

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 860 298**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4015 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)
A61P 25/06 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2015 E 18182695 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.12.2020 EP 3431106**

54 Título: **Combinaciones que comprenden moduladores alostéricos positivos del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 y su uso**

30 Prioridad:

21.01.2014 US 201461929795 P
04.02.2014 EP 14153887
04.02.2014 EP 14153880
03.09.2014 EP 14183324
02.10.2014 EP 14187429
15.12.2014 US 201462091668 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2021

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse, BE

72 Inventor/es:

KLEIN, BRIAN, D.;
LAVREYSEN, HILDE;
PYPE, STEFAN, MARIA, CHRISTIAAN;
TWYMAN, ROY, E.;
VAN OSSELAER, NANCY, EULALIE, SYLVAIN;
WHITE, H., STEVEN;
CEUSTERS, MARC ANDRÉ;
CID-NÚÑEZ, JOSÉ, MARIA;
TRABANCO-SUÁREZ, ANDRÉS, AVELINO y
BONE, ROGER, FRANCIS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 860 298 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

Combinaciones que comprenden moduladores alostéricos positivos del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 y su uso

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a combinaciones que comprenden un modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A").

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 El término "epilepsia" describe una afección en la que una persona presenta convulsiones recurrentes debidas a un proceso subyacente crónico. La epilepsia se refiere a un fenómeno clínico más que a una sola entidad patológica, ya que existen muchas formas y causas de la epilepsia. Si se define la epilepsia como dos o más convulsiones no provocadas, se estima que la incidencia de la epilepsia está comprendida entre aproximadamente un 0.3 y un 0.5 por ciento para diferentes poblaciones en todo el mundo, estimándose la prevalencia de la epilepsia entre 5 y 10 personas de cada 1000.

- 15 Un paso esencial en la evaluación y la gestión de un paciente con una convulsión consiste en determinar el tipo de convulsión que ha tenido lugar. La característica principal que distingue las diferentes categorías de convulsiones consiste en si la actividad convulsiva es parcial (sinónimo de focal) o generalizada.

- 20 Las convulsiones parciales son aquellas en las que la actividad convulsiva se restringe a áreas concretas de la corteza cerebral. Si se mantiene la consciencia completamente durante la convulsión, se considera que las manifestaciones clínicas son relativamente simples y la convulsión se denomina convulsión parcial-simple. Si se ve afectada la consciencia, la convulsión se denomina convulsión parcial-compleja. Un subgrupo adicional importante comprende aquellas convulsiones que empiezan como convulsiones parciales y a continuación se dispersan de forma difusa en toda la corteza, que se conocen como convulsiones parciales con generalización secundaria.

- 25 Las convulsiones generalizadas implican regiones difusas del cerebro simultáneamente de manera bilateralmente simétrica. Las convulsiones de tipo pequeño mal o de ausencia se caracterizan por pérdidas breves y repentinas de la consciencia sin pérdida del control de la postura. Las convulsiones de ausencia atípicas normalmente incluyen una duración más prolongada de la pérdida de consciencia, un inicio y un cese menos abruptos y unos signos motores más evidentes que pueden incluir características focales o lateralizantes.

- 30 Las convulsiones de tipo gran mal o tónico-clónicas generalizadas, que representan el tipo principal de convulsiones generalizadas, se caracterizan por un inicio abrupto, sin previo aviso. Normalmente, la fase inicial de la convulsión consiste en una contracción tónica de los músculos, dificultad para respirar y una intensificación significativa del tono simpático que provoca un incremento de la frecuencia cardíaca, la presión sanguínea y el tamaño de las pupilas. Después de 10-20 s, la fase tónica de la convulsión normalmente evoluciona hacia la fase clónica, producida por la superposición de periodos de relajación muscular sobre la contracción muscular tónica. Los periodos de relajación se incrementan progresivamente hasta el final de la fase ictal, que habitualmente no dura más de 1 min. La fase posictal se caracteriza por falta de respuesta, flacidez muscular y salivación excesiva, que puede provocar una respiración estridente y la obstrucción parcial de las vías respiratorias. Las convulsiones atónicas se caracterizan por una pérdida repentina del tono muscular postural que dura 1-2 s. Se pierde la consciencia momentáneamente, pero normalmente no se observa confusión posictal. Las convulsiones mioclónicas se caracterizan por una contracción muscular breve y repentina que puede implicar una parte del cuerpo o todo el cuerpo.

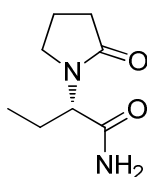
- 35 Se ha identificado la proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") como una diana anticonvulsiva de amplio espectro en modelos de epilepsia parcial y generalizada. Algunos estudios realizados en modelos con animales y tejido humano sugieren que ciertos cambios en la expresión de SV2A están relacionados con la epilepsia (para una revisión véase, por ejemplo: (a) Mendoza-Torreblanca *et al.* "Synaptic vesicle protein 2A: basic facts and role in synaptic function" European Journal of Neuroscience 2013, págs. 1-11; (b) Kaminski RM, *et al.* "Targeting SV2A for Discovery of Antiepileptic Drugs". En: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA *et al.*, editores. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [internet]. 4ª edición. Bethesda (MD): Centro Nacional para la Información Biotecnológica (EE. UU.); 2012. Disponible de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98183/>).

- 40 El papel exacto de SV2A permanece incierto, pero estudios sugieren que cambios en la expresión de SV2A afectan a la función sináptica (Nowack *et al.* "Levetiracetam reverses synaptic deficits produced by overexpression of SV2A" PLoS One 2011, volumen 6 (12), e29560). También se ha sugerido que SV2A es un elemento clave en la exocitosis y está implicada en la neurotransmisión (Crowder *et al.* "Abnormal neurotransmission in mice lacking synaptic vesicle protein 2A (SV2A)" Proc Nat Acad Sci USA 1999, 96, págs. 15268-15273) y estudios con ratones deficientes sugieren que la falta de SV2A da como resultado un desequilibrio entre neurotransmisión glutamatérgica y GABAérgica (Venkatesan *et al.* "Altered balance between excitatory and inhibitory inputs onto CA pyramidal neurons from SV2A-deficient but not SV2B-deficient mice" J Neurosci Res 2012, 90, págs. 2317-2327). La expresión disminuida de SV2A puede ser una consecuencia de actividad convulsiva y puede estar implicada en la evolución de la epilepsia (van Vliet

et al. "Decreased expression of synaptic vesicle protein 2A, the binding site for levetiracetam, during epileptogenesis and chronic epilepsy" *Epilepsia* 2009, 50, págs. 422-433; Feng *et al.* "Down-regulation of synaptic vesicle protein 2A in the anterior temporal neocortex of patients with intractable epilepsy" *J Mol Neurosci* 2009, 39, págs. 354-359; Toering *et al.* "Expression patterns of synaptic vesicle protein 2A in focal cortical dysplasia and TSC-cortical tubers" *Epilepsia* 2009, 50, págs. 1409-1418) y epileptogénesis en pacientes con tumores cerebrales (de Groot *et al.* "Expression of synaptic vesicle protein 2A in epilepsy-associated brain tumors and in the peritumoral cortex" *Neuro-Oncology* 2010, 12, págs. 265-273).

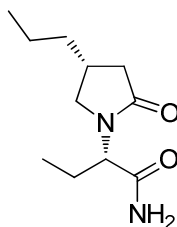
Los ligandos de SV2A incluyen levetiracetam (Lynch *et al.* "The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, vol. 101, págs. 9861-9866), brivaracetam y seletracetam (Kaminski RM, *et al.* "Targeting SV2A for Discovery of Antiepileptic Drugs". En: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA *et al.*, editores. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [internet]. 4ª edición. Bethesda (MD): Centro Nacional para la Información Biotecnológica (EE. UU.); 2012. Disponible de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98183/>; Nowack *et al.* "Levetiracetam reverses synaptic deficits produced by overexpression of SV2A" *PLoSone*, diciembre de 2011, vol. 6(12), e29560).

El levetiracetam, (-)-(S)- α -etil-2-oxo-1-pirrolidinacetamida o (S)-2-(2-oxopirrolidin-1-il)butanamida,



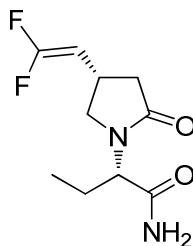
es un fármaco contra la epilepsia. No ha mostrado ninguna actividad en modelos agudos tradicionales (pruebas de convulsiones con pentileno-tetrazol y por electrochoque máximo), pero se ha encontrado que es potente en modelos de epilepsia crónica y en modelos genéticos de epilepsia generalizada. Ha mostrado un margen de seguridad elevado en comparación con otros fármacos contra la epilepsia (Klitgaard "Levetiracetam: the preclinical profile of a new class of antiepileptic drugs" *Epilepsia* 2001, 42 (Suplemento 4), págs. 13-18). Se comercializa con la marca Keppra®, disponible en forma de comprimidos, como disolución oral y como un concentrado que se convierte en una disolución para infusión. Keppra® ha sido aprobado en Europa como monoterapia en pacientes de más de 16 años de edad a los que se les ha diagnosticado epilepsia recientemente, en el tratamiento de convulsiones (ataques) de inicio parcial con o sin generalización secundaria y como una terapia adyuvante para su uso con otros fármacos contra la epilepsia en el tratamiento de convulsiones de inicio parcial con o sin generalización en pacientes de más de 1 mes de edad; convulsiones mioclónicas en pacientes de más de 12 años de edad con epilepsia mioclónica juvenil; y convulsiones tónico-clónicas generalizadas primarias en pacientes de más de 12 años de edad con epilepsia generalizada idiopática (www.ema.europa.eu). Keppra® también ha sido aprobado en los EE. UU. como terapia adyuvante para el tratamiento de convulsiones de inicio parcial en pacientes de más de 1 mes de edad; convulsiones mioclónicas en pacientes de 12 años de edad y mayores con epilepsia mioclónica juvenil; y convulsiones tónico-clónicas generalizadas primarias en pacientes de 6 años de edad y mayores con epilepsia generalizada idiopática. Keppra XR®, disponible en forma de comprimidos de liberación prolongada, ha sido aprobado en los EE. UU. para el tratamiento adyuvante de convulsiones de inicio parcial en pacientes de 16 años de edad y mayores con epilepsia (<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>).

El brivaracetam, el análogo 4-n-propílico de levetiracetam, (2S)-2-[(4R)-oxo-4-propilpirrolidin-1-il]butanamida,



se encuentra en ensayos clínicos y está siendo investigado como monoterapia en convulsiones de inicio parcial y neuralgia posherpética, y como terapia adyuvante en convulsiones de inicio parcial refractarias, la enfermedad de Unverricht-Lundborg en adolescentes y adultos y en epilepsia fotosensible (www.clinicaltrials.gov).

El seletracetam, (2S)-2-[(4S)-4-(2,2-difluorovinil)-2-oxo-pirrolidin-1-il]butanamida,



se ha sometido a prueba en ensayos clínicos.

- 5 En la bibliografía se describen procedimientos para preparar los tres compuestos. Por ejemplo, en los documentos EP 0 162 036 y GB 2 225 322 se describen procesos para preparar levetiracetam. En el documento WO 01/62726, por ejemplo, se describe un proceso para la preparación de brivaracetam. A partir del documento WO2005/121082, por ejemplo, se conoce un proceso para la preparación de seletracetam. En el documento EP1806339 se describen procesos alternativos para preparar los tres compuestos.
- 10 Los fármacos contra la epilepsia han encontrado utilidad en trastornos neurológicos y psiquiátricos, que incluyen dolor neuropático, migraña, temblores esenciales, y en ansiedad, esquizofrenia y trastorno bipolar (Landmarck "Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders. Relations between mechanisms of action and clinical efficacy" *CNS Drugs* 2008, vol. 22(1), págs. 27-47; Calabresi *et al.* "Antiepileptic drugs in migraine: from clinical aspects to cellular mechanisms" *Trends in Pharmacological Sciences* 2007, vol. 28(4), págs. 188-195; Rogawski y Löscher "The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions" *Nat Med* 2004, vol. 10, págs. 685-692).
- 15 Se ha encontrado que levetiracetam es eficaz o potencialmente eficaz en una amplia gama de trastornos neuropsiquiátricos, que incluyen trastornos del estado de ánimo (Muralidharan y Bhagwagar "Potential of levetiracetam in mood disorders: a preliminary review" *CNS Drugs* 2006, vol. 20, págs. 969-979; Mula *et al.* "The role of anticonvulsant drugs in anxiety disorders: a critical review of the evidence" *J Clin Psychopharmacol* 2007, vol. 27, págs. 263-272), trastornos de ansiedad (Kinrys *et al.* "Levetiracetam as adjunctive therapy for refractory anxiety disorders" *J Clin Psychiatry* 2007, vol. 68, págs. 1010-1013; Zhang *et al.* "Levetiracetam in social phobia: a placebo controlled pilot study" *J Psychopharmacol* 2005, vol. 19, págs. 551-553; Kinrys *et al.* "Levetiracetam for treatment-refractory posttraumatic stress disorder" *J Clin Psychiatry* 2006, vol. 67, págs. 211-214), dolor (Enggaard *et al.* "Specific effect of levetiracetam in experimental human pain models" *Eur J Pain* 2006, vol. 10, págs. 193-198; Dunteman "Levetiracetam as an adjunctive analgesic in neoplastic plexopathies: case series and commentary" *J Pain Palliative Care Pharmacother* 2005, vol. 19, págs. 35-43; Price "Levetiracetam in the treatment of neuropathic pain: three case studies" *Clin J Pain* 2004, vol. 20, págs. 33-36), trastornos del movimiento (Bushara *et al.* "The effect of levetiracetam on essential tremor" *Neurology* 2005, vol. 64, págs. 1078-1080; McGavin *et al.* "Levetiracetam as a treatment for tardive dyskinesia: a case report" *Neurology* 2003, vol. 61, págs. 419; Woods *et al.* "Effects of levetiracetam on tardive dyskinesia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study" *J Clin Psychiatry* 2008, vol. 69, págs. 546-554; Zivkovic *et al.* "Treatment of tardive dyskinesia with levetiracetam in a transplant patient" *Acta Neurol Scand* 2008, vol. 117, págs. 351-353; Striano *et al.* "Dramatic response to levetiracetam in post-ischaemic Holmes' tremor" *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2007, vol. 78, págs. 438-439) y se sospecha que muestra efectos potencialmente beneficiosos en la función cognitiva (Piazzini *et al.* "Levetiracetam: An improvement of attention and of oral fluency in patients with partial epilepsy" *Epilepsy Research* 2006, vol. 68, págs. 181-188; de Groot *et al.* "Levetiracetam improves verbal memory in high-grade glioma patients" *Neuro-oncology* 2013, vol. 15(2), págs. 216-223; Bakker *et al.* "Reduction of hippocampal hyperactivity improves cognition in amnesic mild cognitive impairment" *Neuron* 2012, vol. 74, págs. 467-474; para una revisión: Eddy *et al.* "The cognitive impact of antiepileptic drugs" *Ther Adv Neurol Disord* 2011, vol. 4(6), págs. 385-407 y las referencias citadas en el mismo; Wheless "Levetiracetam in the treatment of childhood epilepsy" *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 2007, vol. 3(4), págs. 409-421) y los síntomas de comportamiento en la demencia (Dolder y Nealy "The efficacy and safety of newer anticonvulsants in patients with dementia" *Drugs Aging* 2012, vol. 29(8), págs. 627-637). Los datos de estudios con animales y algunos ensayos clínicos preliminares sugieren que levetiracetam puede presentar cierto potencial para restringir la epilepsia postraumática, tal como la provocada por un estado epiléptico, una lesión cerebral traumática y un accidente cerebrovascular isquémico, y al parecer presenta efectos neuroprotectores. El potencial de levetiracetam para aliviar la epileptogénesis o disfunción cognitiva todavía no ha sido demostrado mediante estudios clínicos y con animales concluyentes (para revisiones: Löscher y Brandt "Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research" *Pharmacol Rev* 2010, vol. 62, 668-700; Shetty "Prospects of levetiracetam as a neuroprotective drug against status epilepticus, traumatic brain injury and stroke" *Front. Neur.* 2013, 4:172. Doi: 10.3389/fneur.2013.00172) pero ha presentado actividad antiepileptogénica en el modelo de estimulación en ratas y ratones. También se ha sugerido que levetiracetam inhibe la liberación de glutamato (Lee *et al.* "Levetiracetam inhibits glutamate transmission through presynaptic P/Q-type calcium channels on the granule cells of the dentate gyrus" *British Journal of Pharmacology* 2009, vol. 158, págs. 1753-1762).

Se ha encontrado que seletracetam y brivaracetam reducen la gravedad de distonía en el modelo de hámster mutante dt^{sz} y pueden ser útiles en algunos pacientes que padecen trastornos del movimiento discinéticos y distónicos (Hamann *et al.* "Brivaracetam and seletracetam, two new SV2A ligands, improve paroxysmal dystonia in the dt^{sz} mutant hamster" *European Journal of Pharmacology* 2008, vol. 601, págs. 99-102).

5 Los moduladores alostéricos positivos de mGluR2 han surgido recientemente como estrategias terapéuticas novedosas prometedoras para el tratamiento de varios trastornos del SNC, incluyendo la epilepsia, y algunos PAM de mGluR2 están sometiéndose actualmente a ensayos clínicos para el tratamiento de esquizofrenia y ansiedad-depresión (www.clinicaltrials.gov, véase, por ejemplo: JNJ-40411813/ADX71149 por Addex Therapeutics y Janssen Pharmaceuticals, Inc.). La sugerencia inicial de que los fármacos que reducen la transmisión glutamatérgica pueden ser eficaces en el tratamiento de la epilepsia procede de estudios no clínicos agudos con agonistas de receptores mGlu2/3 mixtos (Moldrich *et al.* "Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy" *Eur J Pharmacol.* 2003, vol. 476, págs. 3-16). Se encontró que LY379268 y LY389795, dos agonistas de receptores mGlu2/3, eran ineficaces bloqueando convulsiones MES hasta dosis que producían alteración motora, pero se encontraron eficaces en el modelo de 6 Hz de una manera dependiente de la dosis (Barton *et al.* "Comparison of the effect of glutamate receptor modulators in the 6 Hz and maximal electroshock seizure models" *Epilepsy Research* 2003, vol. 56, págs. 17-26). La administración continuada de un agonista de mGlu2/3 indujo, paradójicamente, actividad convulsiva en estudios de toxicología a largo plazo (Dunayevich *et al.* "Efficacy and tolerability of an mGlu2/3 agonist in the treatment of generalized anxiety disorder" *Neuropsychopharmacology.* 2008, vol. 33(7), págs. 1603-10). Este efecto paradójico podría estar relacionado con cambios inducidos por el agonista en la sensibilidad del sistema receptor (taquifilaxia), pero sin embargo no se ha notificado en modelos preclínicos de epilepsia. En cambio, los moduladores alostéricos positivos modulan la neurotransmisión en curso, pero no son directamente estimulantes, con lo que se reduce el riesgo de taquifilaxia.

25 Antes de la actividad convulsiva, se registran aumentos de glutamato extracelular en el hipocampo humano y el aumento se sostiene durante la actividad epileptogénica (During y Spencer "Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain" *Lancet* 1993, vol. 341(8861), págs. 1607-10), lo que respalda la idea de que una reducción de los niveles de glutamato podría ser beneficiosa para el tratamiento de la epilepsia. De hecho, durante la actividad convulsiva, los niveles de glutamato aumentan hasta niveles potencialmente neurotóxicos. La actividad convulsiva da como resultado daños estructurales progresivos en el cerebro humano induciendo anomalías adicionales en el metabolismo de glutamato (Petroff *et al.* "Glutamate-glutamine cycling in the epileptic human hippocampus" *Epilepsia* 2002, vol. 43(7), págs. 703-10). Por tanto, puede esperarse que un modulador alostérico positivo de mGluR2 o un agonista ortostérico de mGluR2 ofrezcan protección contra los daños neurológicos inducidos por las convulsiones.

35 Los documentos WO2009/033704 y WO2010/130424 dan a conocer moduladores alostéricos positivos de mGluR2, usos de los mismos y procedimientos para sintetizar los compuestos. Los documentos WO1997/18199 y WO2003/104217 dan a conocer compuestos de modulador de receptor de aminoácido excitatorios que más tarde mostraron tener actividad de agonista ortostérico de mGlu2/3 (véase por ejemplo Rorick-Kehn *et al.* (2007) *The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics* vol. 321, n.º 1, págs. 308-317), la bibliografía de patentes y científica adicional da a conocer ejemplos adicionales de compuestos que tienen actividad de agonista ortostérico de mGlu2/3, y el documento WO2008/150233 da a conocer compuestos con actividad de activador alostérico de mGluR2.

40 Myhrer, T. et al. "Capacities of metabotropic glutamate modulators in counteracting soman-induced seizures in rats" *Eur. J. Pharmacol.* 718 (2013) 253-260 divulga el efecto de combinaciones de DCG-IV contra convulsiones inducidas por somano en ratas. Si bien la combinación de HI-6 y prociclidina con DCG-IV mostró eficacia como antídoto, la combinación de HI-6 y levetiracetam con DCG-IV no cesó las convulsiones ni preservó vidas, y la eficacia como antídoto observada fue inferior.

45 Klitgaard, H. "Antiepileptic drug Discovery: lessons from the past and future challenges" *Acta Neurol Scand* 2005: 112 (Suppl. 181): 68-72 proporciona un breve contexto histórico sobre la investigación de fármacos antiepilépticos, y describe el descubrimiento de levetiracetam y la posterior identificación de brivaracetam y seletracetam, que tiene un perfil de actividad anticonvulsiva único y potencialmente un mejor perfil de seguridad en comparación con las terapias existentes.

50 Piazzini et al. "Levetiracetam: An improvement of attention and of oral fluency in patients with partial epilepsy" *Epilepsy Research* 2006, Vol. 68, págs. 181-188 divulga resultados preliminares que muestran una mejora cognitiva significativa en la atención y la fluidez oral en los pacientes diagnosticados con epilepsia parcial resistente a fármacos que reciben levetiracetam como terapia complementaria en comparación con los controles.

55 Johannessen Landmark, C and Johannessen, S. I. "Modifications of Antiepileptic Drugs for Improved Tolerability and Efficacy" *Perspect Medicin Chem* 2008:2 21-39 divulga una revisión sobre productos de investigación y fármacos de diseño y comercializados en desarrollo en 2008, incluido levetiracetam.

Price, M.J. "Levetiracetam in the treatment of neuropathic pain: three case studies" *Clin J Pain* 2004, Vol. 20, págs. 33-36 describe tres estudios de un caso de pacientes que presentan dolor neuropático que responden favorablemente al tratamiento con levetiracetam, sin eventos adversos importantes.

El documento WO 01/39779 (UCB, S.A) divulga el uso de levetiracetam en trastornos que incluyen migraña, trastornos bipolares y dolor crónico o neuropático solo o combinado con compuestos que incluyen inhibición neural mediada por receptores GABA_A.

5 El documento EP 2 462 990 (UCB Pharma GmbH) describe una composición farmacéutica que comprende lacosamida y levetiracetam para la prevención, alivio y/o tratamiento de convulsiones epilépticas.

10 El documento WO 2014/078568 (Univ Johns Hopkins) se refiere a grandes rasgos a métodos para tratar la esquizofrenia o el trastorno bipolar administrando una combinación de un inhibidor de una proteína de la vesícula sináptica 2A y un antipsicótico. Los ejemplos divulgan, sin embargo, levetiracetam, brivaracetam o valproato en estudios relacionados con la cognición (aprendizaje espacial y retención de memoria, ensayos en pacientes con afectación cognitiva amnésica leve).

El documento WO2015/032790 (Janssen Pharmaceutica NV) describe compuestos de 1,2,4-triazolo[4,3-a]piridina como moduladores alostéricos positivos del subtipo 2 del receptor metabotrópico de glutamato.

15 Los fármacos contra la epilepsia disponibles actualmente no afectan únicamente a la transmisión glutamatérgica. Su mecanismo de acción se concibe en general como una alteración del equilibrio entre la transmisión de estímulos excitatorios (mediada por glutamato) y la transmisión de estímulos inhibidores (mediada por GABA) (Johannessen Landmark "Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders: relations between mechanisms of action and clinical efficacy" CNS Drugs 2008, Vol. 22(1), págs. 27-47).

20 Un factor limitante significativo para el uso de ligandos de SV2A es la tolerabilidad y el perfil de efectos secundarios. Por ejemplo, la dosis eficaz de levetiracetam para convulsiones de inicio parcial es de 1000 mg, 2000 mg y 3000 mg, administrada dos veces al día. Los efectos secundarios descritos para levetiracetam incluyen un comportamiento irritable o agresivo, ansiedad, cambios de personalidad, escalofríos, tos o ronquera, llantos, despersonalización, diarrea, sequedad bucal, euforia, fiebre, sensación general de malestar o enfermedad, cefalea, hiperventilación, latidos del corazón irregulares, irritabilidad, dolor de las articulaciones, pérdida de apetito, lumbalgia o dolor de los costados, depresión mental, dolores y picores musculares, náusea, dolor o dificultad al orinar, paranoia, reacciones rápidas o desmesuradas a nivel emocional, cambios rápidos del estado de ánimo, inquietud, temblores, estremecimientos, dificultad para respirar, insomnio o somnolencia inusual, dolor de garganta, congestión o secreción nasal, sudores, problemas para conciliar el sueño, cansancio o debilidad inusual y vómitos. Por lo tanto, sigue siendo necesario disponer de un tratamiento eficaz con una dosis eficaz de levetiracetam más baja y un perfil de efectos secundarios más favorable para el tratamiento de la epilepsia y trastornos relacionados, no solamente en la población adulta sino también en la pediátrica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Respuesta a la dosis para la determinación de DE₅₀ a 6 Hz, 44 mA para el comp. de referencia n.º 2 y LEV solo y en combinación.

35 **Figura 2:** Análisis isoblográfico para la combinación del comp. de referencia n.º 1 con levetiracetam (LEV) in el ensayo de 6 Hz (44 mA). Se determinaron los valores iniciales de DE₅₀ (mostrados a continuación) tanto para el comp. de referencia n.º 1 como para LEV (puntos de datos sobre ejes x e y; rombos rellenos). La línea teórica de aditividad conecta los valores de DE₅₀ calculados para los dos compuestos (línea continua negra). Se representan gráficamente los DE₅₀ teóricos (+ EEM) para las tres combinaciones de razón de dosis fija (LEV: comp. de referencia n.º 1): 1:3 – cuadrados rellenos/línea continua negra, 1:1 – triángulos hacia arriba rellenos/línea continua negra, y 3:1 – triángulos hacia abajo rellenos/línea continua negra. Inicialmente se derivaron las dosis de tratamiento experimentales de valores teóricos y se ajustaron según los efectos observados. También se muestran valores de DE₅₀ (+ EEM) determinados experimentalmente para cada combinación de razón de dosis fija: 1:3' – cuadrados vacíos/línea de puntos, 1:1' – triángulos hacia arriba vacíos/línea de puntos, y 3:1' – triángulos hacia abajo vacíos/línea de puntos. Se compararon comparaciones entre valores de DE₅₀ determinados experimentalmente y teóricos usando la prueba de la t (**P<0.001). N=8 por grupo. En la figura 2, se representa la razón de LEV con respecto al comp. de referencia n.º 1 como sigue:

Razón de LEV: comp. de referencia n.º 1		DE ₅₀ (LEV) = 345 mg/kg (211-485) (por vía intraperitoneal, i.p.) DE ₅₀ (Comp. de referencia n.º 1) = 10.2 mg/kg (3.1-12.4) (s.c.)
■	1:3	
▲	1:1	
▼	3:1	
--□--	1:3'	
--△--	1:1'	
--▽--	3:1'	

Figura 3: Estudios de combinación para el comp. de referencia n.º 25-a con levetiracetam (LEV) en el ensayo de 6 Hz (44 mA). A una dosis de 10 mg/kg s.c., el comp. de referencia n.º 25-a aumenta la potencia de LEV, conduciendo a un desplazamiento de aproximadamente 70 veces en la DE₅₀. Esto sugiere una relación farmacodinámica positiva.

5 **Figura 4:** Estudios de combinación para el comp. de referencia n.º 2-a con levetiracetam (LEV) en el ensayo de 6 Hz (44 mA). A una dosis de 10 mg/kg s.c., el comp. de referencia n.º 2-a aumenta la potencia de LEV, conduciendo a un desplazamiento de aproximadamente 35 veces en la DE₅₀. Esto sugiere una relación farmacodinámica positiva.

Figura 5: Estudios de combinación para el comp. n.º 6-b con levetiracetam (LEV) en el ensayo de 6 Hz (44 mA). A una dosis de 10 mg/kg p.o., el comp. n.º 6-b aumenta la potencia de LEV, conduciendo a un desplazamiento de aproximadamente 100 veces en la DE₅₀. Esto sugiere una relación farmacodinámica positiva.

10 **Figura 6:** Estudios de combinación para el compuesto de referencia LY-404039 con levetiracetam (LEV) en el ensayo de 6 Hz (44 mA). A una dosis de 5 mg/kg s.c., el compuesto de referencia LY-404039 aumenta la potencia de LEV, conduciendo a un desplazamiento de aproximadamente 27 veces en la DE₅₀. Esto sugiere una relación farmacodinámica positiva.

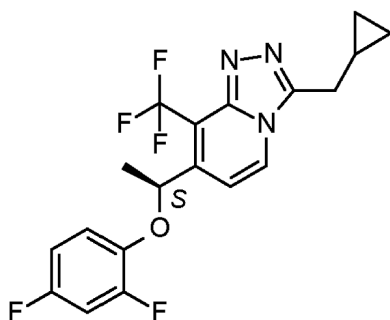
DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 La presente invención se refiere a una combinación que comprende

(a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y

(b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre

20



(comp. n.º 6-b),

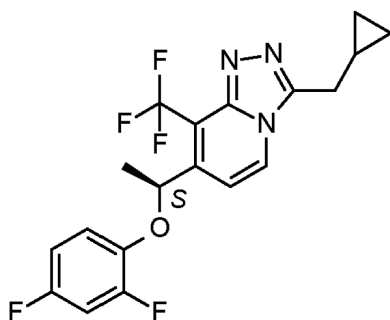
o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización particular, la invención tal como se describe en la presente se refiere a una combinación farmacéutica, en particular a un producto farmacéutico combinado, que comprende

25 (a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y

(b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre

30



(comp. n.º 6-b),

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo; y (c) al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

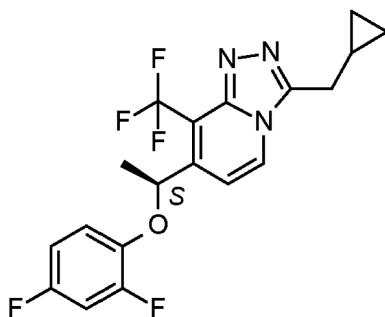
En una realización adicional, la invención se refiere a la combinación descrita en la presente para su uso como medicamento.

5 Una realización adicional de esta invención se refiere al uso de la combinación descrita en la presente para la elaboración de un medicamento o un producto farmacéutico para el tratamiento o la prevención de la epilepsia y trastornos relacionados; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente y trastornos bipolares y trastornos relacionados.

Una realización adicional de esta invención se refiere al uso de la combinación descrita en la presente para la elaboración de un medicamento o un producto farmacéutico para la neuroprotección.

10 Una realización adicional de esta invención se refiere al uso de la combinación descrita en la presente para la elaboración de un medicamento o un producto farmacéutico para la prevención de la epileptogénesis.

15 Una realización adicional se refiere al tratamiento o la prevención de la epilepsia y trastornos relacionados; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente; y trastornos bipolares y trastornos relacionados de un sujeto que comprende administrar de forma concurrente o secuencial al sujeto que lo necesita un ligando de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre



(comp. n.º 6-b),

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en cantidades que serían terapéuticamente eficaces cuando el ligando de SV2A y el compuesto de mGluR2 se administran conjuntamente.

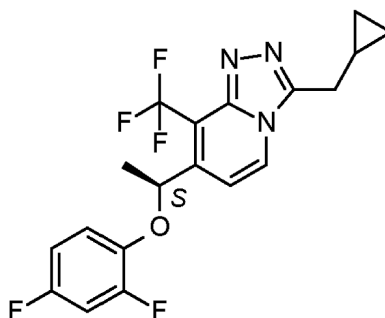
20 Una realización adicional se refiere a una combinación tal como se describe en la presente para la neuroprotección; o a una combinación tal como se describe en la presente para su uso en la neuroprotección.

Una realización adicional se refiere a una combinación tal como se describe en la presente para la prevención de la epileptogénesis; o a una combinación tal como se describe en la presente para su uso en la prevención de la epileptogénesis.

En una realización adicional, la invención se refiere a una combinación de dosis fija de

25 (a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y

(b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre



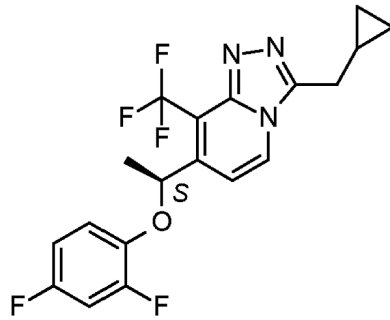
(comp. n.º 6-b),

30 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,

en cantidades que serían terapéuticamente eficaces cuando el ligando de SV2A y el compuesto de tipo mGluR2 se administran conjuntamente a pacientes, para su uso en el tratamiento o la prevención de la epilepsia y trastornos relacionados; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente; trastornos bipolares y trastornos relacionados.

Una divulgación se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de la epilepsia y trastornos relacionados; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente; trastornos bipolares y trastornos relacionados, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación o un producto de combinación que comprende

- 5 (a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y
- (b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre

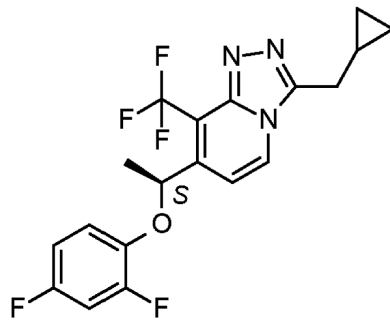


(comp. n.º 6-b),

- 10 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,
a un sujeto que lo necesita, tal como un animal de sangre caliente, en particular un ser humano.

Una divulgación adicional se refiere a un método de neuroprotección, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación o un producto de combinación que comprende

- 15 (a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y
- (b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre

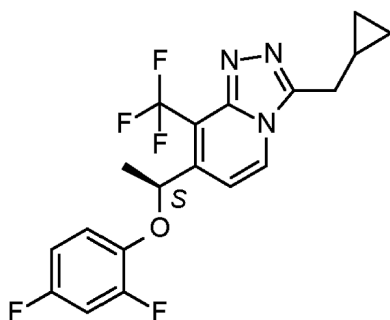


(comp. n.º 6-b),

- 20 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,
a un sujeto que lo necesita, tal como un animal de sangre caliente, en particular un ser humano.

Una divulgación adicional se refiere a un método contra la epileptogénesis, comprendiendo dicho método la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una combinación o un producto de combinación que comprende

- 25 (a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y
- (b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre



(comp. n.º 6-b),

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, a un sujeto que lo necesita, tal como un animal de sangre caliente, en particular un ser humano.

5 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un producto farmacéutico o un envase comercial que comprende una combinación según la invención tal como se describe en la presente, en particular junto con instrucciones, para su uso simultáneo, secuencial o por separado en el tratamiento o la prevención de la epilepsia y trastornos relacionados; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente; trastornos bipolares y trastornos relacionados.

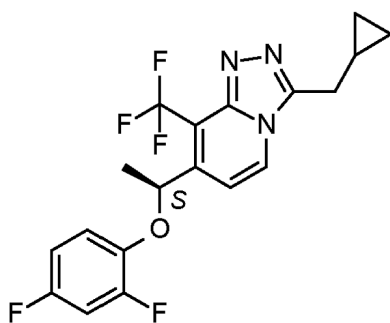
10 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un producto farmacéutico o un envase comercial que comprende una combinación según la invención tal como se describe en la presente, en particular junto con instrucciones, para su uso simultáneo, secuencial o por separado en la neuroprotección.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un producto farmacéutico o un envase comercial que comprende una combinación según la invención tal como se describe en la presente, en particular junto con instrucciones, para su uso simultáneo, secuencial o por separado contra la epileptogénesis.

15 En una realización adicional, la invención se refiere a una combinación que comprende una cantidad que es de manera conjunta terapéuticamente eficaz contra la epilepsia y trastornos relacionados; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente; trastornos bipolares y trastornos relacionados; de

(a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y

20 (b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre



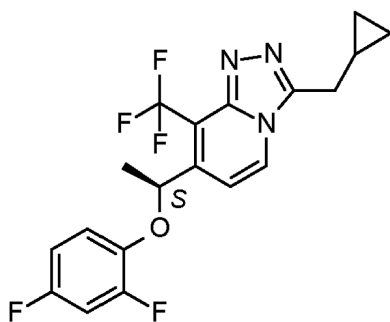
(comp. n.º 6-b),

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización adicional, la invención se refiere a una combinación que comprende una cantidad que es de manera conjunta terapéuticamente eficaz como neuroprotector, de

25 (a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y

(b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre

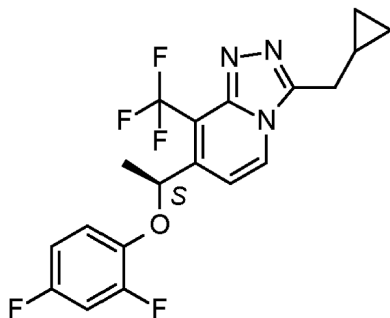


(comp. n.º 6-b),

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización adicional, la invención se refiere a una combinación que comprende una cantidad que es de manera conjunta terapéuticamente eficaz en la prevención de la epileptogénesis, de

- 5 (a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y
- (b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre

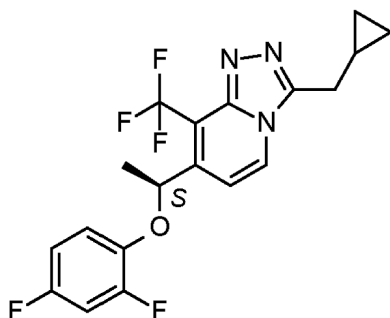


(comp. n.º 6-b),

- 10 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador farmacéuticamente aceptable.

En una realización adicional, la invención se refiere al uso de

- (a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado entre levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y
- 15 (b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado entre



(comp. n.º 6-b),

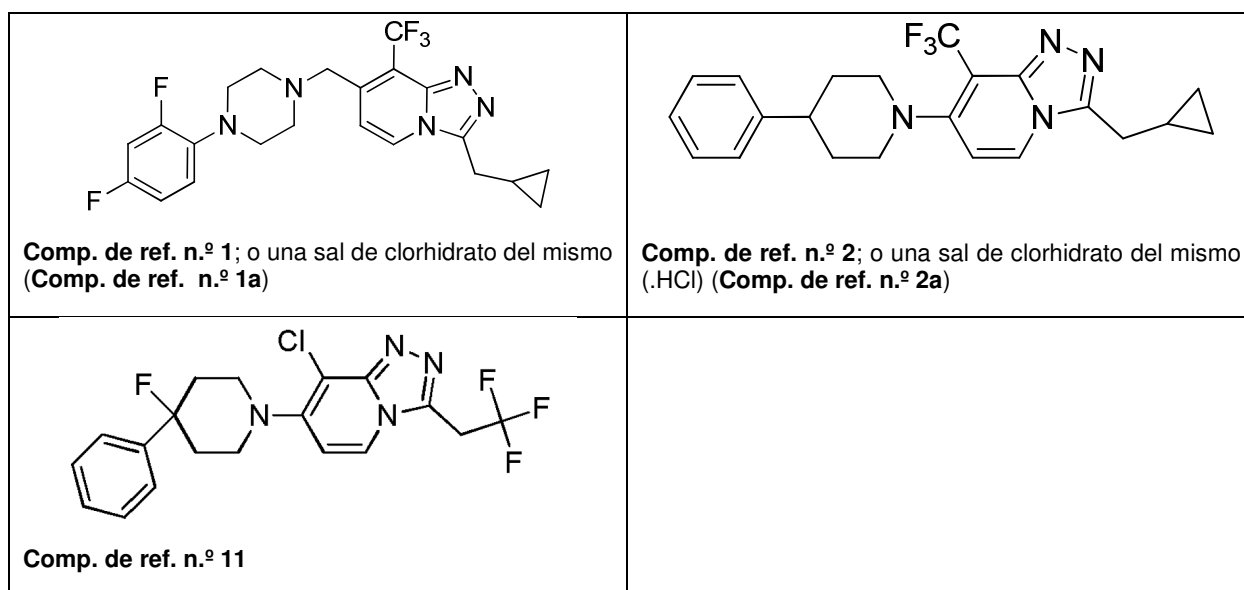
o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo,

para la preparación de un producto combinado según la presente invención

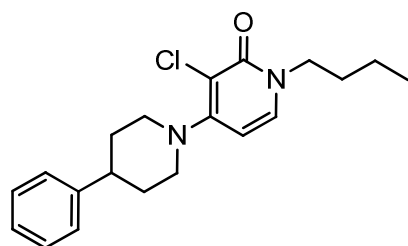
- 20 El componente (b) de la combinación de la invención se denomina en general en la presente "compuesto de mGluR2" o "compuesto de PAM de mGluR2", o "compuesto de modulador alostérico positivo de mGluR2" lo que significa que el compuesto tiene principalmente actividad en el receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2, y en particular es un modulador alostérico positivo (PAM) del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2. Un experto en la técnica estará familiarizado con la gran homología de mGluR2 y mGluR3, a la que se debe que algunos agonistas

ortostérico de mGluR2 también muestren actividad como agonistas ortostéricos de mGluR3. Tal es el caso por ejemplo, del ácido (-)-(1R,4S,5S,6S)-4-amino-2-sulfonilbicyclo[3.1.0]hexano-4,6-dicarboxílico (también conocido como LY-404,039 [CAS 635318-11-5]), con un $K_i = 149$ nM (receptor de mGlu2) y $K_i = 92$ nM (receptor de mGlu3), selectividad de 100 veces para mGlu2 y mGlu3 con respecto a mGlu4a, -6, -7a, y -8a, y sin actividad en mGlu1a y mGlu5a (Rorick-Kehn *et al.* (2007) *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* vol. 321, n.º 1, págs. 308–317). El término "compuesto de mGluR2" o "compuesto de PAM de mGluR2", o "compuesto de modulador alostérico positivo de mGluR2" no excluye por tanto compuestos que muestren alguna otra actividad menor *in vitro* o *in vivo*.

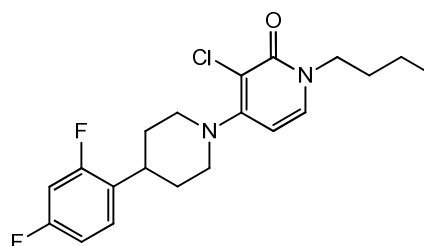
Los compuestos de referencia de PAM de mGluR2 de la combinación de la divulgación se seleccionan en particular de aquellos dados a conocer en el documento WO2010/130424 y pueden prepararse según los procedimientos descritos en ese documento. Los compuestos de referencia particulares incluyen



Los compuestos adicionales de referencia de PAM de mGluR2 de la combinación de la divulgación también se seleccionan en particular de aquellos dados a conocer en el documento WO2009/033704 y pueden prepararse según los procedimientos descritos en ese documento. Los compuestos particulares incluyen



Comp. n.º 2-a



Comp. n.º 25-a

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

El compuesto de PAM de mGluR2 de la combinación de la invención se selecciona en particular entre los divulgados en el documento PCT/EP2014/068676. El compuesto particular es 3-(ciclopropilmetil)-7-[(1S)-1-(2,4-difluorofenoxi)etil]-8-(trifluorometil)[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridina; incluidas las sales y los solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En una realización adicional, el compuesto se puede seleccionar entre la sal de clorhidrato de 3-(ciclopropilmetil)-7-[(1S)-1-(2,4-difluorofenoxi)etil]-8-(trifluorometil)[1,2,4]triazolo[4,3-a]piridina.

Los nombres de los compuestos de la presente invención se generaron según las reglas de nomenclatura que se acordaron por el Chemical Abstracts Service (C.A.S.) usando el software (ACD/Name product, versión 10.01.0.14105, octubre de 2006) de Advanced Chemical Development, Inc.

Tal como se usa en la presente, y a menos que se indique lo contrario, el término “**agente contra la epilepsia**” y la abreviatura “AED”, que corresponde a sus siglas en inglés, se emplearán de manera intercambiable con el término “**agente contra las convulsiones**” y tal como se usan en la presente, se refieren a un agente capaz de tratar, inhibir o prevenir la actividad convulsiva o icogénesis cuando el agente se administra a un sujeto o paciente.

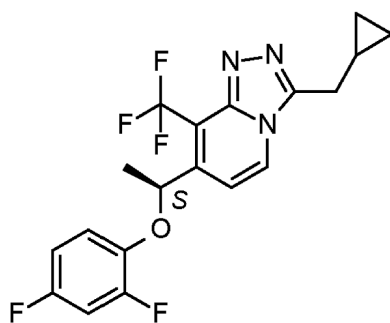
5 Tal como se usa en la presente, a menos que se indique lo contrario, el término “**ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A**” y la abreviatura “**ligando de SV2A**”, se emplearán de manera intercambiable. Los ejemplos de ligandos de SV2A incluyen, pero no se limitan a, los compuestos incluidos en las publicaciones GB 1,039,113; GB 1,309,692; EP 1 262 036; EP 1 806 339; WO 2001/062726; US 2002/094787; WO 2004/087658; WO 2005/121082; WO 2005/054188; WO 2006/128692; WO 2006/128693; WO 2007/065595; WO 2008/132139, and WO 2008/132142; 10 WO 2011/047860; WO 2012/143116; and WO 2012/143117. Ejemplos particulares adecuados de ligandos de SV2A incluyen, pero no se limitan a: levetiracetam, brivaracetam y seletracetam.

En una realización particular, el ligando de SV2A es levetiracetam.

En una realización particular, el ligando de SV2A es brivaracetam.

15 Se conocen procedimientos para la preparación de los ligandos de SV2A anteriores a partir de la bibliografía y se describen, por ejemplo, en el documento EP 1 806 339; en el documento EP 0 162 036 y en el documento GB 2 225 322 (levetiracetam); en el documento WO 01/62726 (brivaracetam); y en el documento WO 2005/121082 (seletracetam).

En una realización adicional, la combinación según la invención comprende (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz de levetiracetam o brivaracetam; y (b) una cantidad farmacéuticamente eficaz de

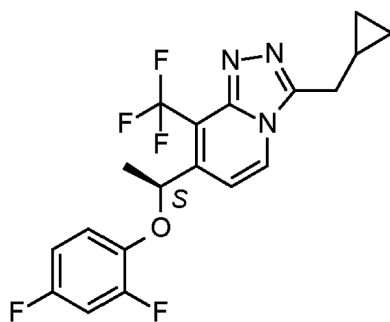


20

(Comp. n.º 6-b)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en particular la sal de clorhidrato del mismo, o un solvato del mismo.

En una realización adicional, la composición farmacéutica según la invención comprende (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz de levetiracetam o brivaracetam; y (b) una cantidad farmacéuticamente eficaz de



25

(Comp. n.º 6-b)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en particular la sal de clorhidrato del mismo, o un solvato del mismo.

El producto de combinación de la presente invención, en particular, la composición farmacéutica según la invención, es especialmente adecuado para el tratamiento de la epilepsia y trastornos relacionados.

30 Se apreciará que algunos de los compuestos de mGluR2, en particular el compuesto de PAM de mGluR2 de la invención y sus sales de adición y solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo pueden contener uno o más centros de quiralidad y existir como formas estereoisoméricas.

La expresión “**compuesto de la invención**” tal como se usa en la presente, se pretende que incluya el compuesto 6-b como se divulgan la presente, y las sales y solvatos del mismo.

Tal como se usa en la presente, cualquier fórmula química con enlaces que se muestran solo como líneas continuas y no como enlaces en cuña continuos o enlaces en cuña discontinuos, o que se indique otra manera que tienen una configuración particular (por ejemplo, R, S) alrededor de uno o más átomos, contempla cada estereoisómero posible, o mezcla de dos o más estereoisómeros.

- 5 Anteriormente o a continuación en la presente, la configuración absoluta se especifica de acuerdo con el sistema de Cahn-Ingold-Prelog. La configuración en un átomo asimétrico está especificada por R o S.

10 Cuando se identifica un estereoisómero específico, esto significa que dicho estereoisómero está sustancialmente exento, es decir, asociado con menos de un 50%, preferiblemente menos de un 20%, más preferiblemente menos de un 10%, incluso más preferiblemente menos de un 5%, en particular menos de un 2% y de la manera más preferible menos de un 1%, de los otros isómeros. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se especifica que un compuesto de mGluR2 es (R), esto significa que el compuesto está sustancialmente exento del isómero (S); por ejemplo, cuando se especifica que un compuesto de mGluR2 es E, eso significa que el compuesto está sustancialmente exento del isómero Z; por ejemplo, cuando se especifica que un compuesto de mGluR2 es cis, esto significa que el compuesto está sustancialmente exento del isómero trans.

15 Para su uso en medicina, las sales del compuesto de esta invención se refieren a "**sales farmacéuticamente aceptables**" no tóxicas (sales de los compuestos de la presente invención en las que el contraión es farmacéuticamente aceptable). Sin embargo, otras sales pueden ser útiles en la preparación o purificación de los compuestos según esta invención o de sus sales farmacéuticamente aceptables, y pueden abarcar ácidos y bases que no son farmacéuticamente aceptables. Todas las sales, ya sean farmacéuticamente aceptables o no, quedan
20 incluidas dentro del ámbito de la presente invención.

Se pretende que las sales de adición de ácidos y bases farmacéuticamente aceptables tal como se mencionan anteriormente o a continuación en la presente comprendan las formas de sal de adición de ácidos y bases no tóxicas terapéuticamente activas que los compuestos de la invención pueden formar. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos incluyen sales de adición de ácidos que pueden formarse, por ejemplo, mezclando una disolución del compuesto con una disolución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como por ejemplo, ácidos inorgánicos
25 tales como hidrácidos halogenados, p. ej. ácido clorhídrico o bromhídrico, ácidos sulfúrico, nítrico o fosfórico; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácidos acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, pirúvico, oxálico (es decir etanodióico), malónico, succínico (es decir ácido butanodióico), maléico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluenosulfónico, ciclámico, salicílico, p-aminosalicílico y pamoicos. A la inversa, dichas formas de sales pueden convertirse en la forma de base libre mediante tratamiento con una base adecuada. Además, cuando los compuestos de la invención portan un resto ácido, las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden incluir bases orgánicas e inorgánicas. Las formas salinas de bases adecuadas comprenden, por ejemplo, las sales de amonio, las sales de metales alcalinos y alcalinotérreos, p.
30 ej., sales de litio, sodio, potasio, magnesio y calcio, sales con bases orgánicas, p. ej., aminas primarias, secundarias y terciarias alifáticas y aromáticas tales como metilamina, etilamina, propilamina, isopropilamina, los cuatro isómeros de la butilamina, dimetilamina, dietilamina, dietanolamina, dipropilamina, diisopropilamina, di-n-butilamina, pirrolidina, piperidina, morfolina, trimetilamina, trietilamina, tripropilamina, quinuclidina, piridina, quinolina e isoquinolina; la benzatina, N-metil-D-glucamina, sales de hidrabamina y sales de aminoácidos tales como, por ejemplo, arginina y lisina. A la inversa, la forma salina puede convertirse en la forma de ácido libre mediante tratamiento con ácido.

40 El término "**solvato**" comprende las formas de adición de disolventes, así como las sales de los mismos, que el compuesto 6-b puede formar. Ejemplos de tales formas de adición de disolventes son, p. ej., hidratos y alcoholatos.

Preparación del compuesto

El compuesto de acuerdo con la invención se puede preparar por lo general mediante una sucesión de pasos, cada uno de los cuales conocido por el experto. En particular, el compuesto se puede preparar de acuerdo con los siguientes
45 métodos de síntesis.

El compuesto se puede sintetizar en forma de mezclas racémicas de enantiómeros que se pueden separar entre sí siguiendo procedimientos de resolución conocidos en la técnica. El compuesto racémico se puede convertir en las formas salinas diastereoméricas correspondientes mediante reacción con un ácido quiral adecuado. Dichas formas salinas diastereoméricas se separan posteriormente, por ejemplo, mediante cristalización selectiva o fraccionada y los
50 enantiómeros se liberan de las mismas con álcali. Una manera alternativa para separar las formas enantioméricas del compuesto conlleva cromatografía líquida o cromatografía con fluidos supercríticos (SFC) utilizando una fase estacionaria quiral. Dichas formas estereoquímicamente isoméricas puras también se pueden derivar de las formas estereoquímicamente isoméricas puras correspondientes de los materiales de partida apropiados, siempre que la reacción transcurra de manera estereoespecífica.

55 Tal como se usa en la presente, se pretende que el término "**composición**" abarque un producto que comprende los componentes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de combinaciones de los componentes especificados en las cantidades especificadas.

Tal como se usa en la presente, el término "**sujeto**" se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano adulto, niño o bebé, que es o que ha sido objeto de tratamiento, observación o experimentación.

5 El término "**cantidad terapéuticamente eficaz**", tal como se usa en la presente, significa la cantidad de compuesto o agente farmacéutico activo que provoca la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o humano que busca un investigador, veterinario, médico u otro profesional sanitario, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que está tratándose y/o la reducción de la gravedad de uno o más de los síntomas de la enfermedad que está tratándose.

10 La combinación de (a) ligando de SV2A y (b) modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo tanto si los compuestos (a) and (b) se administran simultáneamente, por separado o de manera secuencial, puede ser beneficiosa en comparación con el efecto de los compuestos (a) o (b) administrados solos. En particular, se puede producir al menos un efecto beneficioso, p. ej., una mejora mutua del efecto de los compuestos (a) y (b), un efecto más que aditivo, en particular un efecto sinérgico; otros efectos beneficiosos incluyen, por ejemplo, una dosis eficaz significativamente reducida para la combinación de (a) y (b); un efecto terapéutico adicional no observado para ninguno de los compuestos (a) o (b) por sí solos, un perfil de efectos secundarios más beneficioso o un efecto terapéutico combinado con una dosis no eficaz de uno de los compuestos (a) y (b) o de ambos.

20 Cuando la presente invención se refiera a la coterapia o terapia de combinación, que comprende la administración de (a) ligando de proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") y (b) compuesto 6-b tal como se define en la presente, cantidad farmacéutica o terapéuticamente eficaz significará la cantidad de la combinación de agentes tomados conjuntamente, de manera que el efecto combinado provoque la respuesta medicinal o biológica deseada. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz de una coterapia que comprende la administración de (a) un ligando de SV2A tal como se define en la presente y (b) compuesto 6-b tal como se define en la presente sería la cantidad del (a) ligando de SV2A tal como se describe en la presente y la cantidad de (b) un compuesto 6-b que cuando se administran conjuntamente o de manera secuencial tiene un efecto combinado que es terapéuticamente eficaz. Además, un experto en la técnica reconocerá que en el caso de coterapia con una cantidad terapéuticamente eficaz, como en el ejemplo anterior, la cantidad del compuesto 6-b, y/o la cantidad del ligando de SV2A adecuado puede ser o puede no ser, de manera individual, terapéuticamente eficaz.

30 La presente invención proporciona métodos de prevención o tratamiento que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una coterapia con una cantidad terapéuticamente eficaz de un ligando de SV2A y una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto 6-b, tal como se describe en la presente. Con el fin de lograr este objetivo, los compuestos o composiciones de esta invención deben utilizarse en la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz correcta, tal como se describe a continuación.

35 Las dosis y los programas óptimos que deben administrarse pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica y variarán dependiendo del compuesto particular usado, el modo de administración, la concentración de la preparación, el modo de administración y el avance del estado patológico. Además, factores asociados con el paciente particular que está tratándose, que incluyen edad del paciente, peso, dieta y tiempo de administración, darán como resultado la necesidad de ajustar las dosificaciones.

40 Un experto en la técnica reconocerá que una dosis terapéuticamente eficaz de los compuestos de la presente invención puede incluir dosis repetidas dentro de un régimen de tratamiento prolongado que proporcionará resultados clínicamente significativos.

45 Las cantidades del compuesto 6-b en las combinaciones de la invención que se administran diariamente pueden variar de desde aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 2000 mg. Ejemplos de cantidades diarias del compuesto 6-b son 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 750 y 1000 miligramos para el ajuste sintomático de la dosis al paciente que va a tratarse. Una cantidad eficaz del fármaco se administra normalmente con un nivel de dosificación de desde aproximadamente 0.01 mg/kg hasta aproximadamente 150.0 mg/kg de peso corporal por día o cualquier intervalo dentro del mismo. Preferiblemente, el intervalo es de desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 100.0 mg/kg de peso corporal por día, más preferiblemente desde aproximadamente 0.5 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, más preferiblemente desde aproximadamente 1.0 hasta aproximadamente 25.0 mg/kg de peso corporal por día. Los compuestos pueden administrarse siguiendo un régimen de 1, 2, 3 ó 4 veces por día. Las cantidades de ligando de SV2A que se administran diariamente pueden variar desde aproximadamente 0.01 hasta aproximadamente 7000 mg, preferiblemente estarán entre 250 y 5000 mg y más preferiblemente estarán entre 500 y 3000 mg. Ejemplos de cantidades diarias del ligando de SV2A son 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1500 y 3000 miligramos para el ajuste sintomático de la dosis al paciente que va a tratarse. Normalmente, una cantidad eficaz del fármaco se administra con un nivel de dosificación de desde aproximadamente 0.01 mg/kg hasta aproximadamente 150.0 mg/kg de peso corporal por día o cualquier intervalo dentro del mismo. Preferiblemente, el intervalo es de desde aproximadamente 0.1 hasta aproximadamente 100.0 mg/kg de peso corporal por día, más preferiblemente desde aproximadamente 0.5 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, más preferiblemente desde aproximadamente 1.0 hasta aproximadamente 25.0 mg/kg de peso corporal por día. Los compuestos pueden administrarse siguiendo un régimen de 1, 2, 3 ó 4 veces por

día. Todas las cantidades mencionadas en este párrafo y en los siguientes se refieren a la forma libre (es decir, la forma no salina). Los valores anteriores representan equivalentes de la forma libre, es decir, cantidades como si se administrase la forma libre. Si se administran sales, deben calcularse las cantidades en función de la razón de pesos moleculares entre la sal y la forma libre.

- 5 Las dosis diarias mencionadas anteriormente se calculan para un peso corporal promedio de aproximadamente 70 kg y deben recalcularse en el caso de aplicaciones pediátricas o cuando se utilicen en pacientes con un peso corporal que sea sustancialmente diferente.

10 Las dosificaciones pueden presentarse en forma de una, dos, tres, cuatro o más subdosis administradas en intervalos adecuados a lo largo del día. La dosificación usada corresponde preferiblemente a la cantidad diaria del compuesto 6-b, o del ligando de SV2A, mencionado anteriormente, o una subdosis de la misma, tal como 1/2, 1/3, 1/4 de la misma. Una forma de dosificación puede contener el compuesto 6-b, o el ligando de SV2A o ambos juntos, en una cantidad equivalente a los intervalos o las cantidades mencionados en los párrafos anteriores, por ejemplo una forma de dosificación puede contener 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg, 150 mg, o 200 mg del compuesto 6-b, 10 mg, 25 mg, 50 mg, 100 mg o 250 mg, del ligando de SV2A, tanto en formulaciones separadas como en una formulación combinada.

15 En una realización, el compuesto 6-b se administra una vez al día (q.d.), en particular como una dosis al día, y el ligando de SV2A se administra una o dos veces al día (q.d. o b.i.d.), en particular como una o dos dosis al día. En el caso de que ambos compuestos deban administrarse una vez al día, esto puede lograrse administrando dos dosis por separado, una con el compuesto 6-b, una con el ligando de SV2A, o administrando una dosis combinada que contiene el compuesto 6-b y el ligando de SV2A.

20 Las combinaciones de la invención pueden administrarse una, dos, tres, cuatro o, si se desea, múltiples veces al día. En una realización, la combinación se administra una vez al día. En otra realización, la combinación se administra dos veces al día o tres veces al día. La administración de las dosis puede realizarse mediante formas de dosificación separadas, es decir, formas de dosificación que contienen solo el compuesto 6-b o solo el ligando de SV2A; o mediante formas de dosificación combinadas que contienen los principios activos compuesto 6-b y ligando de SV2A. Además,

25 puede usarse una mezcla del uso de una forma de dosificación combinada y de formas de dosificación separadas. Más adelante en la presente se describen las formas de dosificación que pueden administrarse, siendo las preferidas las formas de dosificación orales, en particular los comprimidos o las cápsulas.

30 Los principios activos pueden formularse en composiciones farmacéuticas o bien por separado o bien como una composición farmacéutica combinada. En el último caso, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 6-b, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y del ligando de SV2A, siendo el anterior tal como se especifica en la presente, y un portador farmacéuticamente aceptable.

35 En un aspecto adicional, esta invención se refiere a un proceso para preparar una composición farmacéutica tal como se especifica en la presente, que comprende mezclar de forma íntima un portador farmacéuticamente aceptable con una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 6-b o un solvato o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un ligando de SV2A.

40 Las combinaciones proporcionadas en la presente también pueden formularse como una preparación combinada para su uso simultáneo, secuencial o por separado en la prevención y el tratamiento de la epilepsia y trastornos relacionados; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente; trastornos bipolares y trastornos relacionados; en neuroprotección; o en la prevención de la epileptogénesis. En tal caso, el compuesto 6-b se formula en una composición farmacéutica que contiene otros excipientes farmacéuticamente aceptables, y el ligando de SV2A se formula por separado en una composición farmacéutica que contiene otros excipientes farmacéuticamente aceptables. De manera conveniente, estas composiciones farmacéuticas separadas pueden ser parte de un kit para su uso simultáneo, secuencial o por separado.

45 Los componentes individuales de la combinación de la presente invención pueden administrarse simultáneamente o por separado en diferentes momentos durante el transcurso de una terapia o de forma concurrente en formas de combinación únicas o divididas.

50 Por tanto, el compuesto 6-b y el ligando de SV2A, individualmente o combinados, pueden formularse en diversas composiciones farmacéuticas adecuadas para fines de administración. En estas, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto particular, o de los dos compuestos, se combina con un portador farmacéuticamente aceptable, que puede tomar una gran variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse como medicamentos que deben administrarse por vía oral, parenteral (incluyendo la vía subcutánea (s.c.), intramuscular (i.m.) e intravenosa (i.v.)), rectal, transdérmica, bucal o nasal. Las composiciones farmacéuticas también pueden prepararse para administrarse directamente al sistema nervioso por vías que incluyen la vía intracerebral, intraventricular, intracerebroventricular, intratecal, intracisternal, intraespinal y/o periespinal mediante la administración con agujas y/o catéteres por vía intracraneal o intravertebral con o sin dispositivos de bombeo. Las composiciones adecuadas para la administración oral incluyen polvos, materiales granulados, agregados, comprimidos, pastillas recubiertas o prensadas, grajeas, sobres, cápsulas duras o de gelatina, jarabes y suspensiones. Las composiciones adecuadas para la administración parenteral incluyen

55

soluciones o emulsiones acuosas o no acuosas, mientras que para la administración rectal las composiciones adecuadas incluyen supositorios con un vehículo hidrófilo o hidrófobo. Para la administración tópica, pueden usarse sistemas de liberación transdérmica adecuados y, para el suministro nasal, pueden usarse sistemas de liberación de aerosol adecuados.

5 Por ejemplo, en la preparación de las composiciones para administración oral, puede emplearse cualquiera de los medios farmacéuticos habituales tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes en el caso de composiciones líquidas orales tales como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y disoluciones; o portadores sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes en el caso de composiciones sólidas. Para las composiciones parenterales, el portador normalmente comprenderá agua estéril, al
10 menos en gran parte, aunque se le pueden añadir otros componentes, tales como solubilizantes, emulsionantes o auxiliares adicionales. Pueden prepararse disoluciones inyectables en las que el portador comprende solución salina, disolución de glucosa o una mezcla de ambas. También pueden prepararse suspensiones inyectables, en cuyo caso pueden emplearse portadores líquidos, agentes de suspensión adecuados. También se incluyen preparaciones en forma sólida previstas para convertirse, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida tales como polvos para reconstitución. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el portador comprende
15 opcionalmente un agente potenciador de la penetración en la piel y/o un agente humectante, opcionalmente combinados con aditivos compatibles con la piel adecuados en proporciones minoritarias. El compuesto 6-b o el ligando de SV2A, o combinaciones de los mismos, también pueden administrarse por inhalación o insuflación oral mediante formulaciones adecuadas para este tipo de administración tales como una disolución, una suspensión o un
20 polvo seco. Algunas composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración en forma de aerosoles o pulverizadores son, por ejemplo, suspensiones del compuesto 6-b o del ligando de SV2A, o de ambos, en un portador líquido farmacéuticamente aceptable tal como etanol o agua o una mezcla de los mismos. Si se requiere, la formulación también puede contener adicionalmente otros auxiliares farmacéuticos tales como tensioactivos, emulsionantes y estabilizantes, así como un propelente. Una preparación de este tipo contiene el compuesto activo con una
25 concentración de desde aproximadamente el 0.1 hasta el 50%, en particular desde aproximadamente el 0.3 hasta el 3% en peso.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener el principio activo del compuesto 6-b o el ligando de SV2A, o ambos combinados en una concentración de aproximadamente el 0.1% a aproximadamente el 50%, o de
30 aproximadamente el 1% a aproximadamente el 30%, o de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 20%, o de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 20%, estando todos los porcentajes en peso, en las que el total de todos los componentes en dichas composiciones farmacéuticas no excede el 100%. En las composiciones que contienen los dos compuestos, el compuesto 6-b y el ligando de SV2A, el compuesto 6-b está presente en una concentración de aproximadamente el 0.1% a aproximadamente el 50%, o de aproximadamente el 1% a
35 aproximadamente el 30%, o de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 20%, o de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 20%; y el ligando de SV2A está presente con una concentración de aproximadamente el 3% a aproximadamente el 50%, o de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 50%, o de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 50%, o de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 40%, o de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30%, en las que el total de todos los componentes en dichas composiciones farmacéuticas no excede el 100%.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en una forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Los ejemplos incluyen comprimidos (incluyendo los comprimidos recubiertos o ranurados), cápsulas, pastillas, supositorios, sobres de polvos, obleas, disoluciones o suspensiones inyectables, y múltiples segregados de los mismos. Son de interés las formas de dosificación sólidas para administración oral tales como comprimidos o cápsulas.

45 Las formas de dosificación sólidas en una forma de dosis unitaria pueden envasarse en cualquier envase conocido, prefiriéndose los envases de tipo blíster, en particular para comprimidos y cápsulas. Cuando el compuesto 6-b y el ligando de SV2A se formulan por separado, podrían envasarse en blísteres por separado, pero un blíster también podría comprender formas de dosis unitarias del compuesto 6-b y del ligando de SV2A, por ejemplo, una fila con unidades del compuesto 6-b y otra con el ligando de SV2A. También pueden existir otras posibilidades.

50 Las combinaciones de esta invención pueden usarse para tratar o prevenir la epilepsia y trastornos relacionados; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente; trastornos bipolares y trastornos relacionados; o pueden usarse como un neuroprotector o para prevenir la epileptogénesis.

Tal como se usa en la presente, se pretende que el término "**tratamiento**" se refiera a todos los procesos en los cuales pueda producirse una ralentización, interrupción, detención o finalización del avance de una enfermedad o un alivio
55 de sus síntomas, pero no indica necesariamente una eliminación total de todos los síntomas.

Tal como se usan en la presente y a menos que se indique lo contrario, los términos "**epilepsia y trastornos relacionados**" o "**epilepsia o trastornos relacionados**", significarán cualquier trastorno en el cual un sujeto (preferiblemente un ser humano adulto, niño o bebé) experimenta una o más convulsiones y/o temblores. Los ejemplos adecuados incluyen epilepsia (que incluye epilepsias relacionadas con la localización, epilepsias generalizadas, epilepsias con convulsiones tanto generalizadas como locales), convulsiones de inicio parcial con o sin generalización,
60

convulsiones mioclónicas, convulsiones tónico-clónicas generalizadas primarias, en particular en pacientes con epilepsia generalizada idiopática, convulsiones asociadas con el síndrome de Lennox-Gastaut, convulsiones como una complicación de una enfermedad o afección (tales como las convulsiones asociadas con una encefalopatía, fenilcetonuria, enfermedad de Gaucher juvenil, epilepsia mioclónica progresiva de Lundborg, accidente cerebrovascular, traumatismo craneal, estrés, cambios hormonales, uso o abstinencia de drogas, uso o abstinencia del alcohol, privación del sueño, fiebre, infección) estados epilépticos (convulsivos o no convulsivos), temblor esencial, síndrome del miembro inquieto. Preferiblemente, el trastorno se selecciona de epilepsia (independientemente del tipo, causa subyacente u origen), temblor esencial o síndrome del miembro inquieto. Más preferiblemente, el trastorno es epilepsia (independientemente del tipo, causa subyacente u origen) o temblor esencial. Un ejemplo particular de epilepsia es la epilepsia refractaria, también denominada epilepsia resistente a la terapia o al tratamiento. Este término se usa a menudo cuando en los pacientes han fracasado tres o más fármacos antiepilépticos (FAE). La epilepsia refractaria también incluye la epilepsia parcial refractaria y la epilepsia generalizada refractaria (incluyendo la idiopática o sintomática).

Tal como se usa en la presente, el término "**dolor neuropático**", incluye el dolor resultante de estados o trastornos crónicos o debilitantes. Los estados o trastornos crónicos o debilitantes que pueden conducir a dolor neuropático incluyen neuropatía periférica diabética dolorosa, neuralgia posherpética, neuralgia trigeminal, dolor posterior a accidente cerebrovascular, dolor asociado con esclerosis múltiple, dolor asociado con neuropatías tal como el que se produce en mononeuritis y neuropatía postraumática o idiopática, dolor neuropático asociado con VIH, dolor neuropático asociado con cáncer, dolor neuropático asociado con túnel carpiano, dolor asociado con una lesión de la médula espinal, síndrome de dolor regional complejo, dolor neuropático asociado con fibromialgia, dolor cervical y lumbar, distrofia simpática refleja, síndrome del miembro fantasma y síndromes de dolor asociados con otros estados debilitantes y crónicos.

Tal como se usa en la presente, el término "**migraña**" significará una afección clínica crónica, episódica y debilitante que se diagnostica por la presencia de cefaleas pulsantes unilaterales de moderadas a graves que perduran entre 4 y 72 h, que incluye migraña con aura y migraña sin aura. Tal como se usa en la presente, "migraña sin aura", significará al menos cinco ataques que cumplen los siguientes criterios: (a) el ataque de cefalea perdura durante 4-72 horas, presentando la cefalea al menos dos de las siguientes características: localización unilateral, calidad pulsante, intensidad de moderada a grave con una influencia directa sobre actividades de la vida diaria y que se agrava al subir escaleras o realizar rutinas similares; y (b) durante la cefalea, se produce al menos uno de los siguientes fenómenos: náusea y/o vómitos, fotofobia y fonofobia. Tal como se usa en la presente, "migraña con aura", significará al menos dos ataques acompañados por al menos 3 de las 4 características siguientes: (a) uno o más síntomas de aura completamente reversibles; (b) al menos un síntoma de aura que se desarrolla de forma gradual a lo largo de más de cuatro minutos o dos o más síntomas que se producen de forma sucesiva; (c) ningún síntoma de aura que perdure más de 60 minutos; (d) se produce una cefalea antes, de manera simultánea con o después del aura, con un intervalo libre entre el aura y la cefalea de menos de aproximadamente 60 minutos.

Tal como se usa en la presente, el término "**trastornos bipolares y trastornos relacionados**" incluirá trastorno bipolar de tipo I (p. ej., episodio maníaco único, episodio hipomaníaco más reciente, episodio maníaco más reciente, episodio mixto más reciente, episodio depresivo más reciente y episodio no especificado más reciente), trastorno bipolar de tipo II, trastorno ciclotímico y trastorno bipolar no especificado de otro modo (tal como estos términos se definen según sus criterios de diagnóstico, en el Diagnostic and Statistical manual of Mental Disorders, 4ª edición, revisión de texto, Asociación Psiquiátrica Americana, 2000 (DSM-IV-TR) o en la 5ª edición, revisión de texto, Asociación Psiquiátrica Americana, 2013 (DSM-5™). Preferiblemente, el trastorno bipolar se caracteriza por fases depresivas y maníacas (o hipomaníacas), en el que las fases son cíclicas. Preferiblemente, el trastorno bipolar es un trastorno bipolar de tipo I o un trastorno bipolar de tipo II. Tal como se usa en la presente "manía" debe incluir manía o una fase de estado de ánimo maníaco, independientemente de la causa subyacente. Tal como se usa en la presente, se pretende que el término "manía bipolar" signifique la manía asociada con una característica de o sintomática de un trastorno bipolar. Por tanto, los métodos para tratar la manía bipolar de la presente invención se refieren a métodos que tratan la manía y/o la fase maníaca de los trastornos bipolares. Tal como se usa en la presente, se pretende que el término "depresión bipolar", signifique la depresión asociada con una característica de o sintomática de un trastorno bipolar. Por tanto, métodos para tratar la depresión bipolar de la presente invención se refieren a métodos que tratan la depresión y/o la fase depresiva de los trastornos bipolares. Tal como se usan en la presente, a menos que se indique lo contrario, los términos "ciclo" o "ciclo bipolar" se referirán a la alteración del estado de ánimo entre las fases depresiva y maníaca características de los trastornos bipolares. Por tanto, la presente invención incluye métodos para la estabilización de dicho ciclo, que incluyen la reducción de la frecuencia del ciclo y/o la reducción de la magnitud de las fases maníaca y/o depresiva.

Por tanto, en una realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede utilizarse para estabilizar el estado de ánimo, en particular estabilizar el estado de ánimo durante una depresión maníaca.

Tal como se usa en la presente, el término "**epileptogénesis**", se refiere al proceso gradual mediante el cual se desarrolla la epilepsia. Este proceso puede suceder tras una lesión cerebral o después de una serie de estados, que incluyen enfermedades neurodegenerativas, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, tumor cerebral, infecciones del sistema nervioso central, estado epiléptico, o puede suceder después de que se produzcan mutaciones génicas.

Tal como se usa en la presente, el término "**ansiedad**", se refiere en particular al trastorno de ansiedad generalizado.

Tal como se usa en la presente, el término "**aproximadamente**", tiene su significado convencional. En realizaciones particulares, cuando se refiere a un valor numérico, puede interpretarse que significa el valor numérico $\pm 10\%$, o $\pm 5\%$, o $\pm 2\%$, o $\pm 1\%$, o $\pm 0.5\%$ o $\pm 0.1\%$. En otras realizaciones, se hace referencia al valor exacto, es decir, no se menciona el término "aproximadamente".

"**Y/o**" significa que cada uno de o ambos o todos los componentes o características de una lista, son posibles variantes, especialmente dos o más de los mismos de un modo alternativo o acumulativo.

Tal como se usan en la presente, los términos "**un/a**", "**el/la**" y términos similares usados en el contexto de la presente invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones), deben interpretarse de manera que abarquen tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otro modo en la presente o que el contexto indique claramente lo contrario.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen para ayudar en la comprensión de la invención.

A) COMPUESTOS – QUÍMICA Y PRUEBAS *IN VITRO*

A menos que se indique lo contrario, todos los materiales de partida se obtuvieron de proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación adicional.

A continuación, "ac." significa acuoso; "DCE" significa 1,2-dicloroetano, "DCM" significa diclorometano; "DIPE" significa éter diisopropílico; "DIPEA" significa *N,N*-diisopropiletilamina; "DMF" significa *N,N*-dimetilformamida; "ES" significa electrospray; "Et₃N" significa trietilamina; "Et₂O" significa éter dietílico; "EtOAc" significa acetato de etilo; "h" significa horas; "HPLC" significa cromatografía líquida de alta resolución; "HRMS" significa espectros/espectrometría de masas de alta resolución; "l" o "L" significa litro; "LRMS" significa espectrometría/espectros de masas de baja resolución; "MeOH" significa metanol; "min" significa minuto(s); "pf" significa punto de fusión; "Pd(PPh₃)₄" significa tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0); "FI" significa fase inversa; "t.a." significa temperatura ambiente; "s" significa segundos; "sat." significa saturado; "SFC" significa cromatografía de fluidos supercríticos; "sol." significa solución; "THF" significa tetrahidrofurano.

Las reacciones asistidas por microondas se realizaron en un reactor monomodal; reactor de microondas Initiator™ Sixty EXP (Biotage AB) o en un reactor multimodal: MicroSYNTH Labstation (Milestone, Inc.).

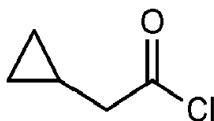
La cromatografía en capa fina (TLC) se llevó a cabo en placas de gel de sílice 60 F254 (Merck) utilizando disolventes de grado reactivo. La cromatografía en columna abierta se realizó en gel de sílice, tamaño de partículas de 60 Å, malla = 230-400 (Merck) utilizando técnicas estándar. La cromatografía en columna ultrarrápida automatizada se realizó utilizando cartuchos listos para conectar de Merck, en gel de sílice irregular, tamaño de partícula de 15-40 μm (columnas ultrarrápidas desechables de fase normal) en un sistema SPOT o LAFLASH de Armen Instrument.

La configuración estereoquímica absoluta de algunos de los compuestos se determinó utilizando dicroísmo circular vibracional (VCD). Se midieron en un Equinox 55 de Bruker equipado con un PMA 37, en una celda líquida de KBr utilizando CD₂Cl₂ como disolvente (PEM: 1350 cm⁻¹, LIA: 1 mV, resolución: 4 cm⁻¹). Se puede consultar una descripción del uso de VCD para la determinación de la configuración absoluta en Dyatkin A.B. *et. al*, Chirality, 14:215-219 (2002).

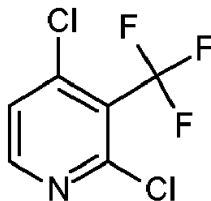
Siempre que se indique en la presente la notación "RS", esta indica que el compuesto es una mezcla racémica a menos que se indique lo contrario. La configuración estereoquímica de algunos compuestos se ha designado "*R*" o "*S*" cuando se ha separado la mezcla. El exceso enantiomérico de los compuestos mostrados en la presente se determinó mediante el análisis de la mezcla racémica mediante cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) seguida de comparación por SFC del (de los) enantiómero(s) separado(s).

Preparación de intermedios

Descripción 1 – Intermedio 1

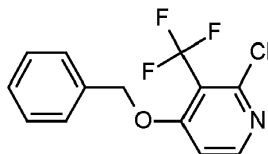


Se disolvió ácido ciclopropilacético ([CAS 5239-82-7], 50 g, 500 mmol) en CH₂Cl₂ (300 mL) y a continuación, se añadió SOCl₂ (100 mL). La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 2 h y a continuación se evaporó el disolvente para producir el intermedio **1** (53 g, 90%), que se utilizó sin purificación adicional.

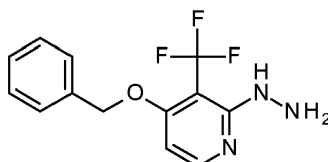
Descripción 2 – Intermedio 2

5 A una solución de 2,4-dicloro-3-yodopiridina ([CAS 343781-36-2], 290 g, 1058 mmol) en DMF (1.7 L) se añadió 2,2-difluoro-2-(fluorosulfonyl)acetato de metilo ([CAS 680-15-9], 403 g, 2098 mmol) y CuI (403 g, 2.13 mol), a continuación, la reacción se calentó a 100 °C durante 5 h.

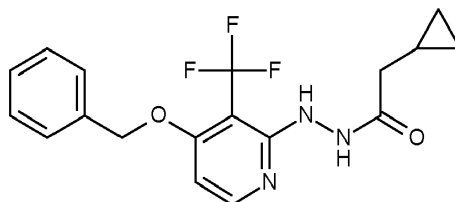
La reacción se enfrió y se filtró. El filtrado se diluyó con H₂O y se extrajo con Et₂O y se lavó con una solución de NH₃. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío para reducir el intermedio 2 (160 g), que se utilizó sin purificación adicional.

Descripción 3 – Intermedio 3

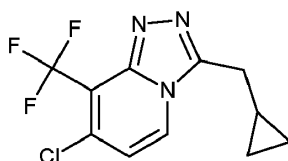
10 A una solución de NaH (60% en aceite, 24 g, 600 mmol) en DMF (2 L) a 0 °C se añadió alcohol bencílico (35 g, 325 mmol) y a continuación la reacción se agitó durante 2 min. Se añadió el intermedio 2 (160 mg, 741 mmol) en una porción y se agitó a 0 °C durante 1 h. La reacción se diluyó mediante la adición de H₂O y se extrajo con Et₂O. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante columna cromatográfica en gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/EtOAc = 20/1). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente para producir el intermedio 3 (100 g, 38%).

Descripción 4 – Intermedio 4

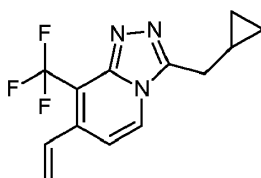
20 A una solución del intermedio 3 (100 g, 277 mmol) en 1,4-dioxano (1.5 L) se añadió hidrato de NH₂NH₂ (solución al 85% en agua, 300 g, 9.11 mol) y a continuación la reacción se calentó en un tubo sellado a 160° durante 2 h. La mezcla se concentró al vacío, se disolvió en DCM y se lavó con NaHCO₃. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío para producir el intermedio 4 (90 g, 90%), que se utilizó sin purificación adicional.

Descripción 5 – Intermedio 5

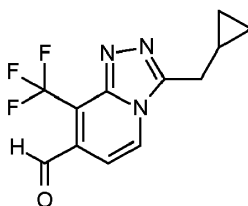
25 A una solución del intermedio 4 (90 g, 318 mmol) en CH₂Cl₂ (1.5 L) se añadió trietilamina (64.3 g, 636 mmol), la mezcla se enfrió hasta 0 °C y a continuación se añadió una solución del intermedio 1 (53 g, 449 mmol) en CH₂Cl₂. La solución se agitó a TA durante 1 h. La mezcla de reacción se lavó con una sol. ac. sat. de NaHCO₃ y se extrajo con CH₂Cl₂. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío para producir el intermedio 5 (104.4 g, 90%).

Descripción 6**Intermedio 9**

- 5 A una solución del intermedio **5** (101 g, 277 mmol) en CH₃CN (1.2 L) se añadieron oxiclورو de fósforo (V) (84.7 g, 553 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (71.3 g, 553 mmol). La mezcla de reacción se agitó a 90 °C durante 38 h. A continuación, la reacción se diluyó con DCM y se lavó con una solución de Na₂CO₃. La capa orgánica se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice (eluyente: éter de petróleo/EtOAc = 4/1). Se recogieron las fracciones puras y se evaporó el disolvente para producir el intermedio **9** (31.39 g, 41%).

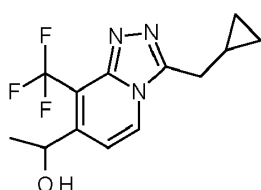
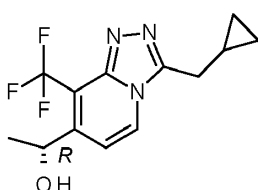
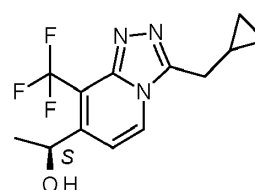
10 **Descripción 7 – Intermedio 13**

- 15 Se añadió (Ph₃P)₄Pd (2.096 g, 1.81 mmol) a una solución agitada del intermedio **9** (10 g, 36.28 mmol) y 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano ([CAS 75927-49-0], 7.77 mL, 43.53 mmol) en dioxano desoxigenado (30 mL) y una solución saturada de NaHCO₃ desoxigenada (30 mL) en nitrógeno. La mezcla se agitó a 100 °C durante 18 h. La mezcla se diluyó con EtOAc/agua y se filtró a través de un lecho de tierras de diatomeas. El filtrado se trató con salmuera y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄), se filtró y los disolventes se evaporaron al vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (sílice; EtOAc en CH₂Cl₂ de 0/100 a 5/95). Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron al vacío para producir el intermedio **13** (6.08, 63%) como un sólido amarillo.

20 **Descripción 8****Intermedio 17**

- 25 Se añadieron tetróxido de osmio (2.5% in *t*-BuOH, 10.103 mL, 0.781 mmol) y a continuación peryodato de sodio 12.53 g, 58.58 mmol) en agua (48.5 mL) a una suspensión del Intermedio **13** (6.08 g, 20.02 mmol) en dioxano (192 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h.

La mezcla se trató con agua y EtOAc y se filtró a través de un techo de tierra de diatomeas. El filtrado se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se evaporaron los disolventes al vacío. El producto crudo se lavó con Et₂O y se filtró y se secó para producir intermedio **17** (4.25 g, 79%) como un sólido marrón.

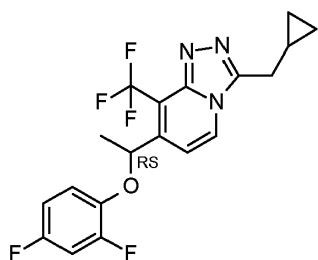
Descripción 930 **(a) Intermedios 21a, 21b y 21c****Intermedio 21a****Intermedio 21b****Intermedio 21c**

Se añadió bromuro de metilmagnesio (1.4 M en THF, 12.40 mL, 17.37 mmol) gota a gota a una suspensión agitada del intermedio **17** (4.25 g, 15.79 mmol) en THF (281.07 mL) a -20 °C en una atmósfera de N₂. La mezcla se agitó a -20 °C durante 45 minutos. El crudo se trató con una sol. sat. de NH₄Cl y se extrajo con EtOAc. La capa orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (sílice: MeOH en DCM de 0/100 a 4/96). Se recogieron las fracciones deseadas y se concentraron al vacío para producir intermedio **21a** (mezcla racémica) (2.96 g, 66%). El intermedio **21a** (1.82 g) se purificó mediante SFC: [fase estacionaria: CHIRALPAK AD-H (5µm 250 x20 mm), fase móvil: 80% de CO₂, 20% de EtOH] para producir **21b** (enantiómero *R*) (0.453 g, 10%) como un sólido gris pálido y el intermedio **21c** (enantiómero *S*) (0.439 g, 10%).

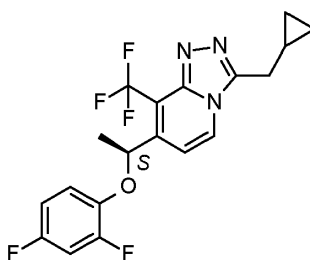
10 Preparación del compuesto final

Ejemplo 1

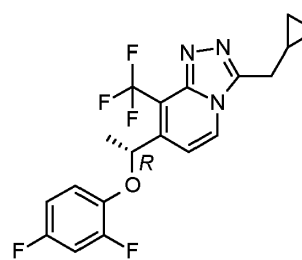
(a) Síntesis de los compuestos 4-b, 6-b y 5-b



Compuesto 4-B



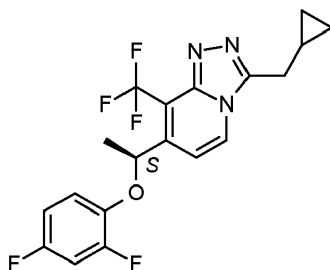
Compuesto 6-B



Compuesto 5-B

15 Se añadió DIAD (2.07 mL, 10.52 mmol) gota a gota a una solución agitada del intermedio **21a** (2 g, 7.01 mmol), 2,4-difluorofenol (1.00 mL, 10.52 mmol) y trifetilfosfina (2.76 g, 10.52 mmol) en THF (74.18 mL) a 0 °C y en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a 100 °C durante 10 minutos con irradiación de microondas. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con una sol. sat. de NaHCO₃. La capa orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (sílice; MeOH en DCM de 0/100 a 97/3). Las fracciones deseadas se recogieron y concentraron al vacío. El residuo se purificó con DIPE para obtener el compuesto **4-b** (1.46 g, 52%) como un sólido blanco, que se purificó mediante SFC quiral [fase estacionaria: Chiralpak AD (5µm 250x30 mm, fase móvil: 85% de CO₂, 15% de iPrOH)], lo que produjo el compuesto **6-b** (0.659 g, 24%) y el compuesto **5-b** (0.693 g, 25%).

(b) Síntesis alternativa del compuesto 6-b



Comp. N° 6-b

25 Se añadió DIAD (31.06 µL, 0.16 mmol) a una solución agitada del intermedio **21b** (30 mg, 0.11 mmol), 2,4-difluorofenol (15.07 µL, 0.16 mmol) y trifetilfosfina (41.38 mg, 0.16 mmol) en THF (1.11 mL) a 0 °C y en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a 100 °C durante 10 minutos con irradiación de microondas. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con una sol. sal. de NaHCO₃. La capa orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna ultrarrápida (sílice; MeOH en DCM de 0/100 a 97/3). Las fracciones deseadas se recogieron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó con DIPE para obtener el compuesto **6-b** (40 mg, 96%) como un sólido blanco.

(c) Síntesis de la sal de clorhidrato del compuesto 6-b (·HCl)

35 Se añadió DIAD (207.06 µL, 1.05 mmol) gota a gota a una solución agitada del intermedio **21b** (200 mg, 0.70 mmol), 2,4-difluorofenol (100.45 µL, 1.05 mmol) y trifetilfosfina (275.84 mg, 1.0516 mmol) en THF (4 mL) a 0 °C y en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó a 100 °C durante 15 minutos con irradiación de microondas. La mezcla se diluyó con EtOAc y se lavó con una sol. sat. de NaHCO₃. La capa orgánica se separó, se secó (Na₂SO₄), se filtró y se concentró al vacío. El residuo se purificó mediante RP HPLC (fase estacionaria: C18 XBridge 30 x 100 mm 5 µm, fase móvil: gradiente de un 60% de una solución al 0.1% de NH₄CO₃H/NH₄OH en agua, pH 9, y un 40% de CH₃CN a un

43% de una solución al 0.1% de $\text{NH}_4\text{CO}_3\text{H}/\text{NH}_4\text{OH}$ en agua, pH 9, y un 57% de CH_3CN), para generar un residuo sólido blanco que se disolvió en Et_2O (8 mL) y 1,4-dioxano (0.5 mL). A la solución obtenida de esa manera se añadió HCl (4M en dioxano, 200 μL) gota a gota. El precipitado sólido blanco se filtró, se lavó con Et_2O , se secó (Na_2SO_4) y se evaporó al vacío. El residuo blanco obtenido de esta manera se purificó con Et_2O para obtener el compuesto **6-b-HCl** (110 mg, 36%) como un sólido blanco.

Parte analítica

Rotaciones ópticas

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro 341 de Perkin-Elmer con una lámpara de sodio y se presentaron de la siguiente manera: $[\alpha]_D^T$ (λ , c g/100mL, disolvente, $T^\circ\text{C}$).

$[\alpha]_D^T = (100\alpha) / (l \times c)$: donde l es la longitud de paso en dm y c es la concentración en g/100 mL para una muestra a una temperatura T ($^\circ\text{C}$) y una longitud de onda λ (en nm). Si la longitud de onda de la luz utilizada es 589 nm (la línea D de sodio), entonces el símbolo D se puede utilizar en su lugar. Siempre se debe proporcionar el signo de la rotación (+ o -). Cuando se utiliza esta ecuación la concentración y el disolvente siempre se proporcionan en paréntesis después de la rotación. La rotación se indica utilizando grados y no se proporcionan unidades de concentración (se asume que es g/100 mL).

LCMS

Para la caracterización por (LC)MS, se utilizaron los siguientes métodos.

Procedimiento general

La medida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se realiza utilizando una bomba LC, un haz de diodos (DAD) o un detector UV y una columna como se especifica en los métodos respectivos. Si fue necesario, se incluyeron detectores adicionales (véase la tabla de los métodos más adelante).

Desde la columna se llevó el flujo al espectrómetro de masas (MS) que se configuró con una fuente de iones a presión atmosférica. La configuración de los parámetros de ajuste está comprendida en las competencias del experto (por ejemplo, intervalo de barrido, tiempo de permanencia...) con el fin de obtener iones que permitan la identificación del peso molecular monoisotópico nominal del compuesto (PM). La adquisición de datos se realizó con el software apropiado. Los compuestos se describen según sus tiempos de retención experimentales (t_R) e iones. Si no se especifica de manera diferente en la tabla de los datos, el ion molecular mencionado corresponde a $[\text{M}+\text{H}]^+$ (molécula protonada) y/o $[\text{M}-\text{H}]^-$ (molécula desprotonada). En caso de que el compuesto no fuera directamente ionizable se especifica el tipo de aducto (es decir, $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$, etc...). Para las moléculas con múltiples patrones isotópicos (Br, Cl...), el valor indicado es el obtenido para la masa isotópica más baja. Todos los resultados se obtuvieron con incertidumbres experimentales que son las que se asocian habitualmente con los métodos utilizados. A continuación, "SQD" significa detector de cuadrupolo único, "TA" temperatura ambiente, "BEH" híbrido de sílice/puente de etilsiloxano, "HSS" sílice de resistencia elevada, "DAD" detector de haz de diodos.

Tabla B: Códigos del método de LCMS (flujo expresado en mL/min; temperatura de la columna (T) en $^\circ\text{C}$; tiempo de ejecución en minutos).

Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ---- T Col	Tiempo de ejecución	Método LCMS
Waters: Acquity® UPLC® - DAD y SQD	Agilent: Eclipse Plus C18 RRHD (1.8 μm , 2.1x50mm)	A: 95% de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 6.5mM + 5% de CH_3CN , B: CH_3CN	De un 95% de A hasta un 5% de A en 4.6 min, se mantiene durante 0.4 min	1 --- 50	5	1
Waters: Acquity UPLC® - DAD y Quattro Micro™	Waters: BEH C18 (1.7 μm , 2.1x100mm)	A: 95% de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 7mM / 5% de CH_3CN , B: CH_3CN	De un 84.2% de A durante 0.49 min, a un 10.5% de A en 2.18 min, se mantiene durante 1.94 min, vuelta a 84.2 % de A en 0.73 min, se mantiene durante 0.73 min.	0.343 --- 40	6.2	3

Puntos de fusión

Los valores son valores máximos y se obtienen con las incertidumbres experimentales que están asociadas habitualmente con este método analítico.

Aparato FP 81HT/FP90 de Mettler

- 5 Se determinaron los puntos de fusión para varios compuestos en tubos capilares abiertos en un aparato FP81HT/FP90 (Mettler-Toledo). Los puntos de fusión se midieron con un gradiente de temperatura de 1, 3, 5 o 10 °C/minuto. La temperatura máxima fue de 300 °C. El punto de fusión se leyó en una pantalla digital.

Tabla C: Datos fisicoquímicos, tiempo de retención (t_R) en min, pico $[M+H]^+$ (molécula protonada), método LCMS y pf (punto de fusión en °C). (n.d. = no determinado).

Comp. n.º	Pf (°C)	t_R (min)	$[MH^+]$	Método LCMS	Rotación óptica
4-b	121.7	2.41	398	1	
5-b	142	2.99	398.3	3	+95.7 ° (589 nm, c 0.69 % p/v, DMF, 20 °C)
6-b	142.4	2.99	398.2	3	-95.4 ° (589 nm, c 0.7 % p/v, DMF, 20 °C)

10

SFC-MS**Procedimiento general**

- 15 La medida de SFC se realizó utilizando un sistema analítico de Berger instruments que comprendía un módulo de control del fluido con bomba dual FCM-1200 para suministrar dióxido de carbono (CO₂) y un modificador, un mostrador de líquidos automático de CTC Analytics, un módulo de control térmico TCM-20000 para calentar la columna desde la temperatura ambiente hasta 80 °C. Se utilizó un detector de matriz de fotodiodos 1100 UV de Agilent equipado con una celda de flujo a presión elevada que soporta hasta 400 bar. Se dividió el flujo desde la columna hacia un espectrómetro de MS. Se configuró el detector de MS con una fuente de ionización a presión atmosférica. Los siguientes parámetros de ionización para el espectrómetro de masas ZQ de Waters son: corona: 9 µa, temp de la fuente: 140 °C, cono: 30 V, temp de la sonda 450 °C, extractor 3 V, gas de desolvatación 400 L/h, gas el cono 70 L/h. Se utilizó nitrógeno como el gas nebulizador. La adquisición de datos se realizó con un sistema de datos Micromass MassLynx-Openlynx de Waters.

- 25 **Método 1:** Además del procedimiento general: La separación quiral analítica en SFC-MS se llevó a cabo en una columna CHIRALPAK AD DAICEL (10 µm, 4.6 x 250 mm) a 35 °C con una tasa de flujo de 3.0 mL/min. La fase móvil es un 85% de CO₂, 15% de iPrOH (+0.3% de iPrNH₂) que se mantiene 7 min en modo isocrático.

Tabla D: Datos de SFC analítica – t_R significa tiempo de retención (en minutos), $[M+H]^+$ significa una masa protonada del compuesto, el método se refiere al método utilizado para el análisis de SFC/MS de los compuestos enantioméricamente puros. La medida se comparó con la mezcla.

Comp. n.º	t_R	$[M+H]^+$	% de área UV	Método	Orden de elución del isómero
6-b	4.28	398	100	1	A
5-b	5.98	398	100	1	B

*A se refiere al primer isómero que eluye. B se refiere al segundo isómero que eluye.

30 **Resonancia magnética nuclear (RMN)**

Se registraron los espectros de ¹H RMN en un espectrómetro DPX-400 de Bruker con secuencias de pulso estándar, que funcionaba 400 MHz y 500 MHz, respectivamente. Los desplazamientos químicos (δ) se indican en partes por millón (ppm) en campo bajo respecto al tetrametilsilano (TMS), que se utilizó como patrón interno.

Comp. n.º 6-b: ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 0.30 - 0.38 (m, 2 H), 0.59 - 0.68 (m, 2 H), 1.14 - 1.22 (m, 1 H), 1.72 (d, $J=6.5$ Hz, 3 H), 3.02 - 3.14 (m, 2 H), 5.84 (c, $J=6.3$ Hz, 1 H), 6.67 - 6.73 (m, 1 H), 6.80 - 6.89 (m, 2 H), 7.30 (d, $J=7.4$ Hz, 1 H), 8.11 (d, $J=7.4$ Hz, 1 H)

Pruebas *in vitro*

- 5 Los compuestos proporcionados en la presente invención son moduladores alostéricos positivos de mGluR2. Parece que estos compuestos potencian las respuestas ante glutamato al unirse a un sitio alostérico que no es el sitio de unión del glutamato. La respuesta de mGluR2 a una concentración de glutamato aumenta cuando los compuestos están presentes. Se espera que el compuesto 6-b tenga su efecto sustancialmente en mGluR2 en virtud de su capacidad para potenciar la función del receptor. Los efectos de los moduladores alostéricos positivos estudiados en mGluR2 utilizando el método del ensayo de unión de ^{35}S GTP γ S descrito más adelante y que es adecuado para la identificación de tales compuestos y más especialmente el compuesto 6-b, se muestran en la Tabla E.

Ensayo de unión de ^{35}S GTP γ S

- 15 El ensayo de unión de ^{35}S GTP γ S es un ensayo basado en membrana funcional utilizado para estudiar la función del receptor acoplado a la proteína G (GPCR) en el cual se mide la incorporación de una forma no hidrolizable de GTP, ^{35}S GTP γ S (guanosina 5'-trifosfato, marcado con ^{35}S que emite radiación gamma). La subunidad α de la proteína G cataliza el intercambio de guanosina 5'-difosfato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP) y tras la activación de GPCR por un agonista, ^{35}S GTP γ S, se incorpora y no se puede escindir para continuar el ciclo de intercambio (Harper (1998) Current Protocols in Pharmacology 2.6.1-10, John Wiley & Sons, Inc.). La cantidad de incorporación de ^{35}S GTP γ S radioactivo es una medida directa de la actividad de la proteína G y, por lo tanto, se puede determinar la actividad del agonista. Se muestra que los receptores de mGlu2 se acoplan preferencialmente a la proteína G α_i , un acoplamiento preferencial para este método, y por lo tanto se utilizan ampliamente para estudiar la activación del receptor de los receptores de mGlu2 tanto en líneas celulares recombinantes es como en tejidos. En este documento describimos el uso del ensayo de unión de ^{35}S GTP γ S utilizando membranas de células transfectadas con el receptor mGlu2 y adaptadas de Schaffhauser *et al.* (Molecular Pharmacology, 2003, 4:798-810) para la detección de las propiedades de modulación alostérica positiva (PAM) de los compuestos de esta invención.

Preparación de la membrana

- 30 Las células CHO se cultivaron hasta preconfluencia y se estimularon con butirato 5 mM durante 24 h. A continuación, se recogieron las células raspando en PBS y la suspensión celular se centrifugó (10 min a 4000 RPM en una centrífuga de sobremesa). El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió con cuidado en Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 mezclando en un vórtex y pipeteando arriba y abajo. La suspensión se centrifugó a 16,000 RPM (rotor Sorvall RC-5C plus SS-34) durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. El sedimento se homogeneizó en Tris-HCl 5 mM, pH 7.4 utilizando un homogeneizador ultra-turrax y se centrifugó de nuevo (18,000 RPM, 20 min, 4 °C). El sedimento final se resuspendió en Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 y se almacenó a -80 °C en alícuotas apropiadas antes de su uso. Se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford (Bio-Rad, EE. UU.) con albúmina de suero bovino como patrón.

Ensayo de unión de ^{35}S GTP γ S

- 40 La medida de la actividad moduladora alostérica positiva de mGluR2 de los compuestos de prueba se realizó de la siguiente manera. Los compuestos de prueba y el glutamato se diluyeron en tampón de ensayo que contenía ácido HEPES 10 mM, sal HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, MgCl_2 3 mM y GDP 10 μM . Se descongelaron las membranas que contenían el receptor de mGlu2 humano en hielo y se diluyeron en tampón de ensayo suplementado con 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de saponina. Las membranas se preincubaron con el compuesto solo o junto con una concentración predefinida ($\sim\text{CE}_{20}$) de glutamato (ensayo PAM) durante 30 min a 30 °C. Después de la adición de ^{35}S GTP γ S (c.f. 0.1 nM), las mezclas ensayo se agitaron brevemente y se incubaron más tiempo para permitir la incorporación de ^{35}S GTP γ S tras la activación (30 minutos, 30 °C). Las mezclas del ensayo finales contuvieron 7 μg de la proteína de la membrana en ácido HEPES 10 mM, sal HEPES 10 mM, pH 7.4, NaCl 100 mM, MgCl_2 3 mM, GDP 10 μM y 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de saponina. El volumen de reacción total fue de 200 μL . Las reacciones se hicieron terminar mediante filtración rápida a través de placas Unifilter-96 GF/B (Perkin Elmer, Massachusetts, EE. UU.) utilizando un recolector Filtermate Universal de 96 pocillos. Los filtros se lavaron 6 veces con NaH_2PO_4 10 mM/ Na_2HPO_4 10 mM, pH 7.4. A continuación, los filtros se secaron con aire, y se añadieron 40 μL de cóctel de centelleo líquido (Microscint-O) a cada pocillo. La radiactividad unida a la membrana se contó en un contador de centelleo y luminiscencia de microplacas de Perkin Elmer.

Análisis de los datos

- 55 Las curvas de concentración-respuesta de los compuestos representativos de la presente invención (obtenidos en presencia de CE_{20} de glutamato agonista de mGluR2 para determinar la modulación alostérica positiva (PAM) se generaron utilizando la interfaz del software Lexis (desarrollado en J&J). Los datos se calcularon como % de la respuesta de glutamato de control, definida como la respuesta máxima que se genera tras la adición de glutamato solo. Las curvas sigmoideas de concentración-respuesta que representaron gráficamente estos porcentajes frente al log de

concentración del compuesto de prueba se analizaron utilizando análisis de regresión no lineales. A continuación, se calculó la concentración que produce la mitad del efecto máximo como CE₅₀.

Los siguientes valores de pCE₅₀ se calcularon como el -log CE₅₀, cuando la CE₅₀ se expresa en M. El E_{máx} se define como el efecto máximo relativo (es decir, el % de efecto máximo respecto a la respuesta de glutamato de control).

- 5 La siguiente Tabla E muestra los datos farmacológicos obtenidos para el compuesto 6-b y los datos farmacológicos reales obtenidos para los compuestos de referencia.

Tabla E: Datos farmacológicos para los compuestos de acuerdo con la invención.

Comp. n.º	GTPyS – pCE ₅₀ PAM hmGluR2	GTPyS – E _{máx} PAM hmGluR2
6-b	7.39	256
5-b	6.06	141
4-b	7.04	329
Ref. 1	7.11	258
Ref. 1a	6.95	286
Ref. 2	7.82	290
Ref. 2a	7.61	484
Ref. 2-a	6.84	340
Ref. 25-a	7.07	261

- 10 Todos los compuestos se estudiaron en presencia de glutamato agonistas de mGluR2 con una concentración CE₂₀ predeterminada, para determinar la modulación alostérica positiva. Se calcularon los valores de pCE₅₀ a partir de un experimento de concentración-respuesta de al menos 8 concentraciones.

B) ESTUDIOS ANTICONVULSIVOS Y ESTUDIOS DE REFERENCIA CON COMPUESTOS DE mGluR2 (AGONISTA ORTOSTÉRICO Y PAM)

Generalidades

- 15 Preparación de compuestos y disoluciones de prueba

Los compuestos de prueba se administraron usando una razón óptima de volumen de líquido con respecto a líquido corporal. Se administraron los compuestos de prueba a ratones a un volumen de 0.01 mL/g de peso corporal (White, H.S., *et al.*, General principles: Experimental selection, quantification, and evaluation of antiepileptic drugs, in Antiepileptic Drugs, cuarta edición, R. H. Levy, R.H. Mattson, and B. S. Meldrum, Editors. 1995, Raven Press, Ltd.: Nueva York. págs. 99-110). Para la administración subcutánea (s.c.), se administraron los compuestos de prueba en un pliegue de piel laxo a lo largo del dorso del animal excepto el compuesto **6-b**, que se administró por vía oral (p.o). Para cada uno de los ensayos realizados con los compuestos de prueba (excepto para el compuesto **6-b**), se administraron concentraciones de compuesto finales como disolución acuosa en Hp-β-CD al 20%. Para el compuesto **6-b**, primero se preparó una disolución madre de Hp-β-CD al 40% y se usó para formular el compuesto **6-b** a las concentraciones deseadas para los ensayos mediante la vía oral; se administraron concentraciones de compuesto finales como disolución acuosa en Hp-β-CD al 20%. Para los grupos de vehículo, se usó una disolución de Hp-β-CD al 20%.

Para el compuesto de referencia LY-404039, se administraron concentraciones de compuesto finales como una solución salina s.c.

- 30 Para el compuesto de referencia CAS 1092453-15-0, se administraron concentraciones de compuesto finales en vehículo de Hp-β-CD al 10% (+NaCl) tras la disolución.

Las concentraciones finales de levetiracetam se administraron en una disolución acuosa de metilcelulosa (MC) al 0.5%, que se administró mediante una inyección intraperitoneal (i.p.).

Reactivos críticos

a) Diluciones de vehículo

Metilcelulosa (MC) al 0.5%

Disolución madre de hidroxipropil-β-ciclodextrina (Hp-β-CD) al 40%

5 b) Diluciones diversas

Se añadió tetracaína (disolución al 0.5% p/v) gota a gota a partir de una botella de plástico con cuentagotas a los ojos de todos los animales que recibirían posteriormente una estimulación eléctrica mediante electrodos corneales.

Animales y cría de animales

10 Se obtuvieron ratones albinos CF n.º 1 macho adultos (26-35 g) de Charles River, Portage, Michigan. Los animales siguieron una dieta adecuada (Prolab RMH 3000) y se les permitió acceso libre a comida y agua, excepto en el tiempo breve durante el que se retiraron de su jaula para las pruebas. Se permitió que los animales recién recibidos en el laboratorio se tomaran el tiempo suficiente para corregir posibles restricciones de comida y agua que hubieran tenido lugar durante el tránsito antes de emplearse en los ensayos. Todos los ratones se acomodaron en jaulas de plástico en salas especialmente construidas con humedad controlada, intercambio de aire e iluminación controlada (12 horas encendida - 12 horas apagada). Los animales se acomodaron, alimentaron y manipularon según las recomendaciones de la Publicación del Consejo Nacional "Guide for the Care and Use of Laboratory animals".

Alteración motora mínima (MMI, por sus siglas en inglés):

20 Se evaluó la MMI aguda mediante una combinación de observaciones directas del animal en busca de síntomas manifiestos de la función muscular o neurológica del animal. En ratones, se usó el procedimiento Rotarod para describir la deficiencia muscular o neurológica mínima. Cuando se coloca un ratón en un rodillo que rota a una velocidad de 6 rpm, el animal puede mantener su equilibrio durante periodos de tiempo prolongados. Se consideró que el animal estaba intoxicado si se caía de su rodillo giratorio tres veces durante un periodo de 1 min.

Determinación de la mediana de la dosis eficaz y tóxica (DE₅₀ y DT₅₀)

25 En la determinación de una DE₅₀ o DT₅₀ para cada compuesto de prueba, la primera dosis administrada es habitualmente la misma dosis que la que se usó en una determinación de TPE exitosa. Cuando la dosis inicial empleada era eficaz o tóxica en más del 50% de los animales, la siguiente dosis sería la mitad de la dosis inicial; si la dosis inicial empleada era eficaz o tóxica en menos del 50% de los animales, la siguiente dosis sería el doble de la dosis inicial. Se seleccionaron terceras y cuartas dosis para producir una línea de respuesta a la dosis uniformemente espaciada. Debería haber un mínimo de 4 puntos o bien incluyendo o bien que se encuentran entre el 0 y el 100%.

30 Determinación de TPE:

Se administraron compuestos de prueba a grupos generalmente cada uno de cuatro animales y cada grupo se sometió a prueba en uno de cinco puntos de tiempo: 0.25, 0.5, 1, 2, o 4 h tras el tratamiento (White *et al.* 1995). Se determinó el TPE usando el ensayo de 6 Hz (32 mA). Se consideró que el tiempo (0.25, 0.5, 1, 2 o 4 h tras el tratamiento) en el que se observó una protección máxima era el tiempo del efecto máximo (TPE, por sus siglas en inglés).

35 Se sometieron a prueba los compuestos en el ensayo de 6 Hz (32 y/o 44 mA) en el TPE determinado para este estudio, o determinado previamente, para varias dosis, que comprendían dosis que provocaban desde una protección escasa o nula hasta una protección total.

Se calcularon la DE₅₀ y el intervalo de confianza del 95% (IC) usando el análisis Probit en un programa informático proporcionado en el laboratorio (Finney "Probit Analysis" 34d DE 1971, Londres: Cambridge University Press).

40 Recogida de suero para el análisis pK/pD

45 En diversas pruebas, se sacrificaron los animales tras los ensayos, y se recogió sangre del torso y/o tejido cerebral (cerebros enteros) para la cuantificación de los niveles de fármaco. Inmediatamente después de los ensayos, los animales se decapitaron y se recogió sangre del torso en un tubo BD Vacutainer® que contenía K2EDTA y se enfrió sobre hielo hasta la centrifugación. Tras la centrifugación (13000–18000 rpm, 5-7 min), se retiró el plasma, se transfirió a un tubo para microcentrífuga etiquetado y se conservó a -80 °C. Para la recogida del tejido cerebral, se retiraron los cerebros inmediatamente tras la decapitación y se congelaron de forma instantánea. Se colocó la muestra congelada en un tubo para centrífuga etiquetado y se conservó a -80 °C.

Prueba de convulsión psicomotora de 6 Hz en ratones

Se usa la prueba de convulsión de 6 Hz como modelo de convulsiones límbicas farmacorresistentes. La convulsión de 6 Hz presenta resistencia a fenitoína, carbamazepina, lamotrigina, y topiramato (Barton *et al.* "Pharmacological characterization of the 6 Hz psychomotor seizure model of partial epilepsy" *Epilepsy Research* 2001, vol. 47, págs. 217-222).

5 Método para la prueba de convulsión psicomotora de 6 Hz

Se indujeron convulsiones focales en ratones mediante estimulación corneal (6 Hz, pulso rectangular de 0.2 ms, duración de 3 s; Barton *et al.* 2001). Se sometieron a prueba los ratones o bien a 32 mA o bien a 44 mA. Antes de la estimulación, se aplicaron gotas con tetracaína al 0.5% a cada ojo. Las convulsiones provocadas por la estimulación corneal en este ensayo se caracterizan por una fase clónica mínima seguida de comportamientos automatísticos estereotipados, que incluyen aturdimiento, espasmos de las extremidades delanteras, contracción de las vibrisas y cola de Straub. Se consideró que los animales que no presentaban estos comportamientos estaban protegidos.

EJEMPLO 1 – ESTUDIOS CON LOS COMPUESTOS DE REFERENCIA 1 Y 2

1.1. Estudio de combinación con el Comp. de referencia n.º 1, Comp. de referencia n.º 2 y levetiracetam

En primer lugar, se sometió a prueba cada compuesto individualmente a una dosis que presentó actividad mínima en la prueba de 6 Hz, 44 mA en cada TPE del compuesto. Cuando se administraron los compuestos de PAM de mGluR2 y levetiracetam en combinación (mismas dosis y puntos de tiempo que en los ensayos individuales) se observó protección casi completa en la prueba de 6 Hz, 44 mA (tabla 2). Además de registrar los datos de eficacia y toxicidad para estos compuestos solos o en combinación, se recogieron tanto muestras de plasma como de cerebro de cada uno de los grupos para análisis farmacocinéticos/farmacocinética. No se observó interacción farmacocinética basándose en los niveles de compuesto en las muestras de plasma y cerebro (datos no mostrados). En resumen, los compuestos de referencia 1 y 2 presentaron interacción farmacocinética positiva con levetiracetam en el modelo de 6 Hz que no parece deberse a la interacción farmacocinética, y sin alteración motora creciente (tablas 2, 2a, 2b). También se sometió a prueba el efecto de 1 dosis de compuesto de referencia 2 en la respuesta a la dosis de LEV. Tal como se muestra en la tabla 3, hubo un desplazamiento de ~200 veces en la DE₅₀ de LEV en comparación con cuando se sometió a prueba LEV solo. Parecía que LEV aumentaba la potencia del Comp. de referencia n.º 2 ligeramente (tabla 3).

1.2. Análisis isoblográfico de las interacciones entre el Comp. de referencia n.º 1 y levetiracetam en el modelo de convulsiones de 6 Hz

Se llevaron a cabo estudios isoblográficos para la administración combinada del Comp. de referencia n.º 1 con LEV en el ensayo de 6 Hz (44 mA). Se llevaron a cabo estudios según los métodos previamente descritos (Madsen *et al.* 2011). se determinaron los valores de DE₅₀ iniciales tanto para el Comp. de referencia n.º 1 como para LEV y se usaron para calcular los valores de DE₅₀ (\pm error estándar de la media, EEM) para tres combinaciones de razón de dosis fija (LEV: Comp. de referencia n.º 1): 1:3, 1:1, y 3:1. Las dosis usadas eran proporcionales a los valores de DE₅₀ calculados. Por ejemplo, la razón de dosis usada para el paradigma 1:1 se basó en 0.5 x DE₅₀ para LEV y 0.5 x DE₅₀ para el Comp. de referencia n.º 1. De manera similar, el paradigma 1:3 usó 0.25 x DE₅₀ para LEV y 0.75 x DE₅₀ para el Comp. de referencia n.º 1. La razón de dosis 3:1 usó 0.75 x DE₅₀ de LEV y 0.25 x DE₅₀ para el Comp. de referencia n.º 1. Las dosis de tratamiento experimentales (véase la tabla 4) se basaron en los valores teóricos y se ajustaron según los efectos observados. Los valores de DE₅₀ determinados experimentalmente (\pm EEM) para cada combinación de razón de dosis fija se compararon con los valores teóricos (prueba de la t) para fines estadísticos. Se determinó que la razón de dosis era supra-aditiva (sinérgica) si el valor de DE₅₀ determinado experimentalmente era significativamente más bajo que la DE₅₀ teórica. Posteriormente, se determinaron las dosis combinadas experimentales para los mismos paradigmas en la prueba de convulsión de 6 Hz (tabla 4 a continuación). El estudio isoblográfico con el compuesto 1 y levetiracetam en el modelo de 6 Hz demostró una interacción farmacodinámica sinérgica significativa en todas las razones de dosis evaluadas y se corresponde estrechamente con los niveles en plasma del compuesto de referencia 1. Además, no se observó alteración motora en ninguna de las razones de dosis evaluadas sugiriendo que la interacción de farmacodinámica sinérgica no produce una toxicidad motora aumentada.

1.3. Modelo de estimulación corneal de ratón y estudios con el compuesto de referencia 1

Se estimularon eléctricamente ratones con un estímulo de 3 segundos, 3 mA, 60 Hz, dos veces al día usando electrodos corneales hasta un criterio de 5 convulsiones consecutivas de estadio 5 tal como se definió por Racine (Racine "Modification of seizure activity by electrical stimulation" II. motor seizure" *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1972, 32, págs. 281-294). Después de que los ratones alcanzasen un estado estimulado estable, se administró el compuesto o vehículo de prueba y, en el TPE determinado previamente, se aplicó a cada animal el estímulo eléctrico indicado anteriormente. Tras la estimulación, se observaron los animales para determinar la presencia o ausencia de la actividad de convulsión alcanzada en la escala de Racine (0 – 5) representando 5 el estado más alto irguiéndose y cayendo. Se sometieron a prueba una dosis de LEV y dos dosis del Comp. de referencia n.º 1 individualmente y en combinación contra convulsiones corneales estimuladas. La combinación del compuesto de referencia 1 con levetiracetam en este modelo sugirió una interacción de farmacodinámica positiva (tabla 5 a continuación).

Se presenta un resumen de los datos para los compuestos sometidos a prueba solos en la tabla 1 y se enumeran resultados adicionales de estudios realizados según el ejemplo 1 en las tablas 2-5 a continuación.

Tabla 1: Resumen de los datos anticonvulsivos agudos en el modelo de 6 Hz a 32 mA y 44 mA para los compuestos de PAM de mGluR2 1 (referencia), 2 (referencia), 11 (referencia), 2-a (referencia), 25-a (referencia), 6-b y compuesto de referencia LY-404039 tras la administración s.c. (excepto el compuesto 6-b, que se sometió a prueba por vía p.o.). TPE significa tiempo del efecto máximo, IC significa intervalo de confianza, s.c. significa subcutáneo, p.o. significa por vía oral, n.t. significa no sometido a prueba. Se determinó el TPE en la prueba de 6 Hz, 32 mA. Generalmente se observan los efectos a dosis que no producen alteración en la prueba de Rotarod. Para los compuestos 11 y 2-a se proporcionan los valores individuales de experimentos de repetición. Para el compuesto de referencia 25a, se usaron ambos puntos de tiempo de 0.25 y de 1 h para los estudios de 6 Hz (44 mA).

Comp. n.º	TPE (h)	DE ₅₀ (IC del 95%) mg/kg, s.c.		Puntuación de convulsión (dosis)
		32 mA	44 mA	Estimulación corneal
Compuesto de referencia 11	0.5	4.77 (3.54 – 6.76) 9.41 (1.53-15.1)	31.5 (15.1 – 47.3)	2.8 (100 mg/kg)
Compuesto de referencia 2	0.25	3.83 (1.62 – 6.71)	5.89 (3.89 – 8.45)	3.4 (40 mg/kg)
Compuesto de referencia 1	0.5	2.8 (1.3 – 4.3)	10.2 (3.1 – 12.4)	3.7 (20 mg/kg)
Compuesto de referencia 25-a	1	7.7 (2.3-18.4)	1 hr TPE: 25.9 (15.5-33.7) 0.25 hr TPE: 29.1 (21.6-39.6)	n.t.
Compuesto de referencia 2-a	0.5	44.7 (23.4-80.5) 20.8 (10.0-31.7) 12.2 (8.4-17.4)	50% de protección a 100 mg/kg 21 (17.9-27.4)	4.4 (100 mg/kg)
6-b	0.5	7.2 (4.2-11.8)	16.1 (13.0-20.1)	n.t.
Compuesto de referencia LY-404039	0.5	10.2 (3.62-12.4)	n.t.	3.1 (100 mg/kg)

Tabla 1a: Resumen de la determinación del TPE a 6 Hz, 32 mA para el Comp. de referencia n.º 1

Dosis (mg/kg, s.c.)	Tiempo (h)	6 Hz, 32 mA	Alteración motora
10	4	0/4	0/0
	2	0/4	0/0
	1	3/4	0/0
	0.5	4/4	0/0
	0.25	4/4	0/0
5	0.5	8/12	0/0
	0.25	8/12	0/0
2.5	0.5	5/8	0/0
	0.25	1/8	0/0
(número de ratones protegidos en 6 Hz o tóxicos en Rotarod/número de sometidos a prueba)			

Tabla 1b: Estudios de dosis-respuesta para el Comp. de referencia n.º 1. Se determinó previamente que el TPE para el Comp. de referencia n.º 1 era de 0.5 h (resultados mostrados anteriormente en la tabla 1a). Se administraron varias dosis del Comp. de referencia n.º 1 en este TPE y se sometieron a prueba en el ensayo de 6 Hz, usando intensidades de estímulos tanto de 32 como de 44 mA.

Prueba	Dosis (mg/kg, s.c.)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
6Hz 32 mA	20	8/8	1/8
	10	7/8	0/8
	5	8/12	0/12
	2.5	7/16	0/16
	0.5	1/8	0/8
DE₅₀ (IC del 95%): 2.8 mg/kg (de 1.3 a 4.3)			
6Hz 44 mA	20	8/8	1/8
	15	7/8	0/8
	10	4/8	0/8
	2.5	0/8	0/8
DE₅₀ (IC del 95%): 10.2 mg/kg (de 3.1 a 12.4)			

Tabla 2: Resumen de la interacción del Comp. de referencia n.º 1 y el Comp. de referencia n.º 2 con levetiracetam (LEV) en el modelo de convulsiones de 6 Hz, 44 mA de ratón. Los resultados se enumeran como número de ratones que presentan protección completa/número total de ratones sometidos a prueba en cada grupo de dosificación (en los niveles de dosificación de combinación o compuesto de prueba especificados).

	Dosis	Tiempo (h)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con toxicidad motora/número de sometidos a prueba
LEV	10 mg/kg i.p.	1	1/6	0/6
Comp. de referencia n.º 2 + LEV	3 mg/kg s.c.	0.25	5/6	0/6
Comp. de referencia n.º 2	3 mg/kg s.c.	0.25	1/6	0/6
LEV	10 mg/kg i.p.	1	1/8	0/8
Comp. de referencia n.º 1 + LEV	2.5 mg/kg s.c.	0.5	6/8	0/8
Comp. de referencia n.º 1	2.5 mg/kg s.c.	0.5	0/8	0/8

Tabla 2a: Niveles en plasma y cerebro del Comp. de referencia n.º 1. en el estudio de combinación con levetiracetam (LEV). BQL significa por debajo del límite cuantificable.

Comp. de referencia n.º 1	LEV	Plasma (ng/ml)	Comp. de referencia n.º 1	Plasma (ng/ml)	Protección a 6 Hz
6 Hz 44 mA	10 mg/kg	9350	2.5 mg/kg	BQL	Sí
		8580		244	No
		10900		314	Sí
		10300		382	Sí
		9780		416	Sí
		9780		377	Sí
		13700		2260*	No
		10100		607	Sí
Nivel en plasma medios		10311		657.1 (390)	6/8
Niveles en plasma medios (sin combinación)					
	1/8	8254	0/8	438	

El nivel en plasma medio mostrado entre paréntesis () se calcula eliminando un resultado atípico* estadístico

Tabla 2b: Niveles en plasma y cerebro del Comp. de referencia n.º 2 en el estudio de combinación con levetiracetam (LEV). AQL significa por encima del límite cuantificable.

Comp. de referencia n.º 2	LEV	Plasma (ng/ml)	Cerebro (ng/ml)	Comp. de referencia n.º 2	Plasma (ng/ml)	Cerebro (ng/ml)	Protección a 6 Hz
6 Hz 44 mA	10 mg/kg	6450	6290	3 mg/kg	1830	1540	Sí
		8200	7990		386	1020	Sí
		3540	4760		4700	1310	Sí
		3850	NA		467	NA	No
		7150	6380		AQL (>500)	1120	Sí
		3890	3960		2080	1140	Sí
Niveles en plasma / cerebro promedio							
		5513	5876		1893	1226	5/6
Niveles en plasma / cerebro medios (sin combinación)							
	1/6	8750	5773	1/6	1295	1113	

NA – muestra no disponible para el análisis

Tabla 3: Determinaciones de DE₅₀ en el modelo de convulsiones de 6 Hz (44 mA) para el Comp. de referencia n.º 2 y levetiracetam (LEV) solos y en combinación. LEV a una dosis de 10 mg/kg aumentó la potencia del Comp. de referencia n.º 2 (desplazamiento de ~5 veces en la DE₅₀). Comp. de referencia n.º 2 a una dosis de 3 mg/kg aumentó tanto la eficacia (hasta el 100% de protección) como la potencia de LEV (desplazamiento de ~200 veces en la DE₅₀). La figura 1 muestra la respuesta a la dosis para las determinaciones de DE₅₀ a 6 Hz, 44 mA para el Comp. de referencia n.º 2 y LEV solos y en combinación.

5

Tratamiento	DE ₅₀ (IC del 95%) mg/kg	Efecto máximo (% de protección)
Comp. de ref. n.º 2 solo	6.97 (5.44 – 8.30)	100%
Comp. de ref. n.º 2 + LEV (10 mg/kg)	1.35 (0.8 – 1.9)	100%
LEV solo	~ 200	75%
LEV + Comp. de ref. n.º 2 (3 mg/kg)	1.0 (0.23 – 2.24)	100%

Tabla 4: Resultados del Comp. de referencia n.º 1 y levetiracetam en el estudio isobolográfico.

Grupo	LEV (mg/kg i.p.)	f	Comp. de ref. n.º 1 (mg/kg s.c.)	f	dosis combinada (mg/kg)	Rotarod número de con toxicidad motora/número de sometidos a prueba	6 Hz (44 mA) número de protegidos/número de sometidos a prueba
paradigma de 1:1	181	0.5	5.1	0.5	93.1	0/8	8/8
	90.5		2.6		46.6	0/8	6/8
	45.3		1.3		23.3	0/8	3/8
	22.6		0.6		11.6	0/8	3/8
ED₅₀ (95% CI; mg/kg): 22.2 (8.4-35.7)							
paradigma de 1:3	45.3	.25	3.8	.75	14.2	0/8	8/8
	22.6		1.9		7.1	0/8	4/8
	11.3		1.0		3.6	0/8	2/8
ED₅₀ (95% CI; mg/kg): 5.9 (3.5-8.7)							
paradigma de 3:1	271.5	.75	2.6	25	204.3	0/8	8/8
	135.8		1.3		102.2	0/8	3/8
	67.9		0.6		51.1	0/8	3/8
	33.9		0.3		25.5	0/8	0/8
ED₅₀ (95% CI; mg/kg): 86.3 (56.8-131.4)							

El análisis isoblográfico (figura 2) demuestra que la combinación del Comp. de referencia n.º 1 y levetiracetam da como resultado un efecto sinérgico significativamente positivo.

Tabla 5: Resultados del estudio de combinación del Comp. de referencia n.º 1 y levetiracetam en el modelo de estimulación corneal en ratones.

Compuesto(s)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	% de protegidos	Puntuación de convulsión media
Vehículo (20% de HPBCD a 30', s.c.; 0.5% de MC a 60', i.p.)	0/10	0%	4.7
LEV 3 mg/kg	5/13	38%	3.3
Comp. de referencia n.º 1 30 mg/kg	3/12	25%	4.0
LEV 3 mg/kg y Comp. de referencia n.º 1 30 mg/kg	10/10	100%	0.6
Comp. de referencia n.º 1 20 mg/kg	5/16	31%	3.7
LEV 3 mg/kg y Comp. de referencia n.º 1 20 mg/kg	7/10	70%	1.9
	Puntuación de convulsión de Racine	<u>de 0 a 5</u> 0 = sin actividad de convulsión 5 = actividad de convulsión máxima	

5 EJEMPLO 2 – ESTUDIOS CON LOS COMPUESTOS DE REFERENCIA 25-a Y 2-a

2.1. Estudio de combinación con el Comp. de referencia n.º 25-a y levetiracetam

Se realizaron estudios de respuesta a la dosis independientes en la prueba de 6 Hz, 44 mA para ambos compuestos para determinar los valores de DE₅₀ en el TPE de 1 h i.p. para levetiracetam y de 1 h s.c. para el Comp. de referencia n.º 25-a. El valor de DE₅₀ para el Comp. de referencia n.º 25-a era de 25.9 mg/kg y para levetiracetam se estimó que era de aproximadamente 345 mg/kg. Se repitió la respuesta a la dosis para levetiracetam con coadministración de 10 mg/kg del Comp. de referencia n.º 25-a (una dosis del Comp. de referencia n.º 25-a que sola no protegió en el modelo de 6 Hz, 44 mA). La coadministración de 10 mg/kg del Comp. de referencia n.º 25-a produjo una DE₅₀ en la respuesta a la dosis de levetiracetam de 4.9 mg/kg (~70 veces inferior en comparación con levetiracetam solo) y proporcionó de manera importante una protección completa en el modelo de convulsiones de 6 Hz, 44 mA. Estos resultados sugieren que existe una interacción farmacodinámica positiva en el modelo de convulsiones de 6 Hz entre el Comp. de referencia n.º 25-a y levetiracetam.

Tabla 6: Determinación del tiempo para el efecto máximo para el Comp. de referencia n.º 25-a en el ensayo de 6 Hz (32 mA). Se usaron dos dosis en este estudio, de 10 y 20 mg/kg, a lo largo de varios puntos de tiempo (0.25 - 4 h). El compuesto mostró el mayor grado de protección en el ensayo de 6 Hz entre 0.25 y 1 h, que era más evidente a 20 mg/kg. Niveles en plasma del compuesto generalmente correspondían a la protección frente a la convulsión del comportamiento. Se usó un TPE de 0.25 h para los estudios de 6 Hz (32 mA) mientras que se usaron los puntos de tiempo tanto de 0.25 como de 1 h para los estudios de 6 Hz (44 mA).

5

s.c. significa subcutáneo

Dosis (mg/kg, s.c.)	Tiempo (h)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba	Niveles en plasma medios del Comp. de referencia n.º 25-a (ng/mL)
10	0.25	2/4	0/4	10,983 (2,477)
	0.5	1/4	0/4	3,330
	1	1/4	1/4	700
	2	0/4	0/4	256
	4	0/4	0/4	40
20	0.25	4/4	0/4	4,095
	0.5	3/4	1/4	2,800
	1	4/4	1/4	1,765
	2	1/4	0/4	618
	4	1/4	1/4	28

El nivel en plasma medio mostrado entre paréntesis () se calcula eliminando un resultado atípico estadístico.

Tabla 7: Estudios de respuesta a la dosis para el Comp. de referencia n.º 25-a en el ensayo de 6 Hz (32 mA^a y 44 mA^b)

IC significa intervalo de confianza

Prueba	Dosis (mg/kg, s.c.)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba	Niveles en plasma medios del Comp. de referencia n.º 25-a (ng/mL)
6Hz 32 mA	20	8/8	0/8	5,570
	15	3/8	0/8	1,201
	10	4/8	0/8	6,113
	5	4/8	0/8	2,558
	1	1/8	0/8	466
ED₅₀ (95% CI): 7.7 mg/kg (de 2.3 a 18.4)				
6Hz 44 mA	40	7/8	0/8	6,263
	30	3/8	0/8	7,220
	20	2/8	0/8	3,368
	10	0/8	0/8	4,345 (1,526)
	5	0/8	1/8	1,428
ED₅₀ (95% CI): 29.1 mg/kg (de 21.6 a 39.6)				

IC significa intervalo de confianza				
Prueba	Dosis (mg/kg, s.c.)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba	Niveles en plasma medios del Comp. de referencia n.º 25-a (ng/mL)
^a Se determinó que el tiempo para el efecto máximo en el ensayo de 6 Hz, 32 mA para el Comp. de referencia n.º 25-a era de 0.25 h (véase la tabla 1). ^b El tiempo para el efecto máximo en el ensayo de 6 Hz, 44 mA para el Comp. de referencia n.º 25-a era similar para 0.25 h y 1 h; los resultados para 1 h confirmaron la DE ₅₀ (IC del 95%) de 25.9 (15.5 – 33.7) (véanse las tablas 1 y 6). El nivel en plasma medio mostrado entre paréntesis () se calcula eliminando un resultado atípico estadístico.				

Tabla 8: Estudios de combinación para el Comp. de referencia n.º 25-a con levetiracetam (LEV) en el ensayo de 6 Hz (44 mA).

Fármaco	Dosis (mg/kg, s.c.)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
LEV	200	2/8	0/8
	400	4/9	0/9
	800	10/12	0/12
ED₅₀ (95% CI): 345.4 mg/kg (de 211.0 a 485.3)			
LEV + Comp. de referencia n.º 25-a 10 mg/kg	200	8/8	1/8
	100	7/8	2/8
	50	5/8	1/8
	10	4/8	0/8
	1	4/8	1/8
ED₅₀ (95% CI): 4.9 (0.0 – 14.2)			
Comp. de referencia n.º 25-a (s.c.) 10 mg/kg sometido a prueba en combinación con LEV (i.p.) –			
Comp. de referencia n.º 25-a 10 mg/kg, no era activo cuando se administró solo.			

5 **2.2. Estudios de combinación con el Comp. de referencia n.º 2-a y levetiracetam**

Se realizaron estudios de respuesta a la dosis en las pruebas de 6 Hz, 32 mA y 44 mA (tabla 9 a continuación) y en la prueba de combinación con levetiracetam (efecto del Comp. de referencia n.º 2-a sobre la respuesta a la dosis de LEV en la tabla 10a y el efecto de LEV sobre la respuesta a la dosis del Comp. de referencia n.º 2-a en la tabla 10b a continuación) de la misma manera que se describió para los estudios con el Comp. de referencia n.º 25-a y levetiracetam anteriormente.

10

Tabla 9: Estudios de respuesta a la dosis para el Comp. de referencia n.º 2-a en el ensayo de 6 Hz (32 mA y 44 mA; 0.5 h de TPE) Se determinó un tiempo para el efecto máximo de 0.5 h en la prueba de 6 Hz, 32 mA (s.c.) y se usó para los estudios de 6 Hz (32 mA y 44 mA).

Prueba	Dosis (mg/kg, s.c.)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
6Hz 32 mA	40	8/8	2/8
	20	6/8	3/8
	10	4/8	0/8
	5	0/8	0/8
	2.5	0/8	1/8
ED₅₀ (95% CI): 12.2 mg/kg (de 8.4 a 17.4)			
6Hz 44 mA	40	8/8	4/8
	20	3/8	0/8
		3/8	0/8
	15	2/8	1/8
10	0/8	1/8	
	0/8	0/8	
ED₅₀ (95% CI): 21.0 mg/kg (de 17.9 a 27.4) TD₅₀: > 40 mg/kg^a			
^a 40 mg/kg – 6 de 16 en total (32 mA y 44 mA combinados) con alteración. Dosis seleccionada para estudios de combinación con LEV en 6 Hz (44 mA): Comp. de referencia n.º 2-a 10 mg/kg.			

Tabla 10a: Estudios de combinación para el Comp. de referencia n.º 2-a con levetiracetam (LEV) en el ensayo de 6 Hz (44 mA). Combinación de 10 mg/kg del Comp. de referencia n.º 2-a con dosis variables de levetiracetam.

Fármaco	Dosis (mg/kg)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
LEV	200	2/8	0/8
	400	4/9	0/9
	800	10/12	0/12
LEV ED₅₀ (95% CI): 345.4 mg/kg (de 211.0 a 485.3)			
LEV + Comp. de referencia n.º 2-a 10 mg/kg ^a	200	6/8	1/8
	100	6/8	0/8
	50	6/8	0/8

Fármaco	Dosis (mg/kg)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
	25	8/8	0/8
	12.5	5/8	0/8
	6.25	4/8	0/8
	3.125	3/8	1/8
	1.5625	0/8	0/8
LEV ED₅₀ (95% CI): 9.6 mg/kg (1.7 – 21.9)			
<p>^aComp. de referencia n.º 2-a (s.c.) 10 mg/kg sometidos a prueba en combinación con LEV (i.p.); Comp. de referencia n.º 2-a 10 mg/kg, no era activo cuando se administró solo.</p> <p>Se sometieron a prueba grupos control de LEV (baja dosis) adicionales a 25 y 6.25 mg/kg (1/8 y 0/6 protegidos, respectivamente).</p> <p>Ratones tratados con vehículo (0.5% de metilcelulosa i.p. (1 h) / 20% de HPBCD s.c. (0.5 h)) no mostraron protección (0/8 protegidos).</p>			

Tabla 10b: Estudios de combinación para el Comp. de referencia n.º 2-a con levetiracetam (LEV) en el ensayo de 6 Hz (44 mA). combinación de 350 mg/kg de levetiracetam con dosis variables del Comp. de referencia n.º 2-a.

Fármaco	Dosis (mg/kg)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
LEV (solo) ^a	350	3/8	0/8
LEV 350 mg/kg + Comp. de referencia n.º 2-a ^b	20	8/8	2/8
	10	7/8	1/8
	5	7/8	1/8
	2.5	5/8	0/8
	1.25	4/8	0/8
<p>DE₅₀ (IC del 95%) del Comp. de referencia n.º 2-a previo: 21.0 mg/kg (de 17.9 a 27.4)</p> <p>DE₅₀ (IC del 95%) de la combinación de LEV y el Comp. de referencia n.º 2-a: 1.5 mg/kg (0.1 – 2.7)</p> <p>Desplazamiento de 14 veces en potencia</p>			
<p>^aDE₅₀ de LEV (presentado de manera separada) previamente determinada en 6 Hz (44 mA): 345 mg/kg.</p> <p>^bComp. de referencia n.º 2-a (s.c.) 10 mg/kg sometidos a prueba en combinación con LEV (i.p.); Comp. de referencia n.º 2-a 10 mg/kg, no era activo cuando se administró solo.</p> <p>Se sometieron a prueba grupos control de LEV (baja dosis) adicionales a 25 y 6.25 mg/kg (1/8 y 0/6 protegidos, respectivamente).</p> <p>Ratones tratados con vehículo (0.5% de metilcelulosa i.p. (1 h) / 20% de HPBCD s.c. (0.5 h)) no mostraron protección (0/8 protegidos).</p>			

A una dosis de 10 mg/kg s.c., el Comp. de referencia n.º 2-a aumenta la potencia de LEV, llevando a un desplazamiento de aproximadamente 35 veces en la DE₅₀. Esto sugiere una relación farmacodinámica positiva (tabla 10a). A una dosis de 350 mg/kg i.p., LEV aumenta la potencia del Comp. de referencia n.º 2-a, conduciendo a un desplazamiento de aproximadamente 14 veces en la DE₅₀. Esto sugiere una relación de farmacodinámica positiva (tabla 10b).

5 **EJEMPLO 3 – ESTUDIOS CON EL COMPUESTO 6-b**

3.1. Estudio de combinación con el Comp. n.º 6-b y levetiracetam

Se realizaron estudios de respuesta a la dosis independientes en la prueba de 6 Hz, 44 mA para ambos compuestos para determinar los valores de DE₅₀ en los TPE de 1 h i.p. para levetiracetam y de 0.5 h p.o. para el Comp. n.º 6-b. El valor de DE₅₀ para el Comp. n.º 6-b era de 16.1 mg/kg y para levetiracetam se estimó que el valor era de aproximadamente 345 mg/kg. Se repitió la respuesta a la dosis para levetiracetam con coadministración de 10 mg/kg del Comp. n.º 6-b (una dosis del Comp. n.º 6-b que sola no protegió en el modelo de 6 Hz, 44 mA). La coadministración de 10 mg/kg del Comp. n.º 6-b produjo una DE₅₀ en la respuesta a la dosis de levetiracetam de 2.4 mg/kg (~100 veces inferior en comparación con levetiracetam solo) y proporcionó de manera importante una protección completa en el modelo de convulsiones de 6 Hz, 44 mA. Estos resultados sugieren que existe una interacción farmacodinámica positiva en el modelo de convulsiones de 6 Hz entre el Comp. n.º 6-b y levetiracetam.

Los resultados de los estudios realizados con el compuesto 6-b se enumeran en las tablas 11-13 a continuación.

Tabla 11: Determinación del tiempo para el efecto máximo para el Comp. n.º 6-b (p.o.) en el ensayo de 6 Hz (32 mA).

Dosis (mg/kg, p.o.)	Tiempo (h)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
10	0.25	1/4	0/4
	0.5	3/4	0/4
	1	0/4	0/4
	2	1/4	0/4
	4	0/4	0/4
20	0.25	4/4	0/4
	0.5	3/4	0/4
	1	4/4	0/4
	2	0/4	0/4
	4	1/4	0/4
Se determinó que el TPE era de 0.5 h.			

20 **Tabla 12: Estudio de respuesta a la dosis para el Comp. n.º 6-b en el ensayo de 6 Hz (32 mA y 44 mA; 0.5 h de TPE).**

Prueba	Dosis (mg/kg, p.o.)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
6Hz 32mA	20	7/8	0/8
	10	6/8	0/8

Prueba	Dosis (mg/kg, p.o.)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
	5	2/8	0/8
	2.5	1/8	0/8
ED₅₀ (95% CI): 7.2 mg/kg (de 4.2 a 11.8)			
6Hz 44mA	40	8/8	0/8
	20	6/8	0/8
	15	4/8	0/8
	10	0/8	0/8
ED₅₀ (95% CI): 16.1 mg/kg (de 13.0 a 20.1)			

Tabla 13: Estudios de combinación para el Comp. n.º 6-b con LEV en el ensayo de 6 Hz (44 mA).

Fármaco	Dosis (mg/kg)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
LEV	200	2/8	0/8
	400	4/9	0/9
	800	10/12	0/12
ED₅₀ (95% CI): 345.4 mg/kg (de 211.0 a 485.3)			
LEV + Comp. n.º 6-b 10 mg/kg	200	8/8	0/8
	100	8/8	0/8
	50	5/8	0/8
	10	5/8	0/8
	1	5/8	0/8
ED₅₀ (95% CI): 2.4 (0.0 – 6.4)			
Comp. n.º 6-b (p.o.) 10 mg/kg sometido a prueba en combinación con LEV (i.p.)			
Comp. n.º 6-b 10 mg/kg, no era activo cuando se administró solo			

EJEMPLO 4 – ESTUDIOS CON EL COMPUESTO DE REFERENCIA LY404039

3.1. Estudio de combinación con LY404039 de referencia y levetiracetam

Se sometió a prueba el compuesto de referencia LY-404039 solo y en combinación con levetiracetam según los procedimientos ya descritos anteriormente en la presente. Los resultados de los estudios realizados con el compuesto de referencia LY-404039 se enumeran en las tablas 14-15.

5

Tabla 14: Estudios de respuesta a la dosis para el compuesto de referencia LY404039 en el ensayo de 6 Hz (32 mA y 44 mA) Se determinó un tiempo para el efecto máximo de 0.5 h en la prueba de 6 Hz, 32 mA (s.c.) y se usó para los estudios de 6 Hz (32 mA y 44 mA).

Prueba	Dosis (mg/kg, s.c.)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
6Hz 32mA	40	8/8	1/8
	20	6/8	1/8
	10	5/8	0/8
	5	1/16	1/16
ED₅₀ (95% CI): 10.9 mg/kg (de 7.8 a 15.9)			
6Hz 44mA	40	7/8	2/8
	20	7/8	1/8
	10	3/8	1/8
	5	0/16	0/16
ED₅₀ (95% CI): 14.1 mg/kg (de 10.0 a 20.6)			
TD₅₀: > 40 mg/kg^a			
^a 40 mg/kg – 3 de 16 en total (32 mA y 44 mA combinados) con alteración. Nota: no se observó actividad tras la administración de vehículo en 32 o 44 mA. Dosis seleccionada para estudios de combinación con LEV en 6 Hz (44 mA): compuesto de referencia LY404039 5 mg/kg.			

10

Tabla 15: Estudios de combinación para el compuesto de referencia LY404039 con levetiracetam (LEV) en el ensayo de 6 Hz (44 mA).

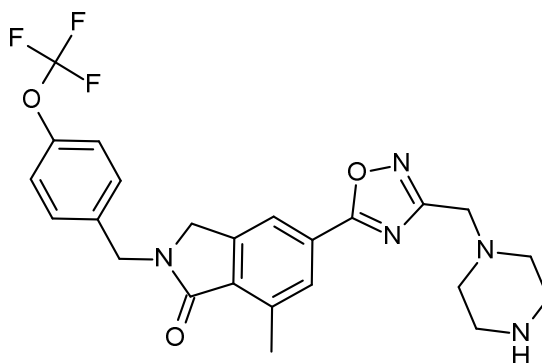
Fármaco	Dosis (mg/kg)	número de protegidos/número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
LEV ^a	200	2/8	0/8
	400	4/9	0/9
	800	10/12	0/12

Fármaco	Dosis (mg/kg)	número de protegidos/ número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
LEV ED₅₀ (95% CI): 345.4 mg/kg (de 211.0 a 485.3)			
LEV + compuesto de ref. LY404039 5 mg/kg^b	200	8/8	0/8
	50	6/8	1/8
	20	6/8	2/8
	5	2/8	1/8
LEV ED₅₀ (95% CI): 12.8 mg/kg (2.5 – 25.2)			
^a LEV solo mostrado anteriormente, dosis de confirmación realizadas en combinación con el Comp. de referencia n.º 2-a (véase la tabla previa anteriormente). ^b El compuesto de referencia LY404039 (s.c.) 5 mg/kg sometido a prueba en combinación con LEV (i.p.); el compuesto de referencia LY404039 5 mg/kg no era activo cuando se administró solo. Se sometieron a prueba grupos control de LEV (baja dosis) adicionales a 25 y 6.25 mg/kg (1/8 y 0/6 protegidos, respectivamente). Ratones tratados con vehículo (10% de agua estéril – NaCl; s.c., 0.5 h de TPE y el 0.5% de MC, i.p., 1 h de TPE) no mostraron protección o alteración de Rotarod.			

A una dosis de 5 mg/kg del compuesto de referencia LY404039 aumenta la potencia de LEV, conduciendo a un desplazamiento de aproximadamente 27 veces en la DE₅₀. Esto sugiere una relación farmacodinámica positiva.

EJEMPLO 5 – ESTUDIOS DE REFERENCIA CON EL COMPUESTO DE REFERENCIA CAS 1092453-15-0

- 5 **4.1. Estudio de combinación con el compuesto de referencia 2,3-dihidro-7-metil-5-[3-(1-piperazinilmetil)-1,2,4-oxadiazol-5-il]-2-[[4-(trifluorometoxi)fenil]metil]-1H-isoindol-1-ona [CAS 1092453-15-0] (descrita en el documento WO 2008150233, WO 2011084098) y levetiracetam**



- 10 Se sometió a prueba el compuesto de referencia CAS 1092453-15-0 solo y en combinación con levetiracetam según los procedimientos ya descritos anteriormente en la presente. Los resultados del ejemplo 5 se enumeran en las tablas 16-17.

Tabla 16: Estudios de respuesta a la dosis para el compuesto de referencia CAS 1092453-15-0 en el ensayo de 6 Hz (32 mAa)

Dosis (mg/kg, s.c.)	Tiempo (h)	número de protegidos /número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
20	0.25	1/4	0/4
	0.5	0/4	0/4
	1	1/4	0/4
	2	0/4	0/4
	4	0/4	0/4
40	0.25	1/4	0/4
	0.5	1/4	0/4
	1	1/4	0/4
	2	0/4	0/4
	4	0/4	0/4
80	0.25	0/4	0/4
	0.5	0/4	0/4
	1	1/4	1/4

Se observó baja actividad a las dosis y puntos de tiempo sometidos a prueba. La mayor actividad a 0.25-1 h en las dosis sometidas a prueba. Se realizaron estudios de combinación usando 20 mg/kg, s.c, 1 h de TPE en el ensayo de 6 Hz (44 mA).

5

Tabla 17: Estudios de combinación para el compuesto de referencia CAS 1092453-15-0 con levetiracetam (LEV) en el ensayo de 6 Hz (44 mA).

Fármaco	Dosis de LEV (mg/kg)	número de protegidos/ número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
LEV ^a	200	2/8	0/8
	400	4/9	0/9
	800	10/12	0/12
LEV ED₅₀ (95% CI): 345.4 mg/kg (de 211.0 a 485.3)			
Compuesto de referencia [CAS 1092453-15-0] (20 mg/kg, solo)		0/8	0/8

Fármaco	Dosis de LEV (mg/kg)	número de protegidos/ número de sometidos a prueba	número de con alteración motora de Rotarod/número de sometidos a prueba
LEV + compuesto de referencia [CAS 1092453-15-0] 20 mg/kg^b	400	4/8	0/8
	200	5/8	0/8
	50	3/8	0/8
	20	2/8	0/8
	5	1/8	1/8
DE₅₀ (IC del 95%) de LEV: 238.9 mg/kg (41.6 – por encima de la mayor dosis sometida a prueba)			
<p>^aSe sometieron a prueba grupos control de LEV (baja dosis) adicionales a 25 y 6.25 mg/kg (1/8 y 0/6 protegidos, respectivamente).</p> <p>^bEl compuesto de referencia [CAS 1092453-15-0] 20 mg/kg (s.c.; 1 h de TPE) sometido a prueba en combinación con LEV (i.p.; 1 h de TPE); el compuesto de referencia [CAS 1092453-15-0] 20 mg/kg presentaba baja actividad cuando se administró solo (6 Hz, 32 mA), y no se sometió a prueba en 6 Hz (44 mA). Este compuesto presentaba una CE₅₀ <i>in vitro</i> = 562 nM (E_{max} = 197%) cuando se sometió a prueba en el ensayo de GTPγS descrito anteriormente en la presente y no se observó ocupación en experimentos <i>ex vivo</i> en ratas.</p> <p>Nota: Animales tratados con vehículo (10% de HPβCD-NaCl; s.c., 1 h y 0.5% de MC, i.p., 1 h) no mostraron protección o alteración motora, N=8.</p>			

El conjunto de datos actual indica que las moléculas de PAM de mGlu2 o agonista tienen actividad anticonvulsiva en el modelo animal de 6 Hz. Las PAM de mGlu2 sometidas a prueba con potencias de CE₅₀ ≤ de 150 nM (tal como se determinó en el ensayo de [³⁵S]GTPγS), parámetros de PK y penetración en el cerebro apropiados, mostraron actividad en el paradigma de 6 Hz, tanto de 32 como de 44 mA. Además, todas las moléculas sometidas a prueba mostraron efectos sinérgicos con LEV. En cambio, la molécula de referencia CAS 1092453-15-0, que solo era débilmente activa (CE₅₀ de 562 nM) *in vitro*, no mostró actividad en ninguna de las pruebas de 6 Hz, y tampoco mostró sinergia con LEV.

De manera importante, los datos indican que, en condiciones de características de PK comparables y penetración en el cerebro apropiada, las PAM de mGlu2 más potentes, basándose en los valores de CE₅₀ *in vitro*, también parecían las más potentes *in vivo*, sugiriendo que la potencia *in vitro* e *in vivo* puede estar vinculadas. Además, se observaron de manera sistemática efectos sinérgicos con LEV con dosis de PAM de mGlu2 similares a la DE₅₀ obtenida en el modelo de 32 mA o al menos 2 veces inferior que la DE₅₀ determinada en el paradigma de 44 mA (es decir, una dosis inactiva en la prueba de 44 mA cuando se sometieron a prueba las moléculas solas).

También para el compuesto de referencia LY404039, el agonista de mGlu2/3, se observó actividad en ambas pruebas de 6 Hz y se observó sinergia a una dosis 3 veces inferior a la DE₅₀ determinada en el modelo de 44 mA, que era inactiva cuando se sometía a prueba sola.

Basándose en los datos preclínicos disponibles en el modelo de 6 Hz, 44 mA, parece que combinar un ligando de SV2A potente y una PAM de mGlu2 potente, conduce a una disminución en la mediana de la dosis eficaz o DE₅₀ del ligando de SV2A, tal como LEV, entre 35 y 100 veces.

Por tanto, sin desear restringirse a la teoría, se sugiere que los compuestos del modulador alostérico positivo del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 (PAM de mGluR2), en particular compuestos de PAM de mGluR2 que tienen una potencia de CE₅₀ de ≤150 nM (tal como se determinó en el ensayo de [³⁵S]GTPγS), en el que CE₅₀ es la concentración que produce la mitad del efecto máximo en una curva de concentración-respuesta obtenida en presencia de CE₂₀ de glutamato, y parámetros de PK y penetración en el cerebro apropiados, dan como resultado una combinación sinérgica con un ligando de SV2A, en particular levetiracetam, a dosis no eficaces de uno o ambos de compuesto (a) y compuesto (b) de la combinación de la invención.

Por tanto, en una realización adicional, el compuesto del modulador alostérico positivo del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 (PAM de mGluR2) de la combinación de la invención tal como se definió en la presente se selecciona de un compuesto de PAM de mGluR2 que tiene una potencia de CE₅₀ de ≤150 nM (tal como se determinó en el ensayo de [³⁵S]GTPγS), en el que CE₅₀ es la concentración que produce la mitad del efecto máximo en una curva de concentración-respuesta obtenida en presencia de CE₂₀ de glutamato.

EJEMPLOS TEÓRICOS**A) RELACIONES DE COMPORTAMIENTO DOMINANTE-SUMISO (DSR, POR SUS SIGLAS EN INGLÉS) EN ENSAYO *IN VIVO* EN RATAS**

5 El ensayo de DSR se divide en dos modelos: Modelo de reducción del comportamiento dominante (RDBM, por sus siglas en inglés) de la manía y modelo de reducción del comportamiento sumiso (RSBM, por sus siglas en inglés) de la depresión. El RDBM, en el que se tratan los animales dominantes con el compuesto de prueba, predice la capacidad del compuesto de prueba para tratar la manía. El RSBM, en el que se tratan los animales sumisos con el compuesto de prueba, predice la capacidad del compuesto de prueba para tratar la depresión.

10 En este ensayo, se usan ratas Sprague Dawley macho (de 140 a 160 g) de Charles River Laboratories Wilmington, MA. Se reciben envíos de ratas en intervalos de dos semanas. Cada envío se someterá a una cuarentena de cinco días, un periodo de aclimatación de una semana y un proceso de selección de una semana, seguido de cinco semanas de tratamiento con vehículo o fármaco para los pares seleccionados.

15 Se acomodarán cuatro ratas en cada jaula. El acceso a la comida se restringirá a una hora por día después de los ensayos desde el lunes hasta el jueves. Después de los ensayos del viernes, las ratas tendrán acceso libre a la comida hasta someterlas nuevamente a ayuno el domingo. En ningún momento se privará a las ratas del acceso a agua. Los periodos de privación de alimentos utilizados tendrán un efecto menor en el aumento de peso, ya que el peso medio de la rata será de aproximadamente 300 g al final del estudio. Al concluir el experimento, las ratas se sacrificarán por decapitación, se recogerán la sangre del tronco y los cerebros para realizar experimentos *in vitro* y mediciones de la concentración de fármaco.

20 El aparato básico de los ensayos constaba de dos cámaras conectadas con un túnel sólo lo suficientemente largo como para permitir que pasara una rata a través cada vez. En el suelo, en el punto central del túnel, se colocará un envase con leche edulcorada. Este aparato básico se replicará, de manera que se pueda realizar un seguimiento por video de un total de cuatro pares de ratas de manera simultánea. La cámara puede distinguir ratas marcadas mediante diferentes colores. Por tanto, las cabezas de las ratas se colorearán con el fin de un seguimiento por video, de rojo en una jaula y amarillo en la otra jaula. Solo un animal puede tener acceso confortable al alimentador cada vez, pero ambos animales pueden beber leche durante la sesión diaria de cinco minutos. Durante las sesiones diarias de cinco minutos, se registrará el tiempo que pasa cada rata en la zona del alimentador con el software de seguimiento por video y se guardará en un archivo de texto.

30 La prueba empezará con una distribución aleatoria de las ratas por pares. Cada miembro de un par se colocará en una cámara opuesta del aparato de pruebas. Se registrará el tiempo que pasa cada animal en la zona del alimentador. Durante la primera semana (cinco días) de pruebas, los animales se habitúan al nuevo entorno. Se asignará la dominancia al animal con la puntuación más elevada durante la segunda semana de pruebas si se cumplen tres criterios. En primer lugar, debe existir una diferencia significativa (prueba de la t bilateral, $P < 0.05$) entre las puntuaciones de bebida diarias promedio de ambos animales. En segundo lugar, la puntuación del animal dominante debe ser al menos un 25% mayor que la puntuación del animal sumiso. Finalmente, no debe haber ninguna "inversión" durante la semana de selección del par, en la que la posible rata sumisa consiga una puntuación mejor que la de su compañero dominante en ocasiones aisladas. Idealmente, también habrá inversiones mínimas durante la semana de aclimatación. Solo pares de animales que cumplan estos criterios continuarán en el estudio.

40 Las diferencias significativas entre el tiempo que las ratas dominantes y sumisas pasan en el alimentador se determinarán mediante ANOVA usando el software GraphPad Prism (software GraphPad, Inc. San Diego, CA) seguido por una prueba de la t bilateral ($P < 0.05$). Se compararán los grupos de tratamiento usando valores del nivel de dominancia normalizados en los animales apareados. El nivel de dominancia es un valor que mide la relación social entre sujetos apareados. Nivel de dominancia (DL, por sus siglas en inglés) = FTD – FTS, donde FTD (por sus siglas en inglés) es el tiempo que pasan las ratas dominantes en el alimentador y FTS (por sus siglas en inglés) es el tiempo que pasan las ratas sumisas en el alimentador. La normalización se llevará a cabo según la fórmula:

Nivel de dominancia (semana n en %) =

$(\text{Nivel de dominancia (semana n)}) / (\text{Nivel de dominancia (semana 2)})$

50 La significación estadística de la diferencia en el nivel de dominancia entre el grupo control (pares de ratas en los que ambos animales tanto dominantes como sumisos se tratarán con vehículo) y el grupo de tratamiento (las ratas sumisas se tratarán con fármaco y las ratas dominantes con vehículo) se determinará mediante ANOVA, seguido por una prueba de la t. El valor del tiempo de comienzo de actividad al 50% de la respuesta (AOT-50) y la respuesta mínima y máxima al fármaco se calcularán basándose en la reducción del valor del nivel de dominancia usando un análisis de regresión no lineal (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Para este cálculo se usán los valores normalizados de DL, donde los valores de DL para las semanas de tratamiento se normalizarán como un porcentaje del valor de la segunda semana (pretratamiento) para ese par según la fórmula anterior. En este contexto, el mínimo de la respuesta (DL) determina una actividad positiva del fármaco, que se corresponde con la eficacia, ya que los valores de DL se reducirán si la respuesta a un fármaco es positiva. En el caso de una respuesta negativa al fármaco (empeoramiento de los síntomas) los valores de DL aumentarán. Si el fármaco no presenta tal actividad el máximo de la respuesta no

excederá el 100%. Cualquier valor de DL máximo significativamente superior al valor de control (aproximadamente el 100%) indica una actividad negativa del fármaco.

Se evaluarán levetiracetam y compuesto de PAM de mGluR2 (p. ej. compuesto **6-b**) en el RDBM con ratas según el procedimiento descrito en mayor detalle a continuación.

5 Se tratarán grupos de ratas dominantes p.o. QD con levetiracetam 10 mg/kg y compuesto de PAM de mGluR2 a varias concentraciones de desde aproximadamente 0.05 mg/kg ($n \geq 3$), a 0.5 mg/kg ($n \geq 3$), a 2.5 mg/kg ($n \geq 3$), a 5.0 mg/kg ($n \geq 3$) y a 50.0 mg/kg ($n \geq 3$). Un grupo control de ratas dominantes que se tratarán con 0.5% de metilcelulosa ($n \geq 3$) y un segundo grupo control de ratas dominantes se tratará i.p. QD con valproato de sodio a 30 mg/kg ($n \geq 6$ de 2 estudios de $n \geq 3$ cada uno).

10 Todos los tratamientos se administrarán aproximadamente 1 hora antes de los ensayos. Todos los tratamientos se iniciarán el sábado después de la segunda semana de ensayos (semana de selección). El levetiracetam y compuesto de PAM de mGluR2 se administrarán por vía oral (p.o.).

15 Cuando se tratan los animales dominantes con 10 mg/kg de levetiracetam y compuesto de PAM de mGluR2, la diferencia entre las ratas dominantes y sumisas desaparecerá después de la primera o segunda semana de tratamiento dependiendo de la dosis. De manera similar, cuando se tratan los animales dominantes con valproato de sodio, la diferencia entre las ratas dominantes y sumisas también desaparecerá después de la primera semana de tratamiento. Puede observarse un incremento de la permisividad de las ratas dominantes tratadas con levetiracetam y el compuesto de PAM de mGluR2 o valproato de sodio. Por tanto, las ratas dominantes tratadas permitirán que sus compañeras sumisas aumenten su tiempo en el alimentador.

20 Para comparar los diferentes efectos de fármacos y dosis, los datos se normalizarán respecto a los valores iniciales de la semana control. Se observará el efecto más fuerte de la combinación de levetiracetam y el compuesto PAM de mGluR2 cuando exista una diferencia significativa en los valores del nivel de dominancia (DL) entre las ratas tratadas con vehículo y con la combinación a partir de la segunda semana y que continua a lo largo de la duración del tratamiento de 5 semanas. En comparación, los animales que se tratarán con valproato de sodio (30 mg/kg) mostrarán de manera sistemática un nivel de dominancia disminuido después de la segunda semana de tratamiento incrementándose el efecto en las siguientes semanas.

Para estimar el tiempo de comienzo de actividad (AOT), los valores promedio diarios del tiempo de alimentador de los pares de animales dominantes y sumisos se representarán gráficamente y las diferencias significativas entre estos dos grupos se calcularán usando la prueba de la t bilateral.

30 Para comparar el tiempo de comienzo de actividad (AOT) entre diferentes tratamientos se estimará el tiempo de comienzo de actividad a partir del ajuste de regresión no lineal. El modelo de regresión no lineal se ajustará para los valores de DL diarios normalizados de cada fármaco, combinación y dosis.

Cabe esperar que los efectos de levetiracetam y el compuesto de PAM de mGluR2 en el RDBM sean dependientes de dosis.

35 En este ensayo, se espera que la combinación de levetiracetam y los compuestos de PAM de mGlu2 reduzcan el comportamiento dominante indicando que la combinación es activa como agente contra la manía.

B) COMPRIMIDOS ORALES

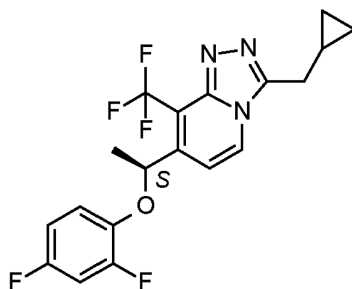
40 A modo de realización específica para una composición oral, se formulan 100 mg de un compuesto de PAM de mGluR2/agonista con una cantidad suficiente de lactosa finamente dividida para proporcionar una cantidad total de 580 a 590 mg para llenar una cápsula de gelatina dura de tamaño O.

REIVINDICACIONES

1. Una combinación que comprende

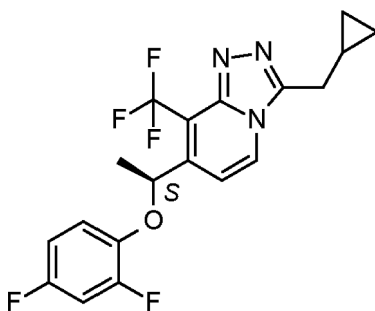
(a) un ligando de una proteína de la vesícula sináptica 2A ("SV2A") seleccionado del grupo que consiste en levetiracetam, brivaracetam y seletracetam; y

5 (b) un compuesto de modulador alostérico positivo ("PAM") del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 ("mGluR2") seleccionado de



o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 2. La combinación de la reivindicación 1, en la que el modulador alostérico positivo del receptor glutamatérgico metabotrópico de subtipo 2 es



o una sal de clorhidrato del mismo.

3. La combinación según la reivindicación 1 o 2, en la que el ligando de SV2A es levetiracetam.

4. La combinación según la reivindicación 1 o 2, en la que el ligando de SV2A es brivaracetam.

15 5. Una composición farmacéutica que comprende una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y un portador farmacéuticamente aceptable.

6. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, formulada como una composición farmacéutica combinada.

7. La composición farmacéutica según la reivindicación 5, formulada en composiciones farmacéuticas separadas.

20 8. Un procedimiento para preparar la composición farmacéutica según la reivindicación 5 o 6, en el que la combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 se mezcla de manera íntima con un portador farmacéuticamente aceptable.

25 9. Un producto que comprende la combinación tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, como una preparación combinada para su uso simultáneo, secuencial o por separado en el tratamiento o la prevención de la epilepsia y trastornos relacionados; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente; trastornos bipolares y trastornos relacionados.

10. Una combinación tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición farmacéutica tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para su uso como medicamento.

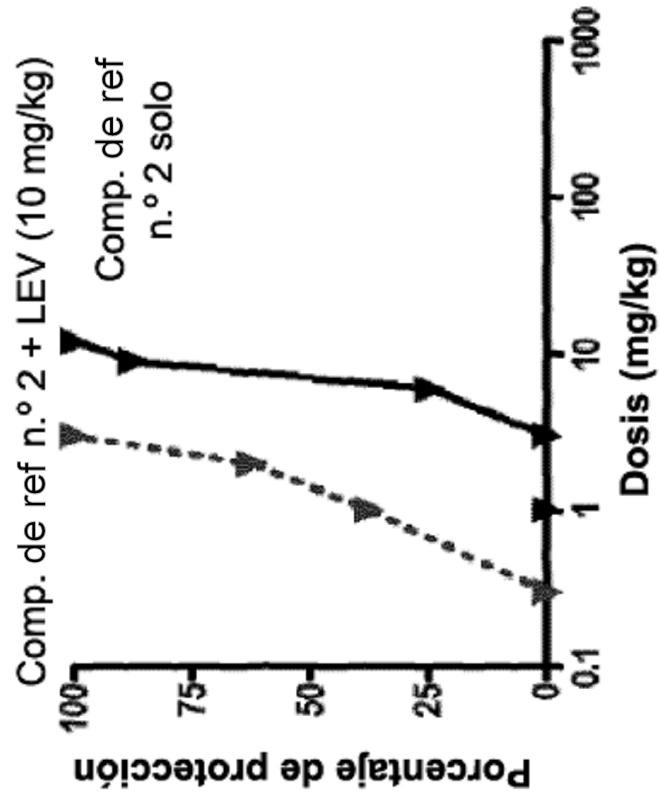
11. Una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en el tratamiento o la prevención de la epilepsia; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente; y trastornos bipolares y trastornos relacionados.

30 12. La combinación para su uso según la reivindicación 11, en el tratamiento o la prevención de la epilepsia.

13. La combinación para su uso según la reivindicación 12, en la que la epilepsia es epilepsia resistente al tratamiento.
14. La combinación para su uso según la reivindicación 12, en la que la epilepsia es epilepsia con convulsiones de inicio parcial con o sin generalización.
- 5 15. La combinación para su uso según la reivindicación 12, en la que la epilepsia es epilepsia con convulsiones generalizadas.
16. La combinación para su uso según la reivindicación 12, donde la epilepsia es epilepsia con convulsiones tónico-clónicas generalizadas primarias.
17. Una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o una composición farmacéutica tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, para su uso en la prevención de la epileptogénesis.
- 10 18. Un producto farmacéutico o un envase comercial que comprende una combinación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 junto con instrucciones para su uso simultáneo, secuencial o por separado en el tratamiento o la prevención de la epilepsia; dolor neuropático; migraña o cefalea resistente; y trastornos bipolares y trastornos relacionados.

FIG. 1

Levetiracetam aumenta la potencia del Comp. de ref n.º 2 en la prueba de 6 Hz (44 mA)



El Comp. de ref n.º 2 aumenta la potencia y eficacia de levetiracetam en la prueba de 6 Hz (44 mA)

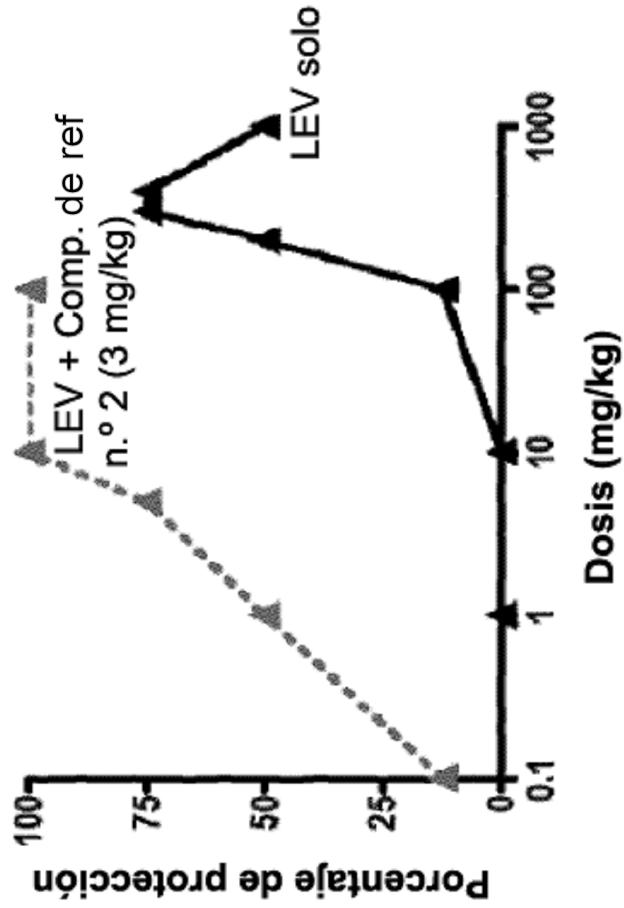


FIG. 2

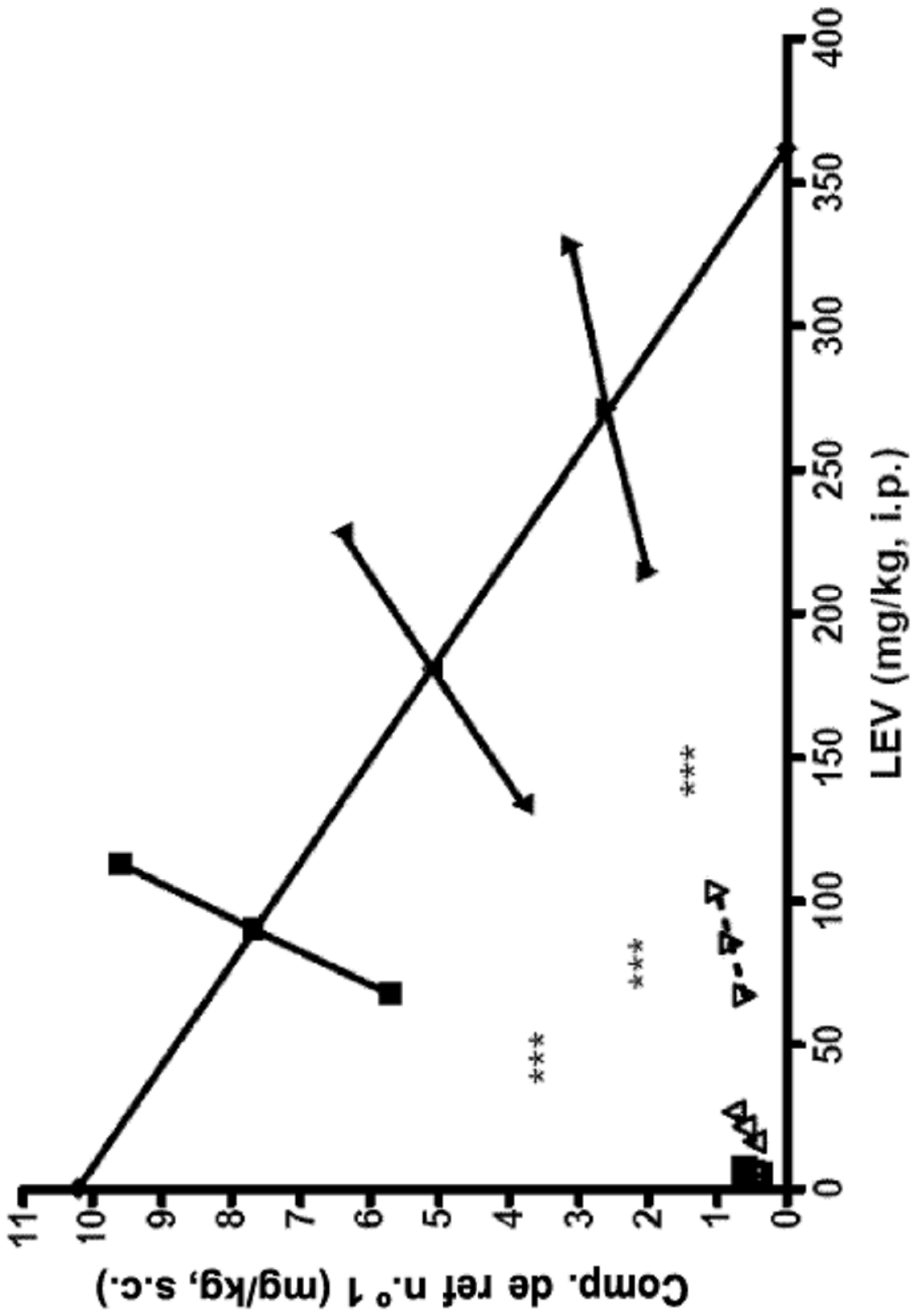


FIG. 3

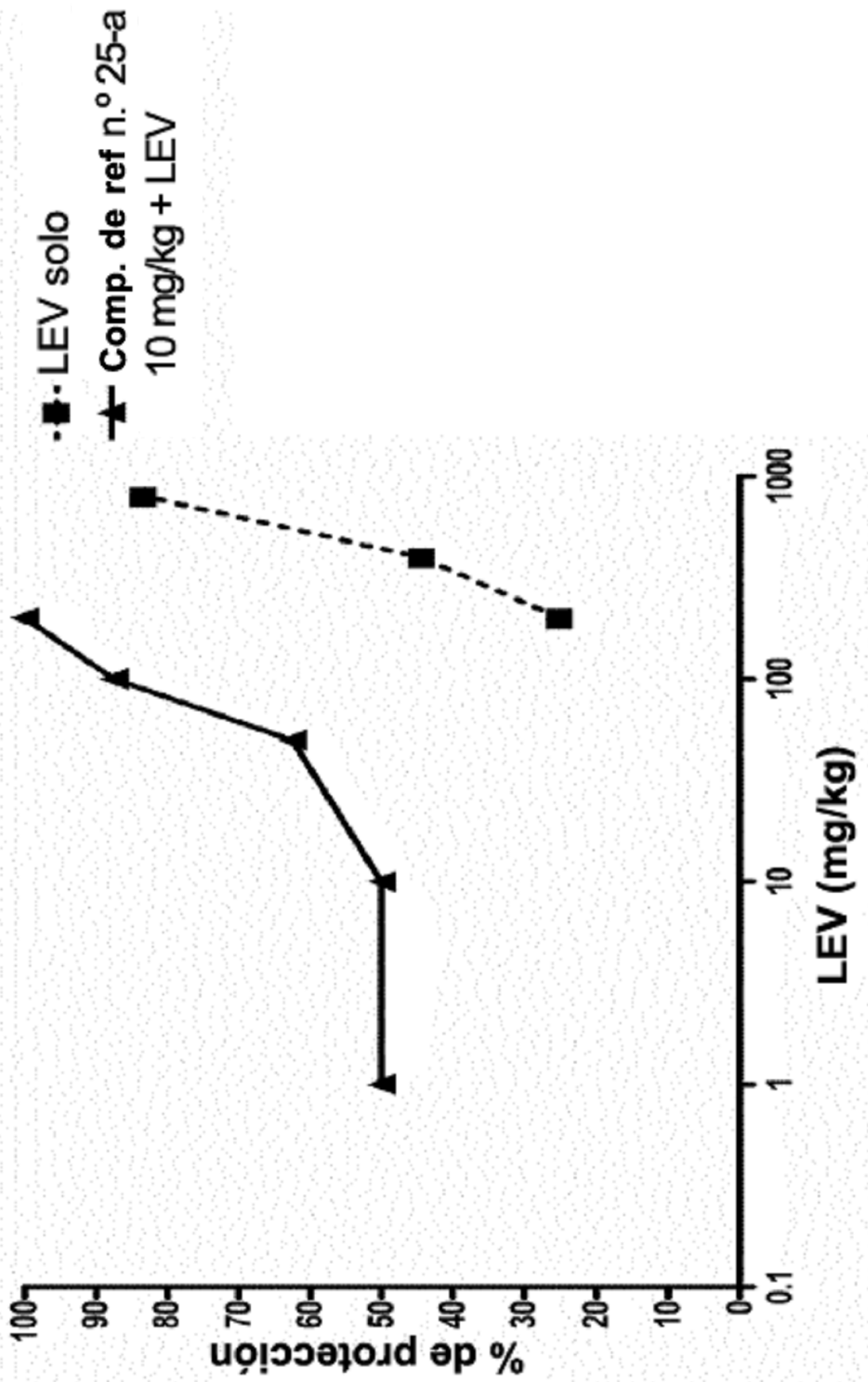


FIG. 4

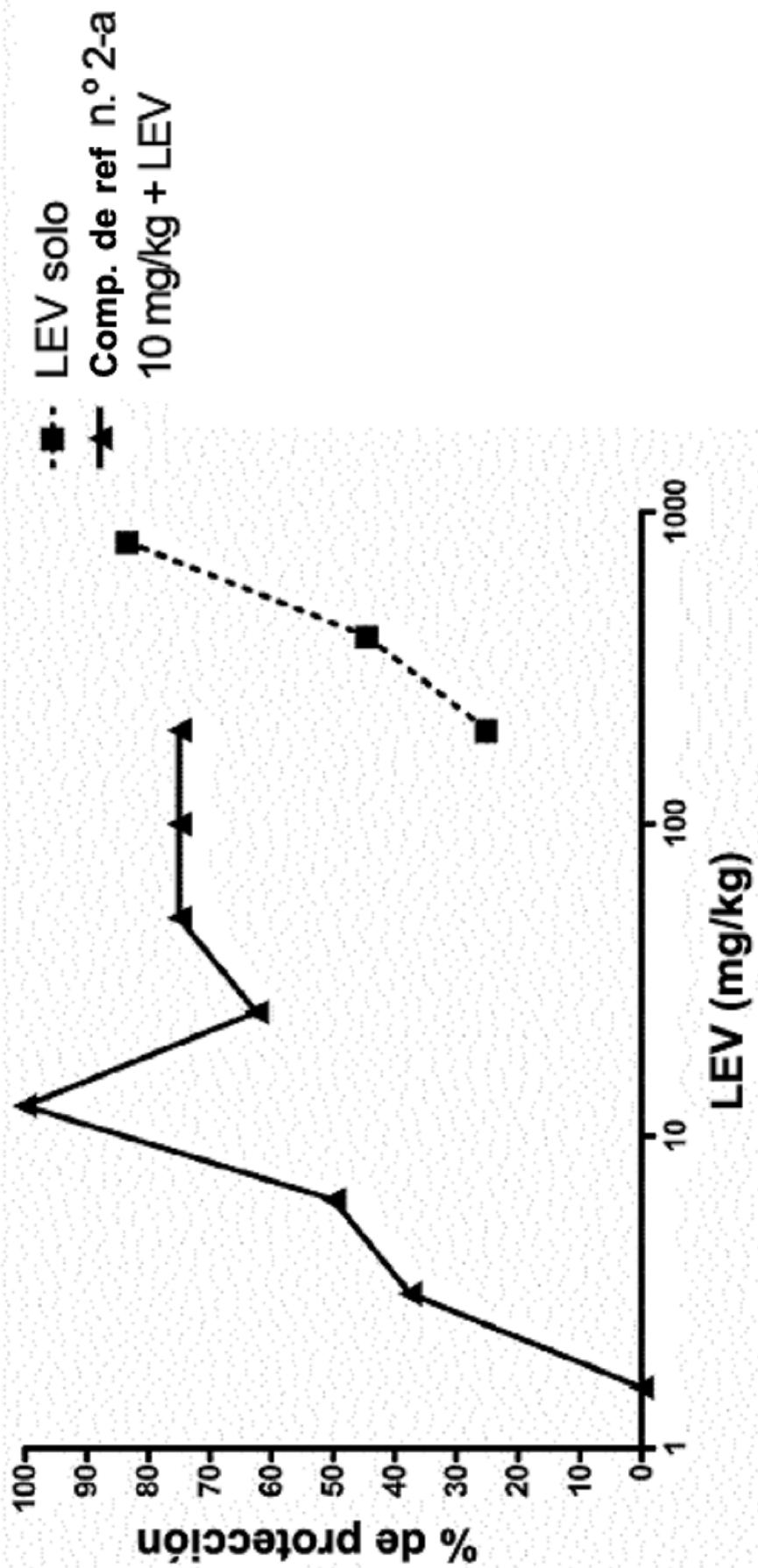


FIG. 5

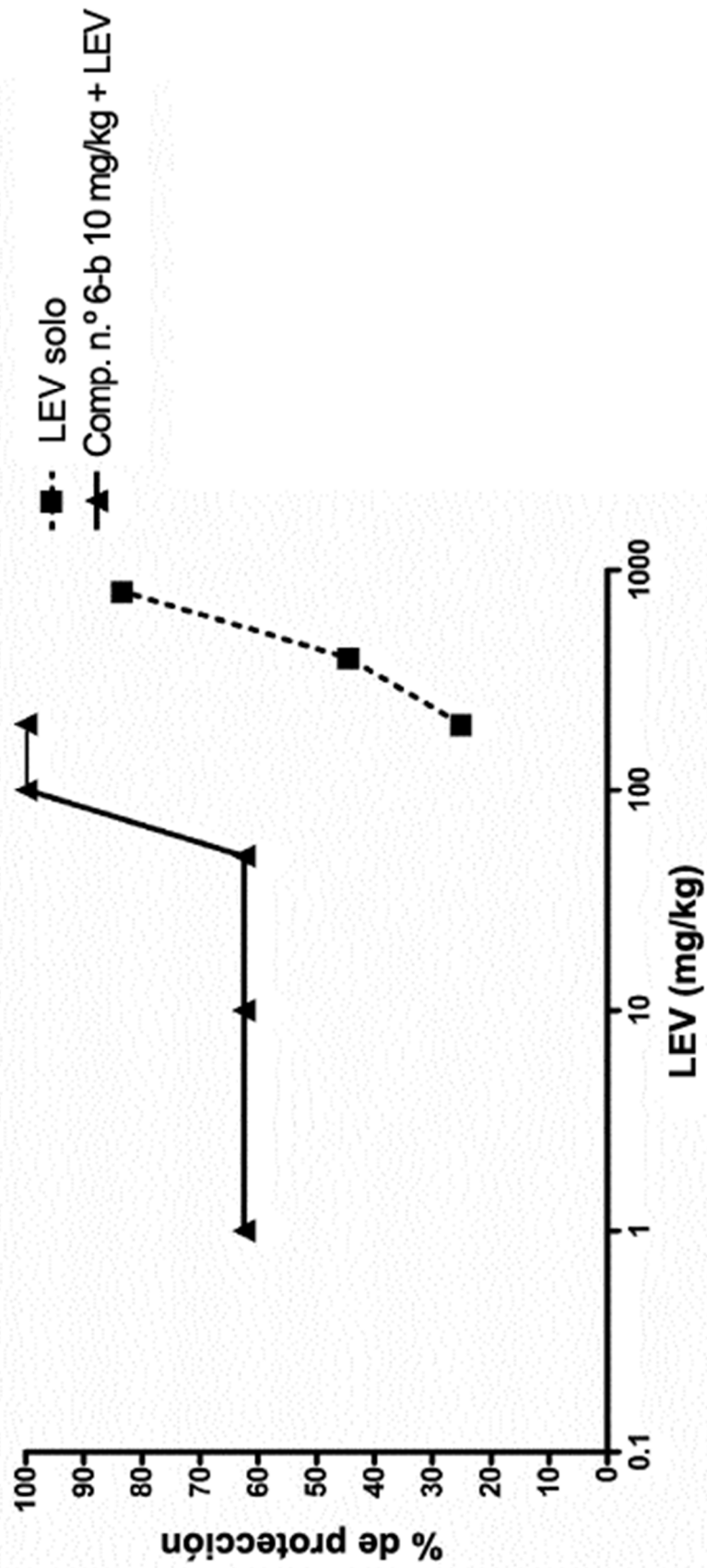


FIG. 6

