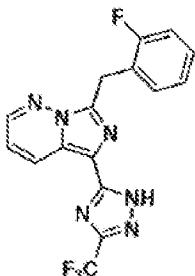


Compuesto I-5

Sintetizado de acuerdo con los métodos de la literatura (Roberts, L. R. *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 6515-6518) como un sólido de color canela (800 mg). Las condiciones de reacción (tales como proporción de reactivos, temperatura y tiempo de reacción) se modificaron según fue necesario.

5  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 15.60 (s, 1 H), 9.22 (d, 1 H), 9.05 (s, 1 H), 8.80 (s, 2 H) 7.99 (d, 1 H), 7.08 -7.14 (m, 2 H), 4.40 (s, 2 H).

Compuesto I-6

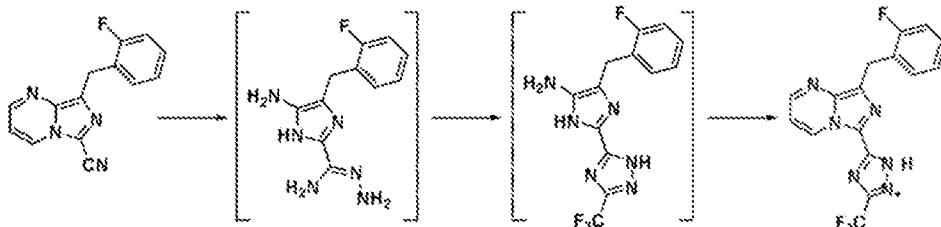


Compuesto I-6

10 Sintetizado de acuerdo con el Procedimiento General A como un sólido amarillo (12 mg, 24% de rendimiento). Las condiciones de reacción (tales como proporción de reactivos, temperatura y tiempo de reacción) se modificaron según fue necesario.

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz, metanol- *d*<sub>4</sub>)  $\delta$  (ppm) 8.58 (dd, 1 H), 8.36 (dd, 1 H), 7.25 - 7.33 (m, 2H), 7.07 - 7.13 (m, 2 H), 6.99 (dd, 1 H), 4.58 (s, 2 H).

Compuesto I-7



Compuesto I-7

15 A una solución de 8-(2-fluorobenzo)imidazo[1,5-a]pirimidina-6-carbonitrilo (110 mg, 0.44 mmol) en metanol anhídrico (3.0 mL) se le añadió hidrazina anhydrida (0.08 ml, 2.7 mmol). Después de agitar a temperatura ambiente durante 46 horas, se observó la desaparición completa de material de partida. La reacción se concentró *in vacuo* y el residuo se secó *in vacuo* durante toda la noche. El residuo (5-amino-4-(2-fluorobenzo)-1H-imidazol-2-carboximidazida) se recolectó en THF (3.0 mL) y anhídrido 2,2,2-trifluoroacético (0.07 mL, 0.54 mmol) se añadió gota a gota. Se añadió una cantidad adicional de anhídrido 2,2,2-trifluoroacético (0.05 mL, 0.36 mmol) para completar el consumo del intermediario de amidrazone. La reacción se concentró *in vacuo* y el residuo se disolvió en DCM/tolueno (proporción 1:1, 6.0 mL) seguido de la adición gota a gota de tricloruro de fosforilo (0.13 mL, 1.3 mmol). La mezcla de la reacción se calentó a 75°C durante toda la noche en un vial sellado. Después de enfriar a temperatura ambiente, se añadió solución acuosa de NaOH (1.0 N, 15 mL) y DCM (20 mL). Después de agitar durante 3 días, la mezcla resultante se neutralizó a pH ~6 - 7 con solución de HCl 6.0 N y se extrajo con DCM/iso-propanol (proporción 5:1, 4 x 30 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y concentraron para producir un aceite marrón. El residuo (4-(2-fluorobenzo)-2-(3-(trifluorometil)-1H-1,2,4-triazol-5-il)-1H-imidazol-5-amina) se recolectó en etanol absoluto (4.0 mL) y se trató con 1,1,3,3-tetrametoxipropano (0.37 ml, 2.2 mmol). Después de calentar durante 5 horas en un microondas, se añadió una cantidad adicional de 1,1,3,3-tetrametoxipropano (0.18 mL, 1.1 mmol) y la mezcla se calentó en un microondas durante 6 horas más. La mezcla de reacción se concentró *in vacuo* y el residuo se purificó utilizando HPLC preparativo de fase inversa (gradiente de 30-80% de acetonitrilo/agua con 0.1% de ácido fórmico como aditivo) para aislar el compuesto título (6.4 mg, 4.0% de rendimiento) como un sólido de color canela.

35  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm) 15.8 (br, 1 H), 9.42 (dd, 1 H), 8.45 (dd, 1 H), 7.31 - 7.23 (m, 2 H), 7.19 - 7.14 (m, 2 H), 7.09 (app. t, 1 H), 4.38 (s, 2 H).

Las síntesis de los compuestos I-8 a I-16 se describen en Roberts, L. R. et al. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011, 21, 6515-6518.

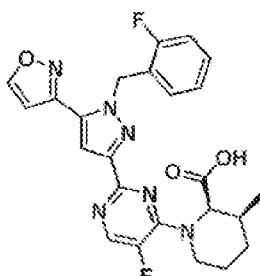
Ejemplo 2: Medición de la actividad biológica mediante el ensayo basado en células GloSensor de GMPc, formato de 384-pocillos

- 5 Se utilizaron células de riñón embrionario humano (HEK293) que expresan GloSensor™ 40F GMPc (Parte No: CS182801, Promega) para evaluar la actividad de los compuestos de prueba. Los biosensores luminiscentes (luciferasa diseñada) que se incorporaron a estas células detectan el GMPc formado por los compuestos que estimulan la enzima GCs y emiten luminiscencia.
- 10 Las células GloSensor de GMPc se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (FBS, al 10 % final) e higromicina (200 µg/ml). El día antes del ensayo, las células se sembraron en DMEM con FBS al 10% en un volumen de 50 µl a una densidad de  $1.5 \times 10^4$  células/pocillo en una placa plana de fondo blanco de-384 pocillos recubierta con poli-D-lisina (Corning No de Cat. 35661). Las células se incubaron durante toda la noche a 37°C en una cámara humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, se eliminó el medio y las células se reemplazaron con 2 mM de 40 µl/pocillo de GloSensor™ (Promega No de Cat E1291). Las células se trataron durante 15 90 minutos a 25°C para permitir que el sustrato se equilibrara en las células. Los compuestos de prueba y el NONOato de dietilenetriamina (DETA-NONOato) se diluyeron a 3 mM (20x) en medio independiente de CO<sub>2</sub> libre de suero y se diluyeron en series en diluciones 4x para crear una curva de dosis 5X a partir de la cual se agregaron 10 µl a los pocillos (concentración de x µM para la solución compuesta de la prueba y concentración de 10 µM para la solución DETA-NONOato; en el que x es una de las siguientes concentraciones finales: 30 µM, 7.5 µM, 1.9 µM, 469 nM, 117 nM, 29.3 nM, 7.3 nM, 1.83 nM, 0.46 nM, 0.11 nM, 0.03 nM).
- 20

Para los estudios de cinética, la luminiscencia se midió inmediatamente durante 0.2 segundos por pocillo con Envision (Perkin Elmer). Para el cribado de SAR de punto final, los datos se recopilaron después de 55 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Los datos se normalizaron a un control alto utilizando la siguiente ecuación:

- 25 100\*(Muestra - Control bajo)/(Control alto - Control bajo), donde el control bajo es el promedio de 16 muestras tratadas con DMSO al 1% y el control alto es el promedio de 16 muestras tratadas con 30 µM del Compuesto Y, que se muestra a continuación. Los datos se ajustaron utilizando un ajuste de 4-parámetros (log(agonista) frente a respuesta - pendiente variable) utilizando el Software GraphPad Prism v.5. n=2 para todos los compuestos. La EC<sub>50</sub> o absoluta (Abs) se interpoló a partir del ajuste de la curva y se define como la concentración a la que un compuesto determinado provoca el 50% de la respuesta de control alta después de la normalización de los datos como se indica anteriormente. Los compuestos que no logran provocar una respuesta mínima del 50% se reportan como >30 µM o ND. Para compuestos que se corren por duplicado o n superior a 2, el resultado proporcionado en la presente es la media geométrica de los diversos resultados obtenidos. La Tabla 2 resume los resultados obtenidos para compuestos seleccionados de la invención en este ensayo.
- 30



35

Compuesto Y

Tabla 2. Actividad celular completa en el ensayo basado en células GloSensor, formato de 384-pocillos (Ejemplo 2) para los compuestos en la Tabla I.

Compuesto	Sensor Glo EC50 Abs (nM)
I-5	B
I-2	A
I-6	B
I-4	B
I-3	B

I-7	B
I-1	B

Valores de actividad de la enzima GCs en células HEK, determinados mediante el ensayo GloSensor. (~) Definiciones de códigos para los valores de actividad de la enzima GCs, expresados como la EC<sub>50</sub> Absoluta, la cual se define como la concentración a la cual un compuesto determinado provoca el 50% de la respuesta de control alta (Compuesto Y) después de la normalización de los datos: EC<sub>50</sub> Abs, ≤ 10 nM = A; 10 nM < EC<sub>50</sub> Abs, o ≤ 100 nM = B; 100 nM < EC<sub>50</sub> Abs = C. Los compuestos que no logran provocar una respuesta mínima del 50% se reportan como > 30 μM o ND.

5

Ejemplo 3. Medición de la actividad biológica mediante el ensayo basado en células neuronales del GMPc

Se aislaron neuronas primarias de rata a partir de fetos de hembras Sprague-Dawley preñadas de 18-días. Los fetos se recolectaron en la solución salina equilibrada de Hanks (HBSS) y los cerebros se extrajeron rápidamente. Los hipocampos cerebrales fueron aislados y fragmentados mecánicamente. Se realizó una digestión adicional del tejido con una solución de tripsina al 0.25 % (peso/vol) en HBSS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> durante 15 minutos a 37°C. Despues de la tripsinación, las células se lavaron y se resuspendieron en medio neurobasal suplementado con 0.5 mM de L-glutamina, 12.5 uM de ácido glutámico, B-27 al 2% y 100 U/mL de penicilina, y 100 μg/ml de estreptomicina. Las células se sembraron a una densidad de 4x10<sup>4</sup> células/pocillo en una placa plana de fondo transparente de 384-pocillos recubierta con poli-D-lisina (Corning No de Cat. 354662). Las células se incubaron durante 6-7 días a 37°C en una cámara humidificada con 5% de CO<sub>2</sub>. Se eliminó el medio y las células se lavaron 1X con HBSS que contenía Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, y se reemplazó con 40 uL de HBSS que contenía 0.5 mM de IBMX, y se incubó durante 15 minutos a 37°C. Se añadieron 10 uL de una solución madre 5X de compuestos de prueba con NONOato de dietilentriamina (DETA-NO). La concentración final de DETA-NO fue de 30 μM. Las células se incubaron durante 20 min a 37°C. Se eliminó el medio, se agregaron 50 uL de ácido acético al 10% helado y se incubó durante 60 minutos a 4°C. Despues de la centrifugación a 4°C durante 5 minutos a 1000 xg para sedimentar los restos celulares, se aspiró el sobrenadante a una placa limpia y se analizó el contenido de las muestras para GMPc. Las concentraciones de GMPc se determinaron de cada muestra mediante LC-MS/MS.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

100

105

110

115

120

125

130

135

140

145

150

155

160

165

170

175

180

185

190

195

200

205

210

215

220

225

230

235

240

245

250

255

260

265

270

275

280

285

290

295

300

305

310

315

320

325

330

335

340

345

350

355

360

365

370

375

380

385

390

395

400

405

410

415

420

425

430

435

440

445

450

455

460

465

470

475

480

485

490

495

500

505

510

515

520

525

530

535

540

545

550

555

560

565

570

575

580

585

590

595

600

605

610

615

620

625

630

635

640

645

650

655

660

665

670

675

680

685

690

695

700

705

710

715

720

725

730

735

740

745

750

755

760

765

770

775

780

785

790

795

800

805

810

815

820

825

830

835

840

845

850

855

860

865

870

875

880

885

890

895

900

905

910

915

920

925

930

935

940

945

950

955

960

965

970

975

980

985

990

995

1000

1005

1010

1015

1020

1025

1030

1035

1040

1045

1050

1055

1060

1065

1070

1075

1080

1085

1090

1095

1100

1105

1110

1115

1120

1125

1130

1135

1140

1145

1150

1155

1160

1165

1170

1175

1180

1185

1190

1195

1200

1205

1210

1215

1220

1225

1230

1235

1240

1245

1250

1255

1260

1265

1270

1275

1280

1285

1290

1295

1300

1305

1310

1315

1320

1325

1330

1335

1340

1345

1350

1355

1360

1365

1370

1375

1380

1385

1390

1395

1400

1405

1410

1415

1420

1425

1430

1435

1440

1445

1450

1455

1460

1465

1470

1475

1480

1485

1490

1495

1500

1505

1510

1515

1520

1525

1530

1535

1540

1545

1550

1555

1560

1565

1570

1575

1580

1585

1590

1595

1600

1605

1610

1615

1620

1625

1630

1635

1640

1645

1650

1655

1660

1665

1670

1675

1680

1685

1690

1695

1700

1705

1710

1715

1720

1725

1730

1735

1740

1745

1750

1755

1760

1765

1770

1775

1780

1785

1790

1795

1800

1805

1810

1815

1820

1825

1830

1835

1840

1845

1850

1855

1860

1865

1870

1875

1880

1885

1890

1895

1900

1905

1910

1915

1920

1925

1930

1935

1940

1945

1950

1955

1960

1965

1970

1975

1980

1985

1990

1995

2000

2005

2010

2015

2020

2025

2030

2035

2040

2045

2050

2055

2060

2065

2070

2075

2080

2085

2090

2095

2100

2105

2110

2115

2120

2125

2130

2135

2140

2145

2150

2155

2160

2165

2170

2175

2180

2185

2190

2195

2200

2205

2210

2215

2220

2225

2230

2235

2240

2245

2250

2255

2260

2265

2270

2275

2280

2285

2290

2295

2300

2305

2310

2315

2320

2325

2330

2335

2340

2345

2350

2355

2360

2365

2370

2375

2380

2385

2390

2395

2400

2405

2410

2415

2420

2425

2430

2435

2440

2445

2450

2455

2460

2465

2470

2475

2480

2485

2490

2495

2500

2505

2510

2515

2520

2525

2530

2535

2540

2545

2550

2555

2560

2565

2570

2575

2580

2585

2590

2595

2600

2605

2610

2615

2620

2625

2630

2635

2640

2645

2650

2655

2660

2665

2670

2675

2680

2685

2690

2695

2700

2705

2710

2715

2720

2725

2730

2735

2740

2745

2750

2755

2760

2765

2770

2775

2780

2785

2790

2795

2800

2805

2810

2815

2820

2825

2830

2835

2840

2845

2850

2855

2860

2865

2870

2875

2880

2885

2890

2895

2900

2905

2910

2915

2920

2925

2930

2935

2940

2945

2950

2955

2960

2965

2970

2975

2980

2985

2990

2995

3000

3005

3010

3015

3020

3025

3030

3035

3040

3045

3050

3055

3060

3065

3070

3075

3080

3085

3090

3095

3100

3105

3110

3115

3120

3125

3130

3135

3140

3145

3150

3155

3160

3165

3170

3175

3180

3185

3190

3195

3200

3205

3210

3215

3220

3225

3230

3235

3240

3245

3250

3255

3260

3265

3270

3275

3280

3285

3290

3295

3300

3305

3310

3315

3320

3325

3330

3335

3340

3345

3350

3355

3360

3365

3370

3375

3380

3385

3390

3395

3400

3405

3410

3415

3420

3425

3430

3435

3440

3445

3450

3455

3460

3465

3470

3475

3480

3485

3490

3495

3500

3505

3510

3515

3520

3525

3530

3535

3540

3545

3550

3555

3560

3565

3570

3575

3580

3585

3590

3595

3600

3605

3610

3615

3620

3625

3630

3635

3640

3645

3650

3655

3660

3665

3670

3675

3680

3685

3690

3695

3700

3705

3710

3715

3720

3725

3730

3735

3740

3745

3750

3755

3760

3765

3770

3775

3780

3785

3790

3795

3800

3805

3810

3815

3820

3825

3830

3835

3840

3845

3850

3855

3860

3865

3870

3875

3880

3885

3890

3895

3900

3905

3910

3915

3920

3925

3930

3935

3940

3945

3950

3955

3960

3965

3970

3975

3980

3985

3990

3995

4000

4005

4010

4015

4020

4025

4030

4035

4040

4045

4050

4055

4060

4065

4070

4075

4080

4085

4090

4095

4100

4105

4110

4115

4120

4125

4130

4135

4140

4145

4150

4155

4160

4165

4170

4175

4180

4185

4190

4195

4200

4205

4210

4215

4220

4225

4230

4235

4240

4245

4250

4255

4260

4265

4270

4275

4280

4285

4290

4295

4300

4305

4310

4315

4320

4325

4330

4335

4340

4345

4350

4355

4360

4365

4370

4375

4380

4385

4390

4395

4400

4405

4410

4415

4420

4425

4430

4435

4440

4445

4450

4455

4460

4465

4470

4475

4480

4485

4490

4495

4500

4505

4510

4515

4520

4525

4530

4535

4540

4545

4550

4555

4560

4565

4570

4575

4580

4585

4590

4595

4600

4605

4610

4615

4620

4625

4630

4635

4640

4645

4650

4655

4660

4665

4670

4675

4680

4685

4690

4695

4700

4705

4710

4715

4720

4725

4730

4735

4740

4745

4750

4755

4760

4765

4770

4775

4780

4785

4790

4795

4800

4805

4810

4815

4820

4825

4830

4835

4840

4845

4850

4855

4860

4865

4870

4875

4880

4885

4890

4895

4900

4905

4910

4915

4920

4925

4930

4935

4940

4945

4950

4955

4960

4965

4970

4975

4980

4985

4990

4995

5000

5005

5010

5015

5020

5025

5030

5035

5040

5045

5050

5055

5060

5065

5070

5075

5080

5085

5090

5095

5100

5105

5110

5115

5120

5125

5130

5135

5140

5145

5150

5155

5160

5165

5170

5175

5180

5185

5190

5195

5200

5205

5210

5215

5220

5225

5230

5235

5240

5245

5250

5255

5260

5265

5270

5275

5280

5285

5290

5295

5300

5305

5310

5315

5320

5325

5330

5335

5340

5345

5350

5355

5360

5365

5370

5375

5380

5385

5390

5395

5400

5405

5410

5415

5420

5425

5430

5435

5440

5445

5450

5455

5460

5465

5470

5475

5480

5485

5490

5495

5500

5505

5510

5515

5520

5525

5530

5535

5540

5545

5550

5555

5560

5565

5570

5575

5580

5585

5590

5595

5600

5605

5610

5615

5620

5625

5630

5635

5640

5645

5650</p

Se recolectaron muestras de sangre (0.25 mL) mediante muestreo retro-orbital. Estas muestras se mantuvieron en hielo hasta su procesamiento para el plasma. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3200 rpm durante 5 minutos a aproximadamente 5°C dentro de 1 hora de la recolección. El plasma se transfirió directamente a un tubo de placa de 96-pocillos (0.125 mL). Se colocaron tapones en los tubos y los tubos se congelaron a aproximadamente -70°C y se almacenaron hasta el análisis.

5

Se recolectó el plasma y se analizó para la presencia del compuesto.

*Cuantificación de compuestos*

El compuesto en cuestión y el estándar interno se trajeron del plasma y del CSF mediante precipitación. Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida (LC) con detección espectrométrica de masas en tandem (MS/MS) mediante ionización por electropulverización. El intervalo de la curva estándar fue de 1 a 1000 ng/mL. Los resultados de los compuestos descritos en este ensayo se ilustran en la Tabla 4 a continuación.

10 K<sub>p,uu</sub> se define como la proporción de concentración del fármaco libre en el CSF con respecto al fármaco libre en el plasma. El fármaco libre en el plasma (o concentración plasmática libre) se calcula mediante la multiplicación de la concentración plasmática total por la fracción libre determinada por la unión a proteínas plasmáticas. Luego, la concentración del CSF se divide por la concentración de plasma libre para determinar la K<sub>p,uu</sub>. (Véase, por ejemplo, Di et al., *J. Med. Chem.*, 56, 2-12 (2013)).

15 Tabla 4: Propiedades PK del CSF de los compuestos seleccionados descritos en la presente (Ejemplo 4) para los compuestos en la Tabla I (a una dosis de 10 mg/kg)

Compuesto	Conc. del CSF (nM @ 1h)	K <sub>p, uu</sub> (@ 1h)
I-2	446	3.26
I-5	62.9	3.16
I-6	0.78	<0.01
I-4	180	0.96

20 Ejemplo 5: Evaluación de los compuestos de la invención sobre la transmisión sináptica y alteraciones de la plasticidad en cortes de hipocampo en ratones R6/2

Se cree que las mejoras en la transmisión sináptica y la plasticidad, medidas mediante potenciación a largo plazo (LTP), indican el potencial de un compuesto para mejorar la memoria. LTP es un fenómeno electrofisiológico que comúnmente se conoce como un fenómeno celular que impulsa el aprendizaje y la memoria.

25 *Protocolo.*

Preparación de cortes agudos del hipocampo de ratones. Los experimentos se llevaron a cabo con ratones R6/2 y WT de 11 a 12 semanas de edad proporcionados por el Laboratorio Jackson (EE. UU.). Se hicieron cortes del hipocampo (350 µm de espesor) con un picador de tejido MacIlwain en una solución de sacarosa oxigenada helada (250 de Sacarosa, 11 de Glucosa, 26 de NaHCO<sub>3</sub>, 2 de KC1, 1.2 de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7 de MgCl<sub>2</sub> y 0.5 de CaCl<sub>2</sub> en mM). Los cortes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en ACSF de la siguiente composición: 11 de Glucosa, 25 de NaHCO<sub>3</sub>, 126 de NaCl 126, 3.5 de KCl, 1.2 de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 de MgCl<sub>2</sub> y 2 de CaCl<sub>2</sub> en mM). Luego, los cortes se dejaron recuperar durante al menos 1 h.

30 35 Perfusión de cortes y control de temperatura. Durante los experimentos, los cortes se perfundieron continuamente con el ACSF (burbujeando con 95% de O<sub>2</sub> - 5% de CO<sub>2</sub>) a una velocidad de 3 mL/min con una bomba peristáltica (volumen de la cámara MEA: ~1 mL). El intercambio completo de la solución en la cámara MEA se logró 20 s después del cambio de soluciones. El líquido de la perfusión se precalentó continuamente a 37°C justo antes de llegar a la cámara MEA con una cánula de perfusión-calentada (PH01, Sistemas Multicanal, Reutlingen, Alemania). La temperatura de la cámara MEA se mantuvo a 37 ± 0.1° C con un elemento de calefacción ubicado en la cabecera del amplificador MEA.

Protocolos de estimulación/aplicación de compuestos.

40 Curva de entrada/salida (I/O): de 100 a 800 µA, en pasos de 100 µA. Luego, la intensidad del estímulo se ajustó a un valor fijo de 250 µA para las mediciones de plasticidad sináptica a corto- y largo-plazo.

45 Propiedades de plasticidad a corto-plazo: se aplicaron dos pulsos con un intervalo entre estímulos decreciente (por ejemplo, 300 ms, 200 ms, 100 ms, 50 ms, 25 ms). Aplicación del compuesto: se registraron fEPSP durante 10 minutos en condiciones de control (para verificar la estabilidad en la línea de base) seguido de una exposición de 15-minutos al compuesto (o 25 minutos en presencia de vehículo solamente para los cortes de control). Se aplicaron un segundo

protocolo I/O y un protocolo de pulsos-pareados, como se describió anteriormente, en presencia continua del compuesto.

5 *Potenciación a largo-plazo (LTP):* después de un período de control de 10-minutos (en presencia del compuesto o vehículo para los cortes de control), se indujo LTP mediante un TBS 10X. Luego se monitorizó la potenciación de la transmisión sináptica durante un período adicional de 60-minutos (en presencia continua del compuesto o vehículo para los cortes de control).

#### Resultados

10 Las características I/O fueron significativamente mayores (valor-p = 0.0146, ANOVA de dos-vías) después de la exposición a 855 nM del Compuesto I-5 en cortes de hipocampo R6/2. Las propiedades de los pulsos-pareados aumentaron significativamente (valor-p < 0.001, ANOVA de dos-vías) después de la exposición a 855 nM del Compuesto I-5 en cortes de hipocampo R6/2. La exposición a 855 nM del Compuesto I-5 durante 15 minutos no modificó la amplitud de fEPSP.

15 En cortes de hipocampo de ratones WT (condiciones de control), HFS desencadenó una potenciación de las amplitudes de respuesta-evocada que se estabilizaron alrededor del 35% (los fEPSP aumentaron en un  $36 \pm 3\%$ , en el punto final). En cortes de hipocampo de ratones R6/2 (condiciones de control), HFS desencadenó una potenciación de las amplitudes de respuesta-evocada que se estabilizaron alrededor del 15% (los fEPSP aumentaron en un  $15 \pm 2\%$ , en el punto final). Después de la exposición a 855 nM del Compuesto I-5, HFS desencadenó una potenciación de la amplitud de la respuesta evocada alrededor del 40% (los fEPSP aumentaron en un  $40 \pm 6\%$ , en el punto final). (FIG. 1) Por tanto, la potenciación en los cortes R6/2 se aumentó significativamente (valor-p = 0.0002, ANOVA de dos-vías) en comparación con los cortes de control R6/2.

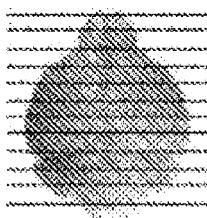
#### Conclusiones.

20 Las características I/O y las propiedades de pulso-pareado se aumentaron después de la exposición a 855 nM del Compuesto I-5 en cortes de hipocampo de ratones R6/2. 855 nM del Compuesto I-5 carecieron de efecto sobre la transmisión sináptica basal en cortes de hipocampo de ratones R6/2, durante un período de exposición de 15-minutos. El déficit de LTP de los cortes del hipocampo R6/2 se restableció al nivel de amplitud de LTP de los cortes del hipocampo WT después de la exposición a 855 nM del Compuesto I-5.

#### Ejemplo 6: GMPc inducido por compuestos en cerebro de ratón

Objetivo. Determinar el efecto de un compuesto de la invención en la respuesta del GMPc en diferentes áreas del cerebro del ratón (corteza, hipocampo, cerebelo y cuerpo estriado).

30 *Protocolo.* A los ratones (n = 9-10 por condición experimental) se les administró P.O. con vehículo (1% de hidroxipropilmelcelulosa, 0.2% de Tween80, 0.5% de metilcelulosa), P.O. con 10 mg/Kg del Compuesto I-2. Treinta minutos después de la dosificación, bajo anestesia con isoflurano, se decapitó a cada ratón, se extrajo su cerebro y se colocó en una placa de Petri helada que contenía una solución de disección fangosa (saturada con 95% de O<sub>2</sub>, 0.5% de CO<sub>2</sub>). Utilizando una espátula helada, el cerebro se transfirió a una matriz de cerebro de ratón con espacio coronal para cortar a intervalos de 1 mm, como se esquematiza en la figura a continuación (no a escala, solo un esquema).



40 El cerebro cortado se transfirió nuevamente a una placa de petri que contenía una solución de disección fangosa con 0.5 mM de IBMX (saturada 95% de O<sub>2</sub>, 0.5% de CO<sub>2</sub>). Primero se diseña el cuerpo estriado dorsal, seguido por el hipocampo en segundo lugar, seguido por la corteza prefrontal medial en tercer lugar y, por último, el cerebelo en cuarto lugar. Después de diseccionar cada región, el "pedazo" de tejido se colocó inmediatamente en un Eppendorf que se había colocado en hielo seco durante los 30 minutos anteriores. Pequeños trozos de tejido se congelaron muy rápido, dentro de aproximadamente 10 segundos. Después de colocar todas las regiones en un eppendorf, los eppendorf se congelaron instantáneamente mediante inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras de tejido se almacenaron a -80°C. Los niveles del GMPc en el cerebro se determinaron mediante LC/MS. Las muestras de cerebro se homogeneizaron en un amortiguador acuoso que constaba de 80:20 (V/V%) de agua:ácido acético utilizando una

sonda ultrasónica. Los homogeneizados de cerebro que contenían compuestos de la GCs y/o del GMPc se extrajeron del tejido cerebral mediante precipitación de proteínas con un solvente orgánico que contenía estándares internos (IS), seguido de filtración y eliminación de fosfolípidos utilizando una placa de eliminación de fosfolípidos Phree™ Phenomenex®. Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida (LC) con detección espectrométrica de masas en tandem (MS/MS) utilizando ionización por electropulverización. Las concentraciones de la curva estándar utilizadas para la cuantificación del GMPc y/o compuestos de la GCs oscilaron de 0.2 a 400 ng/mL. La cuantificación de proteínas de las muestras de cerebro se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas de BCA.

5 **Conclusión.** Dosificación aguda de 10 mg/Kg del Compuesto I-2 P.O. en ratones indujo un aumento significativo del GMPc en el hipocampo (ANOVA  $p=0.0022$ ; Vehículo frente al Compuesto I-2  $p=0.0035$ ), cerebelo (ANOVA  $p<0.0001$ ; Vehículo frente al Compuesto I-2  $p=0.0001$ ) y corteza (ANOVA  $P=0.012$ ; Vehículo frente al Compuesto I-2  $p=0.017$ ).

10 Tabla 6a: La concentración del GMPc en el hipocampo del ratón se normalizó con respecto a la concentración de proteínas en las muestras.

Hipocampo: nM de GMPc/μg de proteína	
Vehículo P.O.	Compuesto I-2 P.O. (10 mg/Kg)
0.033	0.072

15 Tabla 6b. La concentración del GMPc en el cuerpo estriado del ratón se normalizó con respecto a la concentración de proteínas en las muestras.

Cuerpo estriado: nM de GMPc/μg de proteína	
Vehículo P.O.	Compuesto I-2 P.O. (10 mg/Kg)
0.062	0.104

Tabla 6c: La concentración del GMPc en el cerebelo del ratón se normalizó con respecto a la concentración de proteínas en las muestras.

Cerebelo: nM de GMPc/μg de proteína	
Vehículo P.O.	Compuesto I-2 P.O. (10 mg/Kg)
0.364	0.681

20 Tabla 6d: La concentración del GMPc en la corteza del ratón se normalizó con respecto a la concentración de proteínas en las muestras.

mPFC: nM GMPc/μg de proteína	
Vehículo P.O.	Compuesto I-2 P.O. (10 mg/Kg)
0.075	0.124

#### Ejemplo 7. Prueba de Reconocimiento de Objetos Novedosos (NOR)

25 **Objetivo.** Para evaluar la eficacia de los compuestos de la invención para revertir la alteración de la memoria inducida por MK-801 utilizando la prueba de Reconocimiento de Objetos Novedosos (NOR) en ratas macho Long Evans. El NOR es una prueba de aprendizaje por reconocimiento y recuperación de memoria, la cual aprovecha la preferencia espontánea de los roedores por investigar un objeto novedoso en comparación con uno familiar (Ennaceur and Delacour, 1988). Los estudios indicaron que el procedimiento NOR involucra varias regiones del cerebro, incluida la corteza périrhinal (Ennaceur et al. 1996, 1997 y Aggleton et al. 1997) y el hipocampo (Wood et al. 1993 y Clark et al. 2000). La prueba NOR se ha empleado ampliamente para evaluar las posibles propiedades de mejora cognitiva de compuestos nuevos de prueba. Debido a que el paradigma NOR no implica recompensa ni estímulos nocivos, proporciona menos variables de confusión cuando se traduce en pruebas análogas realizadas en ensayos clínicos en humanos. En el presente estudio, se utilizó un modelo de ahorro de memoria para probar el nuevo compuesto: MK-801 (Dizocilpina), un antagonista no competitivo del receptor de NMDA que se utilizó para causar un déficit de memoria de reconocimiento. Los compuestos de la invención se evaluaron mediante su eficacia para revertir el deterioro de la memoria.

#### Material y métodos

**Animales.** En este estudio se utilizaron ratas Long-Evans macho adultas (275-299 gramos a su llegada desde Envigo, Indianápolis, IN). Se colocaron ratas en las salas experimentales y se les asignaron números de identificación únicos (marcas en la cola). Se alojaron 2 ratas por jaula en jaulas de policarbonato con tapas de filtro y se aclimataron durante al menos 7 días antes de la prueba. La sala de animales se mantuvo en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h (las luces se encienden a las 07:00 EST).  $22 \pm 1$  °C y humedad relativa aproximada del 50%. Se proporcionó agua y comida *ad libitum*. Todos los animales fueron examinados, manipulados y pesados antes del estudio para asegurar una salud adecuada y minimizar el estrés no-específico asociado con las pruebas. Cada animal fue asignado aleatoriamente entre los grupos de tratamiento. Los experimentos se realizaron durante la fase del ciclo de luz del animal.

**Compuestos de prueba.** En este estudio se utilizaron los siguientes compuestos:

10 Se disolvió MK-801 (0.1 mg/kg; *Sigma-Aldrich*) en salina y se inyectó IP 15 minutos antes del entrenamiento NOR.

Se disolvió galantamina (1 mg/kg; *Tocris*) en salina y se inyectó IP 15 minutos antes del entrenamiento.

El compuesto I-2 (0.1, 1 y 10 mg/kg) se administró por vía oral 60 minutos antes del entrenamiento. El vehículo era 0.5% de Metilcelulosa, 0.2% de Tween y 1% de HPMC en agua filtrada. El volumen de dosis fue de 4 ml/kg.

15 **Procedimientos experimentales.** La prueba NOR se llevó a cabo en una arena de campo-abierto (40 x 40 cm) ubicada en una habitación con el sonido-attenuado y bajo iluminación tenue. Cada rata fue analizada por separado y se tuvo cuidado de eliminar las señales olfativas/gustativas limpiando la arena y los objetos de prueba con 70% de alcohol entre ensayos y ratas. Todas las pruebas de entrenamiento y prueba fueron grabadas en video y calificadas por un observador ciego a los tratamientos.

20 En los días 1 y 2, se les permitió a las ratas explorar libremente la arena (sin objetos dentro) durante un período de habituación de 5-minutos. En el día 3 (día de entrenamiento y prueba), se les administró a las ratas vehículo (salina), galantamina o soluciones compuestas seguidas de MK-801 o vehículo (salina). Después del tiempo de pretratamiento, cada animal fue colocado en la arena de prueba en presencia de dos objetos idénticos. Cada rata fue colocada en la arena mirando en la misma dirección en la misma posición, y se registró el tiempo dedicado a explorar activamente los objetos durante un período de entrenamiento (T1) de 3-minutos. La rata fue devuelta a su jaula hogar después del entrenamiento. La prueba NOR (T2) se realizó 1 hora después de T1. Cada rata fue colocada nuevamente en la arena de prueba en presencia de un objeto familiar y un objeto novedoso durante 5 minutos, y el tiempo dedicado a explorar ambos objetos se registró durante intervalos de tiempo de 0-1, 0-3 y 0-5 minutos. El orden de presentación y la posición de los objetos (izquierda/derecha) en T2 se aleatorizó entre ratas para evitar sesgos por orden o preferencia de lugar.

30 **Ánalisis estadístico.** Los datos de la prueba NOR (T2) se expresaron como Índice de Reconocimiento, el cual se define como la proporción entre el tiempo dedicado a explorar el objeto novedoso sobre el tiempo total dedicado a explorar ambos objetos (Novedoso / (Familiar + Novedoso) x 100%) durante la sesión de prueba. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una-vía seguido de la prueba *post hoc* LSD de Fisher en intervalos de tiempo de 0-1, 0-3 y 0-5 minutos por separado, con significación establecida en  $P < 0.05$ . Se eliminaron los animales con un tiempo total de exploración de objetos inferior a 10 segundos en la sesión de prueba de 5 minutos; las ratas con un índice de reconocimiento superior al 90% o inferior al 30% también fueron eliminadas porque sugieren un fuerte sesgo (no de memoria) entre dos objetos. Y luego se eliminaron del análisis final los valores atípicos estadísticos que caían por encima o por debajo de dos desviaciones estándar de la media.

40 **Resultados.** Ninguna de las ratas de este estudio mostró efectos secundarios obvios en ninguna dosis. Las ratas mantuvieron un nivel normal de vigilancia, actividad y exploración de los objetos. La ANOVA mostró efectos principales del tratamiento insignificantes en el Índice de Reconocimiento durante el intervalo de tiempo de 0 - 1 min [ $F(5.79)=1.305$ ,  $P>0.05$ ], principalmente porque las ratas tratadas con MK-801 mantuvieron una memoria de reconocimiento relativamente buena en este intervalo de tiempo. Este resultado en 0-1 min no es raro en esta versión de NOR porque al comienzo de la prueba la "novedad" y "familiaridad" de los objetos son relativamente claras. Por lo general, las ratas se desempeñan progresivamente peor en el grupo MK-801 a menos que se aplique un potenciador de la memoria. Durante el intervalo de tiempo de 0 - 3 minutos, la ANOVA encontró un efecto principal del tratamiento significativo [ $F(5.79)=4.237$ ,  $P<0.01$ ]. La prueba *post hoc* mostró que 0.1 mg/kg de MK-801 causaba un fuerte déficit de memoria, con un Índice de Reconocimiento cercano al nivel de probabilidad (50%). La galantamina (1 mg/kg) y el Compuesto I-2 a 0.1 mg/kg revirtieron significativamente los déficits de memoria inducidos por MK-801 ( $P<0.001$  y  $P<0.05$ , respectivamente, en comparación con el grupo Vehículo / MK-801). De manera similar, la ANOVA mostró un efecto de tratamiento principal significativo durante el intervalo de tiempo de 0 - 5 minutos [ $F(5.79)=3.851$ ,  $P<0.01$ ]. La prueba *post hoc* mostró que 0.1 mg/kg de MK-801 causaba un fuerte déficit de la memoria, con un Índice de Reconocimiento cercano al nivel de probabilidad (50%). La galantamina (1 mg/kg) y el Compuesto I - 2 a 0.1 mg/kg revirtieron significativamente los déficits de memoria inducidos por MK-801 ( $P<0.001$  y  $P<0.05$ , respectivamente, en comparación con el grupo Vehículo / MK-801).

55 Tabla 10. Sumario de mediciones del Índice de Reconocimiento (periodo de tiempo de 0 a 3 minutos)

Tratamiento	número-n	Media	Desviación estándar	Error Estándar de la Media	Ánálisis estadístico (valor-p)
Vehículo + Control Salino	13	73.78	9.95	2.761	<0.001
Vehículo + MK-801	13	56.92	13.93	3.86	N/A
Galantamina + MK-801	14	73.33	9.34	2.50	<0.001
I-2 (0.1 mg/kg) + MK-801	13	68.21	11.99	3.33	0.017
I-2 (1 mg/kg) + MK-801	14	63.98	10.41	2.78	0.125
I-2 (10 mg/kg) + MK-801	13	61.76	14.54	4.03	0.299

Se realizan comparaciones estadísticas con el grupo de tratamiento "Vehículo + MK-801". Se considera significancia estadística cuando el valor de p es inferior a 0.05.

*Sumario.* El compuesto de referencia galantamina (1 mg/kg) revirtió significativamente el déficit cognitivo inducido por 0.1 mg/kg de MK-801, lo que sugiere la validez de la prueba. El compuesto de prueba I-2 a 0.1 mg/kg también mostró 5 eficacia para guardar la memoria NOR después del tratamiento con MK-801, lo que sugiere que este compuesto posee propiedades de mejora de la memoria.

#### Ejemplo 8: fosforilación de pCREB en neuronas primarias de rata

*Objetivo.* Evaluar la capacidad del Compuesto I-5 para activar la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB) en neuronas primarias de rata. CREB es un factor de transcripción celular. Se une a secuencias de ADN 10 denominadas elementos de respuesta a AMPc (CRE) y regula la transcripción de los genes río abajo (véase Bourchuladze R, *et al.*, Cell 1994; 79(1): 59-68). CREB tiene un papel bien-dокументado en la plasticidad neuronal y la formación de la memoria a largo-plazo en el cerebro y se ha demostrado que es integral en la formación de la memoria espacial (Véase Silva AJ, *et al.*, Annual Review of Neuroscience 1998; 21: 127 -148). Las proteínas CREB 15 se activan mediante la fosforilación de la Serina 133 por varias cinasas, incluida la proteína cinasa dependiente de AMPc o Proteína Cinasa A (PKA), la proteína cinasa dependiente de GMPc o Proteína Cinasa G (PKG) y las proteínas cinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup>/calmodulina. (Véase Shaywitz AJ and Greenberg ME, Annual Review of Biochemistry 1999; 68 (1): 821-861 y Wong JC, *et al.*, J Cell Biochem 2012; 113(11):3587-98). La estimulación de CREB podría tener beneficios terapéuticos para enfermedades en las que la cognición, plasticidad neuronal o función neuronal están alteradas.

#### 20 Materiales y métodos.

*Compuestos.* El compuesto I-5 se disolvió en DMSO como una solución 10 mM y se almacenó a -20°C. Para lograr las concentraciones de prueba deseadas, las concentraciones madre se diluyeron en serie en DMSO y luego se diluyeron a la concentración adecuada en amortiguador de ensayo.

*Cultivo de neuronas primarias de rata.* Se aislaron neuronas de embriones de rata Sprague Dawley en el día 25 embrionario 18 (E18). Se obtuvieron aproximadamente 10 embriones de cada rata y se aislaron cerebros completos de los embriones. Se diseccionaron el hipocampo y la corteza del cerebro bajo un microscopio estereoscópico utilizando dos pares de pinzas finas. Se retiraron las meninges con cuidado. Después de la disección, los tejidos se cortaron y se lavaron suavemente una vez con 10 mL de solución de Hank libre Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (HBSS, Cat. Corning #21-022-CM) en un tubo cónico de 15 mL. Después del lavado, se añadieron 5 mL de una solución de tripsina al 0.25% 30 (Invitrogen Cat. # 15090-046) y 0.1 % de desoxirribonucleasa I (DNase I, Sigma Cat. # DN-25) a los tejidos en el tubo, que luego se incubaron a 37°C durante 15 min. Después de la incubación y digestión con las enzimas, los tejidos se lavaron tres veces con HBSS helado. Después del lavado, se agregaron al tubo 3 mL de una solución de DNase I al 0.1% y los tejidos se pipetaron lentamente utilizando una pipeta Pasteur de vidrio 12 veces, y luego se centrifugaron a 500xg durante 10 min. La pella celular se resuspendió en el medio de cultivo (medio Neurobasal, Gibco Cat. # 21103-049), suplemento de B27 al 2% (Gibco Cat. # 17504-044), 0.5 mM de L-glutamina (Corning Cat. # 25-005-Cl), 25 μM de ácido L-glutámico (Sigma Cat. # G1251) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco Cat. # 15070-063)). 35 Posteriormente, la suspensión celular se sembró en placas de 96-pocillos recubiertas con poli-L-lisina a 100,000 células/pocillo. Veinticuatro horas después del cultivo en placas, se eliminó la mitad del medio de cultivo y se reemplazó con medio de cultivo como se describió anteriormente, pero sin ácido glutámico. Las células se mantuvieron en una incubadora humidificada a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> y se utilizaron entre los días 6-10.

*Condiciones de ensayo.* Para cada concentración de prueba, el Compuesto I-5 se diluyó en DMSO al 100% hasta 100-veces su concentración de ensayo final. Inmediatamente antes del ensayo, el Compuesto I-5 se diluyó 10-veces en HBSS (que contiene calcio y magnesio) (10x la concentración final del ensayo) que contiene 100 μM de DETA-

NONOato (10x la concentración final del ensayo). Se eliminó el medio y las células se lavaron una vez con 90  $\mu$ l de HBSS (Corning cat. # 21-023-CV). Luego, las células se incubaron con 90  $\mu$ l de HBSS durante 30 minutos a 37°C. Se añadieron 10  $\mu$ l de la placa del artículo de prueba/HBSS/DETA-NONOato a las células, las cuales se incubaron durante 30 minutos adicionales a 37°C. Las concentraciones finales de DMSO fueron del 1%, la concentración final de DETA-NONOato fue de 30  $\mu$ M; y las concentraciones finales del Compuesto I-5 fueron 10,000 nM, 1000 nM, 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0.1 nM, 0.01 nM y 0.0 nM. Se eliminó el medio, se lavaron las células y se realizó el ensayo de acuerdo con el protocolo Cisbio (fosfo-CREB (Ser133) Cat. # 64CREPEG) y se leyó la placa utilizando el instrumento Envision (PerkinElmer).

5 *Análisis de datos.* Los datos se analizaron con un ajuste de 4-parámetros (log(agonista) frente a respuesta - pendiente variable) utilizando el Software GraphPad Prism v.7. La EC<sub>50</sub> se interpoló a partir del ajuste de la curva y se define como la concentración a la cual el Compuesto I-5 provoca el 50% de su respuesta máxima.

10 *Resultados.* La fosforilación de CREB en Ser133 estimulada por el Compuesto I-5 era dependiente de la concentración, con una EC<sub>50</sub> de 0.55 nM. El intervalo de confianza del 95% osciló de 0.07 nM a 4.44 nM.

15 **Ejemplo 9. Evaluación de Compuestos de la Invención en Modelos y de Dolor y Pruebas**

20 *Objetivo.* Evaluar la eficacia de los compuestos de la invención en el dolor agudo y tónico, dolor neuropático, dolor inflamatorio, dolor postoperatorio y dolor visceral.

Materiales y métodos:

25 *Prueba de presión de la pata.* Se mide la hiperalgesia mecánica estática. Esta prueba requiere la aplicación de una presión creciente sobre las patas traseras entre una superficie plana y un puntero afilado. Para evaluar la acción analgésica de un compuesto, una pata trasera del animal se inflamó mediante una inyección o se lesionó mediante ligadura, mientras que la otra pata trasera no resultó lesionada ni inflamada. El aparato ejerció una fuerza cada vez mayor sobre las patas traseras. El umbral de reacción se determinó como la presión (g) requerida para provocar el retiro de la pata y/o la vocalización. El experimentador manejó suavemente a los animales y se evaluó la hiperalgesia mecánica estática dos veces en ambas patas traseras.

30 *Prueba de movimiento de la cola.* Se aplicó un calor radiante en la cola. Cuando la rata sentía malestar, reaccionaba con un movimiento brusco de la cola (movimiento de la cola) el cual detenía automáticamente la estimulación y el cronómetro para medir el tiempo de reacción del animal o la reacción nociceptiva de latencia (período desde el inicio de la estimulación hasta la detección de la respuesta del animal). Previamente se fijó un límite en 10 segundos para evitar daños al tejido.

35 *Prueba de ácido acético.* La contracción abdominal se indujo mediante inyección intraperitoneal en ratas de una solución de ácido acético al 0.6% (10 mL/kg). El número de contorsiones (una torsión o contorsión del cuerpo debido al dolor) se registró desde los 5 hasta los 15 minutos después de la inyección.

40 *Prueba de formalina.* Se inyectó solución de formalina al 2.5% por vía subplantar en la pata trasera derecha. La puntuación del comportamiento del dolor se realizó en ratas durante 36 minutos cada 3 minutos de acuerdo con las siguientes puntuaciones:

0 = comportamiento normal de la extremidad trasera inyectada para sostener el cuerpo.

1 = ligero toque de la pata inyectada en el suelo para apoyar ligeramente o no el cuerpo

2 = retirada total de la pata inyectada

3 = lamer, morder o sacudir la pata inyectada.

45 *Modelo de Bennett.* La mononeuropatía periférica se indujo mediante ligadura laxa del nervio ciático en ratas anestesiadas (Xilazina 10 mg/kg i.p., ketamina 60 mg/kg i.p.) en D<sub>14</sub>. Brevemente, el nervio ciático común quedó expuesto al nivel de la mitad del muslo mediante disección roma a través del bíceps femoral. Proximal a la trifurcación ciática, se ataron cuatro ligaduras laxas a su alrededor con un espacio de alrededor de 1-mm. Se tuvo mucho cuidado al atar las ligaduras, de modo que se vio que el diámetro del nervio estaba apenas restringido. Despues de la cirugía, los animales se recuperaron durante 4 días; las pruebas se realizaron 10 días después del período de recuperación (es decir, 14 días después de la cirugía).

*Oxaliplatino.* Inducción: Se indujo neuropatía periférica aguda mediante una única inyección intraperitoneal de oxaliplatino (6 mg/kg, i.p) 30 horas antes de la prueba. Prueba de acetona: La alodinia fría se midió mediante la prueba de acetona. En esta prueba, la latencia de retirada de la pata trasera se midió después de la aplicación de una gota

de acetona (50  $\mu$ L) a la superficie plantar de ambas patas traseras tres veces para ambas patas traseras alternativamente con intervalos de aproximadamente 2-3 minutos.

*Caragenano.* Inducción: Tres horas antes de la evaluación del umbral nociceptivo mediante la prueba de presión de la pata, se inyectaron 100  $\mu$ L de una suspensión de carragenina al 2% en la cara plantar de la pata trasera derecha.

5 Luego se realizó la prueba de Presión de la Pata como se describió anteriormente.

*Caolín.* Inducción: En ratas, se indujo artritis unilateral mediante una inyección intraarticular de una suspensión de caolín al 10% en la articulación de la rodilla de la pata trasera derecha bajo anestesia de gas (isoflurano al 3.5%/3 L/min). Puntuación de la marcha: La puntuación de la marcha se evaluará 3h 30 min después de la administración de caolín mediante:

10 0: marcha normal

1: discapacidad media

2: elevación intermitente de la pata

3: pata elevada.

15 *Modelo de Brennan.* Cirugía: La cirugía se realizó bajo anestesia de gas (isoflurano al 2.5% / 3L/min). Para todas las ratas, se expuso la cara plantar de la pata trasera izquierda y se realizó una incisión longitudinal de 1 cm utilizando un bisturí quirúrgico, a través de la piel y la fascia de la cara plantar del pie, comenzando a 0.5 cm del borde proximal del talón y extendiéndose hacia los dedos de los pies. El músculo plantar se elevó y se cortó longitudinalmente mientras las inserciones permanecían intactas. Después de la hemostasia con una suave presión, se suturó la piel con dos suturas. Después de la cirugía, los animales se recuperaron en sus jaulas.

20 *Prueba electrónica de Von Frey.* La alodinia táctil se evaluó mediante la prueba electrónica de Von Frey 24 h después de la cirugía. La prueba requiere la aplicación de una presión creciente sobre la cara plantar de las patas traseras. El aparato ejerció una fuerza constante en las patas traseras. Los umbrales de reacción se determinaron como la presión (g) requerida para provocar la retirada de la pata. Cada medición del umbral de reacción se repitió tres veces para ambas patas traseras con intervalos de aproximadamente 2 a 3 minutos.

25 *TNBS.* Cirugía: La sensibilidad del colon se indujo mediante la administración quirúrgica de TNBS siete días antes de la prueba de comportamiento (D-7). Los animales en ayunas (durante toda la noche) se sometieron a cirugía. Brevemente, bajo anestesia (Xilazina 10 mg/kg i.p., ketamina 60 mg/kg i.p.), se realizó una inyección de TNBS (50 mg/kg, 1 mL/kg) en la parte proximal del colon (a 1 cm del ciego). Después de la cirugía, los animales regresaron a sus jaulas en un ambiente regulado, y fueron alimentados *ad libitum* hasta D-1. (los animales estuvieron en ayunas 24

30 horas antes de la distensión). Distensión colorrectal: siete días (D<sub>0</sub>) después de la inyección de TNBS, se evaluó la sensibilidad del colon de los animales en ayunas (durante toda la noche) midiendo la presión intra-colónica necesaria para inducir una respuesta de comportamiento durante la distensión del colon. Para realizar la distensión, se insertó suavemente un globo de 5-cm en el colon de los animales en vigilia a 10 cm del ano y se pegó el catéter a la base de la cola. Después de un período de aclimatación de 30 minutos con el balón insertado, la presión colónica se aumentó gradualmente en pasos de 5 mm de Hg cada 30 segundos, de 5 a 75 mm de Hg (límite) hasta que se evidenció una conducta de dolor. La conducta de dolor se caracterizó por una elevación de la parte posterior del cuerpo del animal y una contracción abdominal claramente visible correspondiente a un calambre severo. Se realizaron dos determinaciones.

35 40 Los resultados para los modelos de dolor agudo y tónico, dolor neuropático, dolor inflamatorio, dolor posoperatorio y dolor visceral y pruebas para animales tratados con 10 mg/kg del Compuesto I-1 PO fueron significativos y se presentan a continuación.

#### Resultados

Modelo de Dolor	Modelo-prueba	Compuesto I-2, p.o., 10 mg/kg	Referencia Interna	
		% de actividad frente vehículo	ID de Referencia	% de actividad frente a vehículo
Dolor Agudo y Tónico	Ratas sanas-prueba de presión de la pata	-10%	4 mg/kg de morfina s.c.	69%
	Ratas sanas-prueba de movimiento de la cola	15%	4 mg/kg de morfina s.c.	66%

	Prueba de ácido acético- calambres abdominales	59%	(-) U50, 488 H 3 mg/kg s.c.	100%
	Prueba de formalina- Puntuación (fase temprana)	61%	4 mg/kg de morfina s.c.	57%
	Prueba de formalina- Puntuación (fase tardía)	11%	4 mg/kg de morfina s.c.	38%
Dolor Neuropático	Modelo de Bennett- prueba de presión de la pata	65%	3 mg/kg de morfina s.c.	191%
	Oxaliplatino- prueba de acetona (tiempo de reacción)	127%	100 mg/kg de gabapentina, po	82%
Dolor Inflamatorio	Carragenina- prueba de presión de la pata	75%	30 mg/kg de indometacina, po	100%
	Caolín- puntaje de marcha	88%	10 mg/kg de indometacina, po	58%
Dolor postoperatorio	Modelo de Brennan- prueba Electrónica de Von Frey	16%	4 mg/kg de morfina s.c.	88%
Dolor Visceral	TNBS- Distensión colorrectal	43%	(-) U50, 488 H 3 mg/kg s.c.	103%

Prueba: 120 minutos después del tratamiento. N = 4 / modelo/ prueba. Los resultados se expresan para cada grupo como un porcentaje de actividad calculado a partir del valor medio de los animales tratados con vehículo y se compara con los animales simples, la pata de control o el valor límite, dependiendo de la prueba.

- 5 Conclusiones. El compuesto I-2 demostró efectos en las pruebas de ácido acético y formalina para el dolor agudo. El compuesto I-2 demostró efectos en los modelos de dolor neuropático del modelo de Bennett/Prueba de presión de la pata y de la prueba de Oxaliplatino-Acetona. El compuesto I-2 demostró efectos en la prueba de carragenina-presión de la pata y en los modelos de puntuación de dolor inflamatorio de caolín- marcha. El compuesto I-2 demostró efectos en el modelo de Brennan-prueba de modelo electrónico de Von Frey para el dolor postoperatorio. El compuesto I-2 demostró efectos en el modelo de prueba de TNBS- distensión colorrectal para el dolor visceral.
- 10 Ejemplo 10. GMPc inducido por el compuesto dosis-respuesta en cerebro de ratón

Objetivo. Determinar el efecto de diferentes dosis de un compuesto de la invención en la respuesta del GMPc en el cerebro de ratón (telencéfalo)

- 15 Protocolo. Día experimental 1: Ratones en ayunas durante toda la noche con acceso *ad libitum* al agua. Día experimental 2: Se administró a los ratones (n=10 por condición experimental) P.O. con vehículo (1% de hidroxipropilmelcelulosa, 0.2% de Tween80, 0.5% de metilcelulosa), 3 o 10 mg/Kg del Compuesto I-2 preparado en vehículo. Treinta minutos después de la dosificación, bajo anestesia con isoflurano, se decapitó a cada ratón y se les extrajo el cerebro. El telencéfalo se separó de cada cerebro y se colocó en tubos Falcon separados de 15 ml y se congeló instantáneamente mediante inmersión en nitrógeno líquido. Las muestras de tejido se almacenaron a -80°C.
- 20 Los niveles del GMPc en el cerebro se determinaron mediante LC/MS. Las muestras de cerebro se homogeneizaron en un amortiguador acuoso que consistía de 80:20 (V/V%) de agua:ácido acético utilizando una sonda ultrasónica. Los homogeneizados de cerebro que contenían compuestos de la GCs o del GMPc se extrajeron del tejido cerebral mediante precipitación de proteínas con un solvente orgánico que contenía estándares internos (IS), seguido de filtración y eliminación de fosfolípidos utilizando una placa de eliminación de fosfolípidos Phree™ Phenomenex®. Las muestras se analizaron mediante cromatografía líquida (LC) con detección espectrométrica de masas en tandem (MS/MS) mediante ionización por electropulverización. Las concentraciones de la curva estándar utilizadas para la cuantificación del GMPc o compuestos de la GCs oscilaron de 0.2 a 400 ng/ml. La cuantificación de proteínas de muestras de cerebro se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA.
- 25

*Conclusión.* Dosificación aguda del Compuesto I-2 a 10 y 3 mg/Kg P.O. aumenta el GMPC en el cerebro de ratón en comparación con los animales a los que se les administró vehículo ( $p<0.0001$  y  $p<0.31$ , ANOVA seguido de comparaciones planificadas).

Ejemplo 11: Efecto sobre la proteína BDNF en el cuerpo estriado dorsal de rata

- 5 *Objetivo.* Determinar el efecto del tratamiento con el Compuesto I-2 en la expresión de BDNF en el cuerpo estriado de rata, en un modelo de lesión cerebral inducida por ácido quinolínico.

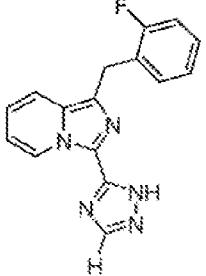
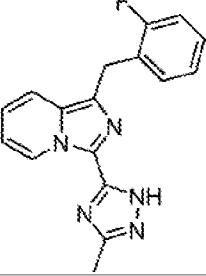
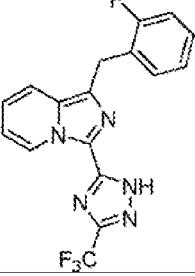
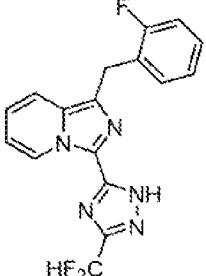
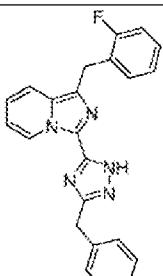
Protocolo. Día experimental 1: Las ratas se anestesiaron profundamente con isoflurano y cada rata recibió una infusión unilateral de 0.25  $\mu$ l de 50 mM de ácido quinolínico (QA) en el cuerpo estriado dorsal (12.5 nmoles de QA en el hemisferio izquierdo o derecho). El cuerpo estriado dorsal contralateral a la infusión de QA en cada rata recibió una infusión de control de 0.25  $\mu$ l de PBS (lado de control). En algunos animales se administró S.C. con vehículo ( $n=5$ ) o 10 mg/Kg del Compuesto I-2 ( $n=6$ ) alrededor de 30 minutos después de la infusión de QA. Días experimentales 2-8: Las ratas recibieron dosis cada 24 h P.O. con Vehículo o 10 mg/Kg del Compuesto I-2. Alrededor de 24 h después de la última dosificación de Vehículo o Compuesto I-2, se anestesiaron las ratas, se les perfundió con PBS seguido de una perfusión con paraformaldehído al 4% en PBS; se recolectó tejido cerebral y se colocó en un tubo Falcon cubierto con paraformaldehído (PAF) al 4% en PBS durante alrededor de 14 h a 4°C y luego se reemplazó por PBS con solución de sacarosa al 30 % durante alrededor de 48 h. El tejido cerebral se cortó en cortes coronales de 40  $\mu$ m y se almacenaron en PBS a 4°C. Los cortes que contenían el cuerpo estriado dorsal se tiñeron mediante incubación con anticuerpos primarios anti-NeuN de ratón y anti-BDNF de conejo, seguido de incubación con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 594 y anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488. Las imágenes del área dorsomedial alrededor de la lesión QA o el área equivalente en el hemisferio de control se tomaron utilizando microscopía de fluorescencia confocal. Las imágenes se analizaron utilizando el software imageJ para determinar la intensidad promedio de BDNF en células positivas para NeuN.

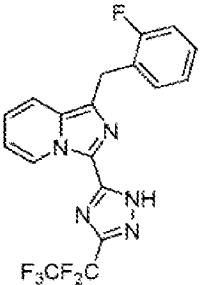
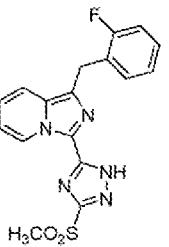
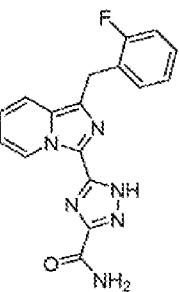
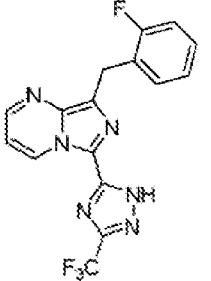
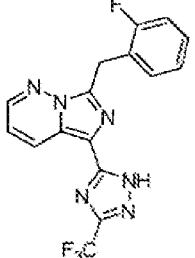
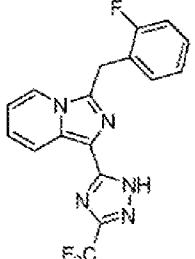
Conclusión. La intensidad promedio de la tinción con BDNF en células positivas para NeuN alrededor de la lesión QA (lado QA) se disminuye significativamente en comparación con las células positivas para NeuN en el hemisferio de control (lado control);  $p<0.0001$ , ANOVA seguida de comparaciones múltiples. El tratamiento con el Compuesto I-2 a 10 mg/kg una vez al día durante 7 días da como resultado el aumento de la intensidad promedio de BDNF en células positivas para NeuN alrededor de la lesión QA, en comparación con el tratamiento con vehículo;  $p<0.01$ , ANOVA seguida de comparaciones múltiples. El tratamiento con el Compuesto I-2 a 10 mg/kg una vez al día durante 7 días da como resultado el aumento de la intensidad promedio de BDNF en células positivas para NeuN en el cuerpo estriado dorsomedial sin lesión (lado de control), en comparación con el tratamiento con vehículo;  $p<0.0001$ , ANOVA seguido de comparaciones múltiples.

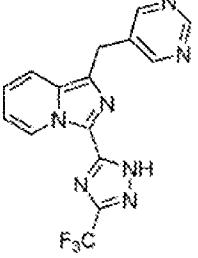
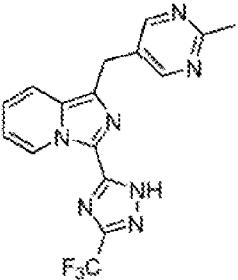
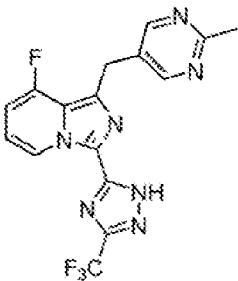
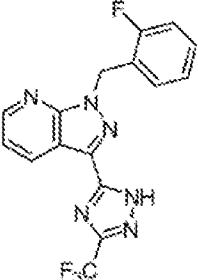
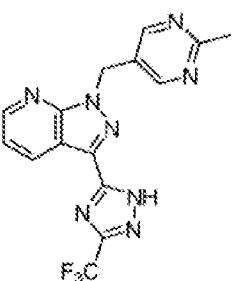
## REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto se selecciona de los mostrados en la Tabla I, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que comprende dicho compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso, solo o en terapia de combinación, en el tratamiento una enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS:
- 5

Tabla I

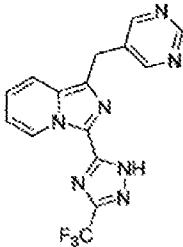
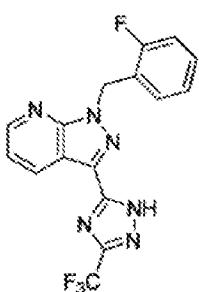
Estructura	Número de Compuesto
	I-8
	I-9
	I-3
	I-11
	I-12

	I-13
	I-14
	I-15
	I-7
	I-6
	I-10

	I-5
	I-4
	I-16
	I-2
	I-1

2. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el compuesto se selecciona de los mostrados en la Tabla II, o una composición farmacéutica o una forma de dosificación que comprende dicho compuesto o sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso, solo o en terapia de combinación, en el tratamiento una enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS:

Tabla II

Estructura	Número de Compuesto
	I-5
	I-2

3. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS

5 se selecciona de enfermedad de Alzheimer (AD), esclerosis lateral amiotrófica (ALS o enfermedad de Lou Gehrig), síndrome de Down, demencia, demencia vascular (VD), deterioro cognitivo vascular, demencia de Binswanger (encefalopatía arteriosclerótica subcortical), arteriopatía cerebral autosómica-dominante con infartos subcorticales y leuкоencefalopatía (CADASIL o síndrome de CADASIL), degeneración o demencia del lóbulo frontotemporal, demencia asociada al VIH, demencia con cuerpos de Lewy, demencia pre-senil (deterioro cognitivo leve o MCI), enfermedad de Huntington (o corea de Huntington, HD), esclerosis múltiple (MS), atrofia de sistema múltiple (MSA), Enfermedad de Parkinson (PD), Parkinsonismo Plus, ataxias espinocerebelosas, enfermedad de Steele-Richardson-Olszewski (parálisis supranuclear progresiva), trastorno por déficit de atención (ADD) y trastorno por déficit de atención con hiperactividad (ADHD).

10 15 4. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 3, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es demencia.

5 20 25 5. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 4, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es demencia vascular.

6. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 4, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es demencia mixta.

7. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 4, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es un deterioro cognitivo vascular.

8. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 4, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es un deterioro cognitivo leve.

9. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 4, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es la enfermedad de Parkinson.

10. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 4, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es la enfermedad de Alzheimer.
- 5 11. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS se selecciona de ya sea lesiones traumáticas (cerradas o abiertas) penetrantes en la cabeza, lesiones cerebrales traumáticas (TBI), lesión cerebral no-traumática, accidente cerebrovascular, aneurisma, hipoxia, deterioro o disfunción cognitiva que resulta de lesiones cerebrales o trastornos neurodegenerativos.
- 10 12. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS se selecciona de una distonía, que incluye distonía generalizada, focal, segmentaria, sexual, intermedia, genética/primaria o reacción distónica aguda; o una discinesia, incluyendo la discinesia aguda, crónica/tardía o no-motora e inducida por levodopa (LID).
- 15 13. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es un trastorno psiquiátrico, mental, del estado de ánimo o afectivo seleccionado de un trastorno bipolar, esquizofrenia, psicosis general, psicosis inducida por fármacos, un trastorno delirante, un trastorno esquizoafectivo, trastorno obsesivo compulsivo (OCD), un trastorno depresivo, un trastorno de ansiedad, un trastorno de pánico o un trastorno de estrés posttraumático (PTSD).
- 20 14. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 13, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es esquizofrenia.
- 25 15. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 1, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS se selecciona de trastornos caracterizados por una reducción relativa en la plasticidad sináptica y los procesos sinápticos que incluyen X frágil, trastorno de Rhett, síndrome de Williams, síndrome de Renpenning, trastornos del espectro autista (ASD), autismo, síndrome de Asperger, trastorno generalizado del desarrollo o trastorno desintegrativo infantil.
- 30 16. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS se selecciona del quimiocerebro, conducta adictiva inducida por levodopa, alcoholismo, dependencia a narcóticos, incluyendo a anfetaminas, opiáceos u otras sustancias o abuso de sustancias.
- 35 17. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es dolor.
- 40 18. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 17, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es dolor neuropático.
- 45 19. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 17, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es dolor neuropático inducido por quimioterapia, dolor neuropático asociado con una enfermedad del CNS, dolor neuropático asociado con Esclerosis Múltiple, dolor neuropático asociado con el herpes (herpes zóster), dolor neuropático asociado con la cirugía de columna, dolor neuropático asociado con la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth intermedia autosómica dominante, neuropatía autonómica y sensorial hereditaria tipo 4, neuropatía autonómica y sensorial hereditaria tipo 5 o la neuropatía autonómica y sensorial hereditaria tipo 7.
20. El compuesto, sal farmacéuticamente aceptable del mismo, composición farmacéutica o forma de dosificación para uso de la reivindicación 17, en el que la enfermedad del CNS, condición de salud del CNS o trastorno del CNS es fibromialgia.

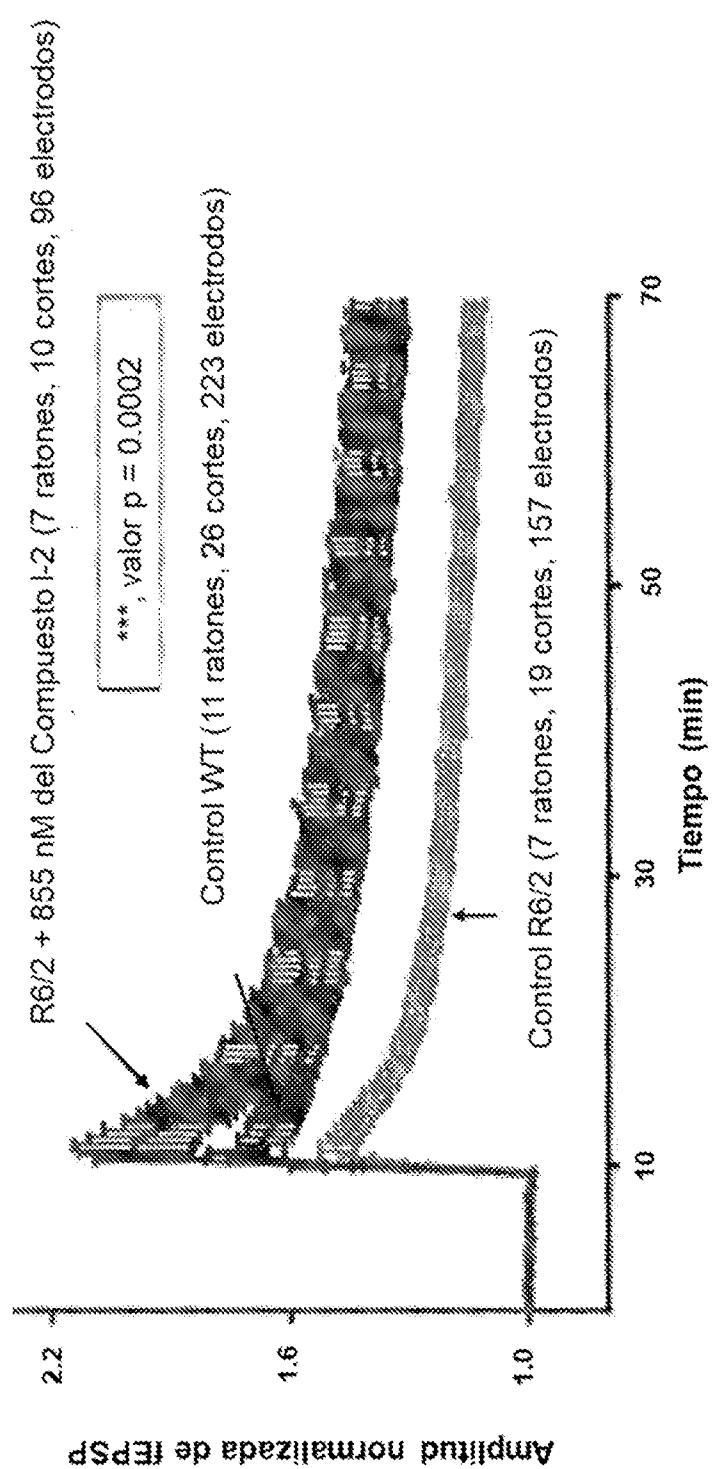


FIG 1.