



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 328 328**

⑫ Número de solicitud: 200800067

⑬ Int. Cl.:

C07D 231/06 (2006.01)

A61K 31/4155 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **11.01.2008**

⑯ Prioridad: **15.01.2007 EP 07384003**

⑰ Fecha de publicación de la solicitud: **11.11.2009**

Fecha de la concesión: **18.05.2010**

⑲ Fecha de anuncio de la concesión: **28.05.2010**

⑳ Fecha de publicación del folleto de la patente:
28.05.2010

㉑ Titular/es: **LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A.**
Avda. de la Mare de Déu de Montserrat, 221
08041 Barcelona, ES

㉒ Inventor/es: **Buschmann, Helmut. H.;**
Torrens Jover, Antonio;
Yenes Mínguez, Susana;
Benet Buchholz, Jordi y
Sola Carandell, Lluís

㉓ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

㉔ Título: **Polimorfo α de una pirazolina sustituida, su preparación y su uso como medicamento.**

㉕ Resumen:

Polimorfo α de una pirazolina sustituida, su preparación y su uso como medicamento.

La presente invención se refiere al polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida, a procedimientos para su preparación, a medicamentos que comprenden este compuesto, así como a su uso para preparar un medicamento para el tratamiento de seres humanos y animales.

ES 2 328 328 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Polimorfo α de una pirazolina sustituida, su preparación y su uso como medicamento.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un polimorfo de una pirazolina sustituida, a procedimientos para su preparación, a medicamentos que comprenden el compuesto, así como a su uso para preparar un medicamento para el tratamiento de seres humanos y animales.

10 **Antecedentes de la invención**

Los Cannabinoides son compuestos que derivan de la planta *Cannabis sativa* que se conoce normalmente como marihuana. El compuesto químico más activo de los cannabinoides naturales es el tetrahidrocannabinol (THC), en particular el Δ^9 -THC.

Estos cannabinoides naturales así como sus análogos sintéticos promueven sus efectos fisiológicos mediante la unión a receptores acoplados a proteínas G específicos, los llamados receptores de cannabinoides.

20 Hasta ahora se han identificado y clonado dos tipos distintos de receptores que unen los cannabinoides tanto sintéticos como naturales. Estos receptores, que se denominan CB₁ y CB₂ están implicados en una variedad de procesos fisiológicos o fisiopatológicos en seres humanos y animales, por ejemplo, procesos relacionados con el sistema nervioso central, sistema inmunitario, sistema cardiovascular, sistema endocrino, sistema respiratorio, el tracto gastrointestinal o la reproducción, como describen, por ejemplo, Hollister, *Pharm. Rev.* 38, 1986, 1-20; Reny and Singha, *Prog. Drug Res.*, 36, 71-114, 1991; Consroe and Sandyk, en *Marijuana/Cannabinoids, Neurobiology and Neurophysiology*, 459, Murphy L. and Barthe A. Eds., CRC Press, 1992.

Por lo tanto, los compuestos que tienen una alta afinidad de unión por estos receptores de cannabinoides y que son adecuados para modular estos receptores, son útiles en la prevención y/o tratamiento de trastornos relacionados con los receptores de cannabinoides.

En particular, el receptor CB₁ está implicado en muchos trastornos diferentes relacionados con la ingestión de alimento, tales como la bulimia o la obesidad, incluida la obesidad asociada con la diabetes de tipo II (diabetes no dependiente de insulina), y por lo tanto los compuestos adecuados para regular este receptor se pueden usar en la profilaxis y/o tratamiento de estos trastornos.

35 **Descripción de la invención**

Un objetivo de la presente invención era proporcionar compuestos nuevos para usar como sustancias activas en medicamentos. En particular, estas sustancias activas deben ser adecuadas para la modulación de los receptores de cannabinoides, más en particular, para la modulación de los receptores de cannabinoides 1 (CB₁).

Dicho objetivo se logró proporcionando el polimorfo del compuesto de piperidinil-pirazolina dado a continuación.

45 Se ha encontrado que estos compuestos tienen una afinidad alta por los receptores de cannabinoides, en particular por el receptor CB₁, y que actúan como moduladores, por ejemplo antagonistas, agonistas inversos o agonistas en estos receptores. Por lo tanto son adecuados para la profilaxis y/o tratamiento de diferentes trastornos relacionados con el sistema nervioso central, sistema inmunitario, sistema cardiovascular, sistema endocrino, sistema respiratorio, el tracto gastrointestinal o la reproducción en seres humanos y/o animales, preferiblemente en seres humanos, incluidos bebés, niños y adultos.

Así, en uno de sus aspectos la presente invención se refiere al polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida.

55 Este polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida cristaliza muy bien y muestra una estabilidad buena en determinadas condiciones, en especial alrededor de temperatura ambiente, y/o frente al tiempo. Parece que también muestra una solubilidad relativamente buena.

60 Como realización preferida de la presente invención, el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida, cristaliza como una celda monoclínica con un ángulo beta de 104,52° a 100 K.

Como otra realización preferida de la presente invención el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida, muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo según la figura 7.

ES 2 328 328 B1

Como otra realización preferida de la presente invención el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida, funde

a más de 114°C, preferiblemente a un punto de inicio de $118 \pm 4^\circ\text{C}$, más preferiblemente a un punto de inicio de $118 \pm 3^\circ\text{C}$

y/o

con un máximo de fusión a $124 \pm 6^\circ\text{C}$, preferiblemente a $124 \pm 5^\circ\text{C}$,

y/o

con una entalpía de fusión de $-58 \pm 4,0 \text{ J/g}$, preferiblemente $-58 \pm 3,0 \text{ J/g}$.

Como otra realización preferida de la presente invención el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida, se descompone a o por encima de 280°C .

Como otra realización preferida de la presente invención el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida, en el espectro de FTIR muestra picos, preferiblemente picos intensos, a $3324 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$, y/o $1534 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$.

Como otra realización preferida de la presente invención el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida, muestra bandas en el espectro de FTRaman, preferiblemente bandas intensas, a $3326 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ y/o un desplazamiento Raman a $3326 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$.

Es muy preferido, que el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida muestre al menos 2, preferiblemente al menos 3, más preferiblemente al menos 4, lo más preferiblemente al menos 5, mucho más preferiblemente las 6 siguientes características de la siguiente lista:

- cristaliza como una celda monoclinica con un ángulo beta de $104,52^\circ$ a 100 K ;

- muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo de acuerdo con la figura 7;

- funde

a más de 114°C , preferiblemente a un punto de inicio de $118 \pm 4^\circ\text{C}$, más preferiblemente a un punto de inicio de $118 \pm 3^\circ\text{C}$

y/o

con un máximo de fusión a $124 \pm 6^\circ\text{C}$, preferiblemente a $124 \pm 5^\circ\text{C}$,

y/o

con una entalpía de fusión de $-58 \pm 4,0 \text{ J/g}$, preferiblemente $-58 \pm 3,0 \text{ J/g}$;

- se descompone a o por encima de 280°C ;

- en el espectro de FTIR muestra picos, preferiblemente picos intensos, a $3324 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$, y/o $1534 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$;

- muestra bandas en el espectro de FTRaman, preferiblemente bandas intensas, a $3326 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$ y/o un desplazamiento Raman a $3326 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$.

En otro aspecto la presente invención también proporciona un procedimiento para preparar el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida a partir de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida, en el que

a) en una etapa de disolución la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida se disuelve en éter de diisopropilo, se calienta a una temperatura entre 65°C y 70°C hasta que la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida se disuelve completamente, y

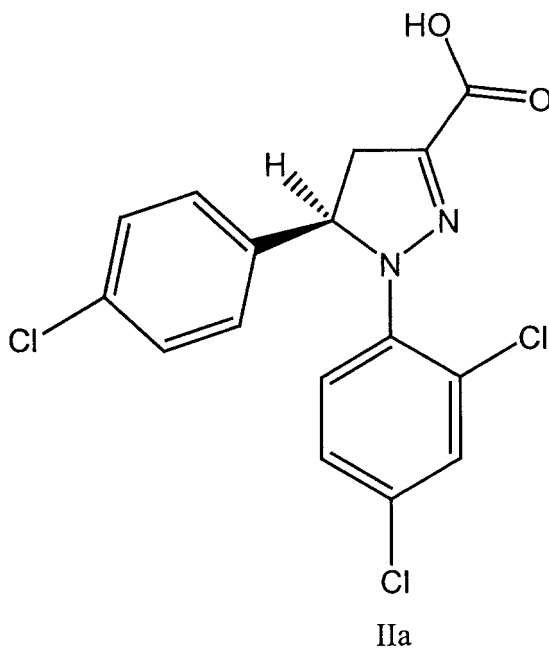
b) en una etapa de enfriamiento, la solución posteriormente se enfría a una temperatura inferior a 25°C , para dar el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida.

ES 2 328 328 B1

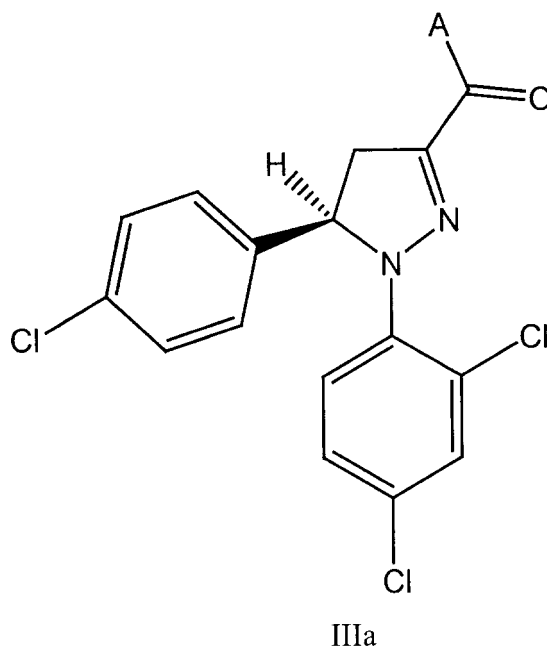
En una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la invención la etapa de enfriamiento b) se hace en dos fases, primero a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, y después a $0 \pm 2^\circ\text{C}$, y/o

en la etapa de disolución a) la temperatura se eleva a 68°C .

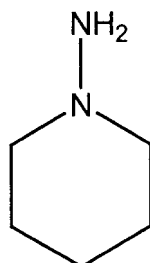
La (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida se puede preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula IIa



que se transforma opcionalmente en atmósfera inerte en un compuesto de fórmula general (IIIa) por reacción con un agente de activación,

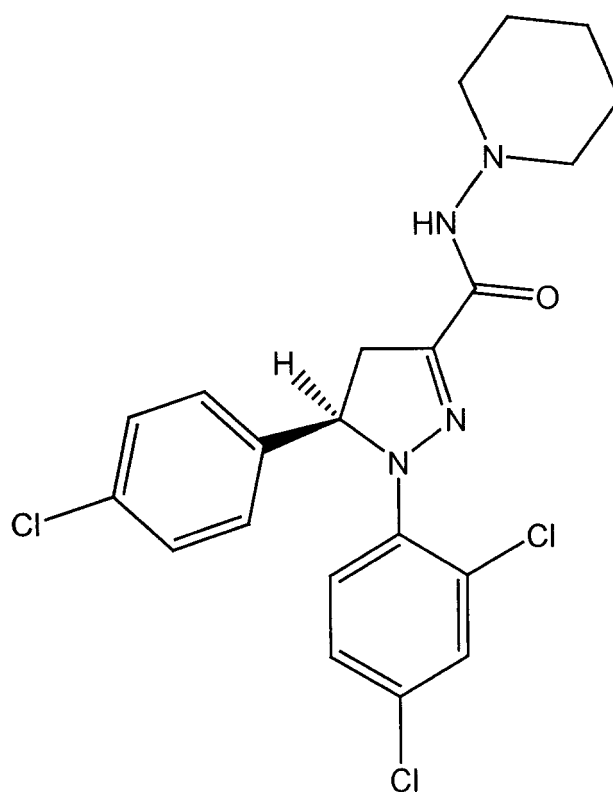


en la que A representa un grupo saliente, preferiblemente un átomo de cloro, aislándose opcionalmente dicho compuesto y/o purificándose opcionalmente, y un compuesto de fórmula (IIa) o fórmula general (IIIa) se hace reaccionar con un compuesto de fórmula VIII,



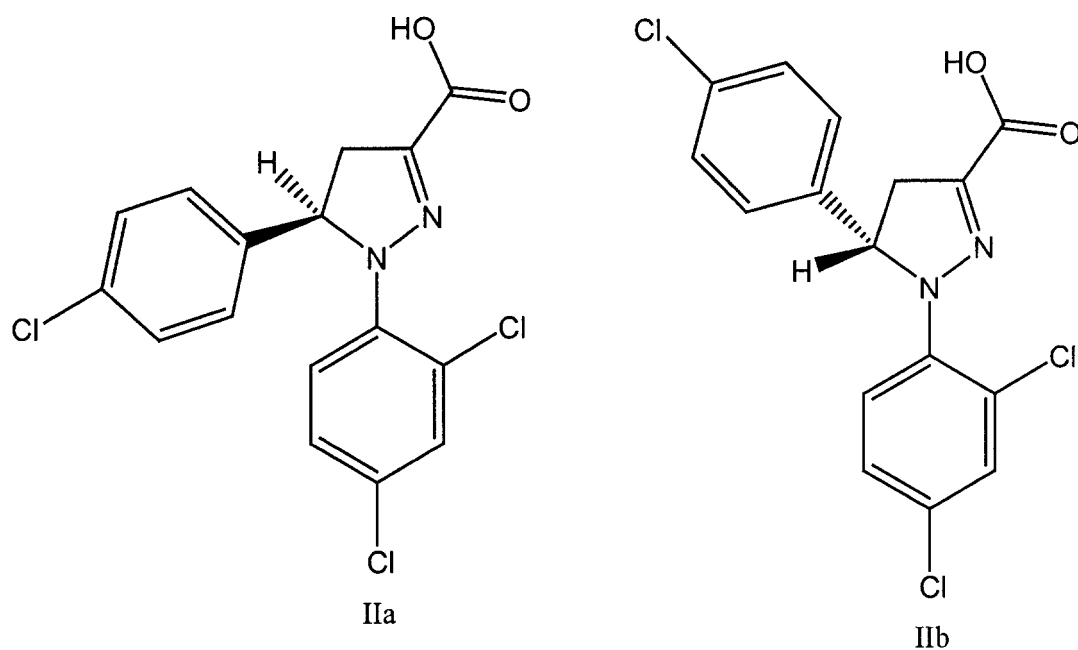
VIII

en atmósfera inerte para dar la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de fórmula (I),



que se aísla opcionalmente y/o se purifica opcionalmente.

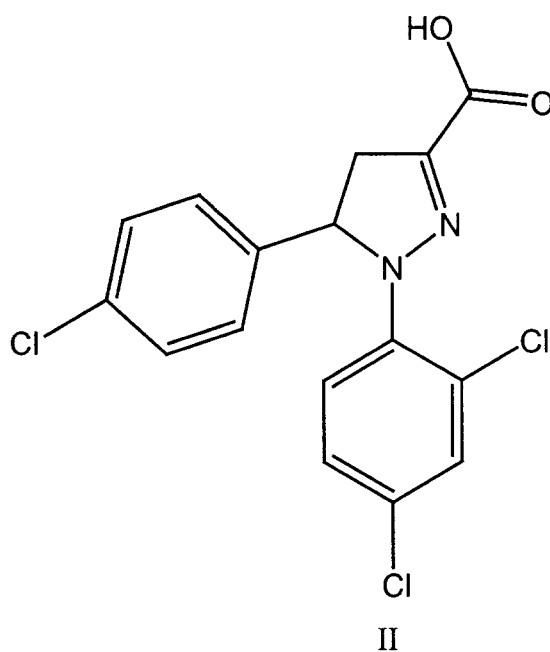
Preferiblemente el compuesto IIa se obtiene de una mezcla que comprende los enantiómeros



y

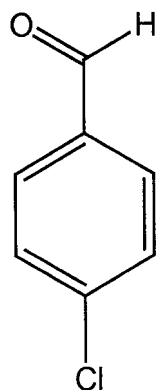
El compuesto (IIa) se puede obtener a partir de la mezcla de enantiómeros mediante medios que conocen los expertos en la materia. Preferiblemente, el compuesto IIa se obtiene de la mezcla en forma de un compuesto de adición con una base quiral, preferiblemente (+)-cinchonina o R-(+)-1-feniletilamina, y preferiblemente se libera del compuesto de adición.

Preferiblemente, la mezcla racémica de acuerdo con la fórmula II

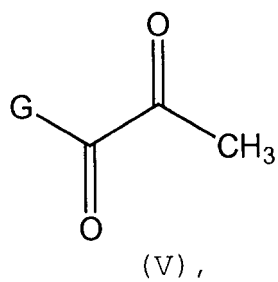


ES 2 328 328 B1

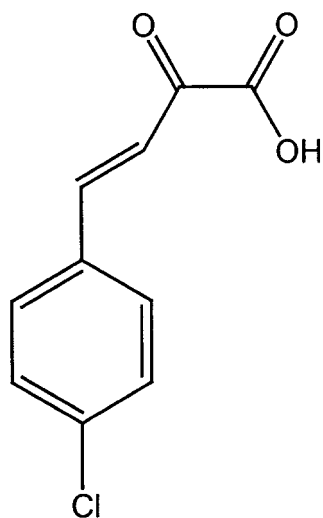
que comprende los enantiómeros IIa y IIb se puede obtener haciendo reaccionar un compuesto benzaldehído de fórmula general IV



con un compuesto piruvato de fórmula (V)

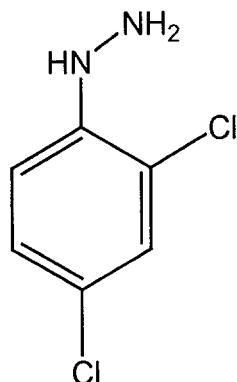


en la que G representa un grupo OR, siendo R un radical alquilo C_{1-6} ramificado o lineal, o G representa un grupo O^-K , siendo K un catión, para dar un compuesto de fórmula (VI)



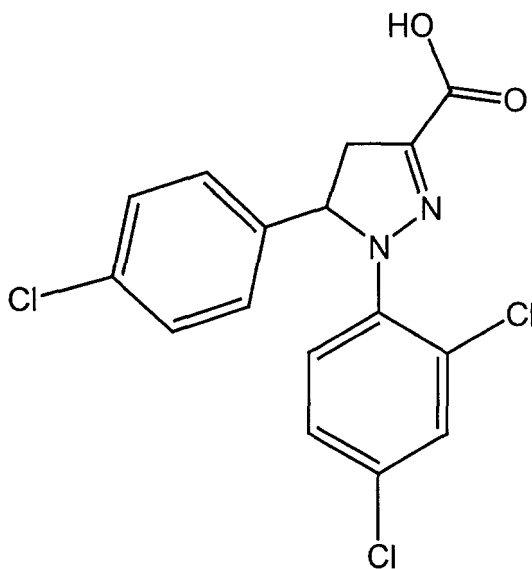
(VI)

que se aísla opcionalmente y/o se purifica opcionalmente, y que se hace reaccionar con una fenil-hidrazina opcionalmente sustituida de fórmula (VII)



(VII)

o una sal correspondiente de la misma, en atmósfera inerte, para dar un compuesto de fórmula (II)



(II)

que se aísla opcionalmente y/o se purifica opcionalmente.

La producción del compuesto de acuerdo con la fórmula II ya está descrita con detalle en las solicitudes de patente internacional WO 2005/077909 y WO 2005/077911. Las respectivas descripciones se incorporan en el presente documento por referencia y forman parte de la presente descripción.

La reacción del compuesto de fórmula general (IIa) con un compuesto de fórmula VIII para dar compuestos de fórmula general I, se lleva a cabo preferiblemente en presencia de una base tal como trietilamina en un medio de reacción tal como cloruro de metileno. La temperatura preferiblemente está en el intervalo de 0°C al punto de ebullición del medio de reacción. El tiempo de reacción puede variar en un amplio intervalo, por ejemplo, de varias horas a varios días.

La reacción anteriormente mencionada que implica la síntesis del anillo de 4,5-dihidro-pirazol preferiblemente se lleva a cabo en atmósfera inerte, preferiblemente nitrógeno o argón, para evitar la oxidación del sistema anular.

Durante los procedimientos descritos antes, puede ser necesaria y/o conveniente la protección de grupos sensibles o de reactivos. La introducción de los grupos protectores convencionales, así como su eliminación, se pueden llevar a cabo por procedimientos que conocen bien los expertos en la materia.

La purificación y el aislamiento de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida o cualquier producto intermedio del mismo, se puede llevar a cabo, si es necesario, por procedimientos convencionales que conocen los expertos en la materia, por ejemplo, procedimientos cromatográficos o recristalización.

El polimorfo de acuerdo con la invención, es adecuado como sustancia farmacéutica activa para preparar medicamentos.

Se ha encontrado que el polimorfo tiene una afinidad alta por los receptores de cannabinoides, en particular los receptores de cannabinoides 1 (CB₁), es decir, es un ligando selectivo para el receptor (CB₁) y actúa como modulador, por ejemplo, antagonista, agonista inverso o agonista, en estos receptores. En particular, el compuesto no muestra o muestra poco desarrollo de tolerancia durante el tratamiento, en particular respecto a la ingestión de alimento, es decir, si se interrumpe el tratamiento durante un periodo de tiempo dado y después se continúa, el compuesto de la invención usado mostrará otra vez el efecto deseado. Tras terminar el tratamiento con el compuesto, se encuentra que la influencia positiva en el cuerpo continua durante al menos un determinado periodo de tiempo.

Además, este polimorfo está conectado con la afinidad relativamente baja del canal Herg, y así se espera un riesgo bajo de prolongación del intervalo QT para este compuesto.

En resumen, el polimorfo de la invención usado se distingue por un amplio espectro de efectos beneficiosos, mientras que al mismo tiempo muestra relativamente pocos efectos indeseados, es decir, efectos que no contribuyen positivamente o incluso que interfieren con el bienestar del paciente.

Así, otro aspecto de la presente invención se refiere a un medicamento que comprende el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto de la presente invención es el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para preparar un medicamento para modular los receptores de cannabinoides, preferiblemente los receptores de cannabinoides 1 (CB₁), para la profilaxis y/o tratamiento de trastornos del sistema nervioso central, trastornos del sistema inmunitario, trastornos del sistema cardiovascular, trastornos del sistema endocrino, trastornos del sistema respiratorio, trastornos del tracto gastrointestinal o trastornos reproductivos.

También se prefiere el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para la profilaxis y/o tratamiento de la psicosis.

También se prefiere en particular el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de los trastornos de ingestión de alimento, preferiblemente bulimia, anorexia, caquexia, obesidad y/o diabetes mellitus de tipo II (diabetes mellitus no dependiente de insulina), más preferiblemente obesidad.

También se prefiere el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento del cáncer, preferiblemente para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más tipos de cáncer seleccionados del grupo constituido por cáncer cerebral, cáncer de hueso, cáncer de labio, cáncer de boca, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, cáncer de pulmón, cáncer de pecho, cáncer de piel, cáncer de colon, cáncer de intestino y cáncer de próstata, más preferiblemente para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más tipos de cáncer seleccionados del grupo constituido por cáncer de colon, cáncer de intestino y cáncer de próstata.

También se prefiere el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento del abuso de alcohol y/o adicción al alcohol, abuso de nicotina y/o adicción a la nicotina, abuso de drogas y/o adicción a drogas y/o abuso de medicamentos y/o adicción a medicamentos, preferiblemente abuso de drogas y/o adicción a drogas y/o abuso de nicotina y/o adicción a nicotina.

Los medicamentos/drogas que con frecuencia son objeto de abuso incluyen opiáceos, barbitúricos, cannabis, cocaína, anfetaminas, fenciclidina, alucinógenos y benzodiacepinas.

También se prefiere el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más trastornos seleccionados del grupo constituido por trastornos óseos, preferiblemente osteoporosis (por ejemplo osteoporosis asociada con una predisposición genética, deficiencia de hormonas sexuales, o envejecimiento), enfermedad ósea asociada con cáncer o enfermedad ósea de Paget; esquizofrenia, ansiedad, depresión, epilepsia, trastornos neurodegenerativos, trastornos cerebelosos, trastornos espinocerebelosos, trastornos cognitivos, traumatismo craneal, traumatismo encefálico, infarto cerebral, ataques de pánico, neuropatía periférica, inflamación, glaucoma, migraña, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Raynaud, trastornos de temblores, trastornos compulsivos, demencia senil, trastornos tímicos, discinesia tardía, trastornos bipolares, trastornos del movimiento inducidos por medicamentos, distonía, choque endotoxémico, choque hemorrágico, hipotensión, insomnio, trastornos inmunológicos, placas escleróticas, vómitos, diarrea, asma, trastornos de la memoria, pruritos, dolor, o para potenciar el efecto analgésico de analgésicos narcóticos o no narcóticos, o para influir en el tránsito intestinal.

También se prefiere en particular el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, opcionalmente en forma de uno de sus estereoisómeros, preferiblemente enantiómeros o diastereoisómeros, o un racemato o en forma de una mezcla de al menos dos de los estereoisómeros, preferiblemente enantiómeros y/o diastereoisómeros, en cualquier proporción de mezcla, o un solvato correspondiente del mismo, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más trastornos seleccionados del grupo constituido por demencia y trastornos relacionados, preferiblemente para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más tipos de demencia seleccionados del grupo constituido por pérdida de memoria, demencia vascular, deterioro cognitivo leve, demencia frontotemporal y enfermedad de Pick; trastornos de alimentación excesiva; obesidad juvenil; obesidad inducida por fármacos; depresión atípica; adicciones conductuales; trastornos por déficit de atención; síndrome de Tourette; supresión de comportamientos relacionados con recompensa; por ejemplo evitación condicionada de lugares tales como la supresión de la preferencia condicionada de lugares inducida por la cocaína y la morfina; impulsividad; disfunción sexual; preferiblemente para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más tipos de disfunción sexual seleccionados del grupo constituido por dificultad eréctil y disfunción sexual femenina; trastornos de ataques; náuseas; emesis; enfermedad neuroinflamatoria, preferiblemente para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más tipos de enfermedades neuroinflamatorias seleccionadas del grupo constituido por esclerosis múltiple, trastornos relacionados con la desmielinización, síndrome de Guillan-Barré, encefalitis vírica y accidentes cerebrovasculares; trastornos neurológicos; espasticidad muscular; lesión cerebral traumática; lesión de la médula espinal; inflamación y trastornos inmunomoduladores, preferiblemente para el tratamiento y/o profilaxis de uno o más tipos de inflamación y trastornos inmunomoduladores seleccionados del grupo constituido por linfoma cutáneo de células T, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, sepsis, sarcoidosis, fibrosis pulmonar idiopática, displasia broncopulmonar, enfermedad retinal, escleroderma, isquemia renal, infarto de miocardio, isquemia cerebral, nefritis, hepatitis, glomerulonefritis, alveolitis fibrosante criptogénica, psoriasis, rechazo de trasplante, dermatitis atópica, vasculitis, alergia, rinitis alérgica estacional, enfermedad de Crohn, enfermedad inflamatoria del intestino, obstrucción reversible de las vías aéreas, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y bronquitis; infarto cerebral; traumatismo craneoencefálico; trastornos de dolor neuropático; úlceras gástricas; arteriosclerosis y cirrosis hepática.

La demencia es una enfermedad que se caracteriza por el deterioro progresivo de las funciones cognitivas y de adaptación social que finalmente pueden interferir en la capacidad del paciente para vivir de forma independiente. La demencia también significa un deterioro de la memoria a corto y largo plazo más síntomas adicionales, tales como problemas con el pensamiento abstracto, criterio o personalidad. Se calcula que 18 millones de pacientes en el mundo padecen demencia. Las formas de demencia más comunes incluyen la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular. Otras formas son la demencia frontotemporal y la enfermedad de Pick.

La demencia también puede ser de origen vascular. La demencia vascular (enfermedad cerebrovascular aterosclerótica) se considera que es la segunda demencia más común en la vejez, que afecta a aproximadamente 10-15% de todos los casos. La enfermedad de Alzheimer (EA) y la demencia vascular pueden existir aislados o juntos (demencia mixta). En la demencia vascular, los cambios ateroscleróticos en los vasos cerebrales pueden conducir a un menor flujo sanguíneo que da como resultado múltiples pequeños infartos cerebrales (demencia multiinfarto). La demencia vascular se trata farmacológicamente con profilaxis de infarto cerebral y por tratamiento de déficit cognitivo.

La enfermedad de Alzheimer (EA), la forma de demencia más común e importante, es un trastorno neurodegenerativo que se caracteriza por el deterioro progresivo de las funciones cognitivas, tales como el razonamiento abstracto y la memoria. Actualmente, se calcula que 2 millones de personas en los Estados Unidos y 12 millones en el mundo están afectadas por esta enfermedad. Debido al aumento de la esperanza de vida, se predice que habrá alrededor de 100 millones de pacientes con EA en el mundo en el año 2050. La EA es una de las enfermedades más extendidas en las personas mayores. La mayoría de los pacientes con EA tienen sesenta años de edad o más. Más del 5% de todas las personas con alrededor de 70 años tienen pérdida de memoria significativa debido a la EA.

La EA se caracteriza principalmente por un desarrollo gradual de la falta de memoria. En las etapas más avanzadas de la enfermedad, se hacen cada vez más evidentes otros fallos de la función cerebral. Estos incluyen deterioro del

habla, la escritura y habilidades aritméticas. La orientación espaciovizual, tal como aparcar el coche, vestirse de forma apropiada, y dar y entender direcciones de un sitio, se vuelven defectuosos o están perjudicados. En una etapa final de la enfermedad, los pacientes olvidan como se usan los objetos y herramientas comunes aunque mantienen la potencia motora y coordinación necesarias para estas actividades.

5 La esquizofrenia se caracteriza por la alteración profunda de la cognición y emoción, que afecta a las características humanas más fundamentales: lenguaje, pensamiento, percepción, afecto y la autoconciencia. Los síntomas positivos incluyen manifestaciones psicóticas, tales como oír voces interiores o experimentar otras sensaciones no conectadas con una fuente obvia (alucinaciones) y asignar una importancia o significado inusual a sucesos normales o mantener
10 creencias personas falsas fijas (falsas ilusiones). Los síntomas negativos se caracterizan por afecto plano y falta de iniciativa u objetivos (abolición), pérdida de intereses o placeres habituales (anhedonia), alteraciones del sueño y la alimentación, humor disfórico (deprimido, ansioso, irritable, o humor enfadado) y dificultad de concentración o de centrar la atención.

15 La depresión mayor es un trastorno multifacético que se caracteriza principalmente por humor disfórico y pérdida de interés o placer en actividades que antes fueron agradables. Otros síntomas físicos y psicológicos incluyen incapacidad para concentrarse, alteraciones motoras (retardo psicomotor o agitación), sentimientos de inutilidad, culpabilidad inadecuada, pensamientos de suicidio, y alteraciones en el apetito y el sueño.

20 Los trastornos de ansiedad son un grupo de síndromes que incluyen el trastorno de ansiedad generalizada, trastorno de pánico, fobias, trastorno obsesivo compulsivo, y trastorno de estrés posttraumático. Aunque cada trastorno tiene sus propias características definidas, todos comparten síntomas comunes de preocupación excesiva, miedos intensos y terror, hipervigilancia y/o síntomas somáticos, en ausencia de una situación peligrosa.

25 La función sexual normal requiere, entre otras, la capacidad para lograr y mantener la erección del pene. Las estructuras anatómicas principales del pene que están implicadas en la función eréctil incluyen el cuerpo cavernoso, cuerpo espinoso, y la túnica albugínea (una cubierta de colágeno que rodea cada uno de los cuerpos). Los cuerpos están compuestos de una masa de músculo liso (trabécula) que contiene una red de vasos revestidos por endotelio (espacios lacunares). La tumescencia y erección del pene se producen por la relajación de las arterias y músculos lisos
30 de los cuerpos, mientras que se cierran las venas emisarias, conduciendo a un aumento del flujo sanguíneo en la red lacunar. La inervación central y periférica contribuye a regular la respuesta eréctil.

La disfunción eréctil (DE) puede ser el resultado del fracaso para iniciar, llenar o almacenar el volumen de sangre adecuado en la red lacunar del pene. Dependiendo de la disfunción subyacente, la DE puede ser vasculogénica,
35 neurogénica, endocrinológica, diabética, psicogénica o relacionada con la medicación.

La DE afecta al 10-25% de los hombres de mediana edad y hombres mayores, y tiene un gran impacto en el bienestar de los hombres afectados. Actualmente se trata usando inhibidores de la PDE5 tales como vardenafilo, tadalafilo y sildenafil. Se puede usar alpostadilo intrauretral (prostaglandina EI) en pacientes en los que fracasan
40 los agentes orales. Además, los dispositivos de estrangulamiento de vacío (VCD) son una terapia no invasiva bien establecida.

La disfunción sexual femenina (DSF) tiene una prevalencia alta, está relacionada con la edad, y es progresiva. Afecta de 30 a 50% de las mujeres. La DSF indica una variedad de problemas médicos y se clasifica de acuerdo con
45 trastornos en (1) el deseo, (2) excitación, (3) orgasmo y (4) dolor sexual, y los síntomas incluyen lubricación vaginal reducida, dolor e incomodidad en el coito, menor excitación, y dificultad para lograr el orgasmo. A un nivel molecular, se ha sugerido que el péptido intestinal vasoactivo (VIP), el óxido nítrico (NO) y las hormonas sexuales tales como los estrógenos y andrógenos son importantes en la función sexual femenina. Los procedimientos de tratamiento actuales incluyen terapia de sustitución con estrógenos, metil-testosterona, inhibidores de la PDE5 tales como sildenafil, el
50 donador de NO L-arginina, prostaglandina EI, fentolamina, y el agonista de dopamina apomorfina.

También se prefiere el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento del síndrome metabólico, en especial in-
55 dependiente del peso, enfermedades cardiovasculares, factores de riesgo cardiovascular, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina; para la profilaxis y/o tratamiento y/o influencia de la dislipidemia; para la profilaxis y/o tratamiento y/o influencia de los parámetros sanguíneos en especial los parámetros de lípidos, que parece que disminuyen los cuerpos de LDL mientras que aumentan los cuerpos de HDL, incluido también el tratamiento de trastornos de la alimentación (obesidad) en afecciones de diabetes desarrollada, en especial de Tipo II.

60 Describen con detalle el síndrome metabólico y las definiciones del mismo Eckel y col., *The Lancet*, Vol. 365 (2005), 1415-1428, incluido en el presente documento por referencia. Una de las respectivas definiciones fue establecida por la OMS en 1998 (como describen Alberti y col., *Diabet. Med.* 1998, 15, páginas 539-53, cuya descripción respectiva se incorpora en el presente documento por referencia y forma parte de la presente descripción). La otra
65 definición, más ampliamente aceptada, del síndrome metabólico fue establecida por el tercer panel de tratamiento del adulto (ATP III, *por sus siglas en inglés*) del Programa nacional de educación de colesterol de EE.UU. (NCEP, *por sus siglas en inglés*) en 2001, como se describe en *JAMA* 2001; 285: 2486-97, cuyas respectivas descripciones se incorporan en el presente documento por referencia y forman parte de la presente descripción.

El síndrome metabólico se caracteriza por una interacción de varios parámetros fisiológicos tales como los triglicéridos, lípidos, presión sanguínea, niveles de glucosa y niveles de insulina. Aunque la obesidad puede jugar un papel crítico en el desarrollo del síndrome metabólico, muchos de sus aspectos son independientes del peso, en especial los parámetros de lípidos. En especial la influencia positiva en los aspectos independientes del peso del síndrome metabólico (véase, por ejemplo, Pagotto and Pasquali, *The Lancet*, Vol. 365 (2005), 1363, 1364, incluido en el presente documento por referencia) tal como algunos parámetros de la sangre, en especial los parámetros de lípidos, es una de las mayores ventajas y más sorprendentes de los compuestos de pirazolina sustituida usados de la invención.

Puesto que el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención también tiene un efecto beneficioso en la relación de lipoproteína de baja densidad (LDL) a lipoproteína de alta densidad (HDL), es decir, disminuye los niveles de LDL y/o eleva los niveles de HDL, también es útil como material de recubrimiento o material de co-recubrimiento en los stents con el fin de prevenir la reestenosis.

El término “tratamiento” como se usa en la presente solicitud abarca la prevención, mejora y/o recuperación completa de la enfermedad. Dicho término también incluye la prevención, mejora y/o recuperación completa de uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

Además el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención está conectada con la afinidad relativamente baja del canal Herg, por lo que se puede esperar un riesgo bajo de prolongación del intervalo QT para el compuesto.

En resumen, el polimorfo α usado en la invención de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención se distingue por un amplio espectro de efectos beneficiosos, mientras que al mismo tiempo muestra relativamente pocos efectos indeseados, es decir, efectos que no contribuyen de forma positiva o que incluso interfieren en el bienestar del paciente.

Otro aspecto de la invención es el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención para fabricar un medicamento para mejorar los factores de riesgo cardiovascular y/o metabólico, tales como uno o más de los siguientes factores:

- Triglicéridos elevados, donde se entiende que los niveles elevados de triglicéridos son preferiblemente > 150 mg/dl,
- Colesterol HDL bajo, donde se entiende que los niveles bajos de colesterol HDL son preferiblemente < 40 mg/dl en hombres y < 50 mg/dl en mujeres,
- Hipertensión, donde se entiende que la hipertensión preferiblemente es > 130/85 mm de Hg,
- Glucosa en ayunas alterada, donde se entiende que los niveles de glucosa en ayunas alterados son preferiblemente > 110 mg/dl.
- Resistencia a la insulina
- Dislipidemia.

Otro aspecto de la invención es el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, para fabricar un medicamento para tratar los aspectos independientes del peso del síndrome metabólico.

Otro aspecto de la invención es el uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, para fabricar un medicamento para tratar la dislipidemia.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para mejorar los factores de riesgo cardiovascular y/o metabólico, tales como uno o más de los siguientes factores:

- Triglicéridos elevados, donde se entiende que los niveles elevados de triglicéridos son preferiblemente > 150 mg/dl,
- Colesterol HDL bajo, donde se entiende que los niveles bajos de colesterol HDL son preferiblemente < 40 mg/dl en hombres y < 50 mg/dl en mujeres,
- Hipertensión, donde se entiende que la hipertensión preferiblemente es > 130/85 mm de Hg,
- Glucosa en ayunas alterada, donde se entiende que los niveles de glucosa en ayunas alterados son preferiblemente > 110 mg/dl.

- Resistencia a la insulina

- Dislipidemia,

5 en un sujeto, preferiblemente un ser humano.

Otro aspecto preferido de la invención también es un procedimiento de tratamiento que abarca todos los usos mencionados, en los que el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la invención, se aplica a una persona que lo necesite, para tratar el síndrome metabólico, en especial el independiente del peso, enfermedades cardiovasculares en especial los factores de riesgo cardiovascular, para influir en los parámetros sanguíneos, en especial los parámetros de lípidos, diabetes, en especial de tipo II, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, trastornos óseos, preferiblemente osteoporosis (por ejemplo, osteoporosis asociada con una predisposición genética, deficiencia de hormonas sexuales o envejecimiento), enfermedad ósea asociada con el cáncer o enfermedad ósea de Paget; esquizofrenia, ansiedad, depresión, epilepsia, trastornos neurodegenerativos, trastornos cerebelosos, trastornos espinocerebelosos, trastornos cognitivos, traumatismo craneal, traumatismo encefálico, infarto cerebral, ataques de pánico, neuropatía periférica, inflamación, glaucoma, migraña, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Raynaud, trastornos de temblores, trastornos compulsivos, demencia senil, trastornos tímicos, discinesia tardía, trastornos bipolares, trastornos del movimiento inducido por medicamentos, distonía, choque endotoxémico, choque hemorrágico, hipotensión, insomnio, trastornos inmunológicos, placas escleróticas, vómitos, diarrea, asma, trastornos de la memoria, pruritos, dolor, o para potenciar el efecto analgésico de analgésicos narcóticos o no narcóticos, o para influir en el tránsito intestinal; abuso de alcohol y/o adicción al alcohol, abuso de nicotina y/o adicción a la nicotina, abuso de drogas y/o adicción a drogas y/o abuso de medicamentos y/o adicción a medicamentos, preferiblemente abuso de drogas y/o adicción a drogas y/o abuso de nicotina y/o adicción a nicotina; cáncer, preferiblemente para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más tipos de cáncer seleccionados del grupo constituido por cáncer cerebral, cáncer de hueso, cáncer de labio, cáncer de boca, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, cáncer de pulmón, cáncer de pecho, cáncer de piel, cáncer de colon, cáncer de intestino y cáncer de próstata, más preferiblemente para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más tipos de cáncer seleccionados del grupo constituido por cáncer de colon, cáncer de intestino y cáncer de próstata; trastornos de ingestión de alimento, preferiblemente bulimia, anorexia, caquexia, obesidad y/o diabetes mellitus de tipo II (diabetes mellitus no dependiente de insulina), más preferiblemente obesidad; psicosis; trastornos del sistema nervioso central, trastornos del sistema inmunitario, trastornos del sistema cardiovascular, trastornos del sistema endocrino, trastornos del sistema respiratorio, trastornos del tracto gastrointestinal o trastornos reproductivos.

35 El medicamento de acuerdo con la presente invención puede estar en cualquier forma adecuada para aplicar a seres humanos y/o animales, preferiblemente seres humanos incluidos bebés, niños y adultos, y se pueden producir por procedimientos convencionales que conocen los expertos en la materia. La composición del medicamento puede variar dependiendo de la vía de administración.

40 El medicamento de la presente invención se puede administrar por ejemplo, por vía parenteral combinado con vehículos líquidos inyectables convencionales, tales como agua o alcoholes adecuados. Se pueden incluir excipientes farmacéuticos convencionales para inyección, tales como agentes estabilizantes, agentes solubilizantes y tampones, en dichas composiciones inyectables. Estos medicamentos se pueden inyectar, por ejemplo, por vía intramuscular, intraperitoneal o intravenosa.

50 Los medicamentos de acuerdo con la invención también se pueden formular en composiciones para administrar por vía oral que contienen uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente compatibles en forma sólida o líquida. Estas composiciones pueden contener ingredientes convencionales tales como agentes aglutinantes, cargas, lubricantes y agentes humectantes adecuados. Las composiciones pueden tener cualquier forma conveniente tal como comprimidos, gránulos, cápsulas, pastillas, soluciones, suspensiones, emulsiones acuosas o aceitosas, o formas en polvo secas adecuadas para reconstituir con agua u otro líquido adecuado antes de usar, para la liberación inmediata o retardada.

55 Las formas orales líquidas también pueden contener determinados aditivos tales como edulcorantes, agentes de sabor, conservantes y agentes emulsionantes. También se pueden formular composiciones líquidas no acuosas para administración oral que contienen aceites comestibles. Dichas composiciones líquidas se pueden encapsular de forma conveniente, por ejemplo en cápsulas de gelatina en una cantidad de dosificación unitaria.

60 Las composiciones de la presente invención también se pueden administrar por vía tópica o por vía de supositorio.

La dosificación diaria para seres humanos y animales puede variar dependiendo de factores que se basan en las respectivas especies y otros factores, tales como la edad, sexo, peso o grado de la enfermedad etc. La dosificación diaria para seres humanos puede estar preferiblemente en el intervalo de 1 a 2000, preferiblemente de 1 a 1500, más preferiblemente de 1 a 1000 miligramos o también de 20 a 200 mg de sustancia activa para administrar durante una o varias ingestiones al día.

*Procedimientos farmacológicos**I. Determinación in vitro de la afinidad por los receptores CB1/CB2*

5 a) La determinación *in vitro* de la afinidad de los compuestos de pirazolina sustituida de la invención por los receptores CB₁/CB₂ se lleva a cabo como se describe en la publicación de Ruth A. Ross, Heather C. Brockie y col., “Agonist-inverse agonist characterization at CB₁ and CB₂ cannabinoid receptors of L-759633, L759656 and AM630”, *British Journal of Pharmacology*, 126, 665-672, (1999), en el que se usan receptores CB₁ y CB₂ humanos transfectados de Receptor Biology, Inc. El radioligando usado para ambos receptores es [³H]-CP55940. Las respectivas partes de la descripción se incorporan en el presente documento por referencia y forman parte de la presente descripción.

b) Unión a CB1 de cerebelo de rata

15 La afinidad de unión al receptor CB1 se evaluó de acuerdo con una modificación del procedimiento descrito por Govaerts y col., *Eur. J. Pharmac. Sci.* 23, 233-243 (2004). Las respectivas partes de la descripción se incorporan en el presente documento por referencia y forman parte de la presente descripción.

Brevemente, se diseccionaron cerebelos de ratas Wistar macho (250-300 g) cuidadosamente sobre hielo y los homogeneizados se prepararon con un homogeneizador Potter-Helvehelm con solución fría de Tris-HCl 50 mM que contenía MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM y sacarosa 0,25 M, pH 7,4. La suspensión se centrifugó a 1.000 x g durante 15 minutos. Los líquidos sobrenadantes se recogieron y centrifugaron a 50.000 x g durante 15 min. Los sedimentos resultantes después se volvieron a suspender en tampón de Tris-HCl sin sacarosa, se homogeneizaron y se incubaron durante 15 min a 37°C en un baño de agitación orbital y se volvieron a centrifugar a 50.000 x g durante 15 min. Los sedimentos se pesaron, se volvieron a suspender en tampón de Tris-HCl sin sacarosa, se homogeneizaron con un homogeneizador Utraturax a 13.500 rpm durante 3 x 5 s y se hicieron partes alícuotas de volúmenes de 0,9 ml en tubos Eppendorf. Las partes alícuotas se centrifugaron a 20.800 x g durante 5 minutos, se descartaron los líquidos sobrenadantes y los sedimentos se congelaron a -80°C hasta su uso. La concentración total de proteína se determinó usando un ensayo comercial de Bio-Rad basado en el método de Lowry.

Los experimentos de unión competitiva se llevaron a cabo en presencia de [³H]-CP 55.940 1 nM en tubos de vidrio siliconizados que contenían 100 µg proteína/tubo resuspendidos en un volumen final de 1 ml de Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, albúmina de suero bovino al 0,5% (p/v), pH 7,4. Los compuestos estaban presentes con diferentes concentraciones y la unión no específica se determinó en presencia de HU-210 10 µM. Después de 1 h de incubación a 30°C, la suspensión se filtró rápidamente a través de filtros de fibra GF/B pretratados con PEI al 0,5% en un cosechador de 96 pocillos y se lavaron 3 veces con 3 ml de tampón de unión helado sin albúmina de suero bovino. La radiactividad de los filtros se midió en un contador Wallac Winspectral 1414 por centelleo de líquido en 6 ml de Ecoscint H (National Diagnostics, Reino Unido). Los ensayos se hicieron por triplicado.

Los datos de unión se analizaron por regresión no lineal con el software GraphPad Prism Versión 3.03.

*II. Sistema de bioensayo in vivo para determinar la actividad cannabinoide**45 Modelo de tétada en ratón*

Se sabe que las sustancias con afinidad por los receptores de cannabinoides producen una amplia variedad de efectos farmacológicos. También se sabe que la administración intravenosa de una sustancia con afinidad por los receptores de cannabinoides en ratones produce analgesia, hipotermia, sedación y catalepsia. De forma individual, ninguno de estos efectos se puede considerar como una prueba de que una sustancia ensayada tiene afinidad por los receptores de cannabinoides, puesto que todos estos efectos son comunes para diferentes clases de agentes activos en el sistema central. Sin embargo, las sustancias que muestran todos estos efectos, es decir, las sustancias que son activas en este modelo llamado de tétada, se considera que tienen afinidad por los receptores de cannabinoides. Además se ha mostrado que los antagonistas del receptor cannabinoide son altamente eficaces para bloquear los efectos de un agonista de cannabinoide en el modelo de tétada en el ratón.

El modelo de tétada se describe, por ejemplo, en la publicación de A. C. Howlett y col., International Union of Pharmacology XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors, *Pharmacol. Rev.* 54, 161-202, 2002 y David R. Compton y col., “*In-vivo* Characterization of a Specific Cannabinoid Receptor Antagonist (SR141716A): Inhibition of Tetrahydrocannabinol- induced Responses and Apparent Agonist Activity”, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 2, 586-594, 1996. Las partes correspondientes de la descripción se incorporan en el presente documento por referencia.

Material y procedimientos

65 En todos los siguientes experimentos se usan ratones NMRI macho con un peso de 20-30 g (Harlan, Barcelona, España).

ES 2 328 328 B1

Antes de ensayar los procedimientos conductuales dados a continuación, los ratones se aclimatan al marco experimental. Se determinan los valores de control pretratamiento para la latencia de la analgesia por placa caliente (segundos), temperatura rectal, sedación y catalepsia.

5 Con el fin de determinar la actividad agonista de la sustancia que se va a ensayar, se inyecta a los ratones por vía intravenosa la sustancia que se va a ensayar o el vehículo solo. 15 minutos después de la inyección se mide la latencia de la analgesia por placa caliente. La temperatura rectal, sedación y catalepsia se miden 20 minutos después de inyección.

10 Con el fin de determinar la actividad antagonista se usa un procedimiento idéntico al usado para la determinación de los efectos agonistas, pero con la diferencia de que la sustancia para la que se va a evaluar la actividad antagonista se inyecta 5 minutos antes de inyección intravenosa de 1,25 mg/kg de Win-55.212 un agonista de receptores de cannabinoides conocido.

15 *Analgesia por placa caliente*

La analgesia por placa caliente se determina de acuerdo con el procedimiento descrito por Woolfe D. y col. "The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol)", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 80, 300-307, 1944. La respectiva descripción se incorpora en el presente documento por referencia y forma parte de la presente descripción.

Los ratones se ponen en una placa caliente (Harvard Analgesimeter) a $55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ hasta que muestran una sensación de dolor lamiéndose las patas o saltando, y se registra el tiempo para que se produzcan estas sensaciones. Esta lectura se considera que es el valor basal (B). El límite de tiempo máximo que se permite que los ratones permanezcan sobre la placa caliente en ausencia de cualquier respuesta de dolor es 40 segundos con el fin de evitar daño en la piel. Este periodo se llama el tiempo discriminante (TD).

Quince minutos después de administrar la sustancia que se va a ensayar, los ratones se ponen otra vez en la placa caliente y se repite el procedimiento descrito antes. Este periodo se llama la lectura postratamiento (PT).

30 El grado de analgesia se calcula con la fórmula:

$$\% \text{ de EMP de analgesia} = (\text{PT}-\text{B})/(\text{TD}-\text{B}) \times 100$$

35 EMP = efecto máximo posible

40 *Determinación de la sedación y ataxia*

La sedación y la ataxia se determinan de acuerdo con el procedimiento descrito por Desmet L. K. C. y col. "Anticonvulsive properties of Cinarizine and Flunarizine in Rats and Mice", *Arzneim. -Forsch. (Frug Res)* 25, 9, 1975. La respectiva descripción se incorpora en el presente documento por referencia y forma parte de la presente descripción.

45 El sistema de puntuación elegido es:

0: no hay ataxia;

1: dudoso;

50 2: calma y tranquilidad evidentes;

3: ataxia pronunciada;

55 tanto antes como después del tratamiento.

El porcentaje de sedación se determina de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ de sedación} = \text{media aritmética} / 3 \times 100$$

60

Hipotermia

65 La hipotermia se determina de acuerdo con el procedimiento descrito por David R. Compton y col. "In-vivo Characterization of a Specific Cannabinoid Receptor Antagonist (SR141716A) Inhibition of Tetrahydrocannabinol - induced Responses and Apparent Agonist Activity", *J. Pharmacol Exp Ther.* 277, 2, 586-594, 1996. La respectiva descripción se incorpora en el presente documento por referencia y forma parte de la presente descripción.

ES 2 328 328 B1

Los valores base de las temperaturas rectales se determinan con un termómetro (Yello Springs Instruments Co., Panlabs) y una sonda con termistor insertada 25 mm antes de administrar la sustancia que se va a ensayar. La temperatura rectal se mide otra vez 20 minutos después de la administración de la sustancia que se va a ensayar. Se calcula la diferencia de temperatura para cada animal, de modo que se considera que diferencias $\geq -2^{\circ}\text{C}$ representan actividad.

Catalepsia

La catalepsia se determina de acuerdo con el procedimiento descrito por Alpermann H. G. y col. "Pharmacological effects of Hoe 249: A new potential antidepressant", *Drugs Dev. Res.* 25, 267-282. 1992. La respectiva descripción se incorpora en el presente documento por referencia y forma parte de la presente descripción.

El efecto cataléptico de la sustancia que se va a ensayar se evalúa de acuerdo con la duración de la catalepsia, de modo que los animales se colocan cabeza abajo con sus patas sobre la parte superior del bloque de madera.

El sistema de puntuación elegido es:

Catalepsia para:

más de 60 segundos = 6; 50-60 segundos = 5, 40-50 segundos = 4, 30-40 segundos = 3, 20-30 segundos = 2, 5-10 segundos = 1, y menos de 5 segundos = 0.

El porcentaje de catalepsia se determina de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Catalepsia} = \text{media aritmética} / 6 \times 100$$

III. Ensayo *in vivo* para la actividad antiobesidad

a) Tratamiento agudo

Las ratas manipuladas normalmente se habitúan a un ciclo invertido de 12/12 h, y el compuesto de ensayo así como la solución salina se administran intensamente por vía oral. Después de la administración, se mide la ingestión de alimento acumulado (g) a las 6 h y 24 h. Después se mide la diferencia de peso corporal entre los animales control y los tratados con compuesto. Esto es una variación del ensayo de acuerdo con Colombo y col. como se describe a continuación.

b) Tratamiento a largo plazo

El ensayo *in vivo* de la actividad antiobesidad de los compuestos de pirazolina de la invención se lleva a cabo como se describe en la publicación de G. Colombo y col., "Appetite Suppression and Weight Loss after the Cannabinoid Antagonist SR 141716"; *Life Sciences*, 63 (8), 113-117, (1998). La parte respectiva de la descripción se incorpora en el presente documento por referencia y forma parte de la presente descripción.

IV. Ensayo *in vivo* de la actividad antidepresiva

El ensayo *in vivo* de la actividad antidepresiva de los compuestos de pirazolina de la invención en el ensayo de desesperación en agua se lleva a cabo como se describe en la publicación de E.T. Tzavara y col., "The CB1 receptor antagonist SR141716A selectively increases monoaminergic neurotransmission in the medial prefrontal cortex: implications for therapeutic actions"; *Br. J. Pharmacol.* 2003, 138(4):544:53. La parte respectiva de la descripción se incorpora en el presente documento por referencia y forma parte de la presente descripción.

V. Determinación del efecto de la administración continuada de los compuestos de la invención en el peso corporal en ratas

Se midió el peso de los animales durante 36 días, y los datos se agruparon en 3 periodos para el análisis: Periodo 1, días 1-8 (periodo para la adaptación de los animales a las condiciones ambientales: una semana sin tratamiento más el primer día de tratamiento); Periodo 2, días 9-22 (periodo de tratamiento: dos semanas); Periodo 3, días 23-36 (periodo de tratamiento de liberación: dos semanas). La administración de los fármacos empezó el día 8, inmediatamente después de pesar el animal y terminó el día 21. El periodo de tratamiento está entre un día después de la primera administración y un día después de la última administración. Los fármacos se administraron por vía i.p. una vez al día. Para propósitos comparativos, los pesos absolutos se transformaron en porcentajes relativos (cada peso se dividió por el del día 8 y se multiplicó por 100). Se construyeron tres grupos de tratamiento: vehículo, N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida racémica (10 mg/kg), y (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida (10 mg/kg).

VI. *Determinación in vitro del antagonismo al receptor CB1**Preparación de membrana*

- 5 Se cultivan células de ovario de hámster chino (CHO) que expresan establemente el receptor cannabinoide 1 (CB1) humano recombinante en mezcla nutritiva de Ham F12 complementada con suero bovino fetal inactivado térmicamente al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 50 U/ml, estreptomicina 50 U/ml y geneticina 0,5 mg/ml. Con el fin de obtener células, los matraces de cultivo se lavan dos veces con solución salina tamponada con fosfato y se raspan. Después, las células se recogen por centrifugación (200 x g, 10 min) y se almacenan en seco a -80°C. Las
10 células se homogeneizan en HEPES 20 mM helado, EDTA 10 mM (pH 7,5) y se centrifugan a 40.000 x g durante 15 min a 4°C. El sedimento de membrana se vuelve a suspender en HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM (pH 7,5) y se centrifuga durante 15 min a 4°C. El sedimento de membrana final se vuelve a suspender en HEPES 20 mM, EDTA 0,1 mM (pH 7,5) y se divide en partes alícuotas y se almacena a -80°C hasta su uso.

15 *Ensayo de unión a [³⁵S]GTPγS*

- La reacción se lleva a cabo en placas de 96 pocillos. Las membranas (15 µg proteína/pocillo) se incuban durante 60 min a 30°C en tampón (HEPES 50 mM, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM, albúmina de suero bovino al 0,1% p/vol, GDP 5 µM, saponina (10 µg/ml), [³⁵S]GTPγS 0,5 nM, pH 7,4) con compuesto a una concentración final de 1 µM en ausencia o presencia de agonista WIN 55.212-2 entre 3 nM y 3 µM. La incubación se termina por filtración rápida a través de fibra de vidrio FB Millipore Multiscreen, y se aclara dos veces con tampón de ensayo helado. Las placas de filtro se secan y se añaden 30 µl de líquido de centelleo. La radiactividad se determina usando un Wallac Microbeta Trilux. Cada experimento se lleva a cabo al menos por duplicado. Se lleva a cabo sistemáticamente un experimento de
25 respuesta-dosis de WIN 55.212-2 solo o en presencia de Rimonabant (1 µM).

Cálculos

- 30 Se resta la media de la unión basal de [³⁵S]GTPγS de todos los datos de unión. Con el fin de comparar los resultados de antagonismo de una campaña de cribado con otra, la diferencia entre el efecto agonista máximo de WIN 55.212-2 solo, y el efecto de antagonismo máximo debido a WIN 55.212-2 más Rimonabant (1 µM) se define como 100%.

35 *Procedimientos adicionales*

Ingestión de alcohol

- El siguiente protocolo se puede usar para evaluar los efectos de la ingestión de alcohol en ratas hembra que prefieren alcohol (P) (por ejemplo, criadas en la Universidad de Indiana) con una prolongada historia de consumo de alcohol. La siguiente referencia proporciona una descripción detallada de las ratas P: Lumeng, L, y col., "Different sensitivities to ethanol in alcohol-preferring and-nonpreferring rats", *Pharmacol, Biochem Behav.*, 16, 125-130 (1982).

- A ratas hembra se les da acceso durante 2 horas a alcohol (al 10% en v/v y agua, elección de 2 botellas) diariamente al inicio del ciclo de oscuridad. Las ratas se mantienen con un ciclo inverso para facilitar las interacciones con el experimentador. Los animales se asignan inicialmente a cuatro grupos equiparados para las ingestiones de alcohol: Grupo 1 - vehículo; Grupo 2 - control positivo (por ejemplo, 5,6 mg/kg de AM251); Grupo 3 - dosis baja de compuesto de ensayo; y Grupo 4 - dosis alta de compuesto de ensayo. Los compuestos de ensayo se mezclan en general en un vehículo de ciclodextrina en agua destilada al 30% (p/v) con un volumen de 1-2 ml/kg. Las inyecciones de vehículo
50 se dan a todos los grupos durante los dos primeros días del experimento. A esto le siguen 2 días de inyecciones de fármaco (a los grupos apropiados) y un día final de inyecciones de vehículo. Los días de inyección de fármaco, los fármacos se dan por vía s.c. 30 minutos antes de un periodo de acceso a alcohol de 2 horas. La ingestión de alcohol para todos los animales se mide durante el periodo de ensayo y se hace una comparación entre los animales tratados con fármaco y con vehículo para determinar los efectos de los compuestos en el comportamiento de beber alcohol.

- 55 Se pueden hacer estudios de bebida adicionales usando ratones hembra C57BI/6 (Charles River). Varios estudios han mostrado que esta cepa de ratones consumirá fácilmente alcohol con poca o sin manipulación (Middaugh y col., "Ethanol Consumption by C57BU6 Mice: Influence of Gender and Procedural Variables" *Alcohol*, 17 (3), 175-183, 1999; Le y col., "Alcohol Consumption by C57BL/6, BALA/c, and DBA/2 Mice in a Limited Access Paradigm" *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 47, 375-378, 1994).

- 60 Por ejemplo, tras llegar los ratones se alojan individualmente y se les da acceso ilimitado a comida para rata en polvo, agua y una solución de alcohol al 10% (p/v). Después de 2-3 semanas de acceso ilimitado, se restringe el agua durante 20 horas y se restringe el alcohol a sólo 2 horas de acceso diario. Esto se hace de forma que el periodo de
65 acceso eran las últimas 2 horas de la parte oscura del ciclo de luz.

Una vez que se ha estabilizado el comportamiento de beber, se puede empezar el ensayo. Los ratones se consideran estables cuando el consumo de alcohol medio durante 3 días es el 20% de la media para los 3 días. El día 1 de ensayo

consiste en que todos los ratones reciben inyección de vehículo (sc o ip). De 30 a 120 minutos después de la inyección se les da acceso a alcohol y agua. Se calcula el consumo de alcohol para este día (g/kg) y se asignan grupos, de modo que todos los grupos tienen ingestión de alcohol equívoca. El día 2 y 3, se inyecta a los ratones vehículo o fármaco y se sigue el mismo protocolo del día anterior. El día 4 es periodo de lavado y no se dan inyecciones. Los datos se analizan usando ANOVA con mediciones repetidas. El cambio en el consumo de agua o alcohol se vuelve a comparar con el vehículo para cada día del ensayo. Los resultados positivos se interpretan como un compuesto que puede reducir significativamente el consumo de alcohol, mientras que no tiene efecto en el agua.

10 *Procedimientos de consumo de oxígeno*

El consumo de oxígeno de cuerpo entero se mide usando un calorímetro indirecto (Oxymax de Columbus Instruments, Columbus, OH) en ratas Sprague Dawley macho (si se usa otra raza de rata o ratas hembras, se especificará). Las ratas (por ejemplo, 300-380 g de peso corporal) se ponen en cámaras del calorímetro y las cámaras se ponen en monitores de actividad. Estos estudios se hacen durante el ciclo de luz. Antes de medir el consumo de oxígeno, las ratas se alimentan con comida convencional a voluntad. Durante la medición del consumo de oxígeno, no hay alimento disponible. Se miden el consumo basal de oxígeno y la actividad ambulatoria de antes de la dosis cada 10 minutos durante 2,5 a 3 horas. Al final del periodo basal predosis se abren las cámaras y se administra una dosis única de compuesto a los animales (el intervalo de dosis habitual es de 0,001 a 10 mg/kg) por alimentación por sonda oral (u otra vía de administración cuando se especifique, es decir, sc, ip, iv). Los fármacos se preparan en metilcelulosa, agua u otro vehículo especificado (los ejemplos incluyen PEG400, beta-ciclodextrano al 30% y propilenglicol. El consumo de oxígeno y la actividad ambulatoria se miden cada 10 minutos durante 1-6 horas adicionales después de la dosis.

El software del calorímetro Oxymax calcula el consumo de oxígeno (ml/kg/h) basándose en el caudal del aire a través de las cámaras y la diferencia de contenido de oxígeno en los puertos de entrada y salida. Los monitores de actividad tienen 15 haces de luz infrarroja espaciados entre sí 2,54 cm en cada eje, y se registra actividad ambulatoria cuando se rompen dos haces consecutivos y los resultados se registran como recuentos.

El consumo de oxígeno en reposo, durante el periodo anterior y posterior a la dosis, se calcula haciendo la media de los valores del consumo de 10 min 02, excluyendo periodos de alta actividad ambulatoria (la actividad ambulatoria cuenta > 100) y excluyendo los 5 primeros valores del periodo anterior a la dosis y el primer valor del periodo después de la dosis. El cambio en el consumo de oxígeno se describe como porcentaje y se calcula dividiendo el consumo de oxígeno en reposo después de la dosis entre el consumo de oxígeno antes de la dosis * 100. Los experimentos se harán típicamente con n = 4-6 ratas y los resultados descritos son media +/- ETM.

35

Interpretación

Un aumento del consumo de oxígeno de >10% se considera un resultado positivo. Históricamente, las ratas tratadas con vehículo no tienen cambio en el consumo de oxígeno respecto al valor basal antes de la dosis.

40

Dependencia de la nicotina

Se puede usar un modelo de autoadministración de nicotina o modelo de preferencia de lugar para evaluar los efectos de un compuesto de ensayo en la dependencia de la nicotina (véase, p. ej., Vastola, y col. *Physiol. Behav.* 77:107-114, 2002; Brower, y col., *Brain Res.* 930:12-20, 2002).

50 *Preferencia de lugar*

En este estudio se usan ratas Sprague-Dawley (Vastola y col., 2002). Los animales se alojan con la temperatura controlada, ciclo de iluminación de 12/12 h con acceso a voluntad a alimento y agua. El condicionamiento y el ensayo se llevan a cabo en una cámara dividida en dos compartimentos con una puerta separando los dos compartimentos. El comportamiento de los animales se registra mediante una cámara de vídeo.

55

Los animales se habitúan al procedimiento de inyección durante varios días. Después los animales se ponen en la cámara de ensayo y se les da acceso libre a ambos compartimentos. Se determina la preferencia inicial por un compartimento particular. Para las pruebas de condicionamiento, se inyecta a los animales nicotina y se limitan al compartimento no preferido, o se inyecta a los animales solución salina y se limitan al compartimento preferido. El día de ensayo, se quita la puerta que separa los compartimentos, el animal se pone en el centro de la cámara y se deja que se muevan libremente entre los compartimentos. Se puntúa el tiempo que permanece en cada compartimento. La ocupación preferencial del compartimento de nicotina obedece a los efectos de refuerzo condicionados de la nicotina.

65

Autoadministración

La autoadministración en animales es un indicador del potencial de abuso de un compuesto en seres humanos. También se pueden usar modificaciones de este procedimiento para identificar compuestos para prevenir o bloquear las propiedades de refuerzo de drogas que tienen un potencial abuso. Un compuesto que suprime la autoadministración de una droga puede prevenir ese abuso de drogas o su dependencia.

En este estudio se usan ratas Sprague-Dawley. Inicialmente, los animales se alojan con temperatura controlada, ciclo de iluminación de 12 h/12 h y con acceso a voluntad al alimento y agua. Después se implantan en los animales catéteres en la yugular que salen por la espalda del animal, y cada animal se pone en una cámara de condicionamiento operante individual (Brower y col., 2002). Los catéteres se conectan a una bomba con jeringuilla dirigida por ordenador que está situada fuera de la cámara. La cámara contiene dos palancas con una luz verde situada encima de cada palanca. La luz está encendida cuando hay nicotina disponible.

En un ensayo de autoadministración, los animales se ponen en las cámaras de condicionamiento operante y las palancas se designan aleatoriamente como una palanca activa e inactiva. Cada respuesta en una palanca activa produce una infusión de nicotina. Las presiones en la palanca inactiva no tienen efecto, pero también se registran. Después se entrena a los animales para que se autoadministren nicotina en un periodo de tiempo fijado teniendo acceso a la droga durante cada sesión diaria. El encendido de la luz de la cámara de alojamiento indica el comienzo de la sesión y la disponibilidad de nicotina. Cuando la sesión termina, la luz del alojamiento se apaga. Inicialmente, se produce una infusión de nicotina con cada presión de la palanca activa. Una vez que se ha establecido el comportamiento de presionar la palanca, aumenta el número de presiones para producir una infusión de nicotina. Tras obtenerse la autoadministración estable de nicotina, se puede evaluar el efecto de un compuesto de ensayo en el comportamiento reforzado de nicotina. La administración de este compuesto de ensayo antes de la sesión puede potenciar, suprimir o no producir cambio en el comportamiento de autoadministración. Los ensayos se llevan a cabo cada dos días, y se controla el orden de administración de las dosis del compuesto de ensayo.

Experimentos de alzheimer/demencia

Tarea del laberinto acuático de Morris

El laberinto acuático de Morris es un ensayo conductual *in vivo* para medir el aprendizaje y memoria de la orientación espacial mediante una tarea de aprendizaje compleja. Es muy adecuada para ensayar compuestos que potencian el aprendizaje y la memoria. Una piscina o depósito de agua circular (2 m de diámetro, altura de 0,7 m) se llena con agua, y se pone una plataforma de 10 cm² 1-1,5 cm por debajo de la superficie del agua en un sitio definido dentro de la piscina. La plataforma de escape no es visible para un animal que está nadando en el depósito de agua. Para el experimento, se pone una rata o ratón en la piscina para que nade libremente.

Los animales tienen la tarea de localizar la plataforma sumergida, y se mide el tiempo y la distancia necesarios para la recuperación satisfactoria. Los muebles de la habitación, incluidos escritorios, equipo de ordenadores, un segundo depósito de agua, la presencia del experimentador y una radio en un estante que suena bajo proporcionan múltiples pistas extra-laberinto.

Antes de administrar el compuesto de ensayo, los animales normalmente se entrenan en la tarea 4 veces al día durante 5 días. Los compuestos de ensayo se administran por vía oral o intraperitoneal el día del experimento en un momento definido (por ejemplo, 30 minutos antes del primer ensayo de nadar). A los animales de control se les administra el vehículo correspondiente que no contiene compuesto de ensayo. Los compuestos activos dan tiempos y distancias más cortos para localizar la plataforma (es decir, cuanto mejor recuerda el animal la situación de la plataforma, menor es la distancia que cubre y llega más rápido a la plataforma).

El ensayo también se puede llevar a cabo usando animales transgénicos o con deterioro cognitivo. El deterioro cognitivo se induce por edad mayor o experimentalmente mediante lesiones cerebrales, tales como lesiones bilaterales de la corteza entorrinal en ratas. Dichas lesiones se pueden inducir con inyecciones intracerebrales de la excitotoxina ácido iboténico.

Tarea de reconocimiento de objetos

La tarea de reconocimiento de objetos se usa para evaluar los efectos de compuestos en el rendimiento cognitivo de roedores. Se pone una rata en un campo abierto, en el que se colocan dos objetos idénticos. Las ratas inspeccionan ambos objetos durante la prueba inicial del ensayo. Después de un determinado intervalo de retención (por ejemplo, 24 h), se lleva a cabo una segunda prueba. Aquí, se colocan en el campo abierto uno de los dos objetos usados en la primera prueba (el objeto "familiar") y un objeto nuevo, y se mide el tiempo de inspección a cada objeto. Una buena retención se refleja por tiempos de exploración mayores para el objeto nuevo comparado con el "familiar".

La administración del potenciador de la cognición putativo antes de la primera prueba, permite principalmente evaluar los efectos en los procesos de adquisición y de consolidación. La administración del compuesto de ensayo después

ES 2 328 328 B1

de la primera prueba permite evaluar los efectos en los procesos de consolidación, mientras que la administración antes de la segunda prueba permite medir los efectos en los procesos de recuperación.

5 *Tarea de evitación pasiva*

La tarea de evitación pasiva evalúa el rendimiento de la memoria en ratas y ratones. La evitación inhibitoria usa un aparato que consiste en una caja con dos compartimentos separados por una puerta de guillotina que puede hacer funcionar el experimentador. Un compartimento está iluminado con luz brillante, y el otro compartimento está oscuro. 10 Un umbral de 2 cm separa los dos compartimentos cuando se levanta la puerta de guillotina. Cuando se abre la puerta, la iluminación en el compartimento oscuro es aproximadamente 2 lux. La intensidad de la luz es aproximadamente 500 lux en el centro del suelo del compartimento iluminado.

Se dan dos sesiones de habituación, una sesión de choque, y una sesión de retención, separadas por intervalos 15 entre sesiones de 24 horas. Durante las sesiones de habituación y la sesión de retención, se deja que la rata explore el aparato durante 300 segundos. La rata se pone en el compartimento iluminado, de cara a la pared opuesta a la puerta de guillotina. Después de un periodo de acomodación de 15 segundos, la puerta de guillotina se abre de forma que se pueden visitar libremente todas las partes del aparato. Las ratas normalmente evitan las zonas iluminadas intensamente y entrarán en el compartimento oscuro en unos segundos.

En la sesión de choque, la puerta de guillotina entre los dos compartimentos se baja en cuanto la rata ha entrado 20 en el compartimento oscuro con todas las patas, y se administra durante 2 segundos un choque eléctrico de 1 mA. Después se saca la rata del aparato y se devuelve a su jaula de alojamiento. El procedimiento durante la sesión de retención es idéntico al de las sesiones de habituación.

El periodo de latencia a lo largo de las etapas, es decir, el primer periodo de latencia para entrar en el compartimento oscuro (en segundos) durante la sesión de retención es un índice del rendimiento de la memoria del animal: se supone una mejor retención si el periodo de latencia para entrar en el compartimento oscuro es más largo. Se da un compuesto de ensayo 30 minutos antes de la sesión de choque junto con escopolamina 1 mg/kg. La escopolamina deteriora el 25 rendimiento de la memoria durante la sesión de retención 24 horas más tarde. Si el compuesto de ensayo aumenta el periodo de latencia para entrar comparado con los controles tratados con escopolamina, se considera que tiene actividad potenciadora de la cognición.

35 *Tarea de alternancia espontánea en el laberinto en T*

La tarea de alternancia espontánea en el laberinto en T (TeMCAT) evalúa el rendimiento de la memoria espacial en ratones. El brazo de inicio y los dos brazos objetivo del laberinto en T están provistos de puertas de guillotina que puede manejar manualmente el experimentador. Se pone un ratón en el brazo de inicio al principio del entrenamiento. 40 En la primera prueba, se bloquea el brazo izquierdo o el derecho objetivos bajando la respectiva puerta de guillotina (prueba forzada).

Después de liberar al ratón en el brazo de inicio, explorará el laberinto, entrando finalmente en el brazo objetivo abierto, y vuelve a la posición inicial, donde será confinado durante 5 segundos, bajando la puerta de guillotina. 45 Después, el animal puede escoger libremente entre el brazo objetivo izquierdo y derecho (todas las puertas de guillotina están abiertas) durante 14 pruebas adicionales (pruebas de elección libre). En cuanto un ratón ha entrado en un brazo objetivo, se cierra el otro brazo. El ratón finalmente vuelve al brazo de inicio y está libre para visitar el brazo que quiera después de confinarlo en el brazo de inicio durante 5 segundos. Tras completarse las 14 pruebas de elección en una sesión, el animal se saca del laberinto.

Se calculan las alternancias en porcentaje de las 14 pruebas. Se analizan este porcentaje y el tiempo total necesario para completar la primera prueba forzada y las posteriores 14 pruebas de elección libre (en segundos). Además, se pueden inducir deficiencias cognitivas por inyección de escopolamina 30 minutos antes del inicio de la sesión de entrenamiento. Un potenciador de la cognición, administrado antes de la sesión de entrenamiento, antagonizará, al 55 menos parcialmente, la reducción inducida por la escopolamina de la tasa de alternancia espontánea.

Modelo de depresión

Se puede usar un modelo de natación forzada o de suspensión por la cola para evaluar la eficacia antidepressiva de los compuestos (véase, por ejemplo, Porsolt, y col., *Nature* 266:730-732, 1977; Stem, y col., *Psychopharmacology* 85:367-370, 1985).

65 *Ensayo de natación forzada*

Se ponen las ratas o ratones en un cilindro lleno con agua a 23-25°C del cual no se puede escapar. Inicialmente, los animales pelean e intentan escapar, pero finalmente adoptan una postura inmóvil característica y no hacen más

intentos de escapar, excepto pequeños movimientos necesarios para mantener su cabeza encima del agua. Se administra a los animales un compuesto y un observador mide la actividad (de natación o trepada) o inmovilidad. Algunos consideran que la inmovilidad refleja un “comportamiento de desesperación” en el que los animales dejan de pelear para escapar de la situación adversa. Una amplia variedad de antidepresivos usados en clínica (ATC, IMAO, ISRS, atípicos) disminuyen la inmovilidad en este ensayo y tienen una validez de predicción buena en cuanto que detectan antidepresivos con diferentes mecanismos de acción pero su validez conceptual es débil. Los fármacos antidepresivos selectivos farmacológicamente producen al menos dos tipos distintos de patrones de comportamiento activo. Los inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina aumentan el comportamiento de nadar, mientras que los fármacos que actúan principalmente en el aumento de los niveles extracelulares de norepinefrina o dopamina aumentan el comportamiento de trepar. Hay falsos positivos (psicoestimulantes) pero relativamente pocos falsos negativos (agonistas [beta]-adrenérgicos). El ensayo es sensible a los efectos relajantes musculares (benzodiazepinas) y sedantes (neurolépticos), que conducen a una inmovilidad mayor. Los falsos positivos y falsos negativos a menudo se pueden cribar midiendo si el compuesto produce estimulación locomotora sedación.

Ensayo de suspensión por la cola

Cuando se suspenden por la cola, los ratones inicialmente pelearán e intentarán escapar y después alternarán entre intentos de escapada activos e inmovilidad. En este ensayo, se administra a los animales un compuesto y un observador mide la inmovilidad durante 6 min. Porsolt describe el comportamiento inmóvil como un “comportamiento desesperado” en el que los animales dejan de pelear para escapar de la situación adversa. Una amplia variedad de antidepresivos usados en clínica (tricíclicos, IMAO, ISRS y atípicos) disminuyen la inmovilidad en este modelo. El ensayo tiene una validez de predicción buena para la actividad antidepresiva y funciona para la mayoría de las clases de antidepresivos, pero tiene algunos falsos positivos (psicoestimulantes). El ensayo es sensible a los efectos relajantes musculares (benzodiazepinas) y sedantes (neurolépticos), que conducen a una inmovilidad mayor. Los falsos positivos y falsos negativos a menudo se pueden cribar midiendo si el compuesto produce estimulación locomotora o sedación. Se han encontrado diferencias en las variedades en el ensayo de suspensión por la cola en los ratones. El ensayo de suspensión por la cola tiene alguna validez aparente, pero su validez conceptual es bastante débil.

Modelo de esquizofrenia

Se puede usar un modelo de inhibición prepulso para evaluar la eficacia de compuestos antipsicóticos (véase Swerdlow and Geyer, *Schizophrenia Bulletin* 24: 285-301, 1998).

Inhibición prepulso

La inhibición prepulso es el proceso por el cual un estímulo relativamente suave, el prepulso, suprime la respuesta a un estímulo fuerte que provoca sobresalto cuando el prepulso precede al estímulo de sobresalto durante un periodo breve (aproximadamente 10 a 500 milisegundos). La inhibición prepulso es un fenómeno entre especies (es decir, está presente en mamíferos que van desde ratones a seres humanos), pero está relativamente ausente entre los pacientes esquizofrénicos. Se cree que la deficiencia de la IPP (inhibición prepulso) en pacientes esquizofrénicos refleja la pérdida de activación sensoriomotora que puede conducir a la sobrecarga sensorial y fragmentación cognitiva. En este ensayo, se administran compuestos a los ratones o ratas y se ponen individualmente en un soporte sobre una plataforma de transducción para medir el sobresalto del cuerpo entero. El soporte se pone en una cámara de sobresaltos con ruido uniforme de fondo. Después de un breve periodo de habituación, se da a los animales múltiples pruebas de un estímulo prepulso auditivo débil, seguido de un fuerte estímulo auditivo de sobresalto. Se dan 4 tipos de pruebas: prepulso más sobresalto, prepulso solo, sobresalto solo, y sin estimulación. Se mide la IPP como la cantidad de inhibición del sobresalto después del prepulso y se expresa como el porcentaje del sobresalto básico. Como control, se toman medidas en las pruebas de estimulación y prepulso solas. La IPP se considera un ensayo con una buena predicción, con validez aparente y conceptual para la esquizofrenia. Se pueden ensayar antipsicóticos putativos solos para determinar si potencian la IPP. Alternativamente, se pueden cribar los antipsicóticos para determinar si bloquean diferentes agentes que alteran la IPP (apomorfina, d-anfetamina, PCP, ketamina, DOI). Finalmente, se pueden cribar ratones mutantes con o sin fármacos usando el procedimiento de la IPP.

Modelo de ansiedad

Se puede usar un modelo de laberinto elevado en cruz para evaluar la eficacia de los compuestos ansiolíticos (véase Pellow and File, *Pharm. Biochem. Behav.* 24, 525-529, 1986).

Laberinto elevado en cruz

El laberinto elevado en cruz se usa ampliamente como un paradigma de la ansiedad que examina el conflicto entre el impulso para explorar y la aversión a las alturas y los espacios abiertos de ratas o ratones. El laberinto es una cruz compuesta de dos brazos abiertos y dos cerrados que se eleva por encima del suelo. Se cree que la combinación de luz,

los brazos abiertos, y la altura produce respuestas de miedo o ansiedad incondicionados en ratones o ratas. El aparato de ensayo es un laberinto abierto en la parte superior construido de plástico opaco con brazos abiertos y cercados alternados. Para las ratas, cada brazo tiene 45-55 cm de longitud y 8-12 cm de ancho, con 35-45 cm de altura los laterales de los brazos cercados, la unión es de aproximadamente 10 x 10 cm, y el laberinto está elevado 45-55 cm por encima del suelo. El laberinto elevado en cruz para ratones consiste en dos brazos cerrados (15 x 6 x 30 cm) y dos brazos abiertos (1 x 6 x 30 cm) formando una cruz, con un centro cuadrangular (6 x 6 cm). El laberinto se pone 50 cm por encima del suelo. El ensayo se realiza en una habitación sin ruido ni distracciones. Los días de ensayo se administra a los animales fármaco o vehículo. Si es necesario un periodo de pretratamiento, los animales se devuelven a la jaula de alojamiento durante el periodo del pretratamiento; de lo contrario, los animales se ponen en una cámara de soporte de plástico transparente solos o con un compañero de jaula durante 1-10 minutos antes del tiempo de ensayo. Después las ratas se ponen en el centro del laberinto siempre orientadas en la misma dirección, sistemáticamente de cara a un brazo abierto o a un brazo cercado. El observador o los observadores registran durante 5-10 minutos, las entradas en cada brazo y el tiempo que pasan en cada brazo, o mediante una cinta de vídeo o un ordenador que recibe la entrada de una cámara de vídeo montada encima del laberinto. Para que cuente como entrada, las cuatro patas deben estar dentro del brazo. Si es necesario se registrarán mediciones adicionales de comportamientos relacionados con la ansiedad, es decir, tiempo pasado inmóvil, tiempo pasado en el centro, tiempo pasado acicalándose, y el número de empinamientos, posturas de estiramiento o heces producidas. Después de hacer los ensayos, los animales se devuelven a sus jaulas de alojamiento. Cuando los animales se ponen en el centro del laberinto, pasan la mayor parte del tiempo en los brazos cerrados, evitando los brazos abiertos. Los fármacos ansiolíticos, tales como las benzodiacepinas, aumentarán la cantidad de tiempo que los animales pasan en los brazos abiertos. El ensayo también es sensible a los fármacos ansiogénicos, lo cual da un mayor apoyo a su validez de predicción.

25 *Disfunción eréctil*

Los fármacos que afectan a la función eréctil se pueden ensayar midiendo el efecto en los aumentos provocados por la apomorfina en la presión intracavernosa en la rata despierta como describen Andersson, y col., (*J. Urol.* 161: 1707-17 [2, 1999]). Se implanta un extremo de un tubo de polietileno en el espacio cavernoso del pene de ratas Sprague-Dawley macho. Tras recuperarse de la cirugía, se registra la presión intracavernosa usando un transductor de presión conectado a un grabador de multicanales. Las erecciones son inducidas por administración de apomorfina (100-250 µg/kg s.c.) con o sin compuesto de ensayo, y se comparan los resultados para el grupo tratado y el grupo no tratado.

35 *Disfunción sexual femenina*

Los sistemas para ensayar los compuestos para el tratamiento de la disfunción sexual femenina incluyen modelos *in vitro* e *in situ* que usan preparaciones para el músculo liso vaginales o del clítoris, evaluación histológica y valoraciones del flujo sanguíneo vaginal. Los estudios *in vivo* de las respuestas sexuales se centran en los paradigmas conductuales que implican postura lordótica y receptividad, así como índices de motivación usando un procedimiento doble de andar por la cámara (véase, por ejemplo, Hale, y col., *Int. J. Impot. Res.* 15 Suppl 5: S75-79, 2003).

La presente invención se ilustra a continuación con ayuda de ejemplos. Estas ilustraciones se dan sólo a modo de ejemplo y no limitan el espíritu general de la presente invención.

Ejemplos

Abreviaturas

50	Eq.	Equivalente
	Proc.	Procedimiento
55	Disol. Crist.	Disolvente usado en el experimento de cristalización
	T Crist.	Temperatura a la que se lleva a cabo el experimento de cristalización
	1ª Crist.	primera cristalización
60	2ª Cris.	segunda cristalización
	t.a.	temperatura ambiente (≈ 20-25°C)

65

Descripción general

El ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico racémico se obtiene como se describe en las solicitudes de patente internacional WO 2005/077909 (ilustrado en el ejemplo 0) y WO 2005/077911. Las respectivas descripciones se incorporan en el presente documento por referencia y forman parte de la presente descripción.

La resolución del racemato de la N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida se puede llevar a cabo por procedimientos que conocen los expertos en la materia, por ejemplo, cromatografía en columna que conduce al Compuesto A como se describe a continuación. El racemato de la N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida se obtiene como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2005/077911. La respectiva descripción se incorpora en el presente documento por referencia y forma parte de la presente descripción.

Sin embargo, su producto intermedio el ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico racémico se puede separar fácilmente en los respectivos enantiómeros por reacción con una base quiral. El procedimiento para esta resolución se describe a continuación.

Resolución de los enantiómeros del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico

La resolución de los enantiómeros del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico se llevó a cabo por reacción con las siguientes bases quirales:

- Brucina
- Quinina
- (-)-Cinchonidina
- (+)-Cinchonina
- R-(+)-1-Feniletilamina
- Clorhidrato de (1R,2S)-(-)-Efedrina
- Clorhidrato de (1S,2R)-(+)-Efedrina

En cada caso las reacciones se llevaron a cabo con 0,5 y 1 equivalentes de base con respecto a 1 equivalente de compuesto ácido y usando los siguientes disolventes

- Etanol
- Acetona
- Acetonitrilo
- Dioxano
- Acetato de etilo
- Cloroformo

Los resultados se resumen en las siguientes tablas. Hay que entender que los experimentos de cristalización mencionados antes que no se reflejan en las siguientes tablas no dieron los cristales de las respectivas sales en las condiciones dadas.

Sin embargo, las condiciones adecuadas para la cristalización de estas sales las pueden determinar los expertos en la materia mediante experimentos rutinarios.

ES 2 328 328 B1

En las siguientes tablas

Ácido representa el ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico racémico

5 R-ácido representa el respectivo derivado del ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico

10 S-ácido representa el respectivo derivado del ácido (S)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico

Procedimientos de cristalización

15 Procedimiento A: Se añadió una solución de la base quirál en la parte superior de una solución del ácido racémico a temperatura ambiente.

20 Procedimiento C: Se añadió una solución del ácido racémico en la parte superior de una solución de la base quirál. La mezcla se calentó a reflujo y se añadió disolvente hasta que se completó la disolución. La solución se dejó cristalizar a t.a.

Procedimiento D: La base quirál se añadió directamente en la parte superior de una solución del ácido racémico a temperatura ambiente.

25 Procedimiento E: La base quirál se añadió directamente a la parte superior de una solución del ácido racémico a temperatura de reflujo.

Procedimiento F: La solución de la sal se evaporó a sequedad. El residuo se disolvió en una cantidad mínima del disolvente calentando a temperatura de reflujo. La solución se dejó cristalizar a t.a.

30

Resolución con Brucina

35

40

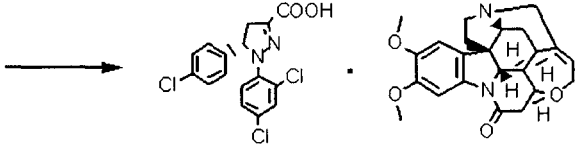
45

50

55

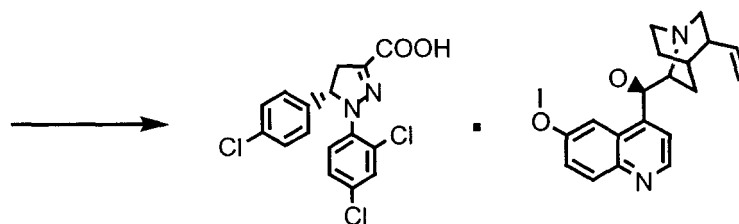
60

65

Brucina									
									
Ácido g (mmol)	Eq. brucina	Proc.	Disolvente para cristalización	T Crist.	Rend. 1ª Crist. %	% S-Ácido	% R-Ácido	Rend. 2ª Crist. %	% S-Ácido
0,4 g (1,09 mmol)	0,5	A	8 ml acetona	t.a.	44,6	98,8	1,2	5,6%	99,4
0,4 g (1,09 mmol)	0,5	A	11,5 ml acetonitrilo	t.a.	50,7	47,5	52,4		
0,4 g (1,09 mmol)	1	A	17 ml acetonitrilo	t.a.	25,6	45,7	54,3		

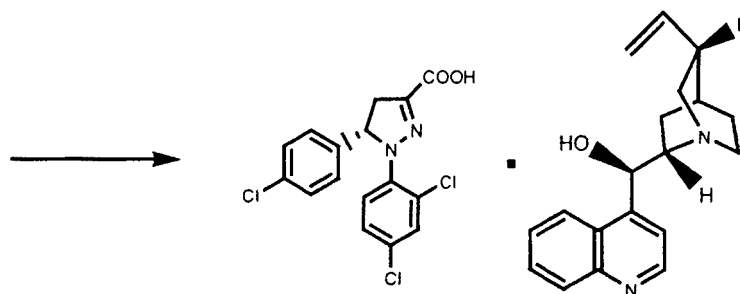
ES 2 328 328 B1

Resolución con quinina



Ácido g (mmol)	Eq. amina	Proc.	Disolvente para cristalización	T Crist.	Rend. 1ª Crist. %	% S-Ácido	% R-Ácido
0,4 g (1,09 mmol)	1	A	8 ml dioxano	t.a.	49,46	91,6	8,3
0,4 g (1,09 mmol)	1	F	15 ml acetonitrilo	t.a.	26	94,4	5,5
0,4 g (1,09 mmol)	1	F	2 ml acetato de etilo	t.a.	25	96,7	3,3
0,4 g (1,09 mmol)	0,5	A	4 ml dioxano	t.a.	38,5	97,5	2,5

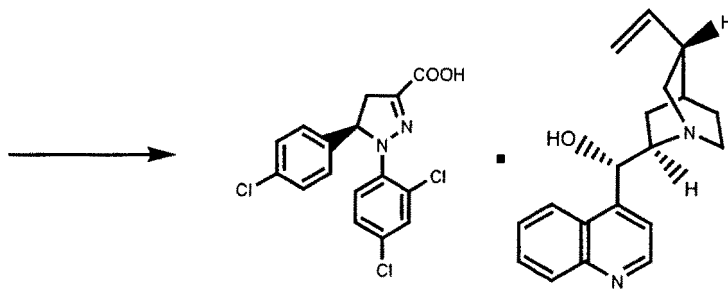
Resolución con (-)-Cinchonidina



Ácido g (mmol)	Eq. amina	Proc.	Disolvente para cristalización	T Crist.	Rend. 1ª Crist. %	% S-Ácido	% R-Ácido
0,4 g (1,09 mmol)	1	F	2 ml dioxano	t.a.	31	94,4	5,6
0,4 g (1,09 mmol)	1	F	19 ml Acetato de etilo	t.a.	28,5	95,8	4,2
0,4 g (1,09 mmol)	1	F	20 ml acetona	t.a.	19,6	96,9	3,1
0,4 g (1,09 mmol)	1	F	24 ml acetonitrilo	t.a.	42	85,8	14,1

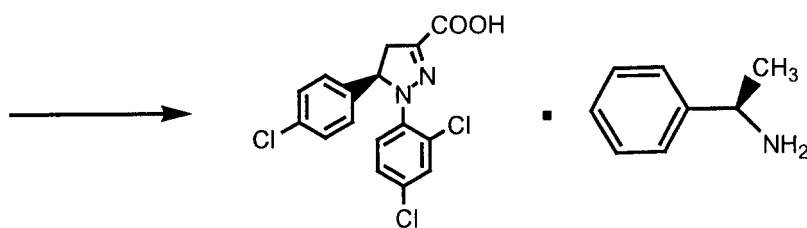
ES 2 328 328 B1

Resolución con (+)-Cinchonina



Ácido	Eq. amina	Proc.	Disolvente para cristalización	T. Crist.	Rend. 1ª Crist. %	% S-Ácido	% R-Ácido
0,4 (1,09 mmol)	1	C	50 ml acetona	t.a.	32,8	7,42	92,57
0,4 (1,09 mmol)	0,5	F	30 ml acetona	t.a.	23,5	4,0	95,9
0,4 (1,09 mmol)	0,5	C	50 ml acetonitrilo	t.a.	31,5	3,07	96,92
0,4 (1,09 mmol)	1	C	50 ml acetonitrilo	t.a.	78,25	39,01	60,98
0,4 (1,09 mmol)	0,5	C	15 ml acetato de etilo	t.a.	14,9	3,62	96,37
0,4 (1,09 mmol)	1	C	27 ml acetato de etilo	t.a.	35	7,78	92,21
0,4 (1,09 mmol)	1	F	4 ml dioxano	t.a.	21	33,5	66,4

Resolución con R-(+)-1-Feniletilamina



Ácido	Eq. amina	Proc.	Disolvente para cristalización	T. Crist.	Rend. 1ª Crist. %	% S-Ácido	% R-Ácido
0,4 (1,09 mmol)	1	D	1,6 ml etanol	t.a.	22	51,4	48,6
0,4 (1,09 mmol)	0,5	E	6 ml acetonitrilo	t.a.	11	8,1	91,9
0,4 (1,09 mmol)	1	E	6 ml acetonitrilo	t.a.	50	36,8	63,2
0,4 (1,09 mmol)	1	E	6 ml dioxano	25°C	5	4,6	95,3

Descripción detallada**Ejemplo 1**

5 (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida (Compuesto A)

Resolución del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico con (+)-Cinchonina

Se añadieron 35 g (294,68 mmol) del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico racémico en 630 ml de acetonitrilo a una suspensión de 16,39 g (47,34 mmol) de (+)-Cinchonina en 920 ml de acetonitrilo con agitación vigorosa. La suspensión resultante se calentó a reflujo y se añadió acetonitrilo (1300 ml) hasta que la disolución fue completa. La solución resultante se dejó cristalizar a temperatura ambiente durante el fin de semana, después de lo cual se obtuvo un sólido cristalino. El sólido cristalino se filtró, se lavó con 50 ml de acetonitrilo frío y se secó para dar 25,26 g de un sólido blanco (ee $\approx$ 91-92%). No se pudo obtener una segunda fracción de cristales de los líquidos madre, ni tras enfriar en el frigorífico ni tras concentración. Por lo tanto, la recrystalización de la sal diastereoisómera se llevó a cabo en disolventes diferentes con el fin de mejorar el exceso enantiomérico:

Disolvente	Rendimiento	Relación de enantiómeros % (R) / % (S)
Acetonitrilo	90%	99,6 / 0,4
EtOH-H ₂ O	68,5%	99,3 / 0,7
Isopropanol	55%	98,9 / 1,1

Por consiguiente, el producto se recrystalizó en acetonitrilo para dar 22,6 g de cristales (rendimiento de 72% en moles respecto a la base quiral). La relación de enantiómeros determinada por electroforesis capilar era:

35 99,7% de ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico - (+)-Cinchonina

0,3% de ácido (S)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico - (+)-Cinchonina ee = 99,4%.

40 *Preparación del ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico a partir del compuesto de adición ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico-(+)-Cinchonina*

Se suspendieron 22,59 g (34 mmol) de la sal diastereoisómera, que se recrystalizó en acetonitrilo, en 200 ml de HCl 6 N y se agitó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, se añadieron 200 ml de tolueno hasta que la disolución fue completa. La mezcla se agitó durante 30 minutos y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con tolueno, las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron a sequedad, después de lo cual se obtuvieron 11,9 g (95%) de un sólido blanco microcristalino (punto de fusión 129-133).

50 Exceso enantiomérico determinado por electroforesis capilar: ee = 99,2%.

Pureza química determinada por HPLC: 99,3%.

55 $[\alpha]_D$ (c=1,23°C, MeOH) = -429.

60 *Aislamiento del enantiómero ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico a partir de los líquidos madre obtenidas de la cristalización del enantiómero ácido (S)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico con Brucina*

El residuo obtenido en la evaporación de los líquidos madre obtenidas de la cristalización del ácido (S)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico con Brucina (véase a continuación) se trató con HCl 6 N como se ha descrito antes para obtener el ácido libre. Después de evaporar la fase orgánica se añadieron 21,86 g de una mezcla con una composición teórica de 20 mmoles de ácido (S)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico y 39,9 mmoles de ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico. Se añadió una suspensión de 13,82 g (39,9 mmoles) de (+)-cinchonina en 1000 ml de acetonitrilo y la mezcla se calentó a reflujo. Se añadió más acetonitrilo hasta que la disolución fue completa (volumen total de

ES 2 328 328 B1

acetonitrilo 4000 ml). Después la mezcla se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente para obtener cristales. Después de unas horas se obtuvo un sólido blanco, que se filtró y se secó para dar 22,42 (rendimiento 84,5% respecto a la sal del ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico).

5 El exceso enantiomérico determinado por electroforesis capilar era $ee = 92\%$.

La pureza de la sal aislada era comparable a la de la sal obtenida directamente de la resolución del racemato. Por consiguiente, se podía aplicar el mismo procedimiento de purificación descrito antes.

10 *Resolución del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico racémico con Brucina*

Preparación de la sal diastereoisómera con Brucina

15 A temperatura ambiente se disolvieron 15,74 g (39,9 mmol) de Brucina en 475 ml de acetona con agitación vigorosa. Se añadió una solución de 29,5 g (79,8 mmol) del ácido 5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico racémico en 85 ml de acetona. La mezcla resultante se dejó cristalizar durante un par de días, después de lo cual se obtuvo un sólido cristalino. El sólido cristalino se filtró, se lavó con acetona fría y se secó para dar 13,66 g (45% en moles respecto a la base) de un sólido de color beige.

20 La relación de enantiómeros determinada por electroforesis capilar era:

99% de ácido (S)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico-Brucina.

25 1% de ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico-Brucina.

Exceso enantiomérico $ee = 98\%$.

30 Los líquidos madres filtradas se dejaron en el frigorífico y dieron una segunda fracción de cristales, que se filtraron y secaron para dar otros 1,56 g (5,1% en moles respecto a la base).

El análisis de la 2ª fracción por electroforesis capilar dio

35 99,3% de ácido (S)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico-Brucina.

0,7% de ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico-Brucina.

Exceso enantiomérico $ee = 98,6\%$.

40 Rendimiento total:

15,22 g (50,1% en moles respecto a la base) de la sal con $ee = 98\%$.

45 *Determinación de la quiralidad de la sal de Brucina por cristalografía de rayos X*

La quiralidad del enantiómero que cristalizó con Brucina ($ee = 98\%$) se determinó por cristalografía de rayos X y corresponde al enantiómero S. Por consiguiente, el otro enantiómero que cristalizó con la (+)-cinchonina es el correspondiente enantiómero R.

50

Preparación de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida (Compuesto A)

55 Se disolvieron 9,94 g (26,89 mmol) de ácido (R)-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-pirazol-3-carboxílico en 95 ml de tolueno, seguido de la adición de 2,35 ml (32,3 mmoles) de cloruro de tionilo y 4 gotas de DMF. La mezcla se calentó en atmósfera de nitrógeno anhidra a una temperatura de 75-80°C con agitación vigorosa durante 2 horas y después se dejó enfriar a temperatura ambiente. Dicha solución de cloruro de ácido después se añadió gota a gota a una solución de 3,47 ml (31,2 mmol) de N-aminopiperidina, 15 ml (107,6 mmol) de trietilamina y 38 ml de tolueno anhidro, que se enfrió a 0-5°C, manteniendo así la temperatura por debajo de 10°C durante la adición. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche, después de lo cual se obtuvo una suspensión. Se añadieron agua y tolueno a dicha suspensión hasta que la disolución fue completa y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con tolueno, las fases orgánicas combinadas se lavaron con solución de NaOH (al 10%) y agua, se secaron sobre sulfato sódico, se filtraron y evaporaron a sequedad para dar 13,41 g de aceite amarillo claro, que no cristalizó. El aceite se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (eluyente: éter de petróleo:acetato de etilo 90:10 a 60:40) para dar 10,5 g (83,5%) de (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida en forma de un sólido amorfo de color amarillo claro (punto de fusión 75-78°C).

ES 2 328 328 B1

RMN ¹H(DMSO-d₆) δ ppm: 9,25 (s, 1H), 7,5 (d, J=8,8 Hz, 1H), 7,4 (d, J=2,3 Hz, 1H), 7,3-7,25 (2d, J=8,8 y 8,5 Hz, 3H), 7,1 (d, J=8,5 Hz, 2H), 5,8 (dd, J=5,7 y 11,8 Hz, 1H), 3,65 (dd, J=11,8 y 18,1 Hz, 1H), 3,0 (dd, J=5,7 y 18,1 Hz, 1H), 2,75 (m, 4H), 1,5 (m, 4H), 1,2 (m, 2H).

Análisis del enantiómero por HPLC quirál: ee = 100%.

Pureza química determinada por HPLC: 98,5%.

[α]_D (c=1, 23°C, MeOH) = -293,5.

Ejemplo 2

Polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida

El polimorfo α se obtuvo de la siguiente forma:

Una solución del compuesto de acuerdo con el ejemplo 1 (Compuesto A/(R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida) en 300 ml de éter de diisopropilo se agitó a 450 rpm y se calentó con un reflujo suave (68°C) en atmósfera de nitrógeno. A la mezcla resultante se añadieron ... ml de éter de diisopropilo gota a gota (2 horas) para disolver el sólido, y la solución mezcla resultante se enfrió a 20°C en 90 minutos. Precipitó un sólido blanco al enfriar. La suspensión se dejó 3 horas a 20°C con agitación suave (200 rpm), se enfrió a 0°C en 2 horas y se dejó durante toda la noche a esa temperatura. Los cristales formados se filtraron para dar un sólido blanco (... g, ...% de rendimiento) que corresponde a la fase cristalina del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida.

Ejemplo 2a

Estructura cristalina del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida

Los cristales del polimorfo α (*modificación α*) se hacen crecer en forma de agujas que están parcialmente emparejadas. Se hizo una determinación de la estructura del monocristal por rayos X de un cristal. La *modificación α* cristaliza en una celda monoclinica. En la tabla 1 se da un resumen de las constantes de la celda:

TABLA 1

Constantes de la celda de la modificación α a 100 K

	Dimensiones de la celda unitaria	
Monoclínico $P2_1$	$a = 13,6460(13) \text{ \AA}$	$\alpha = 90^\circ$
Volumen: $2158,8(4) \text{ \AA}^3$	$b = 11,6896(12) \text{ \AA}$	$\beta = 104,519(2)^\circ$
Densidad: $1,390 \text{ mg/m}^3$	$c = 13,9800(14) \text{ \AA}$	$\gamma = 90^\circ$

Ejemplo 2b

Análisis de DSC del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida

El análisis de DSC del polimorfo α presenta un máximo de fusión agudo con un inicio a $118 \pm 2^\circ\text{C}$ y una entalpía de $-58 \pm 1,4 \text{ J/g}$. La Tabla 3 muestra datos de muestras diferentes del polimorfo α.

TABLA 3

Máximo de fusión de diferentes muestras de modificación α

Referencia	Inicio	máximo	ΔH_f
Muestra 1	116,8°C	121,0°C	-58,9 J/g
Muestra 2	115,0°C	119,2°C	-57,5 J/g
Muestra 3	117,6°C	122,5°C	-57,5 J/g
Muestra 4	118,1°C	125,8°C	-55,4 J/g
Muestra 5	116,9°C	123,2°C	-58,3 J/g
Muestra 6	117,7°C	122,8°C	-57,9 J/g
Muestra 7	116,2°C	119,5°C	-56,3 J/g
Muestra 8	119,8°C	128,9°C	-59,7 J/g
Muestra 9	120,6°C	127,5°C	-58,8 J/g
Muestra 10	119,6°C	127,2°C	-59,6 J/g

Ejemplo 2c

Análisis de TG del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida

En el análisis de TG la pérdida de peso del polimorfo α debido a la descomposición de la muestra se observa a temperaturas superiores a 280°C, y no se observa pérdida de peso a temperaturas inferiores a 280°C.

Ejemplo 2d

Espectro de FTIR del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida

El espectro de FTIR del polimorfo α presenta picos intensos a 3324, 3208, 1655, 1534, 1472, 1240, 1084 y 814 cm^{-1} . Los picos a 3324 y 1534 cm^{-1} son característicos.

Ejemplo 2e

Espectro FTRaman del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida

El espectro FTRaman del polimorfo α muestra bandas intensas o características a 3326, 1654, 1531, 1560, 1392, 1247, 1094, 783 y 661 cm^{-1} y desplazamientos Raman a aproximadamente 3326, 1654 y 1531 cm^{-1} que son característicos.

Ejemplo 2f

Patrón de difracción de rayos X de polvo del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida

(Véase la Figura 7)

*Datos farmacológicos**A) Datos in vitro*

5 La unión de los compuestos de pirazolina de fórmula general I a los receptores CB1 se determinó como se describe en la sección de procedimientos farmacológicos, parte I.

10 El compuesto de pirazolina A muestra una alta afinidad por el receptor CB1 (tabla 4 para 2 experimentos diferentes en ratas).

TABLA 4

15	Compuesto según el ejemplo	CI₅₀ [nM]	pCI₅₀
	1 (Compuesto A)	16,1	
20	1 (Compuesto A)	22	7,66 ± 0,08

25 El antagonismo del compuesto A para el receptor CB1 se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito en los procedimientos farmacológicos, parte VI (tabla 5).

TABLA 5

30	Compuesto según el ejemplo	Antagonismo [%]
35	1 (Compuesto A)	106

B) Datos in vivo

40

Efecto de la administración continuada del compuesto A en el peso corporal en ratas

El efecto de la administración continuada del compuesto A en el peso corporal en ratas se determinó como se describe en la sección de procedimientos farmacológicos, parte V.

45

El número de animales era 10 para el grupo de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida (Compuesto A) y 9 para el grupo de la N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida racémica (Compuesto X) y para el grupo de vehículo. En el grupo de vehículo murió un animal mientras que en el grupo del racémico se excluyó un animal porque su peso disminuyó durante 5 días en el periodo de postratamiento. Todos los resultados se expresan como media ± ETM.

50

La dependencia del peso corporal (expresado como un porcentaje respecto al día 8) con el tiempo (número de días después de la inclusión en el estudio) y el tratamiento se evaluaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (tiempo, tratamiento) con mediciones repetidas en el factor tiempo. El análisis se llevó a cabo en los periodos 2 y 3, por separado, y considerando la primera o segunda semana en cada periodo. Se analizaron las diferencias entre pares de curvas (tratamientos) usando los contrastes adecuados con la prueba ANOVA. También se consideró la posible interacción entre tiempo y el tratamiento incluyendo la corrección de Greenhouse-Geisser (G-G). Un valor de $P < 0,05$ se consideró significativo.

55

La Figura 1 muestra el efecto de la administración continuada (i.p. una vez al día) de la N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida racémica (*Cpto. X*), (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida (*Cpto. A*) y vehículo (*Vehículo*) en el peso corporal de las ratas. El compuesto (R) de acuerdo con el ejemplo 1 muestra una acción más fuerte que el racemato, así como una recuperación del peso más lenta.

60

65

Estudios in vivo adicionales

En una serie de experimentos adicionales se ensayaron los efectos del compuesto A ((R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida) en la ingestión de alimento, peso corporal, adiposidad, dislipidemia y resistencia a la insulina en ratas que se han hecho obesas por el consumo excesivo de alimentos muy sabrosos.

Animales

El experimento se llevó a cabo en ratas Wistar hembras (inicialmente en el intervalo de peso de 250-300 g). Las ratas se alojaron por parejas en jaulas de polipropileno con suelos sólidos y lecho de serrín a una temperatura de $21\pm4^{\circ}\text{C}$ y humedad de $55\pm20\%$. Los animales se mantuvieron en un ciclo de fase inversa de luz-oscuridad (las luces se apagan durante 8 h de 9,30-17,30) y durante este tiempo la habitación se iluminaba con luz roja. Los animales tenían acceso libre a una dieta en polvo con alto contenido de grasa (VRF1 más manteca de cerdo al 20%), chocolate molido, cacahuets molidos y agua corriente en todo momento. Las tres dietas diferentes estaban en tres recipientes de alimentación de vidrio separados con tapas de aluminio con un agujero de 3-4 cm cortado en las mismas para permitir el acceso a la comida. Los animales se alojaron en parejas durante 12 semanas para inducir la obesidad. Después los animales se alojaron solos en jaulas de polipropileno con suelos de rejilla de alambre para permitir registrar la ingestión de alimento de cada rata. Se pusieron bandejas de polipropileno con almohadillas de jaula debajo de cada jaula para detectar cualquier vertido de alimento. Se acostumbró a los animales a estas condiciones nuevas (alojamiento individual, y las jaulas con suelo de rejilla de alambre) durante al menos 14 días antes de empezar con las lecturas de los valores base.

Procedimientos experimentales para el estudio de alimentación

Aproximadamente una semana antes de empezar el estudio, los animales se pesaron (con precisión de 0,1 g usando una balanza de platillo superior electrónica) y se repartieron en 3 grupos de tratamiento con pesos igualados, que contenía cada uno 9-10 animales. Después de un periodo de prueba de valores base de 7 días, a los animales se les administró por la vía adecuada (por ejemplo vía oral) una vez al día vehículo (hidroxipropilmetil-celulosa [HPMC] al 0,5%; 1 ml/kg) o el fármaco de ensayo, es decir Compuesto (Cpto.) A (10 y 30 mg/kg po) una vez al día durante 28 días.

Se midieron la ingestión de alimento y el peso corporal una vez al día. Las variaciones de peso corporal y los niveles de energía de los diferentes tipos de alimento se tuvieron en cuenta expresando la ingestión de alimento en términos de kJ/kg de peso de rata.

Las comparaciones estadísticas entre los pesos corporales y las ingestiones de alimento diarias de los diferentes grupos de tratamiento se han hecho por análisis de covarianza seguido del ensayo de Dunnett para comparar cada grupo de tratamiento con los controles tratados con vehículo. Para los datos de peso corporal (pesos corporales diarios), se usaron los pesos de los animales el día 1 (es decir, inmediatamente antes del primer tratamiento con fármaco) como covariante. Así, se ajustaron las medias para las diferencias de los pesos corporales entre los grupos el día 1, y los errores típicos de la media (ETM) se calcularon a partir de los residuos del modelo estadístico. Todos los valores de peso corporal medio el día 1 son iguales (y por lo tanto el ETM es cero) porque el análisis de covarianza los ajusta todos para igualar la “media general” de los valores de ese día.

Determinación del contenido de grasa en los cadáveres de los animales

La grasa extraíble en éter de las muestras liofilizadas se calculó por el principio de Soxhlet usando un sistema Foss Soxtec HT2. El protocolo usado se basó en las recomendaciones del fabricante para muestras de carne, aunque las muestras liofilizadas ahorran la necesidad de una etapa de hidrólisis de la grasa o mezcla de la muestra con arena para asegurar una extracción eficaz.

Se pesaron con precisión muestras de aproximadamente 1 g en dedales de extracción de celulosa de 26 mm x 60 mm que después se taponaron con aproximadamente 0,8 g de algodón hidrófilo. La grasa de la muestra se extrajo en copas de extracción metálicas convencionales previamente pesadas (incluyendo unas perlas de ebullición) usando 70 ml de éter de petróleo a 40-60°C, un distribuidor de temperatura de 115°C y un caudal de enfriamiento de 2 l/min. Se usó una etapa de ebullición de 25 min, seguido de una etapa de lavado de 40 min. Una etapa de secado de 10 min era suficiente para eliminar el éter de las copas de extracción.

El porcentaje de grasa en la muestra liofilizada se calculó como sigue:

$$\% \text{ de grasa} = [100 \times (\text{peso final de la copa} - \text{peso inicial de la copa})] / \text{peso de la muestra}$$

ES 2 328 328 B1

El porcentaje de grasa en la muestra original se calculó usando el % de agua como sigue:

$$\% \text{ de grasa en la muestra original} = \% \text{ de grasa} \times [(100 - \% \text{ de agua})/100]$$

5

Análisis del plasma

Se tomaron muestras de sangre terminal por punción cardiaca de los animales inmediatamente después de la muerte en tubos con heparina de litio de 4,5 ml Sarstedt (Cat. n° 32.331). Después los tubos se centrifugaron a 1.500 g durante 10 5 minutos a 4°C y se separó el plasma y se congeló inmediatamente en hielo seco (3 partes alícuotas por muestra en tubos Eppendorf cerrados). Las muestras de plasma se almacenaron a -75°C hasta que fueron necesarias para el análisis. Todas las determinaciones se realizaron en muestras de plasma que se habían descongelado sólo una vez.

15 *Ensayo de leptina*

La concentración de leptina en el plasma se determinó usando el kit de ensayo inmunométrico de enzima leptina de rata de Assay Designs (Cat. n° 900-015) de acuerdo con el protocolo habitual del fabricante. Las muestras desconocidas se diluyeron 100 veces usando el tampón de ensayo de leptina antes de ensayar por duplicado. Se determinó la 20 densidad óptica a 450 nm usando un lector de microplaca ajustable VERSAmax de Molecular Devices y las lecturas se transfirieron a GraphPad Prism. Se ajustó una curva polinómica de segundo orden a los datos de calibración y los valores desconocidos se extrapolaron a partir de este ajuste de la curva.

25 *Ensayo de insulina*

La concentración de insulina en el plasma se determinó usando kits de ELISA para insulina de rata ultrasensibles Mercodia de acuerdo con el protocolo del fabricante para muestras de 50 µl. Las muestras desconocidas se diluyeron 20 veces usando el patrón cero antes de ensayar por duplicado. La densidad óptica a 450 nm se determinó usando un 30 lector de microplaca ajustable VERSAmax de Molecular Devices y las lecturas se transfirieron a GraphPad Prism. Se ajustó una curva de spline cúbico a los datos de calibración y los valores desconocidos se extrapolaron a partir de este ajuste de la curva.

35 *Resultados*

Efectos crónicos del Compuesto A ((R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida) (10 y 30 mg/kg po) en el consumo de fuentes macronutrientes individuales

40 En las ratas que se habían convertido en obesas después de un consumo excesivo de una dieta de “cafetería” sabrosa que consistía en comida con alto contenido en grasa, chocolate con leche molido y cacahuets tostados salados molidos, la administración oral repetida del Compuesto A comparado con el grupo de control tratado con vehículo dio como resultado que la ingestión de alimento sabroso se reducía significativamente en las dosis tanto de 10 como de 30 mg/kg el primer día de la administración del fármaco, y la ingestión de alimento diaria permaneció significativamente 45 inferior que en el grupo de control los días 2 a 7 con la dosis más baja y los días 2 a 10 y día 15 para la dosis más alta (Figura 2).

Los resultados en la Figura 2 son las medias (ajustadas para las diferencias entre las ingestiones de alimento de los diferentes grupos de tratamiento en los valores base (media de los días -6 a 0)) ± ETM (calculado a partir de 50 los residuos del modelo estadístico), n = 9-10. Las comparaciones múltiples frente al grupo de control tratado con vehículo se hicieron con el ensayo de Dunnett. Las diferencias significativas con el grupo de control se indican con *p<0,05 (los niveles p sólo se han dado en un nivel para mayor claridad).

55 *Efectos crónicos del Compuesto A ((R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida) (10 y 30 mg/kg po) en los pesos corporales de ratas obesas con acceso a alimentos macronutrientes muy sabrosos*

Los pesos corporales del grupo de control tratado con vehículo aumentaron lentamente a lo largo del estudio 60 (Figura 3).

La administración crónica de Compuesto A (10 y 30 mg/kg po) produjo disminuciones del peso corporal relacionadas con la dosis (Figura 3). Los pesos corporales de los animales a los que se les dio cualquiera de las dosis del Compuesto A eran significativamente menores que los del grupo de control el día 2 (es decir, 24 h después de la 65 primera dosis de fármaco) y cualquier otro día del periodo de tratamiento con fármaco (Figura 3). Así, al final del periodo de 28 días de tratamiento con fármaco, los pesos corporales de las ratas Wistar hembra, con obesidad inducida por la dieta a las que se les dio el Compuesto A (10 y 30 mg/kg po) eran 12,0% y 19,0% menores, respectivamente, que los de los controles tratados con vehículo (Figura 3).

Los resultados mostrados en la Figura 3 son las medias (ajustadas para las diferencias entre los pesos corporales de los diferentes grupos de tratamiento en el valor base (día 1)) $\pm$ ETM (calculado a partir de los residuos del modelo estadístico), $n = 9-10$. Los números representan el % de reducción comparado con el grupo de control el día 29 (es decir, después de 28 días de tratamiento). Las comparaciones múltiples frente al grupo de control tratado con vehículo se hicieron con el ensayo de Dunnett. Las diferencias significativas con el grupo de control se indican con $*p < 0,05$ (los niveles p sólo se han dado en un nivel para mayor claridad).

Efectos crónicos del Compuesto A ((R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida) (10 y 30 mg/kg po) en la adiposidad de ratas obesas con acceso a alimentos macronutrientes muy sabrosos

Los efectos de la administración crónica oral del Compuesto A para 28 días en la composición corporal respecto a la grasa se muestran en la Figura 4 (expresada como g por rata).

La administración repetida con el compuesto A (10 y 30 mg/kg po) produjo una disminución grande de la grasa corporal de 42,8 g y 67,8 g respectivamente, comparado con el grupo de control tratado con vehículo (Figura 4). Los resultados en la Figura 4 se expresan como medias del grupo de tratamiento ($n = 9-10$ y están ajustadas para las diferencias entre los grupos en el peso corporal en el valor base) y ETM (calculado a partir de los residuos del modelo estadístico). Las comparaciones estadísticas se hicieron con ANCOVA (valor base de peso corporal como covariante) seguido de ensayo de Dunnett. Las diferencias significativas se indican por $***p < 0,001$, $**p < 0,01$, $*p < 0,05$.

De acuerdo con las reducciones relativas de la grasa corporal mostradas en la Figura 4, los niveles de leptina en el plasma disminuyeron un 36,1% y 61,7% después del Compuesto A (10 y 30 mg/kg po) cuando se compararon con el grupo de control tratado con vehículo (Figura 5). Los resultados en la Figura 5 se expresan como medias del grupo de tratamiento y ETM (todos $n = 9-10$). Se usó el análisis de covarianza usando el valor base de peso corporal y el orden de desangrado (número de animal) como covariante. Se usó la transformación de Rango. Las comparaciones múltiples frente al vehículo se hicieron con el ensayo de Dunnett. Las diferencias significativas se indican por $*p < 0,05$ y $***p < 0,001$.

Efectos crónicos del Compuesto A ((R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida) (10 y 30 mg/kg po) en las concentraciones de insulina en el plasma de ratas obesas con acceso a alimentos macronutrientes muy sabrosos

Los efectos del Compuesto A (10 y 30 mg/kg po) en los niveles de insulina en el plasma se muestran en la Figura 6.

El Compuesto A (10 y 30 mg/kg po) disminuyó significativamente los niveles de insulina en el plasma en un 38,9% y 41,8% respectivamente comparado con el grupo de control tratado con vehículo (Figura 6). Los resultados en la Figura 6 se expresan como medias del grupo de tratamiento y ETM (todos $n = 9-10$). Se usó el análisis de covarianza usando el valor inicial de peso corporal y el orden de desangrado (número de animal) como covariante. Se usó la transformación de Rango. Las comparaciones múltiples frente al vehículo se hicieron con el ensayo de Dunnett. Las diferencias significativas se indican por $*p < 0,01$ y $***p < 0,001$.

REIVINDICACIONES

1. Polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida.

2. Polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polimorfo α cristaliza en forma de una celda monoclinica con un ángulo beta de $104,52^\circ$ a 100 K .

3. Polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polimorfo α muestra un patrón de difracción de rayos X de polvo de acuerdo con la figura 7.

4. Polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polimorfo α funde

a más de 114°C , preferiblemente a un punto de inicio de $118 \pm 4^\circ\text{C}$, más preferiblemente a un punto de inicio de $118 \pm 3^\circ\text{C}$

y/o

con un máximo de fusión a $124 \pm 6^\circ\text{C}$, preferiblemente a $126 \pm 5^\circ\text{C}$,

y/o

con una entalpía de fusión de $-58 \pm 4,0\text{ J/g}$, preferiblemente $-58 \pm 3,0\text{ J/g}$.

5. Polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polimorfo α se descompone a o por encima de 280°C .

6. Polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polimorfo α en el espectro de FTIR muestra picos, preferiblemente picos intensos, a $3324 \pm 5\text{ cm}^{-1}$, y/o $1534 \pm 5\text{ cm}^{-1}$.

7. Polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** porque el polimorfo α muestra bandas en el espectro de FTRaman, preferiblemente bandas intensas, a $3326 \pm 5\text{ cm}^{-1}$ y/o un desplazamiento Raman a $3326 \pm 5\text{ cm}^{-1}$.

8. Procedimiento para preparar el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que

a) en una etapa de disolución la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida se disuelve en éter de diisopropilo, se calienta a una temperatura entre 65°C y 70°C hasta que la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida se disuelve completamente, y

b) en una etapa de enfriamiento, la solución posteriormente se enfría a una temperatura inferior a 25°C , para dar el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida.

9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, **caracterizado** porque

la etapa de enfriamiento b) se hace en dos fases, primero a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, y después a $0 \pm 2^\circ\text{C}$, y/o

en la etapa de disolución a) la temperatura se eleva a 68°C .

10. Medicamento que comprende al menos el polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y opcionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

11. Uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para preparar un medicamento para modular los receptores de cannabinoides, preferiblemente los receptores de cannabinoides 1 (CB_1), para la profilaxis y/o tratamiento de trastornos del sistema nervioso central, trastornos del sistema inmunitario, trastornos del sistema cardiovascular, trastornos del sistema endocrino, trastornos del sistema respiratorio, trastornos del tracto gastrointestinal o trastornos reproductivos.

12. Uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de los trastornos de ingestión de alimento, preferiblemente bulimia, anorexia, caquexia, obesidad, diabetes mellitus de tipo II (diabetes mellitus no dependiente de insulina), más preferiblemente obesidad.

13. Uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de la psicosis.

14. Uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento del abuso de alcohol y/o adicción al alcohol, abuso de nicotina y/o adicción a la nicotina, abuso de drogas y/o adicción a drogas y/o abuso de medicamentos y/o adicción a medicamentos, preferiblemente abuso de drogas y/o adicción a drogas y/o abuso de nicotina y/o adicción a nicotina.

15. Uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento del cáncer, preferiblemente para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más tipos de cáncer seleccionados del grupo constituido por cáncer cerebral, cáncer de hueso, cáncer de labio, cáncer de boca, cáncer esofágico, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer de cuello de útero, cáncer de pulmón, cáncer de pecho, cáncer de piel, cáncer de colon, cáncer de intestino y cáncer de próstata, más preferiblemente para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más tipos de cáncer seleccionados del grupo constituido por cáncer de colon, cáncer de intestino y cáncer de próstata.

16. Uso del polimorfo α de la (R)-N-piperidinil-5-(4-clorofenil)-1-(2,4-diclorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-carboxamida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para preparar un medicamento para la profilaxis y/o tratamiento de uno o más trastornos seleccionados del grupo constituido por trastornos óseos, preferiblemente osteoporosis (por ejemplo osteoporosis asociada con una predisposición genética, deficiencia de hormonas sexuales, o envejecimiento), enfermedad ósea asociada con cáncer o enfermedad ósea de Paget; esquizofrenia, ansiedad, depresión, epilepsia, trastornos neurodegenerativos, trastornos cerebelosos, trastornos espinocerebelosos, trastornos cognitivos, traumatismo craneal, traumatismo encefálico, infarto cerebral, ataques de pánico, neuropatía periférica, glaucoma, migraña, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Raynaud, trastornos de temblores, trastornos compulsivos, demencia senil, trastornos tímicos, discinesia tardía, trastornos bipolares, trastornos del movimiento inducidos por medicamentos, distonía, choque endotoxémico, choque hemorrágico, hipotensión, insomnio, trastornos inmunológicos, placas escleróticas, vómitos, diarrea, asma, trastornos de la memoria, pruritos, dolor, o para potenciar el efecto analgésico de analgésicos narcóticos o no narcóticos, o para influir en el tránsito intestinal.

Figura 1

Efecto en el peso corporal en ratas (i.p.)

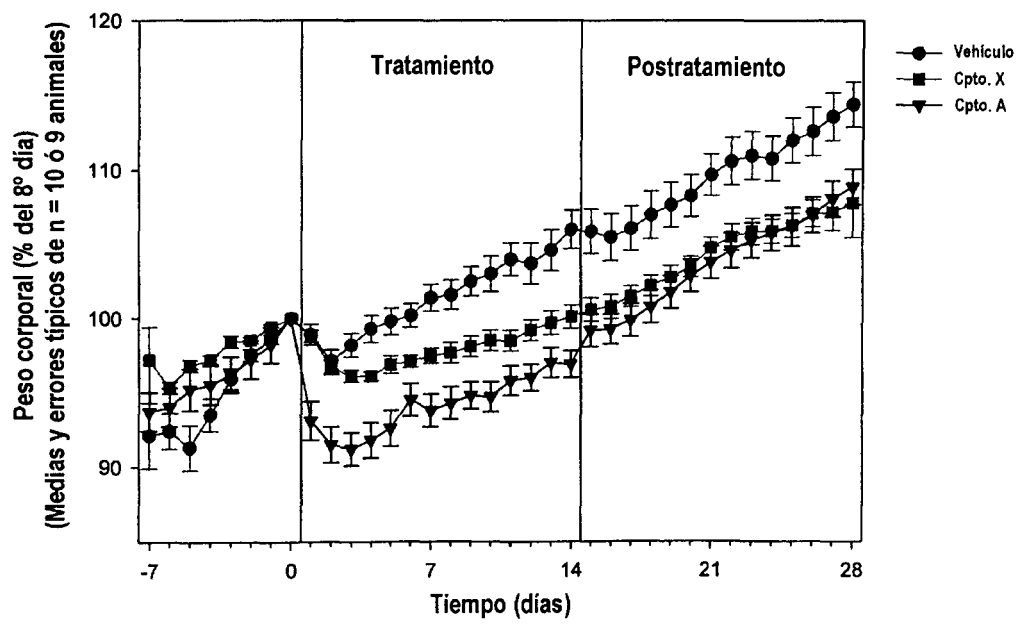


Figura 2

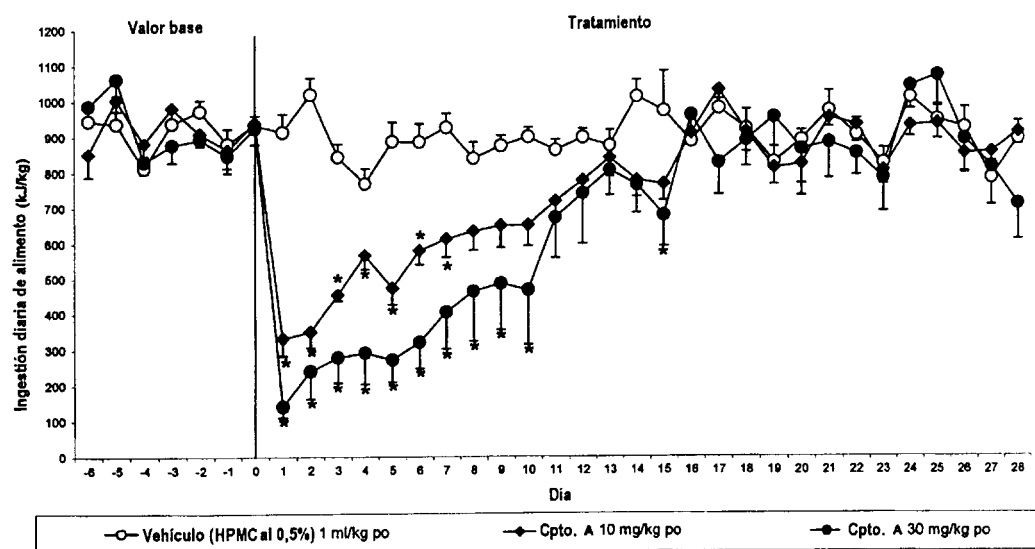


Figura 3

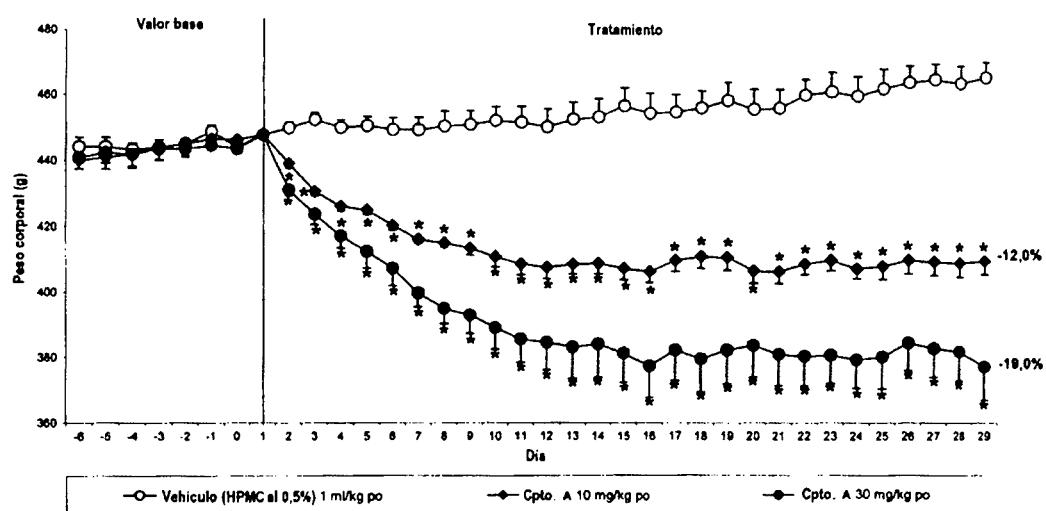


Figura 4

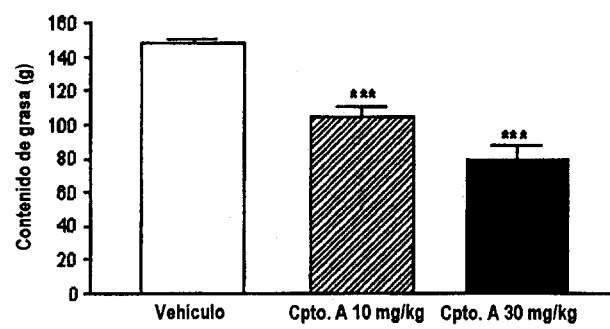


Figura 5

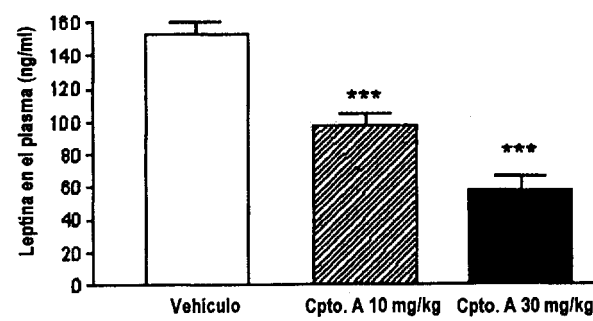


Figura 6

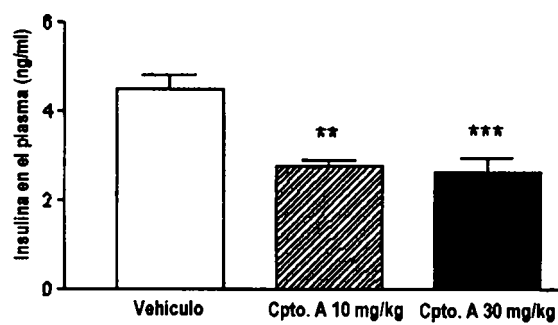
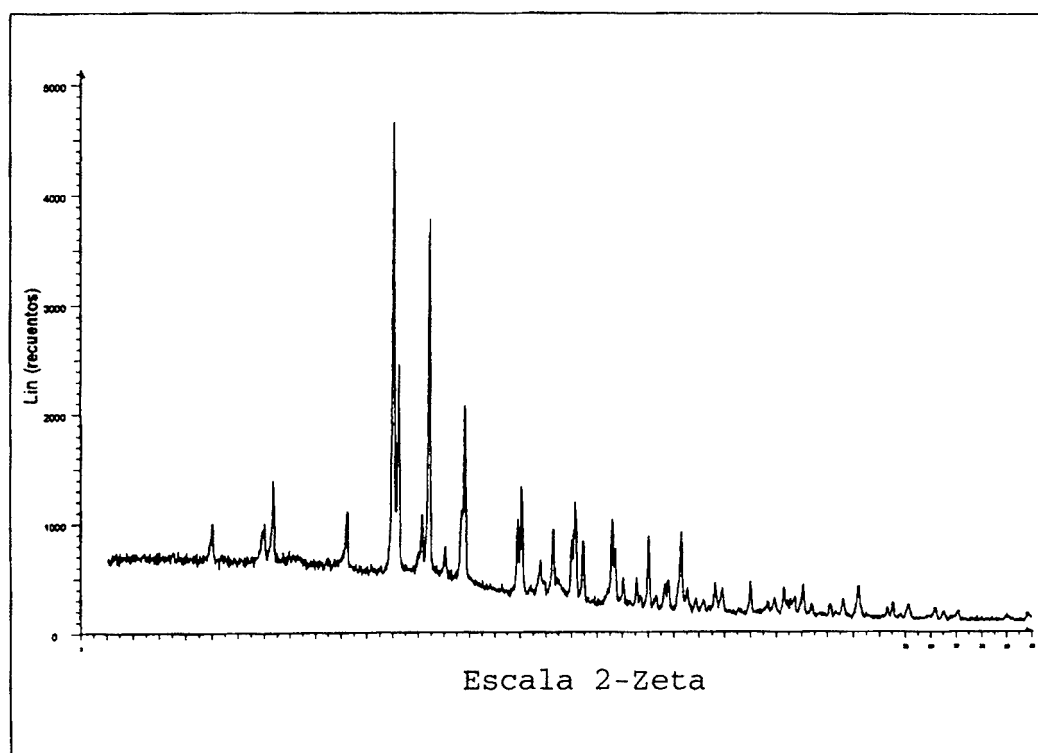


Figura 7





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 328 328

⑫ Nº de solicitud: 200800067

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 11.01.2008

⑭ Fecha de prioridad: 15.01.2007

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
P,X	EP 1757588 A1 (LABORATORIOS DR. ESTEVE) 28.02.2007, todo el documento.	1-16
A	WO 2005077911 A1 (LABORATORIOS DR. ESTEVE) 25.08.2005, ejemplo 1.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

22.10.2009

Examinador

E. Dávila Muro

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C07D 231/06 (2006.01)

A61K 31/4155 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)