

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **3 016 835**

(51) Int. Cl.:

A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/4025 (2006.01)
C07D 405/12 (2006.01)
C07F 9/6558 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2018 PCT/US2018/056713**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2019 WO19079721**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2018 E 18801102 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025 EP 3697779**

(54) Título: **Profármacos de dantroleno y métodos para su uso**

(30) Prioridad:

**20.10.2017 US 201762575124 P
21.05.2018 US 201862674422 P**

(73) Titular/es:

**EAGLE RESEARCH LABS LIMITED (100.00%)
93, Mill Street
Qormi, QRM 3102, MT**

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

09.05.2025

(72) Inventor/es:

**WESCOTT, CHARLES;
HEPNER, ADRIAN y
LARSON, ALYSSA**

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 3 016 835 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Profármacos de dantroleno y métodos para su uso

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 62/575,124, presentada el 20 de octubre de 2017, y la Solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 62/674,422, presentada el 21 de mayo de 2018.

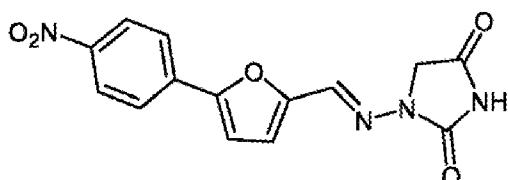
10 CAMPO TÉCNICO

10 La divulgación está dirigida a profármacos de dantroleno, composiciones de los mismos y métodos para su uso en el tratamiento de enfermedades.

15 ANTECEDENTES

15 Los profármacos típicamente son formas alternativas de fármacos activos, modificados reversiblemente o derivatizados con un grupo químico que hace que el profármaco sea inactivo o le confiere solubilidad, estabilidad o biodisponibilidad, o altera alguna otra propiedad del fármaco activo. Típicamente, el grupo químico de un profármaco se escinde del profármaco mediante calor, cavitación, presión, cambio de pH, reducción-oxidación y/o actividad enzimática que actúa sobre el profármaco, liberando de este modo el fármaco activo. La escisión del grupo químico del profármaco puede producirse antes de la administración del fármaco a un sujeto, pero generalmente se produce *in vivo* por procesos enzimáticos en el sujeto.

25 El dantroleno (1-{[5-(4-nitrofenil)-2-furil]metilideneamino}imidazolidina-2,4-diona), tiene la estructura de la fórmula (1):



30 35 El dantroleno es el agente de rescate de elección en el tratamiento de la hipertermia maligna ("MH") y está ampliamente disponible en la mayoría de las ubicaciones donde se administran anestésicos. Sintetizado por primera vez en 1967, el dantroleno se usó inicialmente en el tratamiento de los espasmos musculares en 1975, y posteriormente recibió la aprobación de la FDA en 1979 para el tratamiento de la MH. El dantroleno está reconocido como un potente relajante muscular y como tratamiento contra la espasticidad nerviosa. Desde su descubrimiento inicial, el dantroleno se ha explorado para la profilaxis y el tratamiento de otras afecciones potencialmente mortales, como la sobredosis de drogas recreativas como el "éxtasis" (N-metil-3,4-metilen-dioxifenilisopropilamina), el golpe de calor, el síndrome neuroléptico maligno y el daño isquémico del sistema nervioso periférico, y puede ser importante en la prevención del síndrome de muerte súbita del lactante (SIDS).

40 45 El dantroleno es muy poco soluble en agua. La escasa solubilidad del dantroleno dificulta enormemente su administración. Por ejemplo, el DANTRIUM™ es dantroleno sódico suministrado en viales de 20 mg que deben reconstituirse con 60 ml de agua estéril antes de su administración intravenosa. La dosis recomendada de dantroleno para tratar la MH es de 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Así, un sujeto de 80 kg de peso necesitaría una infusión rápida de hasta 2400 ml para tratar la MH.

50 55 Además de su escasa solubilidad, las soluciones de dantroleno tienen un pH elevado. El pH de DANTRIUM™ es de aproximadamente 9,5. El RYANODEX®, una formulación mejorada de dantroleno sódico que puede reconstituirse a 50 mg/ml, mejora en gran medida la rapidez con la que puede administrarse el dantroleno sódico. Sin embargo, el RYANODEX® reconstituido también tiene un pH elevado, de aproximadamente 10,3. Debido a su elevado pH, las formulaciones actuales de dantroleno no pueden administrarse por vía subcutánea o intramuscular, sino únicamente por vía intravenosa. De hecho, hay que tener cuidado de evitar la extravasación a los tejidos circundantes para evitar la necrosis tisular.

60 65 Aunque un profármaco del dantroleno podría ser útil para abordar los problemas de solubilidad y pH del fármaco, la identificación de una fracción de profármaco adecuada se complica por varios factores inherentes a la molécula de dantroleno. Por ejemplo, se especula que la escasa solubilidad del dantroleno es atribuible a su extenso sistema aromático, que puede presentar un comportamiento de apilamiento hidrofóbico pi. Ni siquiera la fracción nitro cargada del dantroleno puede mejorar la solubilidad del compuesto en agua.

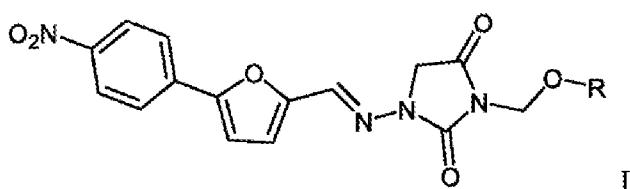
65 El dantroleno incluye una fracción de hidantoína, presente en otros compuestos farmacéuticos como, por

ejemplo, la fenitoína. Aunque se han notificado estrategias de profármacos para mejorar la hidrosolubilidad de otros compuestos que contienen hidantoína, no está claro si podrían aplicarse con éxito estrategias similares al dantroleno, teniendo en cuenta su estructura química y propiedades físicas únicas.

5 Hay una necesidad de nuevas formulaciones de dantroleno que tengan una concentración y un pH adecuados, haciéndolas apropiadas para el uso intramuscular o subcutáneo, así como para la administración oral, transmucosal (por ejemplo, intranasal) e intraósea. Snyder, H.R. et. al. (Journal of Medicinal Chemistry, American Chemical Society, vol. 10, 1967, páginas 807-809) divulga que "se sintetizó una serie de 1-[5-arylfurfuralideno]amino]hidantoínas y se examinaron los efectos de los compuestos sobre el reflejo flexor en el gato anestesiado".

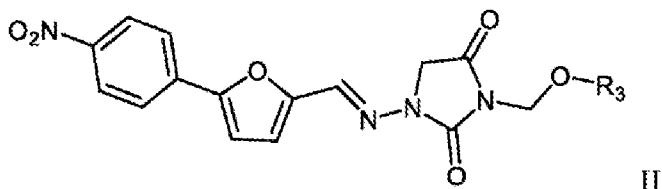
SUMARIO

La divulgación se dirige a compuestos de fórmula I



20 en donde R es $-P(O)(OH)_2$ o $-P(O)(OR_1)(OR_2)$; R₁ es H o -alquilo C₁₋₂₆; y R₂ es -alquilo C₁₋₂₆, así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. También se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de fórmula I, así como métodos para su uso.

También se divultan, pero no se reivindican, compuestos de fórmula II



30 en donde R₃ es H, $-C(O)-Z-N(R_4)(R_5)$, $-C(O)Z-C(O)-OH$, o $-C(O)-NH-Y-CH_2-OC(O)-Z-C(O)-OH$; Z es alquilo C₁₋₆; Y es aríleno; alquilo C₁₋₆; R₅ es H o alquilo C₁₋₆; o R₄ y R₅, junto con el nitrógeno al que están unidos, forman un heterocicloalquilo; así como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. También se divultan composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos de fórmula II (no reivindicados), así como métodos para su uso (no reivindicados). Todas las referencias a métodos de tratamiento que usan los compuestos y sales farmacéuticamente aceptables en la presente se refieren a los compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso en tales métodos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 45 La Figura 1 representa el área de pico a lo largo del tiempo para la conversión de un profármaco de la divulgación en dantroleno por fosfatasa alcalina a 25° C.
- 50 La Figura 2 representa el área de pico a lo largo del tiempo para la conversión de un profármaco de la divulgación (2a) en dantroleno por fosfatasa alcalina a 25° C.
- 55 La Figura 3 representa el área de pico a lo largo del tiempo para la conversión de un profármaco de la divulgación en dantroleno por plasma de rata a 22° C.
- 60 La Figura 4 representa el área de pico a lo largo del tiempo para la conversión de un profármaco de la divulgación en dantroleno por plasma de rata a 37° C.
- 65 La Figura 5 representa la conversión del compuesto 2a en dantroleno en plasma de rata. El plasma de rata se incubó con 100 µg/ml del compuesto 2a a 37° C. El área bajo los picos del profármaco y del dantroleno en los cromatogramas de 385 nm se representa frente al tiempo de reacción. Los círculos representan el profármaco. Los triángulos son el dantroleno.
- La Figura 6 representa la concentración media de dantroleno en el plasma de ratas a las que se les dosificaron 7,5 mg/kg del profármaco 2a ($n=5 \pm SEM$ (error estándar de la media)). Cuantificación por absorbancia a 385 nm.
- La Figura 7 representa la concentración media de dantroleno en sangre completa de rata de animales a los que se les dosificaron 7,5 mg/kg del profármaco 2a ($n=3$). Cuantificación por absorbancia a 385 nm.
- La Figura 8 representa la concentración media de dantroleno en el plasma de ratas a las que se les dosificaron 7,5 mg/kg del profármaco 2a ($n=5 \pm SEM$). Cuantificación por absorbancia a 385 nm.

La Figura 9 representa la concentración media de dantroleno en sangre completa de rata de animales a los que se les dosificaron 7,5 mg/kg del profármaco 2a ($n=5\pm SEM$). Cuantificación por absorbancia a 385 nm.

5 La Figura 10 representa la conversión del compuesto 2b en dantroleno en plasma de rata. El plasma de rata se incubó con 100 µg/ml del compuesto 2b a 37º C. El área bajo los picos del profármaco y del dantroleno en los cromatogramas de 385 nm se representa a lo largo del tiempo de reacción. Los círculos son el profármaco. Los triángulos son el dantroleno.

La Figura 11 representa la concentración media de dantroleno en plasma de rata de animales a los que se les dosificaron 10,6 mg/kg de 2b ($n=5\pm SEM$). Cuantificación por absorbancia a 385 nm.

10 La Figura 12 representa la conversión de 10c en dantroleno en plasma de rata. El plasma de rata se incubó con 100 µg/ml del compuesto 10c a 37º C. El área bajo los picos del profármaco y del dantroleno en los cromatogramas de 385 nm se representa a lo largo del tiempo de reacción. Los círculos son el profármaco. Los triángulos son el dantroleno.

15 La Figura 13 representa la conversión de 12a en dantroleno en plasma de rata. El plasma de rata se incubó con 100 µg/ml de 12a a 37º C. El área bajo los picos del profármaco y del dantroleno en los cromatogramas de 385 nm se representa a lo largo del tiempo de reacción. Los círculos son el profármaco. Los triángulos son el dantroleno.

La Figura 14 representa la concentración media de dantroleno en la sangre completa de los animales a los que se les dosificaron 4 mg/kg del profármaco 12a ($n=3\pm SEM$). Cuantificación por absorbancia a 385 nm.

20 La Figura 15 representa la versión de conversión de 17b a dantroleno en plasma de rata. El plasma de rata se incubó con 100 µg/ml de 17b a 37º C. El área bajo los picos del profármaco y del dantroleno en los cromatogramas de 385 nm se representa frente al tiempo de reacción. Los círculos son el profármaco. Los triángulos son el dantroleno.

25 La Figura 16 representa la conversión de 22c en dantroleno en plasma de rata. El plasma de rata se incubó con 100 µg/ml de 22c a 37º C. El área bajo los picos del profármaco y del dantroleno en los cromatogramas de 385 nm se representa frente al tiempo de reacción. Los círculos son el profármaco. Los triángulos son el dantroleno.

La Figura 17 representa la concentración media de dantroleno en sangre completa de animales a los que se les dosificaron 4 mg/kg del profármaco 22c ($n=3\pm SEM$). Cuantificación por absorbancia a 385 nm.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

30 La presente divulgación puede entenderse más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada tomada en relación con las figuras y ejemplos acompañantes, que forman parte de esta divulgación. Debe entenderse que la presente divulgación no se limita a las composiciones, dispositivos, métodos, aplicaciones, condiciones o parámetros específicos descritos y/o mostrados en la presente, y que la terminología usada en la presente tiene el propósito de describir realizaciones particulares a modo de ejemplo únicamente y no se pretende que sea limitativa de la divulgación reivindicada.

35 Como se usan en la memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen el plural, y la referencia a un valor numérico particular incluye por lo menos ese valor particular, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

40 Cuando se expresa un intervalo de valores, una realización ejemplar incluye desde un valor particular y/o hasta otro valor particular. Todos los intervalos son inclusivos y pueden combinarse. Además, la referencia a valores expresados en intervalos incluye todos y cada uno de los valores dentro de ese intervalo. Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso de la preposición "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otra realización. Se pretende que el término "aproximadamente", como se usa en la presente al referirse a un valor medible, como una cantidad, una duración temporal y similares, abarque variaciones razonables del valor, como, por ejemplo, $\pm 10\%$ del valor especificado. Por ejemplo, la frase "aproximadamente el 50%" puede incluir $\pm 10\%$ de 50, o del 45% al 55%, incluyendo el 50%.

45 50 Debe apreciarse que ciertas características de la divulgación que, por claridad, se describen en la presente en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. A la inversa, varias características de la divulgación que, por brevedad, se describe en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación.

55 55 Como se usa en la presente, ya sea por sí solo o junto con otro término o términos, debe entenderse que las frases "método para tratar" y "método de tratamiento" pueden usarse indistintamente con la frase "para su uso en el tratamiento de" una enfermedad particular.

60 60 Como se usa en la presente, ya sea por sí mismo o junto con otro término o términos, "farmacéuticamente aceptable" indica que la entidad designada como, por ejemplo, un excipiente farmacéuticamente aceptable, es generalmente compatible química y/o físicamente con otros ingredientes de una composición, y/o es generalmente compatible fisiológicamente con el receptor de la misma.

65 Como se usa en la presente, "composición farmacéutica" se refiere a una composición preparada combinando cualquiera de las formulaciones, incluyendo las suspensiones o dispersiones descritas en la presente, con uno o más

excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 "Excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra un compuesto de la divulgación. Un "excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sustancia no tóxica, biológicamente tolerable y, por lo demás, biológicamente adecuada para su administración a un sujeto, como una sustancia inerte, añadida a una composición farmacológica o usada de otro modo como vehículo, portador o diluyente para facilitar la administración de un agente y que es compatible con el mismo. Los ejemplos de excipientes se enumeran, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a ed., Mack Publishing Co. (1985).

10 Como se usan en la presente, ya sea por sí solos o junto con otro término o términos, "sujeto o sujetos", "individuo o individuos" y "paciente o pacientes" se refieren a mamíferos, incluyendo los humanos. El término humano o humanos se refiere e incluye un niño, adolescente o adulto humano.

15 Como se usan en la presente, ya sea por sí mismos o junto con otro término o términos, "trata", "que trata", "tratado" y "tratamiento" se refieren e incluyen usos y resultados de mejora, paliativos y/o curativos, o cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones, los métodos descritos en la presente pueden usarse profilácticamente. Debe entenderse que la "profilaxis" o un uso o resultado profiláctico no se refieren ni requieren una prevención absoluta o total (es decir, un uso o resultado preventivo o protector al 100%). Como se usa en la presente, profilaxis o un uso o resultado profiláctico se refiere a usos y resultados en los que la administración de un compuesto o composición disminuye o reduce la gravedad de una afección, síntoma, trastorno o enfermedad particulares descritos en la presente; disminuye o reduce la probabilidad de experimentar una afección, síntoma, trastorno o enfermedad particulares descritos en la presente; o retrasa la aparición o recaída (reaparición) de una afección, síntoma, trastorno o enfermedad particulares descritos en la presente; o cualquier combinación de lo anterior.

20 25 Como se usan en la presente, ya sea solos o junto con otro término o términos, "terapéutico" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad de un compuesto o composición que (a) trata una afección, síntoma, trastorno o enfermedad particulares descritos en la presente; (b) atenúa, mejora o elimina uno o más síntomas de una afección, trastorno o enfermedad particulares descritos en la presente; (c) retrasa la aparición o recaída (reaparición) de una afección, síntoma, trastorno o enfermedad particulares descritos en la presente. Debe entenderse que los términos "terapéutico" y "terapéuticamente eficaz" abarcan cualquiera de los efectos mencionados (a)-(c), ya sea solo o en combinación con cualquiera de los otros (a)-(c).

30 35 El término "alquilo C₁-C₆" se refiere a un conector alifático que tiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de carbono e incluye, por ejemplo, -CH₂-, -CH(CH₃)-, -CH(CH₃)-CH₂- y -C(CH₃)₂- . El término "-alquilo C₀-" se refiere a un enlace.

40 45 El término "alquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 12 átomos de carbono ("C₁-C₁₂"), preferiblemente de 1 a 6 átomos de carbono ("C₁-C₆"), en el grupo. Ejemplos de grupos alquilo son metilo (Me, alquilo C₁), etilo (Et, alquilo C₂), n-propilo (alquilo C₃), isopropilo (alquilo C₃), butilo (alquilo C₄), isobutilo (alquilo C₄), sec-butilo (alquilo C₄), terc-butilo (alquilo C₄), pentilo (alquilo C₅), isopentilo (alquilo C₅), terc-pentilo (alquilo C₅), hexilo (alquilo C₆), isohexilo (alquilo C₆), y similares.

50 55 El término "heterocicloalquilo" se refiere a cualquier estructura de anillo saturado monocíclico o bicíclico de tres a diez miembros que contenga por lo menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en O, N y S. Los ejemplos de grupos heterocicloalquilo adecuados incluyen, entre otros, azepanilo, aziridinilo, azetidinilo, pirrolidinilo, piperazinilo, piperidinilo, morfolinilo, tiomorfolinilo y similares.

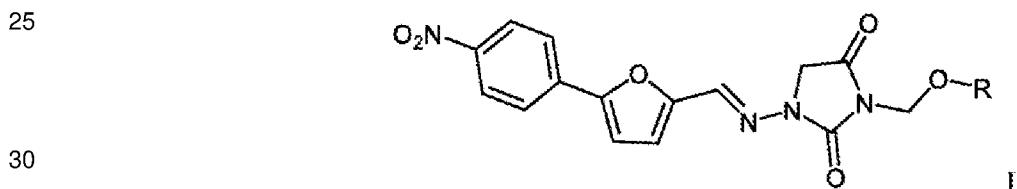
60 65 El término "arilo", cuando se usa solo o como parte de un grupo sustituyente, se refiere a una estructura de anillo de hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico que tiene 6 o 10 átomos de carbono en el anillo. Las fracciones de arilo preferidas son el fenilo y el naftilo.

70 75 El término "arileno" se refiere a una estructura de anillo de hidrocarburo aromático monocíclico o bicíclico que tiene 6 o 10 átomos de carbono en el anillo. Las fracciones de arileno preferidas son el fenileno y el naftaleno. Los compuestos de la divulgación pueden ser quirales y, como resultado, pueden existir como un solo enantiómero o como una mezcla de enantiómeros. La presente divulgación contempla todos los enantiómeros y mezclas de los mismos.

80 85 También se encuentran dentro del alcance de la divulgación las variantes isotópicas del compuesto de fórmula I y II. Como se usa en la presente, el término "variante isotópica" se refiere a un compuesto que contiene proporciones de isótopos en uno o más de los átomos que constituyen dicho compuesto, en mayor abundancia que la natural. Por ejemplo, una "variante isotópica" de un compuesto puede estar radiomarcada, es decir, contener uno o más isótopos radiactivos, o puede estar marcada con isótopos no radiactivos como, por ejemplo, deuterio (²H o D), carbono-11 (¹¹C), carbono-13 (¹³C), nitrógeno-15 (¹⁵N), fluoruro-18 (¹⁸F), o similares. Se entenderá que, en un compuesto en el que se realice dicha sustitución isotópica, los siguientes átomos, cuando estén presentes, pueden variar, de tal manera que, por ejemplo, cualquier hidrógeno puede ser ²H/D, cualquier carbono puede ser ¹¹C o ¹³C, cualquier nitrógeno puede ser ¹⁵N, o cualquier fluoruro (si está presente) puede ser ¹⁸F, y que la presencia y colocación de dichos átomos puede determinarse dentro de la capacidad de la técnica.

Los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo. En algunos aspectos, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de aproximadamente 1 segundo o menos a aproximadamente de 1 minuto a 90 minutos. En algunos aspectos, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de menos de 1 segundo. En otros aspectos, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de segundos, es decir, con una semivida de menos de un minuto, por ejemplo, con una semivida de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, o aproximadamente 59 segundos. En otros aspectos, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 minutos, por ejemplo, aproximadamente 1, 2, 3, 4 o aproximadamente 5 minutos. En otros aspectos, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 minutos. En otros aspectos de, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 minutos. En algunos aspectos, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de aproximadamente 1 minuto a 60 minutos. En algunos aspectos, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de aproximadamente 1 minuto a 45 minutos. En algunos aspectos, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de aproximadamente 1 minuto a 30 minutos. En algunos aspectos, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de aproximadamente 1 minuto a 20 minutos. En algunos aspectos, los compuestos de fórmula I y II se convierten en dantroleno in vivo con una semivida de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85 o aproximadamente 90 minutos.

La divulgación se dirige a profármacos de dantroleno de fórmula I:

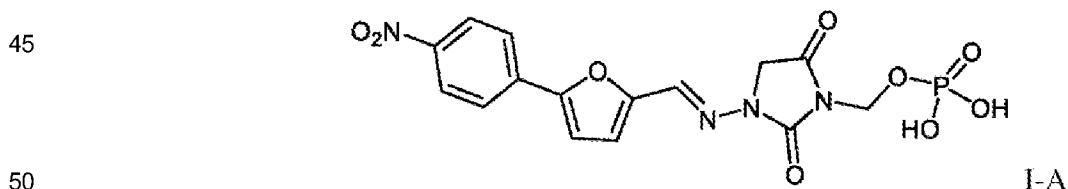


en donde R es

35 -P(O)(OH)₂ o -P(O)(OR₁)(OR₂);
R₁ es H o -alquilo C₁₋₂₆; y
R₂ es -alquilo C₁₋₂₆;

40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

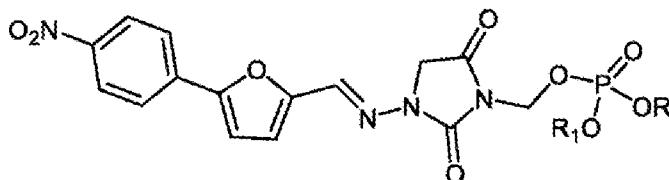
45 En algunos aspectos, los profármacos de dantroleno de la divulgación son aquellos en los que R es -P(O)(OH)₂ y son de fórmula I-A:



55 Las sales farmacéuticamente aceptables de compuestos de fórmula I-A también están dentro del alcance de la divulgación. Las sales preferidas incluyen, por ejemplo, sales de sodio de compuestos de fórmula I-A. También están dentro del alcance de la divulgación las sales de litio, magnesio, calcio y potasio de los compuestos de fórmula I-A. Las formas de sal alternativas incluyen sales de amonio, colina y trometamina. Una sal preferida del compuesto de fórmula I-A es la sal monosódica. Otra sal preferida del compuesto de fórmula I-A es la sal disódica. Otra sal preferida del compuesto de fórmula I-A es la sal monotrometamina. Otra sal preferida del compuesto de fórmula I-A es la sal ditrometamina. También están dentro del alcance de la divulgación las sales orgánicas farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I-A.

60 En algunos aspectos, los profármacos de dantroleno de la divulgación son aquellos en los que R es -P(O)(OR₁)(OR₂) y son de fórmula I-B:

5



En algunos aspectos, R₁ es H. En estos aspectos, R₂ es -alquilo C₁₋₂₆. También están dentro del alcance de la divulgación las sales farmacéuticamente aceptables de tales compuestos de fórmula I-B. Las sales preferidas incluyen, por ejemplo, sales de sodio de compuestos de fórmula I-B. Otras sales incluyen las sales de litio, magnesio, calcio y potasio de los compuestos de fórmula I-B. Las formas alternativas de sal incluyen sales de amonio, colina y trometamina. También están dentro del alcance de la divulgación las sales orgánicas farmacéuticamente aceptables de compuestos de fórmula I-B.

En algunos aspectos de los compuestos de fórmula I-B, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₋₂₆. Por ejemplo, en algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₋₆. En otros aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₋₁₂. En otros aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₃₋₂₆. En otros aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₈₋₂₆. En otros aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₂₀₋₂₆. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₂. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₃. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₄. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₅. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₆. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₇. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₈. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₉. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₀. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₁. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₂. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₃. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es alquilo -C₁₄. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₅. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₆. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₇. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₈. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₁₉. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₂₀. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₂₁. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₂₂. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₂₃. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₂₄. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es -alquilo C₂₅. En algunos aspectos, R₁ es H y R₂ es alquilo C₂₆.

En algunos aspectos de los compuestos de fórmula I-B, R₁ es -alquilo C₁₋₂₆ y R₂ es -alquilo C₁₋₂₆. En otros aspectos, R₁ es -alquilo C₁₋₁₂. En otros aspectos, R₁ es -alquilo C₁₃₋₂₆. En otros aspectos, R₁ es -alquilo C₁₈₋₂₆. En otros aspectos, R₁ es -alquilo C₂₀₋₂₆. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₂. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₃. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₄. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₅. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₆. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₇. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₈. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₉. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₀. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₁. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₂. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₃. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₄. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₅. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₆. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₇. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₈. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₉. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₂₀. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₂₁. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₂₂. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₂₃. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₂₄. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₂₅. En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₂₆.

En algunos aspectos, R₁ es -alquilo C₁₋₂₆ y R₂ es -alquilo C₁₋₂₆. Por ejemplo, en algunos aspectos R₁ y R₂ son cada uno independientemente -alquilo C₁₋₆, -alquilo C₁₋₁₂, -alquilo C₁₃₋₂₆, -alquilo C₁₈₋₂₆, -alquilo C₂₀₋₂₆, -alquilo C₁, -alquilo C₂, -alquilo C₃, -alquilo C₄, -alquilo C₅, -alquilo C₆, -alquilo C₇, -alquilo C₈, -alquilo C₉, -alquilo C₁₀, alquilo -C₁₁, -alquilo C₁₂, -alquilo C₁₃, -alquilo C₁₄, -alquilo C₁₅, -alquilo C₁₆, -alquilo C₁₇, -alquilo C₁₈, -alquilo C₁₉, -alquilo C₂₀, -alquilo C₂₁, -alquilo C₂₂, -alquilo C₂₃, -alquilo C₂₄, -alquilo C₂₅, o -alquilo C₂₆.

Los compuestos de fórmula I, que incluyen los compuestos de fórmula I-A y I-B, pueden estar presentes como sales farmacéuticamente aceptables, cuando proceda. Estas sales incluyen sales de sodio. También se conciben sales de potasio, litio, calcio y magnesio. Otras formas alternativas de sales incluyen las sales de amonio, colina y trometamina.

Los compuestos de fórmula I y II, que incluyen compuestos de fórmula I-A, I-B y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden prepararse como composiciones farmacéuticas combinando el compuesto con un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, los uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables adicionales se seleccionan del grupo que consiste en conservantes, antioxidantes o mezclas de los mismos. En otras realizaciones más de la divulgación, el excipiente adicional farmacéuticamente aceptable es un conservante como, por ejemplo, fenol, cresol, éster p-hidroxibenzoico, clorobutanol o mezclas de los mismos. En otras realizaciones más de la divulgación, el excipiente farmacéuticamente aceptable adicional es un antioxidante como, por ejemplo, ácido ascórbico, piroslufito sódico, ácido palmítico, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, tocopheroles o mezclas de los mismos.

65

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden suministrarse como suspensiones. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden proporcionarse como soluciones.

5 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden tener el compuesto de la divulgación presente a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml, por ejemplo, de 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de 1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, preferiblemente de 5 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml, preferiblemente a pH fisiológico. En realizaciones particulares de la divulgación, un compuesto de la divulgación está presente a una concentración igual o mayor de aproximadamente 5 mg/ml. En realizaciones adicionales, un compuesto de la divulgación está presente a una concentración de aproximadamente 10 mg/ml. En más realizaciones adicionales, un compuesto de la divulgación está presente a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, o 50 mg/ml. En otras realizaciones más, un compuesto de la divulgación está presente a una concentración de aproximadamente 125 mg/ml, 150 mg/ml, 175 mg/ml, 200 mg/ml, 225 mg/ml, 250 mg/ml, 275 mg/ml, 300 mg/ml, 325 mg/ml, 350 mg/ml, 375 mg/ml, o aproximadamente 400 mg/ml.

10 15 En ciertas realizaciones, un compuesto de la divulgación está presente a una concentración igual o mayor de aproximadamente 55 mg/ml. En realizaciones adicionales, un compuesto de la divulgación está presente a una concentración de aproximadamente 55 a 125 mg/ml. En realizaciones particulares, un compuesto de la divulgación está presente a una concentración de aproximadamente 75 mg/ml, 80 mg/ml, 85 mg/ml, 90 mg/ml, 95 mg/ml, 100 mg/ml, 105 mg/ml, 110 mg/ml, 115 mg/ml, 120 mg/ml o 125 mg/ml. En otras realizaciones, un compuesto de la divulgación está presente a una concentración de aproximadamente 75 mg/ml a 95 mg/ml, de 80 mg/ml a 100 mg/ml, de 90 mg/ml a 110 mg/ml, de 95 mg/ml a 105 mg/ml, de 95 mg/ml a 115 mg/ml, de 100 mg/ml a 110 mg/ml, de 110 mg/ml a 125 mg/ml, incluyendo todos los intervalos y subintervalos intermedios.

20 25 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender además un estabilizador o dos o más estabilizadores. En más realizaciones adicionales de la divulgación, el estabilizador se selecciona del grupo que consiste en surfactantes, polímeros, polímeros reticulados, agentes tampón, electrolitos y no electrolitos. En otras realizaciones más de la divulgación, la composición comprende una combinación de dos o más estabilizadores seleccionados del grupo que consiste en surfactantes, polímeros, polímeros reticulados, agentes amortiguadores, electrolíticos y no electrolíticos. En otras realizaciones más de la divulgación, el estabilizador es un surfactante como, pero no limitado a, óxido de polietileno (PEO), un derivado de PEO, polisorbato 80, polisorbato 20, poloxámero 188, aceites vegetales polietoxilados, lecitina, albúmina de suero humano y mezclas de los mismos. En realizaciones particulares de la divulgación, el estabilizador es un polímero como, pero no limitado a, una polivinilpirrolidona (como, pero no limitado a povidona K12, povidona K17, y mezclas de las mismas), polietilenglicol 3350, y mezclas de los mismos. En otras realizaciones de la divulgación, el estabilizador es un electrolito como, pero no limitado a, cloruro de sodio, cloruro de calcio y mezclas de los mismos. En otras realizaciones más de la divulgación, el estabilizador es un no electrolito como, pero no limitado a, dextrosa, glicerol, manitol, o mezclas de los mismos. En otras realizaciones de la divulgación, el estabilizador es un polímero reticulado como, pero no limitado a, carboximetilcelulosa sódica (CMC). En algunas realizaciones de la divulgación, el estabilizador es CMC 7LF, CMC 40 7MF, CMC 7HF, o mezclas de los mismos.

30 35 En realizaciones adicionales de la divulgación, pueden usarse combinaciones de estabilizadores no electrolíticos y estabilizadores electrolíticos. En algunas realizaciones, la combinación de estabilizadores puede comprender dos o más estabilizadores no electrolíticos. En otras realizaciones, la combinación de estabilizadores puede comprender dos o más estabilizadores electrolíticos. En realizaciones adicionales, la combinación de estabilizadores puede comprender uno o más estabilizadores no electrolíticos y uno o más estabilizadores electrolíticos. En otras realizaciones más, la combinación de estabilizadores puede comprender dos o más de manitol, dextrosa y cloruro sódico.

40 45 50 En ciertas realizaciones de la divulgación, pueden usarse combinaciones de estabilizadores surfactantes y estabilizadores poliméricos. En algunas realizaciones, la combinación de estabilizadores puede comprender dos o más estabilizadores surfactantes. En otras realizaciones, la combinación de estabilizadores puede comprender dos o más estabilizadores poliméricos. En realizaciones adicionales, la combinación de estabilizadores puede comprender uno o más estabilizadores surfactantes y uno o más estabilizadores poliméricos. En otras realizaciones más, la combinación de estabilizadores puede comprender dos o más de polisorbato 80, polisorbato 20 y poloxámero 188. En otras realizaciones adicionales, la combinación de estabilizadores puede comprender uno o más de polisorbato 80, polisorbato 20 y poloxámero 188 y uno o más de povidona K12, povidona K17 y polietilenglicol 3350.

55 60 65 En ciertas realizaciones de la divulgación, la composición comprende de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml de uno o más estabilizadores, y todos los intervalos y subintervalos entre ellos. En realizaciones particulares de la divulgación, la composición comprende aproximadamente de 0,2 a 0,7 mg/ml, de 0,5 a 1 mg/ml, de 1 a 5 mg/ml, de 2 a 8 mg/ml, de 5 a 6 mg/ml, de 5 a 10 mg/ml, de 8 a 12 mg/ml, de 10 a 15 mg/ml, de 15 a 20 mg/ml, de 20 a 30 mg/ml, de 30 a 40 mg/ml, de 40 a 50 mg/ml, de 45 a 55 mg/ml, de 50 a 60 mg/ml, o de 60 a 75 mg/ml de uno o más estabilizadores, y todos los intervalos y subintervalos entre ellos. En realizaciones adicionales de la divulgación, la composición comprende aproximadamente 0,2 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4

mg/ml, 5 mg/ml, 5.5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 12 mg/ml, 15 mg/ml, 17 mg/ml, 20 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 35 mg/ml, 40 mg/ml, 45 mg/ml, 50 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml, 65 mg/ml, 70 mg/ml, o 75 mg/ml de uno o más estabilizadores.

- 5 En realizaciones particulares de la divulgación, la composición comprende además uno o más agentes tampón como, pero no limitados a, NaH₂PO₄·H₂O, NaH₂PO₄·2H₂O, NaH₂PO₄ anhidro, citrato sódico, ácido cítrico, Tris, hidróxido sódico, HCl, o mezclas de los mismos. En ciertas realizaciones de la divulgación, la composición comprende aproximadamente de 1 mM a 20 mM de uno o más agentes tampón, y todos los intervalos y subintervalos entre ellos. En realizaciones particulares de la divulgación, la composición comprende aproximadamente de 1 a 2 mM, de 1 a 3 mM, de 1 a 5 mM, de 2 a 8 mM, de 5 a 6 mM, de 5 a 10 mM, de 8 a 12 mM, de 10 a 15 mM, o de 15 a 20 mM de uno o más agentes tampón, y todos los intervalos y subintervalos entre ellos. En realizaciones adicionales de la divulgación, la composición comprende aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, o 20 mM de uno o más agentes tampón.
- 10 15 En ciertas realizaciones de la divulgación, una composición farmacéutica tiene un pH de aproximadamente 3-10, por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10. En realizaciones adicionales de la divulgación, la composición tiene un pH de aproximadamente 5-9. En realizaciones adicionales de la divulgación, la composición tiene un pH de aproximadamente 6 a 9. En realizaciones adicionales de la divulgación, la composición tiene un pH de aproximadamente 6 a 7. En realizaciones adicionales de la divulgación, la composición tiene un pH de aproximadamente 6 a 8.5. En realizaciones adicionales de la divulgación, la composición tiene un pH de aproximadamente 7 a 8.5. En ciertas realizaciones de la divulgación, la composición tiene un pH de aproximadamente 6,0 a 8,0. En realizaciones particulares de la divulgación, la composición tiene un pH de aproximadamente 6,0 a 7,0, 6,5 a 7,0, 6,5 a 7,5, 6,7 a 7,2, 7,0 a 7,2, 7,0 a 7,5, 7,0 a 8,0 o 7,0 a 8,5.
- 20 25 En ciertas realizaciones de la divulgación, una composición farmacéutica tiene una osmolaridad de aproximadamente 280 mOsm/l a aproximadamente 310 mOsm/l, por ejemplo, de aproximadamente 280, 285, 290, 300, 305, o aproximadamente 310 mOsm/l. En realizaciones adicionales de la divulgación, la composición tiene una osmolaridad de aproximadamente 290 mOsm/l a aproximadamente 300 mOsm/l. En otras realizaciones adicionales de la divulgación, la composición tiene una osmolaridad de aproximadamente 290 mOsm/l. En algunas realizaciones, la osmolaridad puede seleccionarse mediante el uso de cantidades apropiadas de uno o más estabilizadores que actúan como tonificantes en una composición como, pero no limitados a, los estabilizadores no electrolíticos y estabilizadores electrolíticos descritos en la presente. En algunas realizaciones, la osmolaridad puede seleccionarse mediante el uso de cantidades apropiadas de uno o más agentes tampón que actúan como tonificantes en una composición como, pero no limitados a, los agentes tampón descritos en la presente.
- 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse por vía intravenosa. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse por vía intramuscular. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se administran por vía subcutánea. Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también pueden administrarse por vía oral. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se administran por vía transmucosal, por ejemplo, por vía intranasal. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se administran por vía intraósea.
- Los compuestos y las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden usarse para tratar trastornos que responden al dantroleno. Todas las referencias a métodos de tratamiento que usan los compuestos y sales farmacéuticamente aceptables en la presente se refieren a los compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso en tales métodos. Por ejemplo, a los sujetos que necesitan tratamiento se les puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la divulgación, o una sal del mismo. En otros aspectos, a los sujetos que necesitan tratamiento se les puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica de la divulgación, o una sal de la misma. En otros aspectos, los sujetos que necesitan tratamiento pueden exponerse a una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la divulgación, por ejemplo, un compuesto de fórmula I-A, I-B o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Por ejemplo, los sujetos que necesitan tratamiento pueden exponerse a una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la divulgación.
- Los trastornos que responden al dantroleno incluyen, por ejemplo, hipertermia maligna, espasticidad crónica, golpe de calor por esfuerzo, arritmias cardíacas, taquicardia, fibrilación auricular, parada cardíaca, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, lesión miocárdica, cardiomiopatía, enfermedad del núcleo central, esclerosis lateral amiotrófica, rhabdomiólisis, distrofia muscular de Duchenne, ataxia, hiperactividad del detrusor, vejiga hiperactiva, convulsiones, epilepsia, síndrome neuroléptico maligno, trastorno por estrés humano, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, lesión por isquemia-reperfusión, lesión por reperfusión neuronal, hipoxia, aneurisma cerebral, hemorragia subaracnoidea, accidente cerebrovascular, hipertermia asociada al abuso de drogas o hipertermia asociada a sobredosis de drogas.
- En aspectos preferidos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la hipertermia maligna en un sujeto.

- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la espasticidad crónica en un sujeto.
- 5 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar el golpe de calor por esfuerzo en un sujeto.
- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar arritmias cardíacas en un sujeto.
- 10 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la taquicardia en un sujeto.
- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la fibrilación auricular en un sujeto.
- 15 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la parada cardiaca en un sujeto.
- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar el infarto de miocardio en un sujeto.
- 20 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la insuficiencia cardíaca en un sujeto.
- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la lesión miocárdica en un sujeto.
- 25 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la cardiomiopatía en un sujeto.
- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la enfermedad del núcleo central en un sujeto.
- 30 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la esclerosis lateral amiotrófica en un sujeto.
- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la rabdomiolisis en un sujeto.
- 35 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la distrofia muscular de Duchenne en un sujeto.
- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la ataxia en un sujeto.
- 40 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la hiperactividad del detrusor en un sujeto.
- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la vejiga hiperactiva en un sujeto.
- 45 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar las convulsiones en un sujeto.
- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la epilepsia en un sujeto.
- 50 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar el síndrome neuroléptico maligno en un sujeto.
- En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar el trastorno de estrés humano en un sujeto.
- 55 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar el síndrome neuroleptico maligno en un sujeto.
- 60 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar el trastorno de estrés humano en un sujeto.
- 65 En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar el síndrome neuroleptico maligno en un sujeto.

la enfermedad de Alzheimer en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la enfermedad de Huntington en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la esclerosis múltiple en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la enfermedad de Parkinson en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la lesión por isquemia-reperfusión en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la lesión neuronal por reperfusión en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la hipoxia en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar el aneurisma cerebral en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la hemorragia subaracnoidea en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar el accidente cerebrovascular en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la hipertermia asociada al abuso de drogas (por ejemplo, el abuso de éxtasis (3,4-metilendioximetanfetamina)) en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la hipertermia asociada a la sobredosis de drogas (por ejemplo, sobredosis de éxtasis (3,4-metilendioximetanfetamina) en un sujeto.

En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la acumulación de acetilcolina en un sujeto. En otros aspectos, los compuestos y/o las composiciones farmacéuticas de la divulgación se usan para tratar la exposición a agentes nerviosos neurotóxicos, por ejemplo, exposición a gases nerviosos, (por ejemplo, gases organofosforados como sarín, somán y VX) en un sujeto. Véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 62/554,049, presentada el 5 de septiembre de 2017. Como se usa en la presente, "agente nervioso neurotóxico" o "agente nervioso" se refiere a compuestos que afectan a la transmisión de los impulsos nerviosos en el sistema nervioso. Los agentes nerviosos son compuestos organofosforados, es decir, son de la fórmula $(R)_3P(O)$, en donde cada grupo R puede ser igual o diferente. Los agentes nerviosos de tipo "G" incluyen el metilfosfonofluoridato de O-pinacolilo (somán, GD), el N,N-dimetilfosforamidocianidato de etilo (tabún, GA), el metilfosfonofluoridato de propan-2-ilo (sarín, GB), el metilfosfonofluoridato de ciclohexilo (ciclosarín, GF) y el 2-(dimetilamino)etilo (GV). Los agentes nerviosos de tipo "V" incluyen el metilfosfonotiolato de O-ciclopentilo S-(2-dietilaminoetilo) (EA-3148), (S)-{[2-(dietilamino)etil]sulfonil}(etil)fosfonatos de etilo como el (S)-{[2-(dietilamino)etil]sulfanil}(etil)fosfinato de etilo (VE), S-[2-(dietilamino)etil] fosforotioato de O,O-dietilo (VG), metilfosfonotioato de S-[2-(dietilamino)etil] O-etilo (VM), N,N-dietil-2-(metil-(2-metilpropoxi)fosforil)sulfaniletanamina (VR), y {[2-[bis(propan-2-il)amino]etil}sulfanil}(metil)fosfinato de etilo (VX). Los métodos descritos en la presente pueden usarse para tratar a un sujeto expuesto a un agente nervioso. Los métodos descritos en la presente también pueden usarse para tratar a un sujeto expuesto a dos o más agentes nerviosos.

Como se usa en la presente, las expresiones "resultante de la exposición a un agente nervioso" y "debido a la exposición a un agente nervioso" se refieren a los efectos que son consecuencia directa de la exposición a un agente nervioso, así como a los efectos que son consecuencia secundaria de la exposición a un agente nervioso.

En algunos aspectos, la divulgación se dirige a métodos de tratamiento de un sujeto expuesto a un agente nervioso con una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un compuesto de Fórmula I como se describe en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Todas las referencias a métodos de tratamiento que usan los compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de la presente se refieren a los compuestos y a las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para su uso en dichos métodos. Por ejemplo, en algunos aspectos, los métodos descritos previenen el daño neurológico secundario a la exposición a agentes

nerviosos. En otros aspectos, los métodos descritos proporcionan efectos neuroprotectores después de la exposición a agentes nerviosos. En otros aspectos, los métodos descritos mejoran el daño tisular cerebral secundario a la exposición a agentes nerviosos. En otros aspectos, los métodos descritos mejoran el daño tisular cerebral secundario al estado epiléptico secundario a la exposición a agentes nerviosos. En otros aspectos, los métodos descritos previenen la necrosis neuronal debida a la exposición a agentes nerviosos. En otros aspectos, los métodos descritos mejoran la necrosis neuronal debida a la exposición a agentes nerviosos. En otros aspectos, los métodos descritos tratan la sobrecarga de calcio intracelular debida a la exposición a agentes nerviosos. En otros aspectos, los métodos descritos mejoran la sobrecarga de calcio intracelular debida a la exposición a agentes nerviosos. En otros aspectos, los métodos descritos previenen la sobrecarga de calcio intracelular debida a la exposición a agentes nerviosos.

Los sujetos descritos en la presente pueden exponerse a un agente nervioso por inhalación. En otros aspectos, los sujetos se exponen a un agente nervioso por transmisión transdérmica del agente. En otros aspectos, los sujetos se exponen a un agente nervioso a través del consumo de un líquido o alimento contaminado con un agente nervioso. En otros aspectos, los sujetos se exponen a un agente nervioso mediante la administración subcutánea, intravenosa o intramuscular del agente al sujeto.

En algunos aspectos, los métodos se dirigen a métodos para proteger a un sujeto de la necrosis neuronal, después de que el sujeto haya estado expuesto a un agente nervioso. En estas realizaciones, se administra al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, después de que el sujeto haya estado expuesto a un agente nervioso. Como se usa en la presente, la "protección" frente a la necrosis neuronal abarca la disminución de la gravedad de los efectos del agente nervioso o la mejora del efecto del agente nervioso o la disminución del daño neural resultante de la exposición al agente nervioso. En algunos aspectos, la "protección" frente a la necrosis neuronal abarca la prevención de la necrosis neuronal en un sujeto que ha estado expuesto a un agente nervioso. Es decir, los sujetos que están "protegidos" de la necrosis neuronal mediante la administración de los compuestos y composiciones descritos en la presente obtienen mejores resultados en las pruebas neuroconductuales, en comparación con los sujetos expuestos a agentes nerviosos a los que no se les han administrado los compuestos o composiciones descritas.

En algunas realizaciones, la totalidad del sistema nervioso central del sujeto está protegido de la necrosis neuronal. En algunas realizaciones, están protegidos de la necrosis neuronal la corteza fronto-parietal, el hipocampo y/o el tálamo. En otros aspectos, estará protegida de la necrosis neuronal la corteza fronto-parietal. En otros aspectos, está protegido de la necrosis neuronal el hipocampo. En otras realizaciones, está protegido de la necrosis neuronal el tálamo.

La presencia y el alcance de la necrosis neuronal pueden determinarse usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo pruebas neurocomportamentales, pruebas radiológicas y evaluación patológica.

La divulgación también se dirige a métodos para proteger a un sujeto de una disminución de la función del sistema nervioso central resultante de la exposición a un agente nervioso. Estos métodos comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, después de que el sujeto haya estado expuesto a un agente nervioso.

La divulgación también se dirige a métodos para proteger a un sujeto de una disfunción del sistema nervioso central resultante de la exposición a un agente nervioso. Estos métodos comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un compuesto de fórmula I como se describe en la presente o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, después de que el sujeto haya estado expuesto a un agente nervioso.

La divulgación también se dirige a métodos para tratar cambios de comportamiento en un sujeto como resultado de la exposición a un agente nervioso. Estos métodos comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, después de que el sujeto haya estado expuesto a un agente nervioso.

Como se usa en la presente, la "protección" frente a una disminución de la función del sistema nervioso central abarca la disminución de la gravedad de los efectos del agente nervioso sobre el sistema nervioso central o la mejora de los efectos del agente nervioso sobre el sistema nervioso central o la disminución de los efectos del agente nervioso sobre el sistema nervioso central. Es decir, los sujetos que están "protegidos" de una disminución de la función del sistema nervioso central mediante la administración de los compuestos descritos de las composiciones que contienen fórmula I, obtienen mejores resultados en las pruebas neuroconductuales, en comparación con los sujetos expuestos al agente nervioso a los que no se les han administrado las composiciones descritas.

La divulgación también se dirige a métodos de tratamiento de convulsiones inducidas por agentes nerviosos en un sujeto que ha estado expuesto a un agente nervioso. En algunos aspectos, las convulsiones tratadas son estados epilépticos (SE). Estos métodos comprenden administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Como se

usa en la presente, el tratamiento de las convulsiones inducidas por agentes nerviosos da como resultado una reducción de la gravedad o duración de las convulsiones. En otros aspectos, el tratamiento da como resultado una reducción tanto de la gravedad como de la duración de las convulsiones.

- 5 La cantidad del compuesto de fórmula I, o de una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que es eficaz para tratar al sujeto de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos debe ser determinada por un profesional experto en la técnica. La cantidad terapéuticamente eficaz puede ser la cantidad necesaria para tratar al sujeto en una única dosis. Alternativamente, la cantidad terapéuticamente eficaz puede ser la cantidad acumulativa de dantroleno necesaria para tratar al sujeto a lo largo de un tratamiento crónico.
- 10 En aquellas realizaciones en las que el sujeto es humano, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es una cantidad de compuesto equivalente a de 1 mg/kg a 100 mg/kg de dantroleno, administrado en una o más dosis. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 1 mg/kg a aproximadamente 90 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 1 mg/kg a aproximadamente 80 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente de 1 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 1 mg/kg a aproximadamente 60 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 1 mg/kg a aproximadamente 40 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 1 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de aproximadamente 20 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de aproximadamente 5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 6 mg/kg, de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de aproximadamente 15 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 10 mg/kg a 100 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 20 mg/kg a 100 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 30 mg/kg a 100 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 40 mg/kg a 100 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 50 mg/kg a 100 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 50 mg/kg a 75 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a de 25 mg/kg a 75 mg/kg de dantroleno. En algunos aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 o aproximadamente 34 mg/kg de dantroleno. En algunos aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I para tratar a un sujeto humano es equivalente a aproximadamente 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o aproximadamente 100 mg/kg de dantroleno. En otros aspectos, la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I es equivalente a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o aproximadamente 100 mg/kg de dantroleno.
- 45 55 En algunos aspectos de la divulgación, el momento de la administración de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al sujeto, después de la exposición a un agente nervioso, puede afectar a la cantidad de protección contra la necrosis neuronal conferida al sujeto.
- 60 65 En algunos aspectos de la divulgación, el momento de la administración de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al sujeto, después de la exposición a un agente nervioso, puede afectar a la cantidad de disminución de la función del sistema nervioso central conferida al sujeto.
- 65 En algunos aspectos de la divulgación, el momento de la administración de la composición farmacéutica que

comprende el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, al sujeto, después de la exposición a un agente nervioso puede afectar al tratamiento de las convulsiones inducidas por agentes nerviosos en el sujeto.

5 En cuanto al momento de la administración de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en algunos aspectos, se administra al sujeto por lo menos una dosis de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 24 horas o menos después de que el sujeto haya estado expuesto al agente nervioso. En algunos aspectos, se administra al sujeto por lo menos una dosis de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 20 horas o menos después de que el sujeto haya estado expuesto al agente nervioso. En algunos aspectos, se administra al sujeto por lo menos una dosis de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 16 horas o menos después de que el sujeto haya estado expuesto al agente nervioso. En algunos aspectos, se administra al sujeto por lo menos una dosis de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 12 horas o menos después de que el sujeto haya estado expuesto al agente nervioso. En algunos aspectos, se administra al sujeto por lo menos una dosis de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 8 horas o menos después de que el sujeto haya estado expuesto al agente nervioso. En algunos aspectos, se administra al sujeto por lo menos una dosis de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 4 horas o menos después de que el sujeto haya estado expuesto al agente nervioso. En algunos aspectos, se administra al sujeto por lo menos una dosis de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 2 horas o menos después de que el sujeto haya estado expuesto al agente nervioso. En algunos aspectos, se administra al sujeto por lo menos una dosis de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, 1 hora o menos después de que el sujeto haya estado expuesto al agente nervioso. En algunos aspectos, se administra al sujeto por lo menos una dosis de la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el plazo de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o en el plazo de aproximadamente 24 horas después de que el sujeto haya estado expuesto a un agente nervioso.

30 Mientras que en algunos aspectos, la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrar la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I al sujeto expuesto al agente nervioso en una dosis. En otros aspectos, pueden necesitarse dos o más dosis de la composición farmacéutica para administrar la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I al sujeto expuesto al agente nervioso. Por ejemplo, pueden necesitarse 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 dosis de la composición farmacéutica para administrar la cantidad eficaz del compuesto de fórmula I al sujeto expuesto al agente nervioso. Estas dosificaciones adicionales pueden administrarse sustancialmente al mismo tiempo que la primera dosis. En otros aspectos, las dosificaciones adicionales están separadas en el tiempo de la primera dosis. En aquellos aspectos en los que se administran 3 o más dosis, cada dosis puede estar separada en el tiempo de la administración de cualquier otra dosis.

40 Las separaciones de dosis pueden estar separadas 1 o más horas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 horas. En otros aspectos, las separaciones de dosis pueden ser de 1 o más días.

45 De acuerdo con la divulgación, la administración del compuesto de fórmula I al sujeto expuesto al agente nervioso es una terapia complementaria para la exposición al agente nervioso. A los sujetos expuestos a un agente nervioso también se les puede administrar uno o más antídotos contra agentes nerviosos. Una clase de antídotos para la exposición a agentes nerviosos son los reactivadores de la acetilcolinesterasa, por ejemplo el cloruro de asoxima (HI-6). Otra clase de antídotos para la exposición a agentes nerviosos son los antagonistas inversos de los receptores de acetilcolina, por ejemplo, el nitrato de metilo de atropina. A los sujetos expuestos a agentes nerviosos también se les puede administrar medicación anticonvulsiva. Los medicamentos anticonvulsivos ejemplares incluyen aldehídos (por ejemplo, paraldehído), alcoholes alílicos aromáticos (por ejemplo, estiripental), benzodiazepinas (por ejemplo, clobazam, clonazepam, clorazepam, diazepam, midazolam, lorazepam, nitrazepam, temazepam, nimetazepam), barbitúricos (por ejemplo, fenobarbital, metilenobarbital, barbexaclona), bromuros (por ejemplo, bromuro de potasio), carbamatos (por ejemplo, felbamato), carboxamidas (por ejemplo, carbamazepina, oxcarbazepina, acetato de eslicarbazepina), ácidos grasos (por ejemplo, ácido valproico, valproato sódico, divalproex sódico, vigabatrina, pro gabida, tiagabina), topiramato, análogos de GABA (por ejemplo, gabapentina, pregabalina), hidantoínas (por ejemplo, etotoína, fenitoína, mefenitoína, fosfenitoína), oxazolidinedionas (por ejemplo, parametadiona, trimetadiona, etadiona), propionatos (por ejemplo, beclamida), pirimidinedionas (por ejemplo, primidona), pirrolidinas (por ejemplo, brivaracetam, levitiracetam, seletracetam), succinimidas (por ejemplo, ethosuximida, fensuximida, mesuximida), sulfonamidas (por ejemplo, acetazolamida, sulfatiame, metazolamida, zonisamida), triazinas (por ejemplo, lamotrigina), ureas (por ejemplo, feneturida, fenacetemida), valproilamidas (por ejemplo, valpromida, valnoctamida), perampanel y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el medicamento anticonvulsivo es una benzodiazepina, por ejemplo, midazolam. En otros aspectos, el medicamento anticonvulsivo es un barbitúrico. En otros aspectos más, el medicamento anticonvulsivo es una hidantoína. En algunos aspectos, el medicamento anticonvulsivo es paraldehído. En otros aspectos, el medicamento anticonvulsivo es bromuro de potasio. En algunos aspectos, el medicamento

anticonvulsivo es un ácido graso. En otros aspectos, el medicamento anticonvulsivo es topiramato.

En aquellos aspectos en los que al sujeto expuesto al agente nervioso se le administra un antídoto, el compuesto de fórmula I se administra después de que se haya administrado el antídoto. Por ejemplo, el compuesto de fórmula I puede administrarse después de la administración del reactivador de la acetilcolinesterasa y/o después de la administración del antagonista inverso de los receptores de acetilcolina.

En aquellos aspectos en los que al sujeto expuesto al agente nervioso se le administra un medicamento anticonvulsivo, el compuesto de fórmula I puede administrarse simultáneamente con la administración del medicamento anticonvulsivo. El compuesto de fórmula I puede administrarse sustancialmente al mismo tiempo con la administración del medicamento anticonvulsivo, así como, por ejemplo, en el plazo de aproximadamente 5 minutos de la administración del medicamento anticonvulsivo. En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I se administra antes de que se administre el medicamento anticonvulsivo. En otras realizaciones, el compuesto de fórmula I se administra después de la administración del medicamento anticonvulsivo.

La composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse por vía intravenosa. En otros aspectos, la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse por vía transdérmica. En otros aspectos, la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse por vía intramuscular. En otros aspectos, la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse por vía intraósea. En otros aspectos, la composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede administrarse por vía subcutánea.

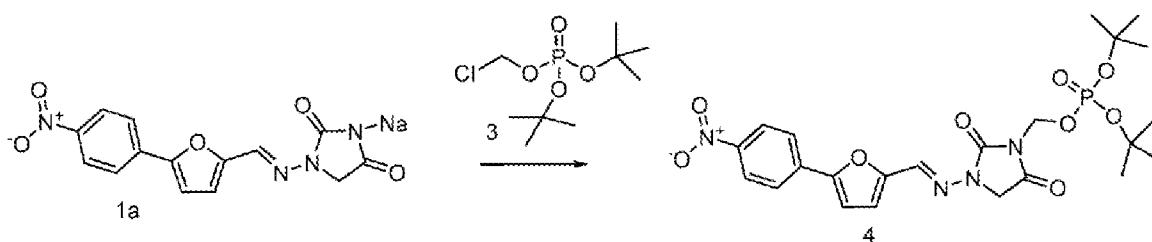
Las composiciones farmacéuticas preferidas para su uso en los métodos descritos incluyen el compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas preferidas comprenden el compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, manitol, un polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80), una povidona (por ejemplo, povidona K12), un ajustador de pH opcional (por ejemplo, NaOH o HCl) y agua.

De acuerdo con la divulgación, la administración de un compuesto y/o composición farmacéutica como se divulga en la presente producirá una AUC sustancialmente equivalente en el sujeto, en comparación con la administración de un producto de dantroleno incluido en la lista de referencia, como RYANODEX®. En otros aspectos, la administración de un compuesto y/o composición farmacéutica como se divulga en la presente producirá una AUC sustancialmente equivalente en el sujeto, en comparación con una composición comparativa. Por ejemplo, en algunos aspectos, tras la administración a un sujeto, los intervalos de confianza (IC) del 90% de la media relativa de $AUC_{(0-t)}$ y $AUC_{(0-\infty)}$ de dantroleno de una composición farmacéutica divulgada estarán dentro del 80% al 125% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120% o 125%) de la media relativa de $AUC_{(0-t)}$ y $AUC_{(0-\infty)}$, respectivamente, de dantroleno tras la administración de un producto de dantroleno listado de referencia, por ejemplo, RYANODEX®. En algunos aspectos, tras la administración a un sujeto, los intervalos de confianza (IC) del 90% de la media relativa de $AUC_{(0-t)}$ y $AUC_{(0-\infty)}$ de dantroleno de una composición farmacéutica divulgada estarán dentro del 80% al 125% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 105%, 110%, 115%, 120% o 125%) de la media relativa del $AUC_{(0-t)}$ y $AUC_{(0-\infty)}$, respectivamente, del dantroleno tras la administración de un producto comparativo.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar algunos de los conceptos descritos en la presente divulgación. Aunque se considera que cada ejemplo proporciona realizaciones individuales específicas de la divulgación, no debe considerarse que ninguno de los Ejemplos limita las realizaciones más generales descritas en la presente. En los siguientes ejemplos, se ha procurado garantizar la exactitud con respecto a las cifras usadas (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales.

EJEMPLOS

Ejemplo 1



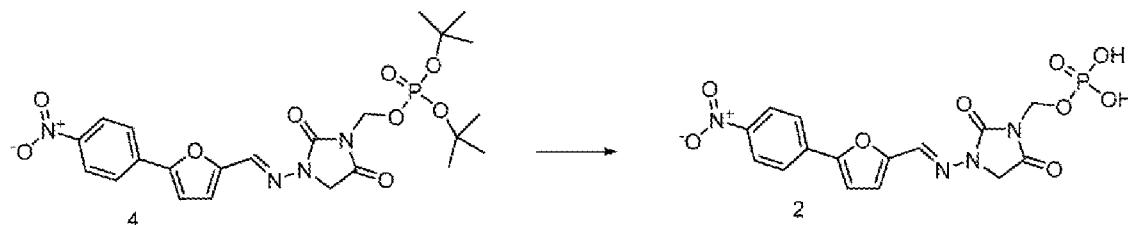
65 Se disolvió dantroleno sódico (1 eq.) en dimetilformamida anhidra. Se añadió el reactivo 3 (1 eq.) y la mezcla de la reacción se agitó a 60° C bajo nitrógeno. Después de 4 h, se añadió otro equivalente de reactivo 3 y la reacción

se agitó a 60° C durante la noche. A continuación, la reacción se diluyó con acetato de etilo y se lavó dos veces con cloruro sódico saturado. Se separaron las capas. Las capas orgánicas se secaron sobre sulfato sódico y se concentraron al vacío. El producto bruto se purificó usando cromatografía en gel de sílice. El producto deseado se aisló con una pureza del 90-95%. La ¹H NMR era congruente con la prevista para el producto deseado.

Ejemplo 1, Método A se secó **1a** con P₂O₅ durante una noche. A una mezcla de **1a** (500 mg, 1,48 mmol) en DMF (10 ml) se añadió **3** (0,84 ml, 3,72 mmol) seguido de NaI (245 mg, 1,63 mmol) a 0° C. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 64 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (30 ml) y salmuera (20 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con agua (2x15 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó. El residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida (dos veces), eluyendo con un 0-10% de MeOH/CH₂Cl₂ para proporcionar el compuesto deseado **4** (355 mg, 45%) como un sólido amarillo.

Ejemplo 1, Método B: se secó **1a** con P₂O₅ durante una noche. A una mezcla de **1a** (8,0 g, 23,8 mmol) en DMF (160 ml) se le añadió **3** (6,5 ml, 28,79 mmol) seguido de NaI (4,28 g, 28,55 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (250 ml) y salmuera (60 ml). La capa orgánica se separó, se lavó con agua (2x75 ml), se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó. El residuo se trituró con CH₂Cl₂-hexanos para dar un sólido amarillo (~7 g). Este sólido se purificó por cromatografía ultrarrápida (dos veces, SiO₂ desactivado), eluyendo con un 0-10% de MeOH/CH₂Cl₂ para proporcionar el compuesto **4** deseado (1,92 g, 15%) como un sólido amarillo.

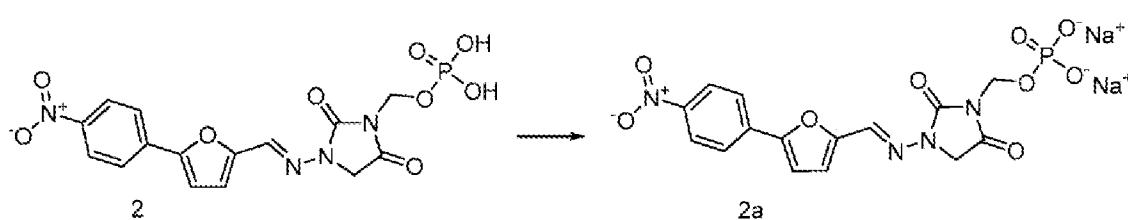
Ejemplo 2



Se trató una muestra del compuesto **4** con 1 ml de mezcla 9/1 de ácido trifluoroacético/agua durante 20-30 min a temperatura ambiente. El exceso de TFA se eliminó inmediatamente usando alto vacío y el sólido resultante se recogió por filtración, se lavó con agua (5 ml) y se secó al aire. El material de partida, la mezcla de la reacción y el producto final se analizaron por LC/MS para determinar si **2** revierte a dantroleno durante las condiciones de desprotección. No se observó reversión de **2** a dantroleno. La ¹H NMR del producto era congruente con la prevista para el producto deseado.

Ejemplo 2, Método A: A una mezcla de **4** (886 mg, 1,65 mmol) en CH₂Cl₂ (9 ml) se le añadió TFA (9 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El solvente se evaporó en un rotavapor hasta la sequedad. El residuo resultante se trituró con hexanos durante 1 h y el sólido amarillo se filtró y se secó para proporcionar el compuesto deseado **2** (660 mg, 94%).

Ejemplo 3



Se mezclaron 50 mg de **2** con 3 ml de metanol (solución completa) y se aplicaron a 1 g de columna de intercambio iónico Na⁺. El compuesto se eluyó con metanol y después de liofilización dio 18 mg (36% de recuperación) de un sólido naranja. Este material se disolvió en agua y se tituló cuidadosamente a pH 8,5 mediante la adición de pequeñas alícuotas de NaOH 0,1 M, con agitación. A continuación, la solución se liofilizó para proporcionar el sólido naranja, el compuesto **2a**. La LC/MS de la muestra antes y después de la liofilización fue idéntica, lo que indica que no se produjo reversión a dantroleno durante el intercambio iónico. La ¹H NMR del producto era congruente con la prevista para el producto deseado.

Ejemplo 3, Método A: A una suspensión agitada de **2** (500 mg, 1,17 mmol) en agua (63 ml, grado HPLC) se le añadió NaOH 0,1 N (23,6 ml, 2,34 mmol) a temperatura ambiente en alícuotas de 650 µl seguido inmediatamente por un vórtex rápido hasta que el pH alcanzó 8,5. La solución se filtró, y el filtrado se liofilizó durante la noche para dar

el compuesto del título **2a** (530 mg, 96%) como un sólido amarillo. MS (Cl) m/z=424.9 [M]⁺. ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 8.08 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.72 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.59 (s, 1H), 6.98 (d, J=3.6 Hz, 1H), 6.86 (d, J=3.6 Hz, 1H), 5.19 (d, J=6.0 Hz, 2H), 4.32 (s, 2H).

5 **Ejemplo 4. Conversión de 2a en dantroleno por fosfatasa alcalina a 25º C**

Incubación con fosfatasa alcalina

10 El profármaco 2a se incubó con fosfatasa alcalina purificada a 25º C. La mezcla de la reacción final contenía aproximadamente 20 µg/ml de profármaco y 50 µU/µl de fosfatasa alcalina (de intestino de ternera, Sigma N° 11097075001) en 1xPBS, pH 7,4. También se preparó una mezcla de control que contenía 20 µg/ml de profármaco sin enzima en 1xPBS pH 7,4. La mezcla de la reacción enzimática se almacenó a 25º C y se inyectaron alícuotas de 10 µl para analizarlas por HPLC a las 0,9 h, 3,2 h, 5,5 h, 7,7 h y 19,9 h. La mezcla de control también se almacenó a 25º C y se inyectaron alícuotas de 10 µl para analizarlas por HPLC a las 1,5 h, 3,8 h, 6,6 h, 8,3 h y 20,4 h.

15 **Análisis de muestras por HPLC**

20 El análisis se realizó usando un sistema Waters 2695 Alliance equipado con un detector PDA y una columna Restek Ultra C18 (5 um, 250x4,6 mm) mantenida a 25º C. Las muestras se analizaron usando un método de gradiente con una fase móvil A que contenía acetonitrilo y una fase móvil B que contenía 33:67 de acetonitrilo:tampón de fosfato pH 6,9. La columna se equilibró con un 100% de fase móvil B y se mantuvo a esta composición durante 19 minutos. A continuación, la fase móvil A se incrementó al 55% durante 5 minutos. La columna se lavó con un 55% de A durante 2 minutos, se devolvió al 100% de B durante 2 minutos y se volvió a equilibrar con un 100% de B durante 5 minutos para un tiempo de ejecución total de 33 minutos. Se inyectó una muestra de 10 µl y los analitos se detectaron por UV a 375 nm. El profármaco eluyó aproximadamente a los 3,1 minutos y el dantroleno eluyó aproximadamente a los 15,4 minutos. Los cambios en el área del pico se monitorizaron a lo largo del tiempo para determinar la conversión del profármaco en dantroleno. En la Figura 1 y la Figura 2 se muestran los gráficos del área del pico a lo largo del tiempo.

25 **Ejemplo 5. Conversión de 2a en dantroleno en plasma de rata a 22º C**

30 **Incubación con plasma**

35 Se realizó un experimento in vitro añadiendo 40 µl de aproximadamente 10 mg/ml de 2a disuelto en DMF a 360 µl de plasma de rata previamente congelado de ratas macho Sprague Dawley a 22º C. El plasma enriquecido se almacenó a 22º C y se tomaron alícuotas de 50 µl a los 25 min, 3 h y 20 h después del enriquecimiento. Las alícuotas se trataron inmediatamente con 50 µl de acetonitrilo y se mezclaron mediante agitación en vórtex seguido de centrifugación a 4000 rpm durante 5 min a 25º C. Se diluyeron 50 veces 50 µl de sobrenadante en 33:67 de tampón de acetonitrilo: fosfato pH 6,9 y se transfirieron a un vial de vidrio para su análisis por HPLC.

40 **Análisis de muestras por HPLC**

45 Los análisis se realizaron usando un sistema Waters 2695 Alliance equipado con un detector PDA y una columna Restek Ultra C18 (5 um, 250x4,6 mm) mantenida a 25º C. Las muestras se analizaron usando un método de gradiente con una fase móvil A que contenía acetonitrilo y una fase móvil B que contenía 33:67 de acetonitrilo: tampón de fosfato pH 6,9. La columna se equilibró con un 100% de fase móvil B y se mantuvo a esta composición durante 19 minutos. La columna se equilibró con un 100% de fase móvil B y se mantuvo en esta composición durante 19 minutos. A continuación, la fase móvil A se incrementó al 55% durante 5 minutos. La columna se lavó con un 55% de A durante 2 minutos, se devolvió al 100% de B durante 2 minutos y se volvió a equilibrar con un 100% de B durante 5 minutos para un tiempo total de 33 minutos. Se inyectó una muestra de 10 ul y los analitos se detectaron por UV a 375 nm. El profármaco eluyó aproximadamente a los 3,1 minutos y el dantroleno eluyó aproximadamente a los 15,4 minutos. Los cambios en el área del pico se controlaron con el tiempo para determinar la conversión del profármaco en dantroleno. Véase la Figura 3.

55 **Ejemplo 6. Conversión de 2a en dantroleno en plasma a 37º C**

60 **Incubación con plasma**

65 Se realizó un experimento in vitro añadiendo 60 µl de aproximadamente 10 mg/ml de profármaco disuelto en DMF a 690 µl de plasma de rata congelado previamente de ratas macho Sprague Dawley a 37º C. El plasma enriquecido se almacenó a 37º C y se tomaron alícuotas de 50 µl a los 5, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 100 min, 2,5 h, 3,5 h, 4 h, 5 h y 6,5 h después del enriquecimiento. Las alícuotas se trataron inmediatamente con 50 µl de acetonitrilo y se mezclaron mediante agitación en vórtex seguido de centrifugación a 4000 rpm durante 5 min a 25º C. Se transfirieron 50 µl de sobrenadante a un vial de vidrio para su análisis por HPLC.

70 **Análisis de muestras por HPLC**

Los análisis se realizaron usando un sistema Waters 2695 Alliance equipado con un detector PDA y una columna Restek Ultra C18 (5 um, 250x4,6 mm) mantenida a 25º C. Las muestras se analizaron usando un método de gradiante con fase móvil A que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% en agua y fase móvil B que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% en acetonitrilo a un caudal de 1,0 ml/min. La columna se equilibró con un 67% de fase móvil A/33% de fase móvil B y se mantuvo en esta composición durante 19 minutos. Después se aumentó la fase móvil B al 70% durante 5 min. La columna se lavó con 70% de B durante 2 min, se volvió a 33% de B durante 2 min, y luego se reequilibró con 33% de B durante 15 min para un tiempo total de ejecución de 47 min. Se inyectó una muestra de 5 ul y los analitos se detectaron por UV a 375 nm. El profármaco eluyó aproximadamente a los 6,5 minutos y el dantroleno eluyó aproximadamente a los 18,5 minutos. Los cambios en el área del pico se monitorizaron a lo largo del tiempo para determinar la conversión del profármaco en dantroleno. El gráfico del área del pico del profármaco a lo largo del tiempo se muestra en la Figura 4.

Ejemplo 7. Biodisponibilidad del dantroleno después de la administración de 2a a ratas

Métodos

El compuesto **2a** se formula a 8 mg/ml en manitol acuoso al 5% (como modificador de la tonicidad), a pH 8,0. La formulación se administra IV, SC o IM a ratas Harlan Sprague Dawley canuladas (3 ratas/grupo) de Envigo RMS Inc (Indianápolis, IN). Cada grupo recibe 7,5 mg/kg de 2a, lo que equivale a 5 mg/kg de equivalentes de dantroleno (DE). Se recoge sangre completa (0,1 ml) a través de un catéter en la vena yugular a las 0, 0,033 (sólo IV), 0,083, 0,167, 0,33, 0,66, 1, 3, 6 y 9 horas. Inmediatamente después de la recogida, los 0,1 ml de sangre completa se añaden a 0,3 ml de acetonitrilo para inactivar la reacción de bioconversión del profármaco. A continuación, las muestras se colocan en hielo húmedo hasta que se centrifugan para eliminar el precipitado. La matriz de sangre completa precipitada se analiza para **2a**, dantroleno y el metabolito 5-OH dantroleno usando una columna Phenomenex Synergi 4 µm Polar RP de 80Å, 75x2 mm en un sistema Waters Acquity UPLC conectado a un sistema Applied Biosystems/MDS Sciex API 6500 LC/MS/MS. Las muestras se cuantifican basándose en curvas estándar preparadas con cada analito en la matriz de sangre completa precipitada.

De manera similar, se miden las concentraciones plasmáticas de dantroleno a lo largo del tiempo después de la administración de Ryanodex por vía intravenosa a ratas a una dosis de 5 mg kg⁻¹. Como el Ryanodex es el hidrato 3,5 de dantroleno sódico, esto es equivalente a una dosis de 3,9 mg kg⁻¹ de dantroleno sobre una base molar, (es decir, 3,9 mg kg⁻¹ de equivalentes de dantroleno (DE)).

El área bajo la curva (AUC) se calcula usando la regla trapezoidal con el software SigmaPlot 12.5.

Resultados

La administración de 2a a ratas por vía IV, IM y SC dará como resultado la aparición rápida de dantroleno en la sangre.

Ejemplo 8. Biodisponibilidad de dantroleno después de la administración de compuestos de la divulgación a ratas.

Métodos

Los compuestos de la divulgación se formulan en manitol acuoso al 5% (como modificador de la tonicidad). La formulación se administra por vía IV, SC o IM a ratas Harlan Sprague Dawley canuladas (3 ratas/grupo) de Envigo RMS, Inc. (Indianápolis, IN). Cada grupo recibe una cantidad equivalente a 5 mg/kg de equivalentes de dantroleno (DE). Se recoge sangre completa (0,1 ml) a través de un catéter de vena yugular a las 0, 0,033 (sólo IV), 0,083, 0,167, 0,33, 0,66, 1, 3, 6 y 9 horas. Inmediatamente después de la recogida, los 0,1 ml de sangre completa se añaden a 0,3 ml de acetonitrilo para inactivar la reacción de bioconversión del profármaco. A continuación, las muestras se colocan en hielo húmedo hasta que se centrifugan para eliminar el precipitado. La matriz de sangre completa precipitada se analiza para el profármaco original, dantroleno, y el metabolito 5-OH dantroleno usando una columna Phenomenex Synergi 4 µm Polar RP 80 Å, 75x2 mm en un sistema Waters Acquity UPLC acoplado a un sistema LC/MS/MS Applied Biosystems/MDS Sciex API 6500. Las muestras se cuantifican basándose en curvas estándar preparadas con cada analito en la matriz de sangre completa precipitada.

De manera similar, se miden las concentraciones plasmáticas de dantroleno a lo largo del tiempo después de la administración de Ryanodex por vía intravenosa a ratas a una dosis de 5 mg kg⁻¹. Como el Ryanodex es el hidrato 3,5 de dantroleno sódico, esto equivale a una dosis de 3,9 mg kg⁻¹ de dantroleno sobre una base molar, (es decir, 3,9 mg kg⁻¹ de equivalentes de dantroleno (DE)).

El área bajo la curva (AUC) se calcula usando la regla trapezoidal con el software SigmaPlot 12.5.

Resultados

La administración de los compuestos de la divulgación a ratas por vía IV, IM y SC dará como resultado una aparición rápida de dantroleno en la sangre.

5

Ejemplo 9

Visión de conjunto del estudio

10 El objeto de estudio es determinar si un compuesto de la divulgación (por ejemplo, el compuesto 2a) tiene efectos neuroprotectores en un modelo de supervivencia en mamíferos, por ejemplo, perros, cerdos, conejos, roedores (por ejemplo, ratas, ratones, cobaya) y primates (por ejemplo, mono, chimpancé). Un modelo ejemplar es un modelo de supervivencia a GD (somán) en ratas.

15 Se administrarán dosis únicas de un compuesto de la divulgación tras la aparición de convulsiones inducidas por agentes nerviosos. Por ejemplo, se administran dosis únicas del compuesto equivalentes a de 1 mg/mg a 30 mg/kg de dantroleno (por ejemplo, 10 mg/kg o 30 mg/kg). La administración del compuesto de la divulgación puede ser por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular, transdérmica, intraósea. Por ejemplo, la dosis puede administrarse por vía intravenosa.

20 La supervivencia puede verse facilitada por el tratamiento con un antídoto contra agentes nerviosos. Por ejemplo, antes de la exposición al agente nervioso puede administrarse cloruro de asoxima (HI-6), por ejemplo, treinta minutos antes de la inyección subcutánea (SQ) de somán, nitrato de metilo de atropina un minuto después de la inyección SQ de somán y midazolam veinte minutos después del inicio de las convulsiones inducidas por somán que alcanzan una puntuación Racine de por lo menos 3.

25 Los controles incluyen un grupo de animales no tratados (sin tratamiento previo) y otro grupo que recibirá agua estéril después del inicio de las convulsiones inducidas por el agente nervioso (por ejemplo, 50 minutos después del inicio de las convulsiones inducidas por el agente nervioso).

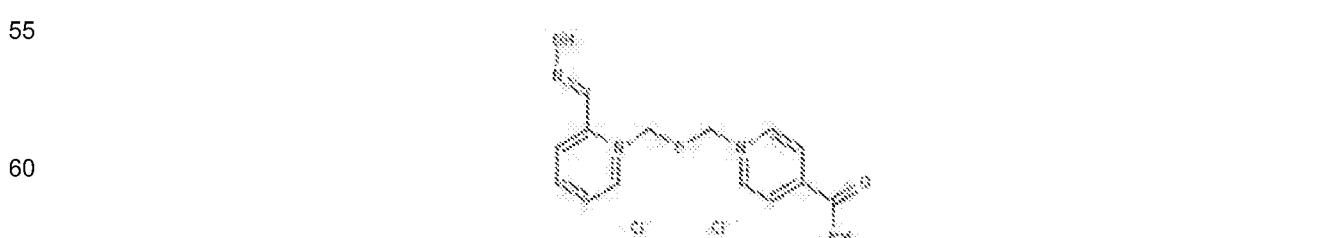
30 35 Se llevan a cabo una serie de pruebas neuroconductuales durante un periodo de tiempo, por ejemplo, aproximadamente 28 días después de la exposición a una dosis única de agente nervioso. Al día siguiente del periodo de tiempo de pruebas (por ejemplo, el día 29), se sacrifica a todos los animales bajo anestesia, por ejemplo, mediante exsanguinación y perfusión intracardíaca. Se recoge el cerebro de cada animal para un examen neuropatológico microscópico y se recoge el corazón de cada animal para un posible examen patológico.

Materiales

40 **Somán (GD)** - diluido con cloruro sódico al 0,9%. El somán es un agente nervioso organofosforado que desactiva la acetilcolina esterasa (AChE) al formar un aducto con la enzima.

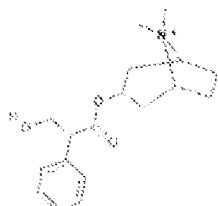
- 45 • Nombre químico: Pinacolil metil fosfonofluoridato
 - Fórmula: C₇H₁₆FO₂P
 - Peso molecular: 182,17
 - MRIGlobal Lote N°: GD090415-DOC-1
 - ID de Norma primaria: 13972-49-3
 - Pureza: 100%.
 - Condiciones de almacenamiento: <4º C.
- 50 **HI-6:** Nombre químico: [(E)-[1-[(4-carbamoipiridin-1-ilo-1-il)metoximetil]piridin-2-ilideno]metil]-oxoazanio;metanosulfonato (cloruro de asoxima)

55 Estructura:



Nitrato de metilo de atropina: Nombre químico: (8,8-dimetil-8-azoniabiciclo[3.2.1]octan-3-il) 3-hidroxi-2-fenilpropanoato;nitrato

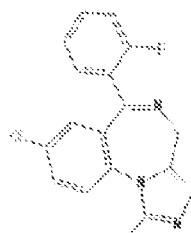
5 Estructura:



10 Fórmula: C₁₈H₂₆N₂O₆
Peso molecular: 366.414

Midazolam: Nombre químico: 8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepin

15 Estructura:



20 Fórmula: C₁₈H₁₃ClFN₃
Peso molecular: 325.771

35 Dosis

HI-6, somán, nitrato de metilo de atropina y midazolam: Pueden seleccionarse dosis únicas de HI-6 (IP, 125 mg/kg); somán (SC, 154 µg/kg, 1,4x LD₅₀), nitrato de metilo de atropina (IM, 2 mg/kg); y midazolam (IM, 2 mg/kg). Se espera que este régimen provoque convulsiones que alcancen una puntuación de Racine de por lo menos 3 y un número aceptable de supervivientes para el estudio de seguimiento.

Compuestos de la divulgación: puede administrarse cualquier compuesto de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en la presente. Un compuesto preferido es el compuesto 2a.

45 Preparación de la dosis

En los experimentos en los que se usa GD, el GD se prepara en cloruro sódico al 0,9% enfriado con hielo, de acuerdo con SOP MRI-5821 "Preparación de patrones y muestras a partir de soluciones diluidas de evaluación de pruebas y desarrollo de la investigación (RDTE)".

50 Escala de Racine

- 1= inmovilización y mirada fija
- 2= asentimiento con la cabeza, "sacudidas de perro mojado"
- 3= clonus de la extremidad anterior
- 4= clonus bilateral de la extremidad anterior
- 5= clonus bilateral de la extremidad anterior, encabritamiento y pérdida de equilibrio

55 Pruebas neuroconductuales

Las áreas cerebrales dañadas por la exposición al somán pueden incluir el hipocampo y las cortezas entorrinal, frontal y parietal. Estas zonas contienen estructuras y circuitos neuronales para el aprendizaje, la formación de la memoria, el procesamiento de la información y otros procesos cognitivos. Para evaluar los posibles efectos neuroprotectores del compuesto de la divulgación, se evalúa a los animales usando una serie de pruebas de

comportamiento que requieren aprendizaje, memoria, integración sensorial motora y respuestas adaptativas. Ejemplos de tales pruebas incluyen: 1) Prueba de preferencia por la sacarosa y 2) Prueba de natación forzada.

Prueba de preferencia por la sacarosa

5 La prueba de preferencia por la sacarosa (SPT) utiliza la inclinación natural de las ratas a preferir el agua azucarada al agua normal. Es una prueba establecida para medir el comportamiento de búsqueda de placer (hedonismo) o la falta del mismo (anhedonia) y requiere que los animales se adapten al cambio en la colocación a la izquierda frente a la derecha de botellas que contienen agua del grifo y agua con un 1% de sacarosa.

10 Las ratas se alojan individualmente con acceso a voluntad a comida y agua (una botella de agua en cada jaula) antes del SPT. Para la parte de aclimatación del SPT, se introducen 2 botellas de agua en la jaula de cada rata durante 5-6 días. Las botellas de agua estaban provistas de tubos con cazoleta que minimizaban las fugas y se pesaban aproximadamente cada 24 horas. Después de la fase de aclimatación, se llena una botella de agua con aproximadamente 200 ml de solución de sacarosa al 1% y la otra botella de agua con aproximadamente 200 ml de agua del grifo. Veinticuatro horas después, se registra la cantidad de líquido que queda en cada botella. A continuación, se cambia la posición D/I de las botellas y, veinticuatro horas después, se vuelve a registrar la cantidad de líquido que queda en cada botella. La cantidad (ml) de solución de sacarosa consumida se expresa como porcentaje del volumen total de líquido consumido (agua con sacarosa más agua) en cada uno de los dos períodos de 24 horas y se compara entre grupos y días.

Prueba de natación forzada

25 La prueba de natación forzada (FST) fue desarrollada a finales de 1970 por Porsolt como una forma rápida de evaluar la eficacia de los fármacos antidepresivos en roedores. Se interpretó que el aumento de la inmovilidad que se produce hacia el final del FST de 5 minutos en roedores no tratados ("normales") reflejaba "desesperación conductual", y su reversión con fármacos antidepresivos se correlacionó con la eficacia antidepresiva de estos agentes en las personas. Sin embargo, la validez de constructo de esta prueba se ha cuestionado por muchas razones, que incluyen: 1) los efectos agudos de los antidepresivos se prueban en el FST mientras que en pacientes clínicamente deprimidos, los fármacos requieren de 4 a 6 semanas para la mejora clínica; 2) la variable dependiente en el FST es la respuesta aguda del animal a la prueba y no una característica del animal; y 3) la interpretación del comportamiento flotante como "desesperación conductual" es antropomórfica. Ahora se cree que la inmovilidad progresiva observada en las ratas no tratadas refleja una respuesta adaptativa al estrés agudo de ser colocadas en un recipiente sin posibilidad de escapar.

35 En el FST, la actividad natatoria y la inmovilidad se miden en una cámara cilíndrica de vidrio (46 cm de altura x 30 cm de diámetro) llena de agua (30 cm de altura, 25° C). Se usan termómetros para garantizar que la temperatura del agua es constante (24-26° C) para todos los animales. Se llevan a cabo dos sesiones de natación, una como "preprueba" inicial de 15 minutos, seguido 24 horas más tarde por una segunda "prueba" de 5 minutos. Las sesiones de prueba se graban en video. Se puntúa el tiempo pasado nadando activamente y el tiempo pasado inmóvil por cada minuto del FST.

Neuropatología

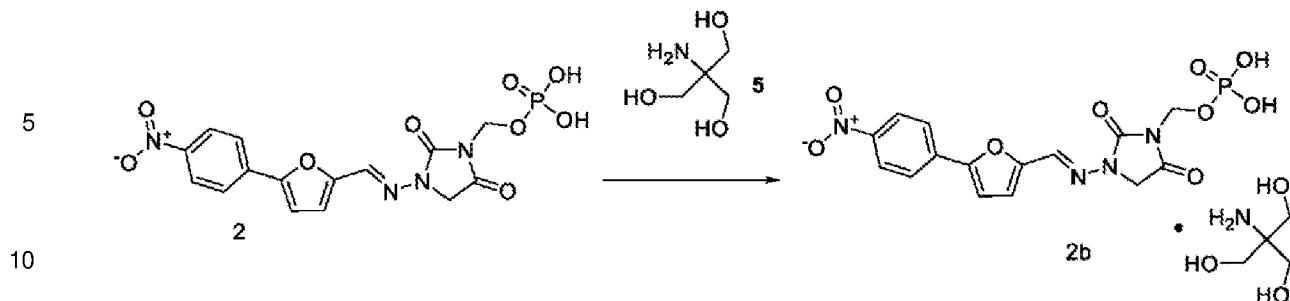
45 Las 7 secciones cerebrales de cada animal se evalúan microscópicamente usando un sistema de puntuación semicuantitativo de 6 puntos. Las lesiones microscópicas se califican en una escala de 6 puntos:

- 0 = normal
- 1 = 1-5 células afectadas por campo microscópico de 40x
- 2 = 6-20 células afectadas por campo microscópico de 40x
- 3 = 21-50 células afectadas por campo microscópico de 40x
- 4 = 50%-80% de las células afectadas por campo microscópico de 40x
- 5 = >80% de las células afectadas por campo microscópico de 40x

55 **Ejemplo 10. Preparación de 2b**

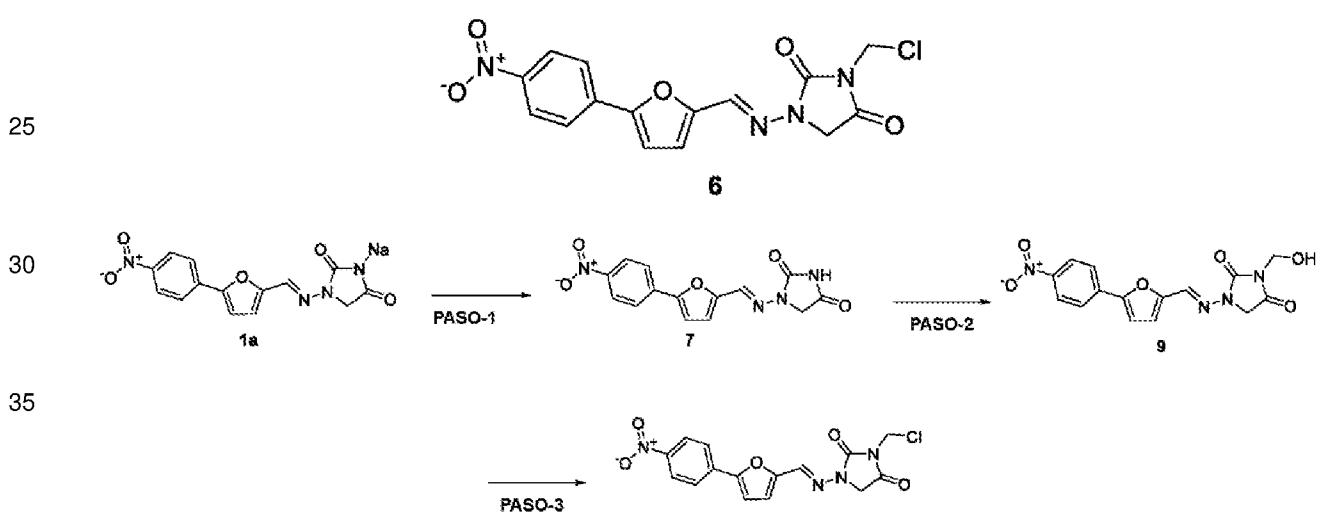
60

65



A una suspensión agitada de 2 (100 mg, 0,23 mmol) en agua (12 ml, grado HPLC) se le añadió Tris (5, 57 mg, 0,47 mmol) disuelto en agua (5 ml) gota a gota a temperatura ambiente. El pH de la solución final fue de 6,6. La solución se filtró y el filtrado se liofilizó durante la noche para dar el compuesto del título 2b (150 mg, 95%) como un sólido amarillo. MS (Cl) m/z=424.9 [M]+. ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.24 (m, 2H), 7.93 (m, 2H), 7.73 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 6.97 (m, 1H), 5.20 (m, 2H), 4.40 (m, 2H), 3.63 (m, 15H).

Ejemplo de referencia 11

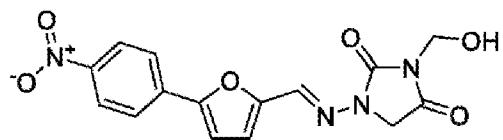


PASO 1: se secó **1a** con P_2O_5 durante la noche. A una mezcla de **1a** (1,0 g, 2,97 mmol) en DMF (20 ml) se le añadió ácido acético glacial (340 μ l, 5,95 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla se vertió sobre hielo triturado, el sólido se filtró y se lavó con agua. El sólido húmedo resultante se secó sobre P_2O_5 anhídrico durante la noche para obtener el compuesto **7** deseado (920 mg, 98%) como un sólido amarillo.

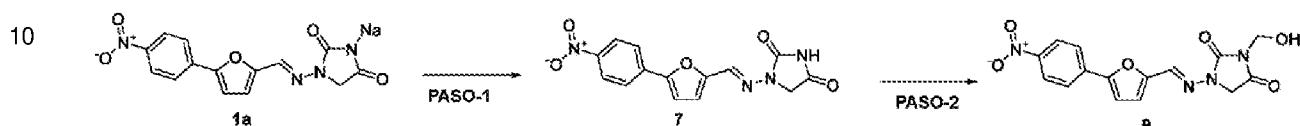
PASO 2: A una suspensión de **7** (1,35 g, 4,29 mmol) en agua (45 ml) se le añadió formalina (4,35 ml, 57,45 mmol, 37% de formaldehído en agua) seguido de K_2CO_3 (51 mg, 0,37 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de la reacción se filtró, y el sólido amarillo se lavó con formaldehído acuoso al 3% y se secó al aire durante 24 h para dar el compuesto deseado **9** (1,2 g, 82%).

PASO 3: A una solución de 9 (615 mg, 1,78 mmol) en DMF:Acetona (40 ml, 15:25 ml) se le añadió PCl₃ (1,2 ml, 13,71 mmol) lentamente a 0° C. La mezcla de la reacción se agitó durante 10 min a 0° C y 2 h a temperatura ambiente. Después la mezcla se vertió sobre hielo triturado, y el sólido amarillo resultante se filtró, se lavó con agua (3x50 ml) y se secó sobre P₂O₅ al vacío durante 16 h para dar el compuesto deseado 6 (600 mg, 92%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.33 (d, J=8.5 Hz, 2H), 8.03 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.48 (d, J=3.3 Hz, 1H), 7.11 (d, J=3.6 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 4.53 (s, 2H).

60 Ejemplo de referencia 12



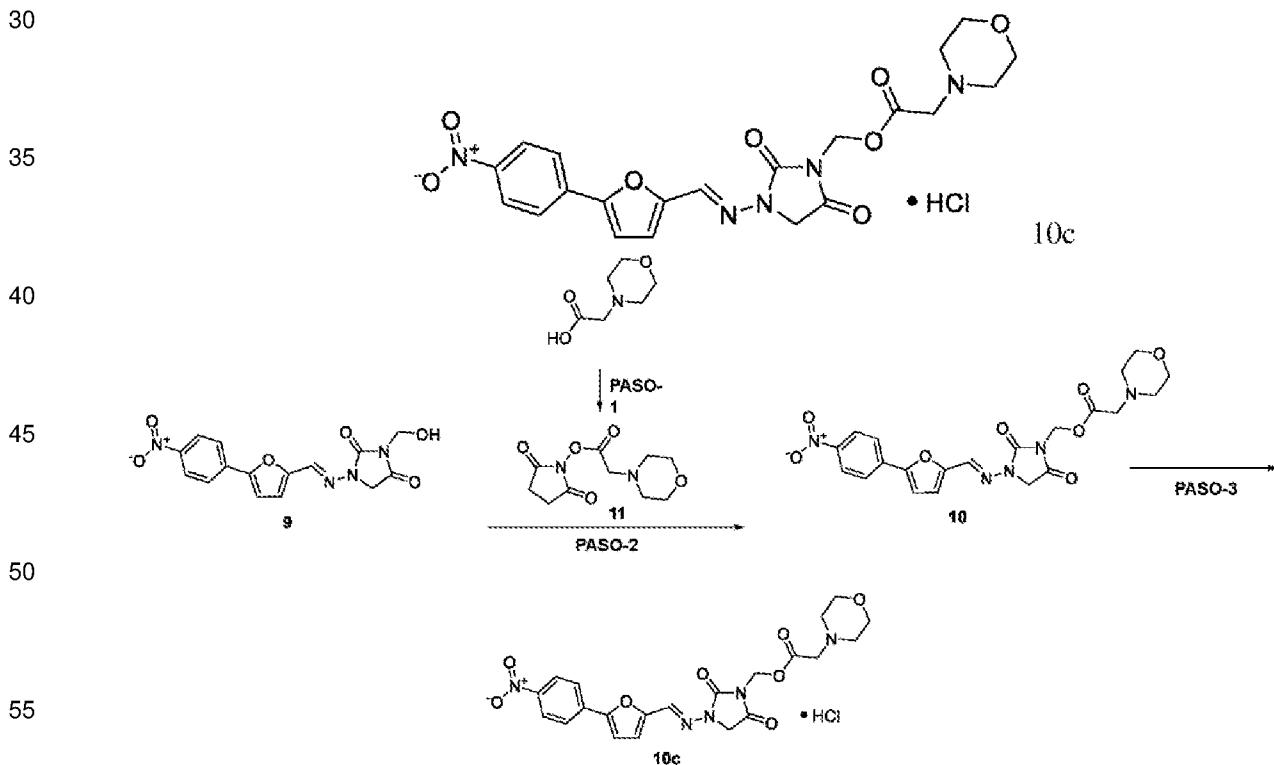
5



PASO 1: se secó **1a** con P_2O_5 durante la noche. A una mezcla de **1a** (1,0 g, 2,97 mmol) en DMF (20 ml) se le añadió ácido acético glacial (340 μl , 5,95 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de la reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla se vertió sobre hielo triturado, el sólido resultante se filtró y se lavó con agua. El sólido húmedo se secó sobre P_2O_5 anhídrico durante la noche para obtener el compuesto deseado **7** (920 mg, 98%) como un sólido amarillo.

PASO 2: A una suspensión de **7** (90 mg, 0,28 mmol) en agua (2,6 ml) se le añadió formalina (0,29 ml, 3,83 mmol, 37% de formaldehído en agua) seguido de K₂CO₃ (3,4 mg, 0,02 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de la reacción se filtró y el sólido amarillo se lavó con formaldehído acuoso al 3% y se secó al aire durante 24 h para dar el compuesto deseado **9** (86 mg, 88%). MS (Cl) m/z=343 [M]⁺. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.32 (d, J=9.0 Hz, 2H), 8.03 (d, J=9.1 Hz, 2H), 7.83 (s, 1H), 7.47 (d, J=3.6 Hz, 1H), 7.08 (d, J=3.6 Hz, 1H), 6.52 (t, 1H), 4.85 (d, J=7.1 Hz, 2H), 4.45 (s, 2H).

Ejemplo de referencia 13



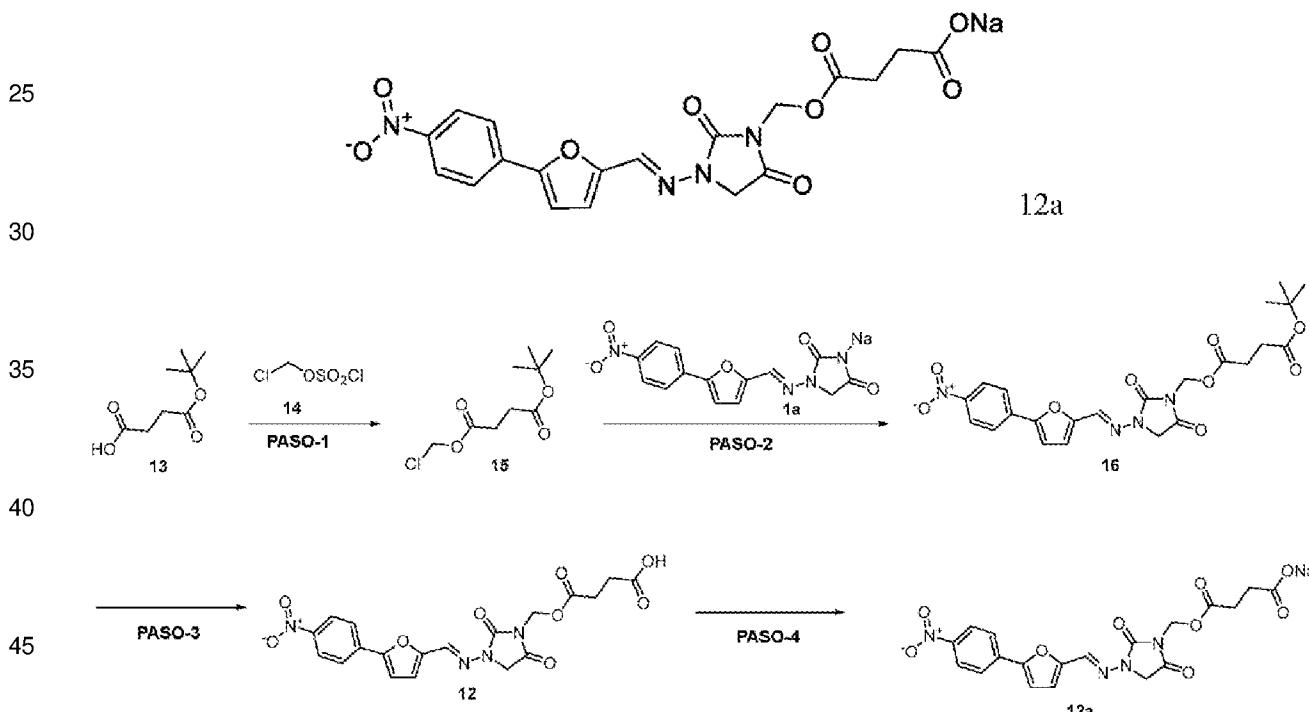
PASO 1: Se disolvió DMF anhídrico (0,8 ml, 10,33 mmol) en tetrahidrofurano anhídrico (13 ml). Esta solución se añadió gota a gota a una solución agitada de cloruro de tionilo (0,75 ml, 10,33 mmol) disuelto en tetrahidrofurano (9 ml) y se enfrió en un baño de hielo. Tras la adición completa y 30 minutos en hielo, se retiró el baño de hielo y se añadió N-hidroxisuccinimida sólida (832 mg, 7,23 mmol) (que se disolvió completamente) seguido inmediatamente de la adición de ácido acético de morfolina sólido prepolymerizado (1,0 g, 6,88 mmol). El ácido morfolino acético se disolvió lentamente dando una solución homogénea que se enturbió rápidamente. La reacción se dejó agitando enérgicamente durante toda la noche a temperatura ambiente. El sólido blanco se lavó con tetrahidrofurano y se secó al vacío, para dar el compuesto deseado **11** (1,6 g, 96%) como sólido blanco.

5 **PASO 2:** A una solución de **9** (660 mg, 1,92 mmol) y **11** (928 mg, 3,83 mmol) en DMF anhidra (12 ml) se le añadió trietilamina (0,39 ml, 2,8 mmol). La mezcla resultante se agitó durante una noche a 60° C. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente y se purificó por cromatografía en columna de fase inversa usando acetona-tríptico-agua como eluyente. Las fracciones de columna se analizaron por HPLC y las fracciones que contenían producto se liofilizaron para obtener el compuesto bruto con una pureza del 50%. Este producto bruto se purificó de nuevo por HPLC preparativa usando acetona-tríptico-agua. La liofilización de las fracciones puras dio el compuesto del título **10** (100 mg, 10%) como un sólido amarillo.

10 **PASO 3:** A una solución agitada de **10** (75 mg, 0,16 mmol) en 1,4-dioxano anhidro (4 ml) se le añadió HCl (0,3 ml, 4N en 1,4-Dioxano) a temperatura ambiente y la mezcla resultante se agitó durante 2 h. Los solventes se evaporaron en un rotavapor hasta la sequedad. El residuo resultante se disolvió en agua y se liofilizó durante la noche para obtener **10c** (75 mg, 94%).

15 MS (Cl) m/z=472.1 [M]⁺. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.33 (d, J=8.8 Hz, 2H), 8.03 (d, J=9.1 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.49 (d, J=3.6 Hz, 1H), 7.11 (d, J=4.1 Hz, 1H), 5.60 (s, 2H), 4.54 (s, 2H), 3.32-3.81 (m, 10H). ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 8.17 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.81 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.60 (s, 1H), 6.93-7.02 (m, 1H), 6.88-6.92 (m, 1H), 5.73 (s, 2H), 4.39 (s, 2H), 4.26 (s, 2H), 3.90-4.09 (m, 4H), 3.30-3.52 (m, 4H).

20 **Ejemplo de referencia 14**



35 **PASO 1:** A una mezcla de K₂CO₃ (4,0 g, 28,94 mmol) y TBAHSO₄ (240 mg, 0,70 mmol) en agua (8 ml) se le añadió **13** (2,0 g, 11,48 mmol) en CH₂Cl₂ (8 ml) a 0° C. La mezcla resultante se agitó durante 20 min a 0° C antes de añadir **14** (1,3 ml, 12,85 mmol) y se agitó de nuevo durante 3 h. La capa orgánica se separó y se lavó con agua (2x5 ml) y salmuera acuosa saturada (5 ml). La capa de CH₂Cl₂ se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con 0-100% de EtOAc/hexanos para obtener el compuesto **15** deseado (2,2 g, 86%) como una goma incolora.

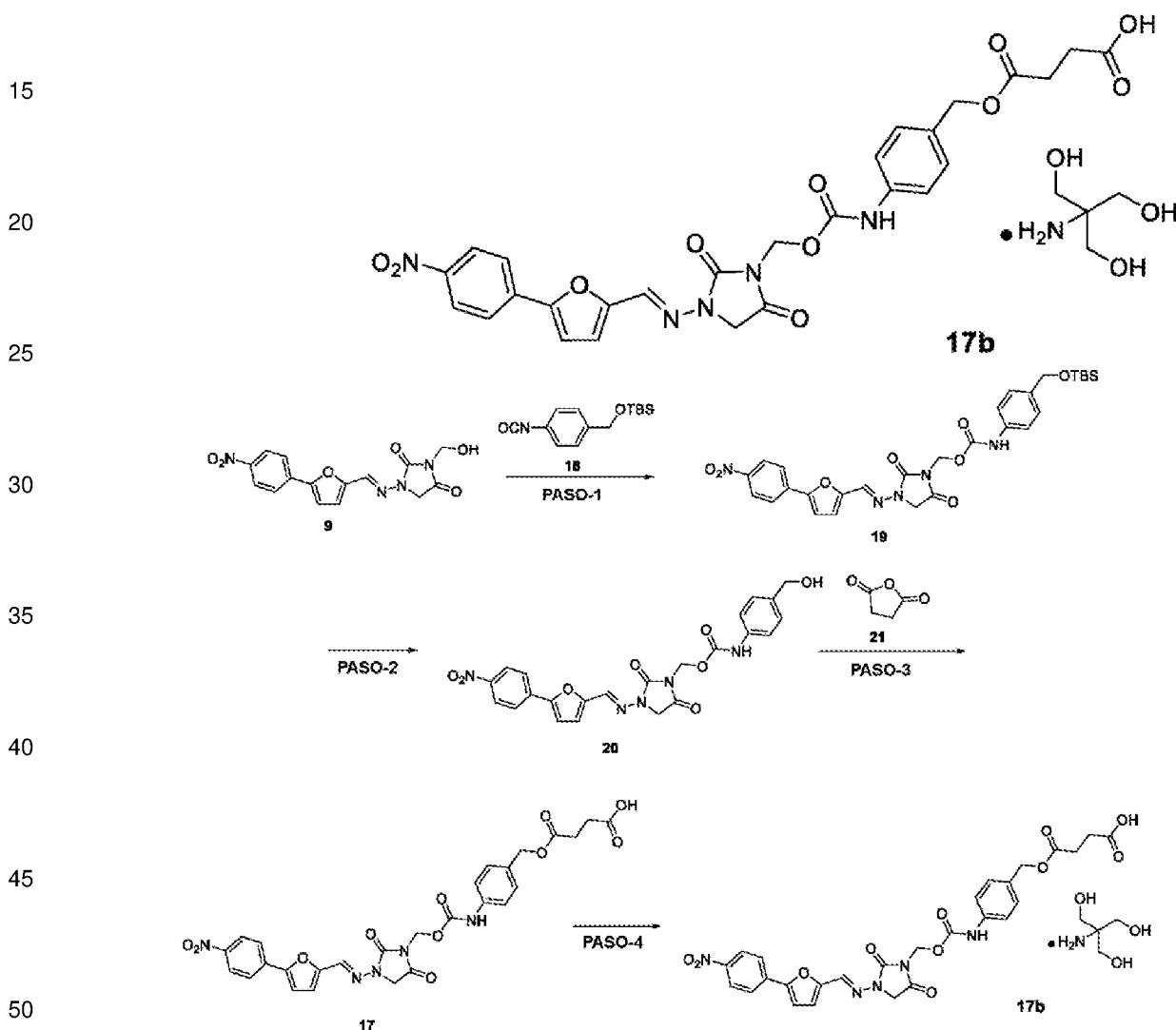
40 **PASO 2:** se secó **1a** con P₂O₅ durante la noche. A una mezcla de **15** (2,2 g, 9,87 mmol) en DMF (35 ml) se le añadió **1a** (1,66 g, 4,93 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml) y se lavó con agua (2x25 ml) y salmuera acuosa saturada (15 ml). La capa de EtOAc se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y se evaporó al vacío. El residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con 0-100% de EtOAc/CH₂Cl₂ (dos veces) seguido de trituración con CH₂Cl₂-hexanos para obtener el compuesto deseado **16** (500 mg, 20%) como un sólido amarillo.

45 **PASO 3:** A una mezcla de **16** (340 mg, 0,68 mmol) en CH₂Cl₂ (18 ml) se le añadió TFA (1,8 ml). La mezcla resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Los solventes se evaporaron en un rotavapor hasta la sequedad. El residuo resultante se trituró con hexanos durante 1 h y el sólido amarillo se filtró y se secó para obtener

el compuesto deseado **12** (300 mg, 99%).

PASO 4: A una suspensión agitada de **6** (260 mg, 0,58 mmol) en agua (36 ml, grado HPLC) se le añadió NaOH 0,1 N (5,85 ml, 0,58 mmol) a temperatura ambiente en 400 alícuotas seguido inmediatamente de una agitación en vórtex rápida. El pH de la solución final fue de 6,73. La solución se filtró y el filtrado se liofilizó durante la noche para dar el compuesto del título **12a** (150 mg, 55%) como un sólido amarillo. MS (Cl) m/z=445.1 [M]⁺. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.34 (d, J=8.8 Hz, 2H), 8.04 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.49 (d, J=3.6 Hz, 1H), 7.11 (d, J=3.8 Hz, 1H), 5.43 (s, 2H), 4.51 (s, 2H), 2.40 (m, 2H), 2.15 (m, 2H).

10 Ejemplo de referencia 15



PASO 1: A una solución del compuesto **9** (500 mg, 1,45 mmol) en DMF anhidra (10 ml) se le añadió el compuesto **18** (488 mg, 1,85 mmol) en DMF (2 ml) seguido de TEA (0,3 ml, 2,2 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con EtOAc (50 ml), se lavó con agua (2x15 ml). La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico, se filtró y se evaporó hasta la sequedad. El producto bruto se purificó dos veces por cromatografía ultrarrápida eluyendo con un 0-10% de MeOH/CH₂Cl₂ para obtener el compuesto **19** deseado (350 g, 40%) como sólido amarillo.

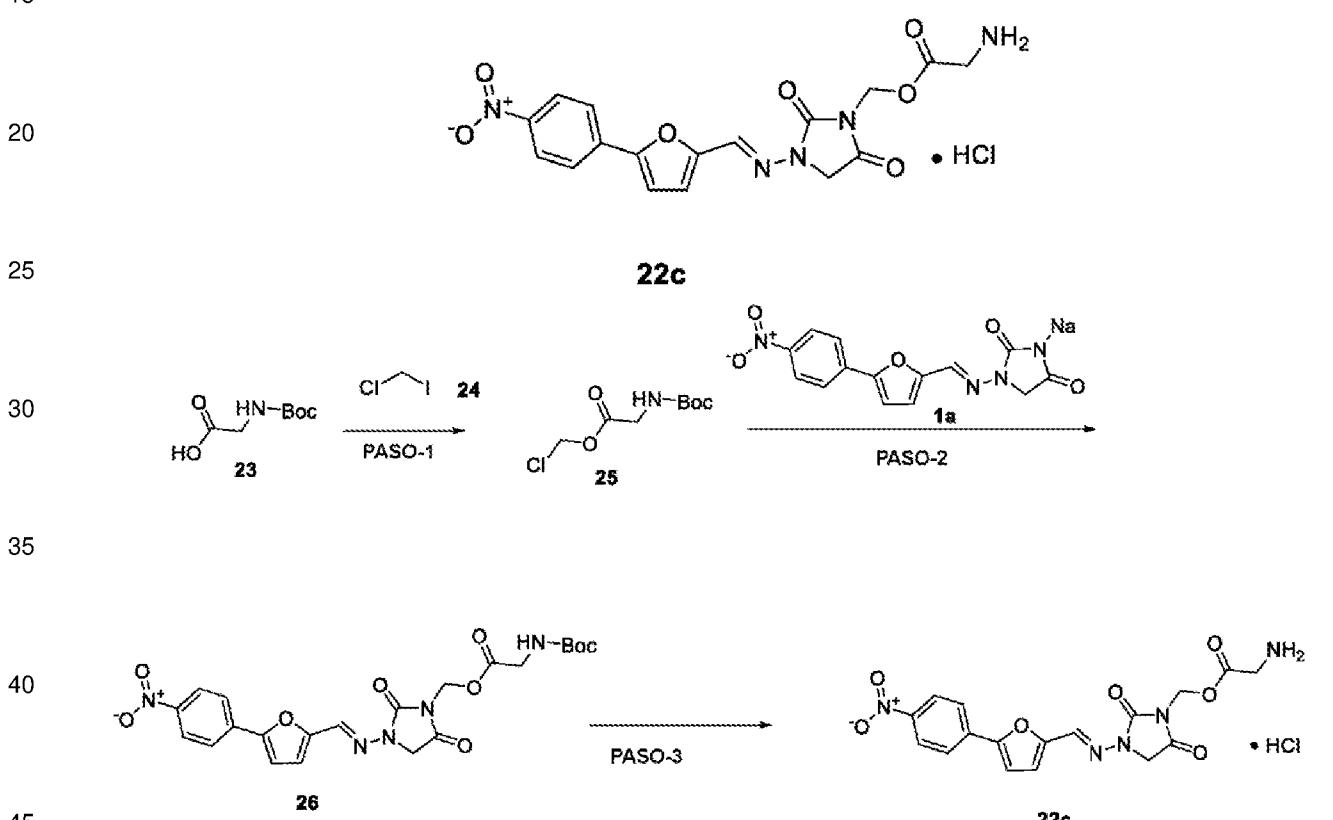
PASO 2: A una solución del compuesto **19** (200 mg, 0,32 mmol) en MeOH:1,4-Dioxano (1:1, 6 ml) se le añadió ácido p-toluenosulfónico monohidrato (63 mg, 0,32 mmol). La solución transparente se agitó durante 16 h a temperatura ambiente. Los solventes se evaporaron en un rotavapor hasta la sequedad. El residuo se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con un 0-10% de MeOH/CH₂Cl₂ para obtener el compuesto deseado **20** (125 g, 77%) como un sólido amarillo.

PASO 3: A una solución del compuesto **20** (120 mg, 0,24 mmol) y el compuesto **21** (26,4 mg, 0,26 mmol) en

5 m-xileno:1,4-dioxano (1:1, 16 ml) se le añadió ácido p-toluenosulfónico monohidrato (15 mg, 0,07 mmol) y tamices moleculares de 4Å (100 mg). La mezcla resultante se sometió a refluo durante 16 h. La mezcla de la reacción se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con 1,4-dioxano (30 ml) y se filtró. El filtrado se evaporó y el residuo bruto se purificó dos veces por cromatografía ultrarrápida eluyendo con un 0-10% de MeOH/CH₂Cl₂ para obtener el compuesto deseado **17** (16 mg, 11%) como un sólido amarillo.

10 **PASO 4:** A una suspensión agitada de **17** (5 mg, 8,4 µmol) en agua (3 ml, grado HPLC) se le añadió Tris 0,1 N (90 µl, 8,9 µmol) gota a gota a temperatura ambiente. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La solución se filtró, y el filtrado se liofilizó durante la noche para dar el compuesto del título **17b** (6 mg, 100%) como un sólido amarillo. MS (Cl) m/z=594.1 [M]⁺. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 9.96 (brs, 1H), 8.34 (d, J=8.8 Hz, 2H), 8.05 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.5 (d, J=3.2 Hz, 1H), 7.46 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.29 (d, J=8.5 Hz, 2H), 7.12 (d, J=3.5 Hz, 1H), 5.57 (s, 2H), 4.99 (s, 2H), 4.55 (s, 2H), 3.23-3.32 (m, 9H), 2.33-2.36 (m, 4H).

15 **Ejemplo de referencia 16**



50 **PASO 1:** A una mezcla de **23** (2,5 g, 14,28 mmol) en DMF (30 ml) se le añadió trietilamina (3,47 ml, 24,93 mmol) seguido de **24** (3,92 ml, 53,9 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 40 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (100 ml) y agua (50 ml). La capa de EtOAc se lavó con agua (2x25 ml), NaHCO₃ al 5% (25 ml) y salmuera acuosa saturada (15 ml). La capa de EtOAc se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico y se concentró al vacío. El residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con 0-100% de EtOAc/hexanos para obtener el compuesto deseado **25** (657 mg, 21%) como un aceite incoloro.

55 **PASO 2:** se secó **1a** con P₂O₅ durante la noche. A una mezcla de **1a** (647 mg, 1,92 mmol) en DMF (12 ml) se le añadió **25** (647 mg, 2,89 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 110 h. La mezcla se diluyó con EtOAc (40 ml), se lavó con agua (2x15 ml) y salmuera acuosa saturada (15 ml). La capa de EtOAc se secó sobre Na₂SO₄ anhídrico, se filtró y se evaporó al vacío. El residuo bruto se purificó por cromatografía ultrarrápida eluyendo con 0-100% de EtOAc/CH₂Cl₂ para obtener el compuesto deseado **26** (260 mg, 27%) como un sólido amarillo.

60 **PASO 3:** A una solución agitada de **26** (210 mg, 0,41 mmol) en 1,4-dioxano anhídrico (4 ml) se le añadió HCl (4 ml, 4N en 1,4-Dioxano) a temperatura ambiente y la mezcla resultante se agitó durante la noche. Los solventes se evaporaron en un rotavapor hasta la sequedad. El residuo resultante se trituró con hexanos durante 1 h y el sólido amarillo se filtró y se secó para obtener el compuesto **22c** (153 mg, 83%). MS (Cl) m/z=402.1 [M]⁺. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.47 (brs, 3H), 8.34 (d, J=8.8 Hz, 2H), 8.04 (d, J=8.8 Hz, 2H), 7.91 (s, 1H), 7.50 (d, J=3.6 Hz, 1H), 7.12

(d, J=3.6 Hz, 1H), 5.61 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 3.85 (s, 2H).

Ejemplo 17. Materiales y métodos generales de UPLC

5 El análisis LC-MS se realizó usando un sistema de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento Agilent 1290 Infinity II equipado con una columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1x50 mm, 1,8 µm). La elución se monitorizó a 210 nm y 385 nm usando un detector de matriz de diodos. La fase móvil A fue agua con 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético, y la fase móvil B fue acetonitrilo con 0,1% de ácido trifluoroacético. Para cada muestra, se inyectaron 10 µl, y la elución se realizó usando un gradiente lineal que comenzó en 25% de B y aumentó al 43% de B 10 durante 4 minutos a un caudal de 0,5 ml/min. El sistema de cromatografía líquida se acopló a un espectrómetro de masas Agilent 6420 de triple cuadrupolo.

Curvas estándar de HPLC para la medición de la concentración

15 Se pesó aproximadamente 1 mg del compuesto de interés y se disolvió a 1 mg/ml usando acetonitrilo al 25% (en agua v/v). Se preparó una dilución de 10 veces usando acetonitrilo al 25% del profármaco para obtener una solución de 100 µg/ml. Se realizó una serie de diluciones dobles con acetonitrilo al 25% para obtener soluciones de 50, 25, 12,5 y 6,25 µg/ml. Para cada muestra se analizaron 10 µl usando el equipo y el gradiente descritos en la 20 sección Materiales y métodos generales de UPLC. Se generó una curva estándar para la concentración integrando manualmente los cromatogramas de 385 nm y trazando el área del pico en función de la concentración.

Análisis farmacocinético

25 En cada punto temporal, se recogieron 400 µl de sangre en un tubo de K2EDTA y se colocaron en hielo antes de la centrifugación. Después de la centrifugación, se combinaron 100 µl de plasma con 300 µl de acetonitrilo antes de centrifugar para eliminar el material precipitado. Las muestras se analizaron usando el gradiente de la sección Materiales y métodos generales de UPLC. Se creó una curva estándar de dantroleno para cada experimento 30 disolviendo 3,8 mg de dantrio en 14,9 ml de metanol al 50% (v/v) en agua. El dantrio se diluyó en el sobrenadante de sangre de rata precipitada 1:3:acetonitrilo para generar las muestras para la curva estándar. La curva estándar varió de 5000 a 5 ng/ml. El dantroleno se monitorizó por absorbancia a 385 nm usando el detector de matriz de diodos y la funcionalidad de monitorización de reacción múltiple del espectrómetro de masas.

Reconversión del compuesto 2a en plasma y farmacocinética

35 Para medir la conversión del compuesto 2a en dantroleno en plasma de rata, se disolvió 1 mg de compuesto 2a a 1 mg/ml en agua. Se combinó una alícuota de 100 µl del Compuesto 2a con 900 µl de plasma tomado de ratas Sprague Dawley. A continuación, la reacción plasmática se colocó en un baño de agua a 37º C. La concentración inicial del Compuesto 2a en el plasma fue de 100 µg/ml. Se preparó una muestra inicial extrayendo inmediatamente 100 µl de la reacción plasmática y se mezcló con 100 µl de acetonitrilo para inactivar la reacción, lo que provocó la 40 precipitación. El material insoluble se sedimentó por centrifugación a 15000 rpm durante 5 minutos a 25º C. Se preparó una muestra para el análisis LC-MS combinando 75 µl del sobrenadante con 75 µl de agua. El análisis LC-MS se realizó inyectando 10 µl, y las muestras se eluyeron usando el equipo y el gradiente descritos en la sección Materiales y métodos generales de UPLC. Se prepararon muestras adicionales después de 10, 30, 45, 60, 120, 180 y 240 45 minutos. La pérdida de compuesto de ensayo y el aumento de dantroleno se cuantificaron mediante la integración manual de los picos en los cromatogramas de 385 nm (Figura 5). La semivida del Compuesto 2a en estas condiciones se obtuvo ajustando una función exponencial a los datos. La semivida del Compuesto 2a fue de 82 minutos. También se realizó un control negativo en el que se usó solución salina tamponada con fosfato en lugar de plasma de rata, y no se observó ninguna conversión.

50 La farmacocinética plasmática del dantroleno después de la administración del Compuesto 2a en ratas vivas se ensayó dosificando ratas Sprague-Dawley canuladas en vena, y analizando el plasma en busca de dantroleno mediante LC-MS (Figura 6 y Tabla 1). La dosificación, la recogida de muestras y el análisis fueron realizados por MPI Research. Las dosis intravenosas se administraron a través de la cánula venosa yugular. Las dosis intramusculares se administraron inyectando la mitad de la dosis en la masa muscular grande de la extremidad posterior izquierda y la otra mitad de la dosis en la extremidad posterior derecha. Había cinco ratas en cada grupo de prueba. El Compuesto 2a se disolvió a 8 mg/ml en manitol acuoso al 5% (p/v) filtrado estérilmente para obtener un nivel de dosis de 7,5 mg/kg y un volumen de dosis de 0,94 ml/kg. Se recogió plasma antes de la administración y a las 0,033, 0,083, 0,167, y 0,33, 0,66, 1, 2, 3, 6, 9 horas después de la administración.

60 En cada experimento, sólo se observaron cantidades traza de 2a después de la administración del compuesto por vía IV, IM o SC. En consecuencia, para la medición farmacocinética sólo se siguió la concentración de dantroleno.

Tabla 1. Biodisponibilidad plasmática del dantroleno después de la administración del Compuesto 2a por vía intravenosa e intramuscular

Vía de Administración	AUC (ng*hr/ml)	AUC (μ g*hr/ml)	% de Biodisponibilidad
IV	52148	5.2148	100
IM	40565	4.0565	77.8

En un segundo análisis, se realizó la farmacocinética en sangre completa del Compuesto 2a en ratas vivas (Figura 7 y Tabla 2). Cada grupo de prueba incluyó tres ratas. El Compuesto 2a se disolvió a 8 mg/ml en manitol acuoso al 5% (p/v) filtrado estéril para proporcionar un nivel de dosis de 7,5 mg/kg y un volumen de dosis de 0,94 ml/kg. Se recogió sangre antes de la administración, 0,033, 0,083, 0,167, y 0,33, 0,66, 1, 2, 3, 6, 9 horas después de la administración. Las muestras de sangre completa se diluyeron 4 veces en acetonitrilo y se centrifugaron para eliminar el precipitado.

Tabla 2. Biodisponibilidad de sangre completa del dantroleno después de la administración del Compuesto 2a por vía intravenosa e intramuscular

Vía de Administración	AUC (ng*hr/ml)	AUC (μ g*hr/ml)	% de Biodisponibilidad
IV	47528	4.7528	100
IM	45297	4.5297	95.3

Se realizó otro análisis farmacocinético del Compuesto 2a en ratas vivas (Figuras 8 y 9 Tabla 3). Cada grupo de prueba tenía cinco ratas. El Compuesto 2a se disolvió a 8 mg/ml en manitol acuoso al 5% (p/v) filtrado estéril para obtener un nivel de dosis de 7,5 mg/kg y un volumen de dosis de 0,94 ml/kg. Se recogió sangre antes de la administración y a las 0,033, 0,083, 0,167, y 0,33, 0,66, 1, 2, 3, 6, 9 horas después de la administración. Las muestras de sangre se diluyeron 4 veces en acetonitrilo y se centrifugaron para eliminar el precipitado. Las muestras de plasma se obtuvieron introduciendo la sangre en tubos de K₂EDTA y centrifugando a continuación. El plasma resultante se aspiró y se diluyó 4 veces en acetonitrilo antes de centrifugar de nuevo para eliminar el material precipitado.

Tabla 3. Biodisponibilidad del dantroleno después de la administración del Compuesto 2a por vía intravenosa, intramuscular y subcutánea

Vía de Administración	AUC (ng*hr/ml)	AUC (μ g*hr/ml)	% de Biodisponibilidad
IV ^a	41906	4.1906	100
IM ^a	33861	3.3861	80.8
SC ^a	26388	2.6388	64.0
IV ^b	40298	4.0298	100
IM ^b	22857	2.2857	56.7
SC ^b	20019	2.0019	49.7

^a Análisis de sangre completa ^bAnálisis del plasma

Reconversión del compuesto 2b en plasma y farmacocinética

Para medir la conversión del Compuesto 2b en dantroleno en plasma de rata, se disolvió 1 mg de Compuesto 2b a 1 mg/ml en agua. Se combinó una alícuota de 100 μ l del Compuesto 2b con 900 μ l de plasma tomado de ratas Sprague Dawley. A continuación, la reacción plasmática se colocó en un baño de agua a 37° C. La concentración inicial del Compuesto 2b en el plasma era de 100 μ g/ml. Se preparó una muestra inicial extrayendo inmediatamente 100 μ l de la reacción plasmática y mezclando con 100 μ l de acetonitrilo para inactivar la reacción, lo que provocó la precipitación. El material insoluble se sedimentó por centrifugación a 15000 rpm durante 5 minutos a 25° C. Se preparó una muestra para el análisis LC-MS combinando 75 μ l del sobrenadante con 75 μ l de agua. El análisis LC-MS se realizó inyectando 10 μ l, y las muestras se eluyeron usando el equipo y el gradiente descritos en la sección Materiales y métodos generales de UPLC. Se prepararon muestras adicionales después de 15, 30, 45, 60, 120, 180 y 240 minutos. La pérdida de Compuesto 2 y el aumento de dantroleno se cuantificaron mediante integración manual de los picos en los cromatogramas de 385 nm (Figura 10). La semivida del Compuesto 2b en estas condiciones se obtuvo ajustando una función exponencial a los datos. La semivida del Compuesto 2b fue de 77 minutos. También se realizó un control negativo en el que se usó solución salina tamponada con fosfato en lugar de plasma de rata, y no se observó conversión.

La farmacocinética del dantroleno después de la administración del Compuesto 2b a ratas vivas se ensayó dosificando ratas Sprague-Dawley canuladas en vena, y analizando la sangre en busca de dantroleno usando LC-MS (Figura 11 y Tabla 4). La dosificación, la recogida de muestras y el análisis fueron realizados por MPI Research. Las dosis intravenosas se administraron a través de la cánula venosa yugular. Las dosis intramusculares se administraron inyectando la mitad de la dosis en la masa muscular grande de la extremidad posterior izquierda y la otra mitad de la dosis en la extremidad posterior derecha. Había cinco ratas en cada grupo de prueba. El Compuesto 2b se disolvió a 11,4 mg/ml en manitol acuoso al 5% (p/v) filtrado estéril para obtener un nivel de dosis de 10,6 mg/kg y un volumen de dosis de 0,94 ml/kg. Se recogió plasma antes de la administración y a las 0,033, 0,083, 0,167, y 0,33, 0,66, 1, 2, 3,

6, 9 horas después de la administración.

Tabla 4. Biodisponibilidad plasmática del dantroleno después de la administración del Compuesto 2b por vía intravenosa e intramuscular

Vía de Administración	AUC (ng·hr/ml)	AUC (μ g·hr/ml)	% de Biodisponibilidad
IV	55748	5.5749	100
IM	41947	4.1947	75.2

Ejemplo de referencia 18. Reversión del Compuesto 10c en plasma

Para medir la conversión de 10c en dantroleno en plasma de rata, se disolvieron 0,9 mg de 10c a 1 mg/ml en agua. Se combinó una alícuota de 100 μ l de 10c con plasma tomado de ratas Sprague Dawley. A continuación, la reacción plasmática se colocó en un baño de agua a 37° C. La concentración inicial de 10c en el plasma era de 100 μ g/ml. Se preparó una muestra inicial extrayendo inmediatamente 100 μ l de la reacción plasmática y se mezcló con 100 μ l de acetonitrilo para inactivar la reacción, lo que provocó precipitación. El material insoluble se sedimentó por centrifugación a 15000 rpm durante 5 minutos a 25° C. Se preparó una muestra para el análisis LC-MS combinando 75 μ l del sobrenadante con 75 μ l de agua. El análisis LC-MS se realizó inyectando 10 μ l, y las muestras se eluyeron usando el equipo y el gradiente descritos en la Sección de materiales y métodos generales de UPLC. Se prepararon muestras adicionales después de 10, 20, 35, 45 y 60 minutos. La pérdida de 10c y el aumento de dantroleno se cuantificaron mediante integración manual de los picos en los cromatogramas de 385 nm. La semivida del 10c en estas condiciones se obtuvo ajustando una función exponencial a los datos. En el plazo de los primeros 10 minutos de incubación con plasma, el 10c se había convertido completamente en dantroleno. La semivida se estimó en 1,9 min. También se realizó un control negativo en el que se usó solución salina tamponada con fosfato en lugar de plasma de rata, y se observó una conversión lenta a dantroleno. La semivida del 10c en solución salina tamponada con fosfato fue de 294 minutos. Véase la Figura 12.

Ejemplo de referencia 19. Conversión plasmática y farmacocinética del compuesto 12a

Para medir la conversión de 12a en dantroleno en plasma de rata, se preparó una solución de 1 mg/ml de 12a en agua. Se combinó una alícuota de 100 μ l de 12a con plasma tomado de ratas Sprague Dawley. A continuación, la reacción plasmática se colocó en un baño de agua a 37° C. La concentración inicial de 12a en el plasma era de 100 μ g/ml. Se preparó una muestra inicial extrayendo inmediatamente 100 μ l de la reacción plasmática y se mezcló con 100 μ l de acetonitrilo para inactivar la reacción, lo que provocó la precipitación. El material insoluble se sedimentó por centrifugación a 15000 rpm durante 5 minutos a 25° C. Se preparó una muestra para el análisis LC-MS combinando 75 μ l del sobrenadante con 75 μ l de agua. El análisis LC-MS se realizó inyectando 10 μ l, y las muestras se eluyeron usando el equipo y el gradiente descritos en la Sección materiales y métodos generales de UPLC. Se prepararon muestras adicionales después de 10, 20, 35, 45, 60, 75 y 150 minutos. La pérdida de 12a y el aumento de dantroleno se cuantificaron mediante la integración manual de los picos en los cromatogramas de 385 nm (Figura 13). La semivida de 12a en estas condiciones se obtuvo ajustando una función exponencial a los datos. Se calculó que la semivida era de 12,2 min. También se realizó un control negativo en el que se usó solución salina tamponada con fosfato en lugar de plasma de rata; la semivida fue mayor de 150 minutos.

Las propiedades farmacocinéticas de 12a se ensayaron de la misma manera que 22c, excepto que el compuesto se disolvió a 5 mg/ml en manitol al 5% para proporcionar un nivel de dosis de 4 mg/kg y un volumen de dosis de 0,8 ml/kg (Figura 14).

Ejemplo de referencia 20. Conversión plasmática del compuesto 17b

Para generar una curva estándar para calcular la concentración de 17b disolvimos 1 mg de compuesto en 200 μ l de dimetilformamida para obtener una solución de 5 mg/ml. La solución de 5 mg/ml se diluyó 5 veces en agua y se centrifugó a 15000 rpm, 25° C, 5 min. El sobrenadante se usó para hacer una dilución de 10 veces en acetonitrilo al 25% en agua para obtener una solución de 100 μ g/ml. Se realizó una serie de diluciones dobles usando acetonitrilo al 25% para obtener soluciones de 50, 25, 12,5 y 6,25 μ g/ml. Estas soluciones se analizaron como se describe en la Sección materiales y métodos generales de UPLC, salvo que el gradiente se amplió para terminar en acetonitrilo al 90% después de 14,4 minutos.

Para medir la conversión de 17b en dantroleno en plasma de rata, se preparó una solución de 1 mg/ml de 17b en agua. Se combinó una alícuota de 100 μ l de 17b con 900 μ l de plasma tomado de ratas Sprague Dawley. A continuación, la reacción plasmática se colocó en un baño de agua a 37° C. La concentración inicial de 17b en el plasma era de 100 μ g/ml. Se preparó una muestra inicial extrayendo inmediatamente 100 μ l de la reacción plasmática y se mezcló con 100 μ l de acetonitrilo para inactivar la reacción, lo que provocó la precipitación. El material insoluble se sedimentó por centrifugación a 15000 rpm durante 5 minutos a 25° C. Se preparó una muestra para el análisis LC-MS combinando 75 μ l del sobrenadante con 75 μ l de agua. El análisis LC-MS se realizó inyectando 10 μ l, y las muestras se eluyeron usando el equipo descrito en la Sección de materiales y métodos generales de UPLC y el método ampliado descrito en el párrafo anterior. Se prepararon muestras adicionales después de 15, 30, 45, 60, 180, 240 y

300 minutos. La pérdida de 17b y el aumento de dantroleno se cuantificaron mediante la integración manual de los picos en los cromatogramas de 385 nm (Figura 15). La semivida de 17b en estas condiciones se obtuvo ajustando una función exponencial a los datos. Se calculó que la semivida era de 94,5 min. También se realizó un control negativo en el que se usó solución salina tamponada con fosfato en lugar de plasma de rata; la semivida se estimó en 447 minutos.

5

Ejemplo de referencia 21. Conversión plasmática y farmacocinética del Compuesto 22c

Para medir la conversión de 22c en dantroleno en plasma de rata, se preparó una solución de 1 mg/ml de 22c en agua. Se combinó una alícuota de 100 µl de 22c con 900 µl de plasma tomado de ratas Sprague Dawley. A continuación, la reacción plasmática se colocó en un baño de agua a 37º C. La concentración inicial de 22c en el plasma era de 100 µg/ml. Se preparó una muestra inicial extrayendo inmediatamente 100 µl de la reacción plasmática y se mezcló con 100 µl de acetonitrilo para inactivar la reacción, lo que provocó la precipitación. El material insoluble se sedimentó por centrifugación a 15000 rpm durante 5 minutos a 25º C. Se preparó una muestra para el análisis LC-MS combinando 75 µl del sobrenadante con 75 µl de agua. El análisis LC-MS se realizó inyectando 10 µl, y las muestras se eluyeron usando el equipo y el gradiente descritos en la Sección materiales y métodos generales de UPLC. Se prepararon muestras adicionales después de 10, 20, 35, 45, 60, 75 y 150 minutos. La pérdida de 22c y el aumento de dantroleno se cuantificaron mediante la integración manual de los picos en los cromatogramas de 385 nm (Figura 16). La vida media del 22c en estas condiciones se obtuvo ajustando una función exponencial a los datos. En el plazo de los primeros 10 minutos de incubación con plasma, el 22c se había convertido completamente en dantroleno. La semivida se estimó en 3,2 minutos. También se realizó un control negativo en el que se usó solución salina tamponada con fosfato en lugar de plasma de rata, y se observó una reconversión del 85% al cabo de 150 minutos.

La farmacocinética del 22c en ratas vivas se ensayó dosificando ratas Sprague-Dawley canuladas por vena y analizando la sangre en busca de dantroleno mediante LC-MS (Figura 17). Las dosis intravenosas se administraron a través de la cánula de la vena yugular. Las dosis subcutáneas se administraron mediante inyección entre la piel y las capas subyacentes de tejido en la extremidad posterior izquierda de cada animal. Las dosis intramusculares se administraron inyectando la mitad de la dosis en la masa muscular grande de la extremidad posterior izquierda y la otra mitad de la dosis en la extremidad posterior derecha. Había tres ratas en cada grupo de prueba. El 22c se disolvió a 3 mg/ml en manitol acuoso estéril filtrado al 5% (p/v) con DMSO al 10% para proporcionar un nivel de dosis de 4 mg/kg y un volumen de dosis de 1,33 ml/kg. Se recogió sangre antes de la administración y 0,167, 0,33, 0,66 y 1,33 horas después de la administración. En cada punto temporal, se recogieron 100 µl de sangre en un vial cargado con 300 µl de acetonitrilo. Las muestras de sangre se centrifugaron para separar cualquier material insoluble. Los sobrenadantes se congelaron rápidamente y se almacenaron en hielo seco. Las muestras se analizaron usando los métodos de las Secciones materiales y métodos generales de UPLC y Análisis farmacocinético.

40

45

50

55

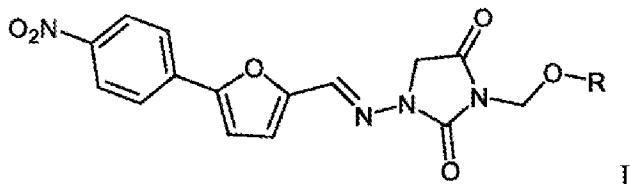
60

65

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I

5



10

en donde R es

15 -P(O)(OH)₂ o -P(O)(OR₁)(OR₂);

R₁ es H o -alquilo C₁₋₂₆; y

R₂ es -alquilo C₁₋₂₆;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

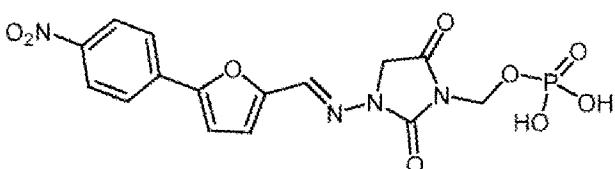
20 2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R es -P(O)(OR₁)(OR₂) y R₁ es H.

3. El compuesto de la reivindicación 1, en donde R es -P(O)(OR₁)(OR₂) y R₂ es -alquilo C₁₋₂₆.

4. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es:

25

30



5. El compuesto de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

35 6. El compuesto de la reivindicación 4, en donde la sal es una sal de sodio.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, o una sal farmacéutica del mismo, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

40 8. Un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno que responde al dantroleno en un sujeto, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o de la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el trastorno es hipertermia maligna, espasticidad crónica, golpe de calor por esfuerzo, arritmias cardíacas, taquicardia, fibrilación auricular, paro cardiaco, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, lesión miocárdica, cardiomiopatía, enfermedad del núcleo central, esclerosis lateral amiotrófica, rabdomiólisis, distrofia muscular de Duchenne, ataxia, hiperactividad del detrusor, vejiga hiperactiva, convulsiones, epilepsia, síndrome neuroléptico maligno, trastorno de estrés humano, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, lesión por isquemia-reperfusión, lesión por reperfusión neuronal, hipoxia, aneurisma cerebral, hemorragia subaracnoidea, accidente cerebrovascular, hipertermia asociada al abuso de drogas, hipertermia asociada a sobredosis de drogas, exposición a agentes nerviosos, exposición a gases nerviosos o acumulación de acetilcolina.

55 9. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 8, en donde la administración es intravenosa o intramuscular.

10. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 8, en donde la administración es oral.

60 11. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 8, en donde la administración es subcutánea.

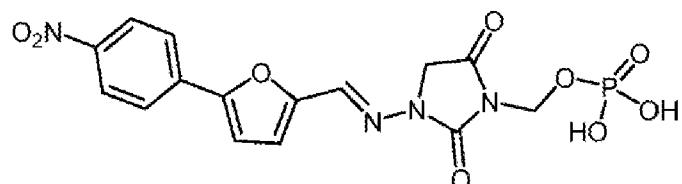
12. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 8, en donde la administración es intranasal.

65 13. El compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo para el uso de la reivindicación 8, en donde la

administración es intraósea.

14. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es la sal de ditrometamina de Fórmula I-A:

5



10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

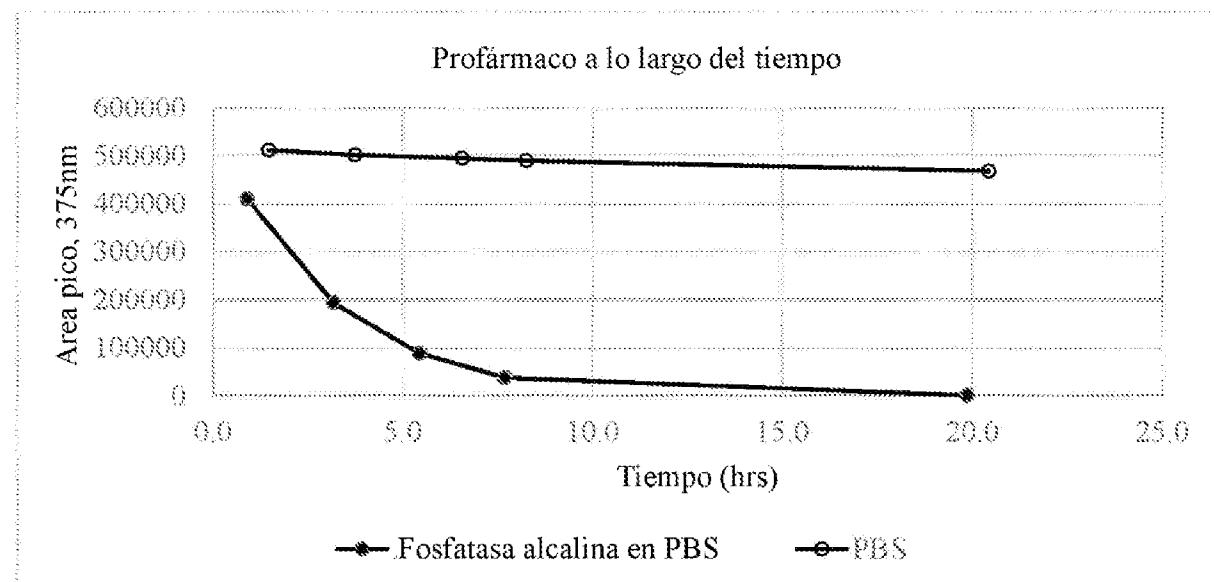


Figura 2

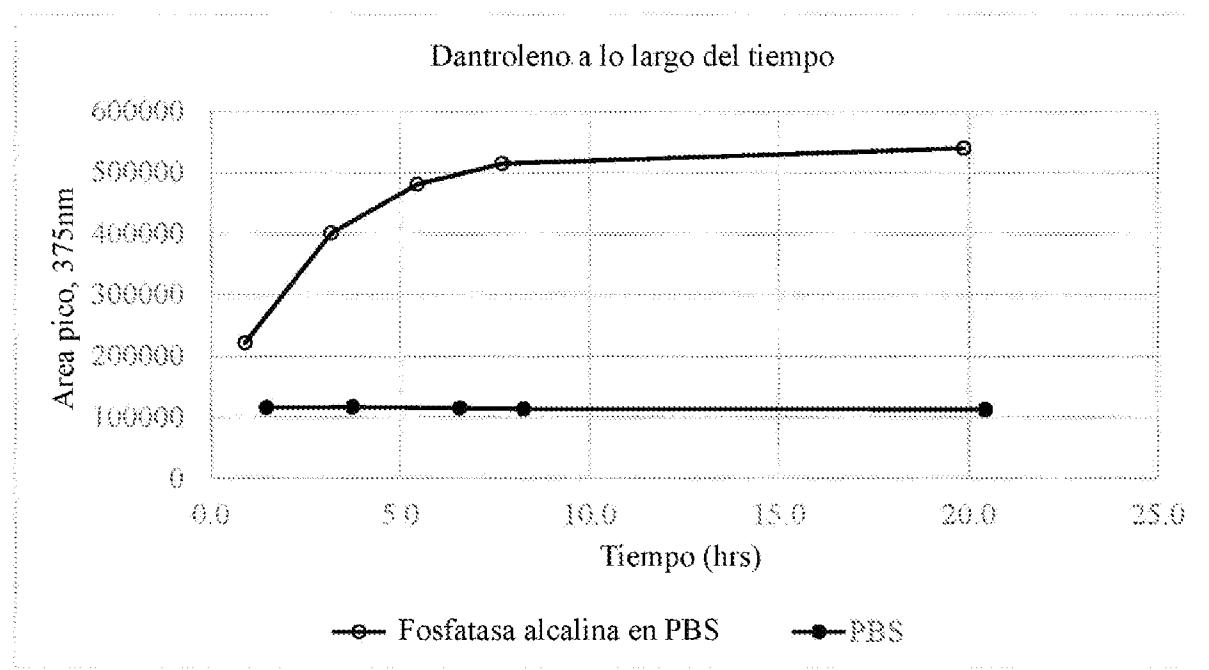


Figura 3

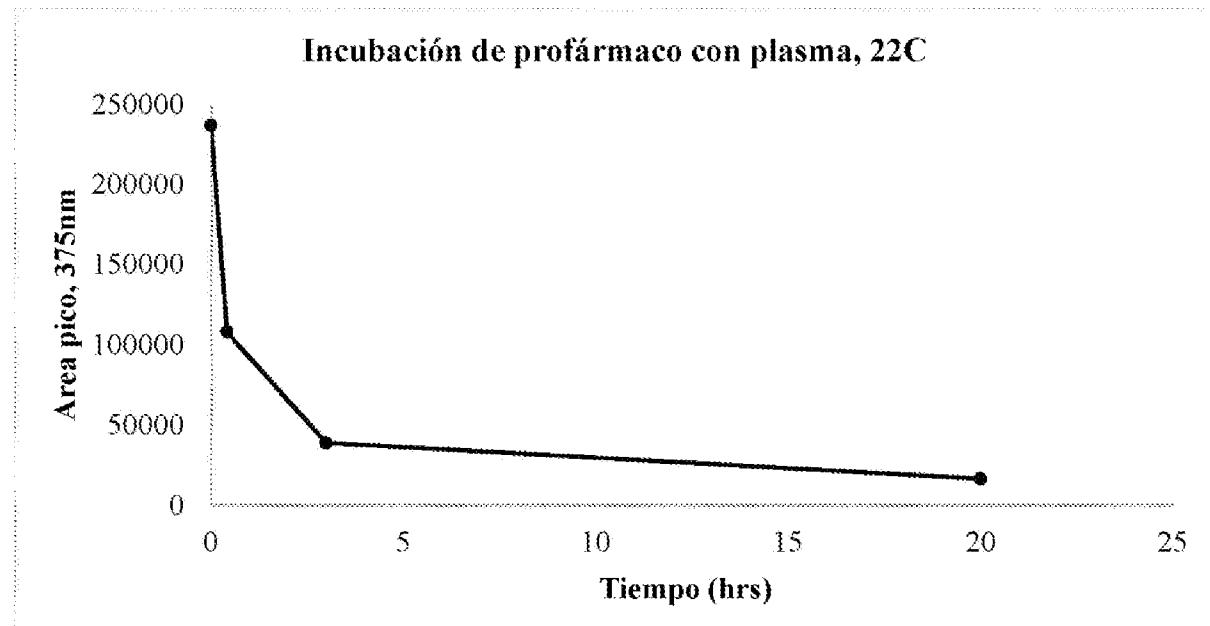


Figura 4

Conversión de profármaco por plasma de rata a 37 C

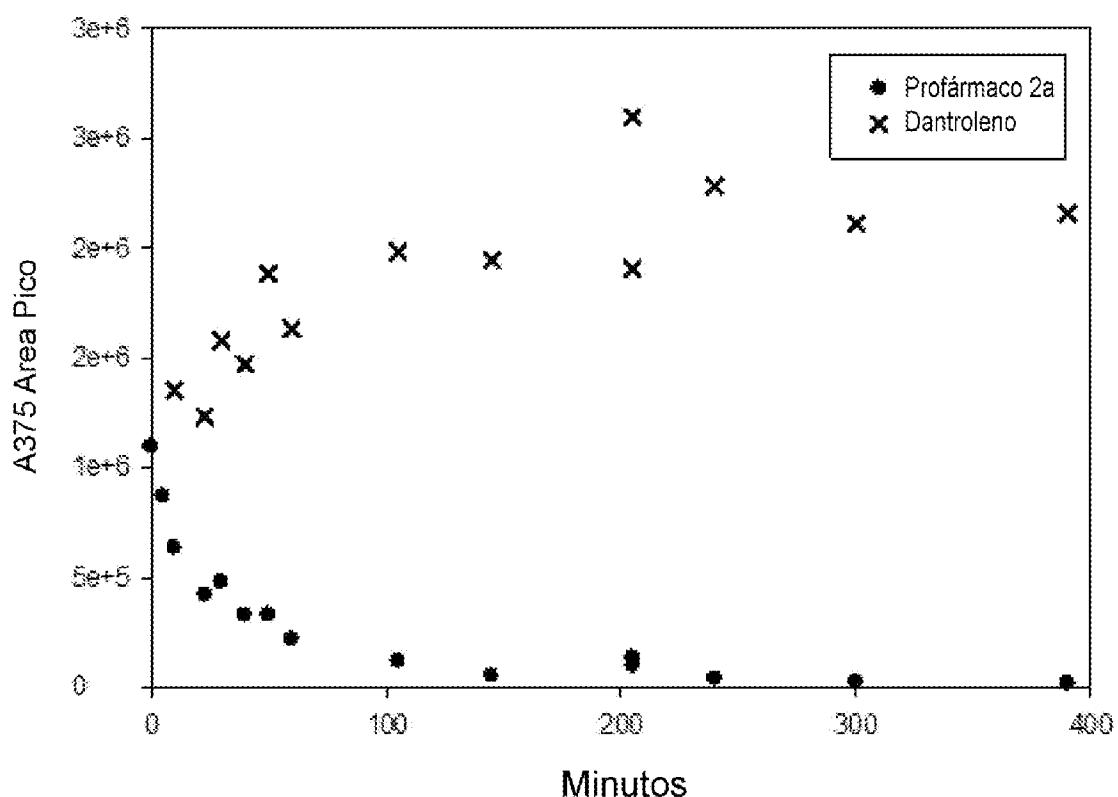


Figura 5

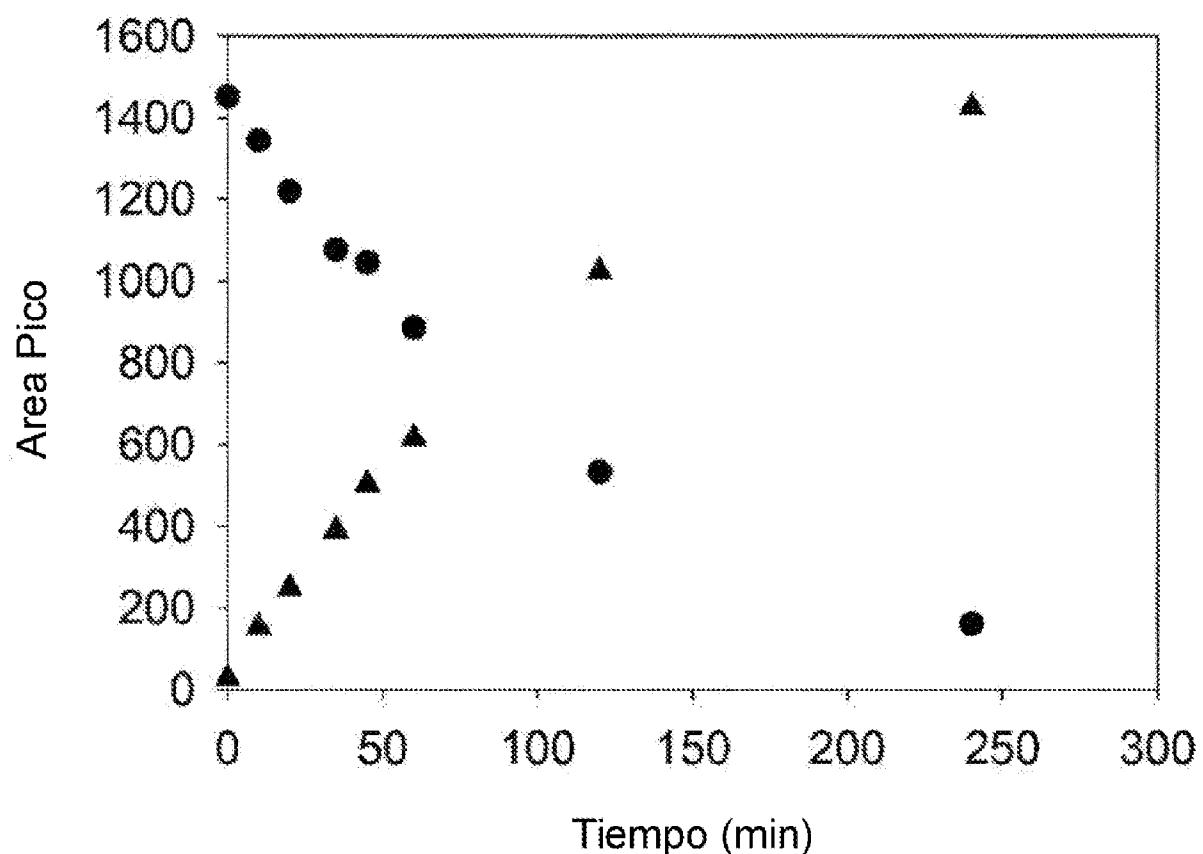


Figura 6

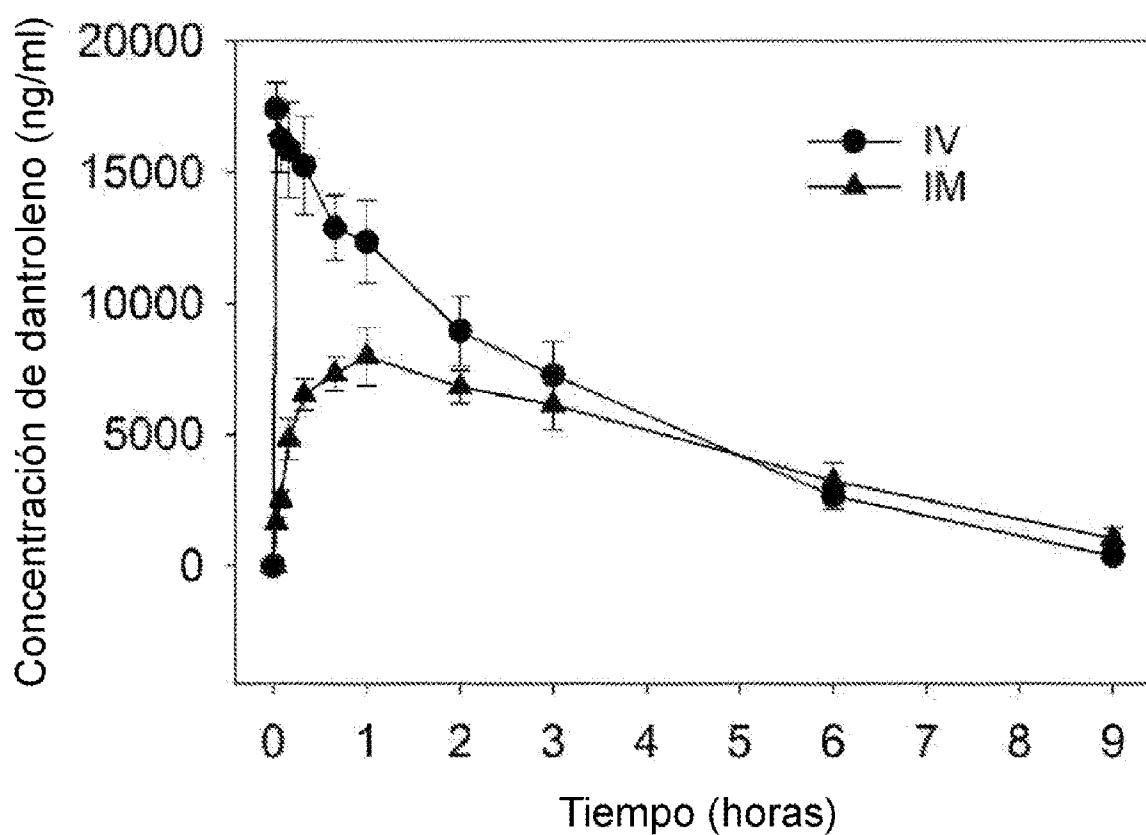


Figura 7

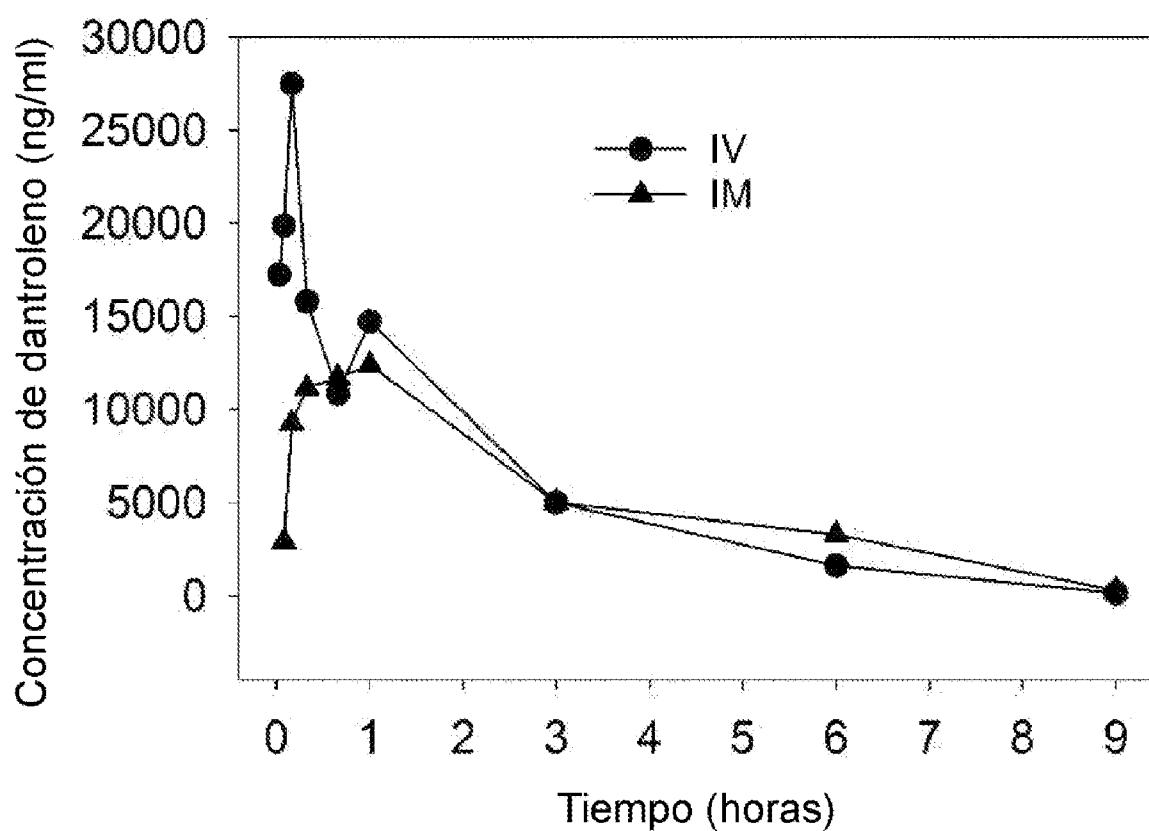


Figura 8

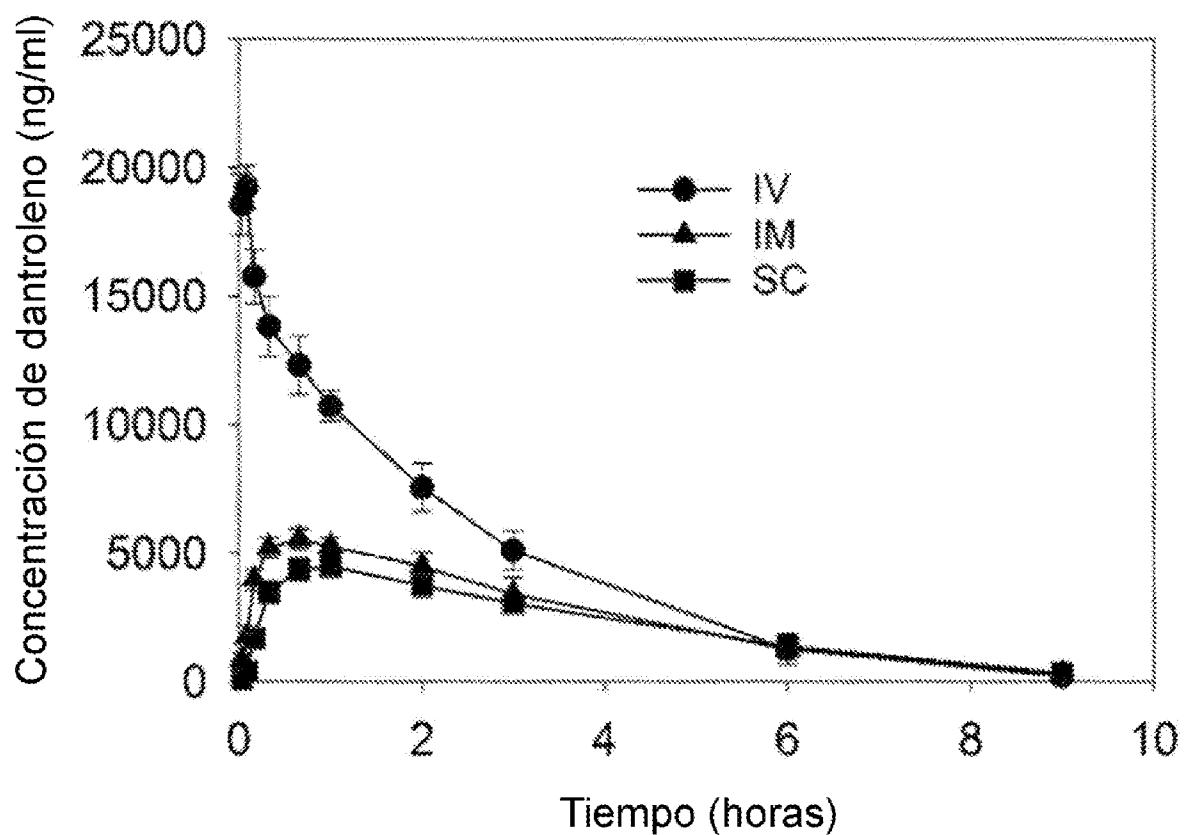


Figura 9

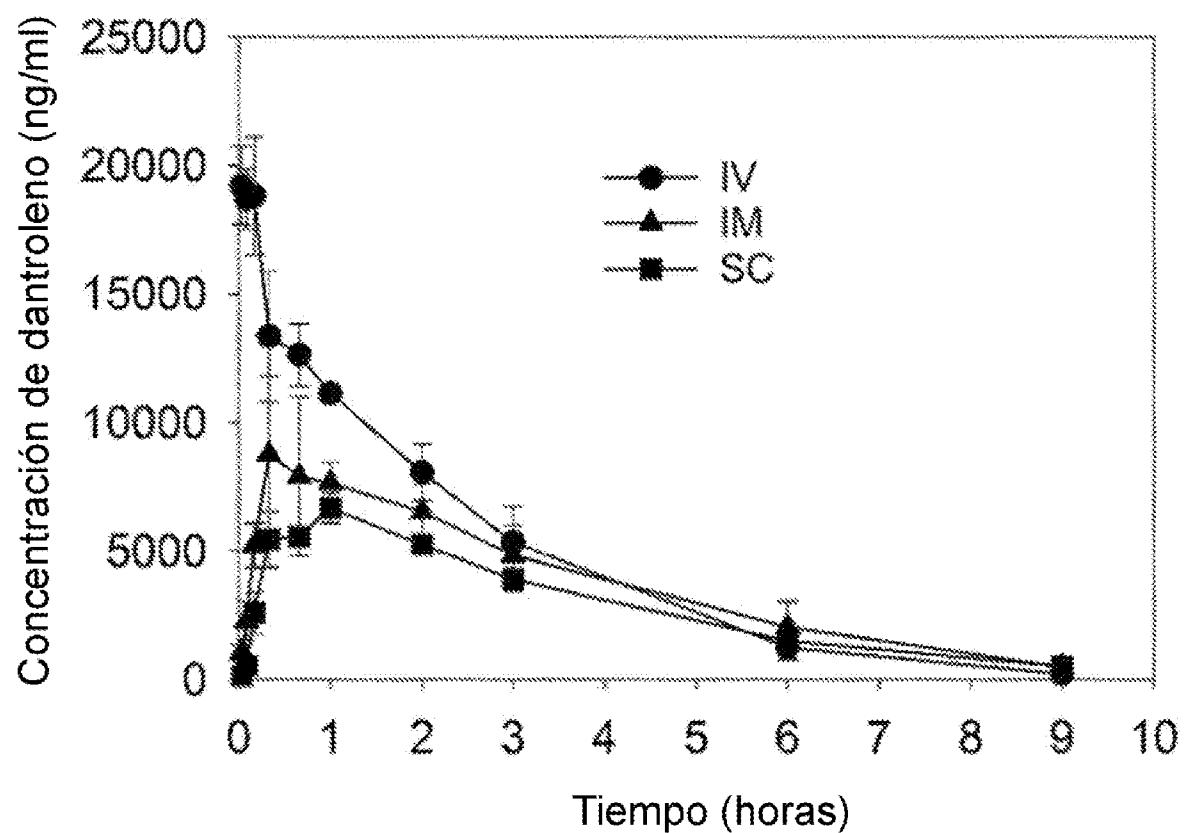


Figura 10

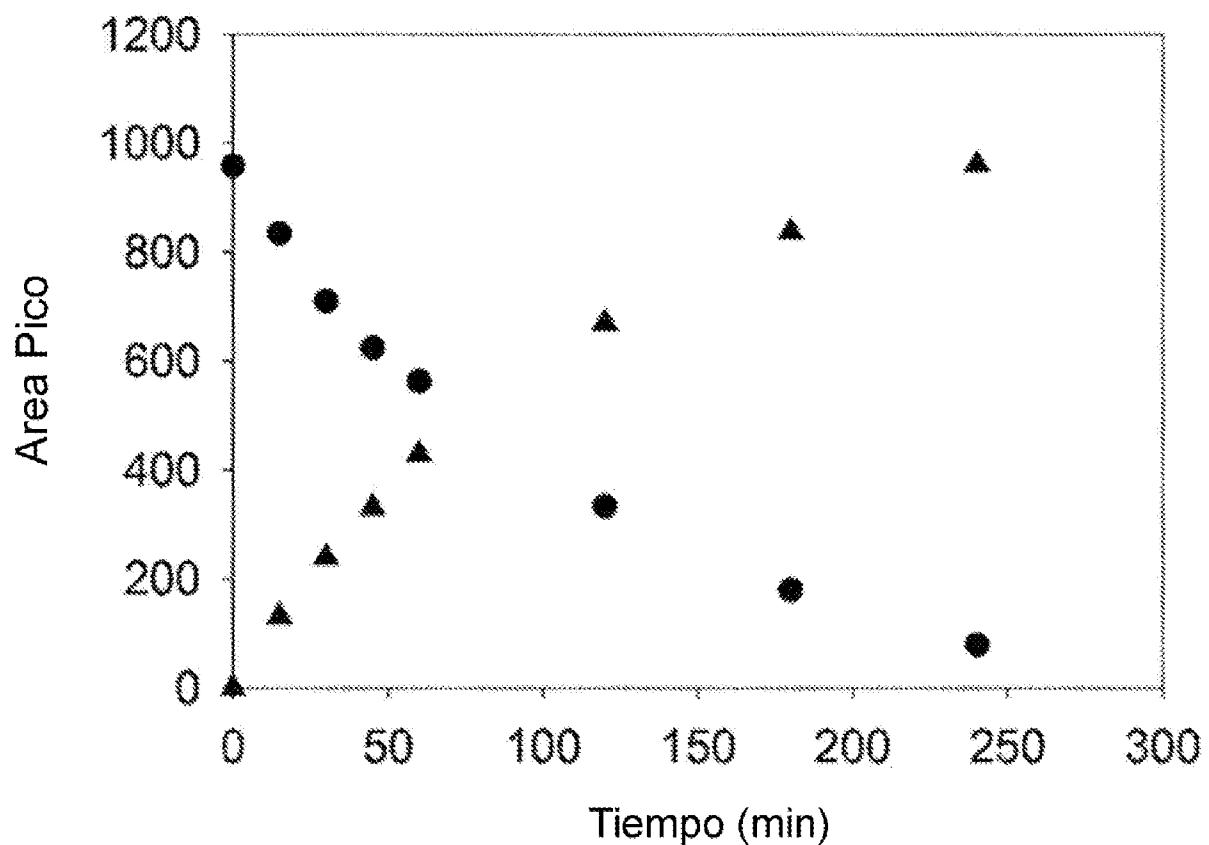


Figura 11

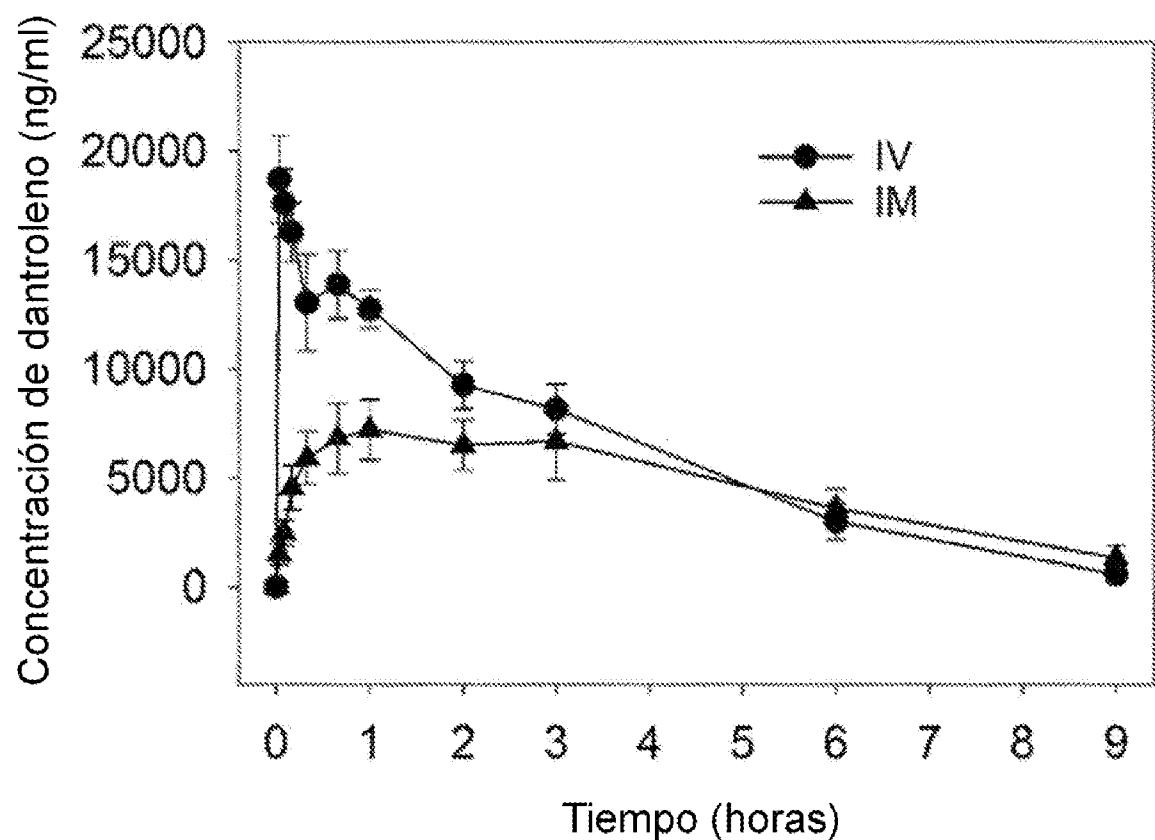


Figura 12

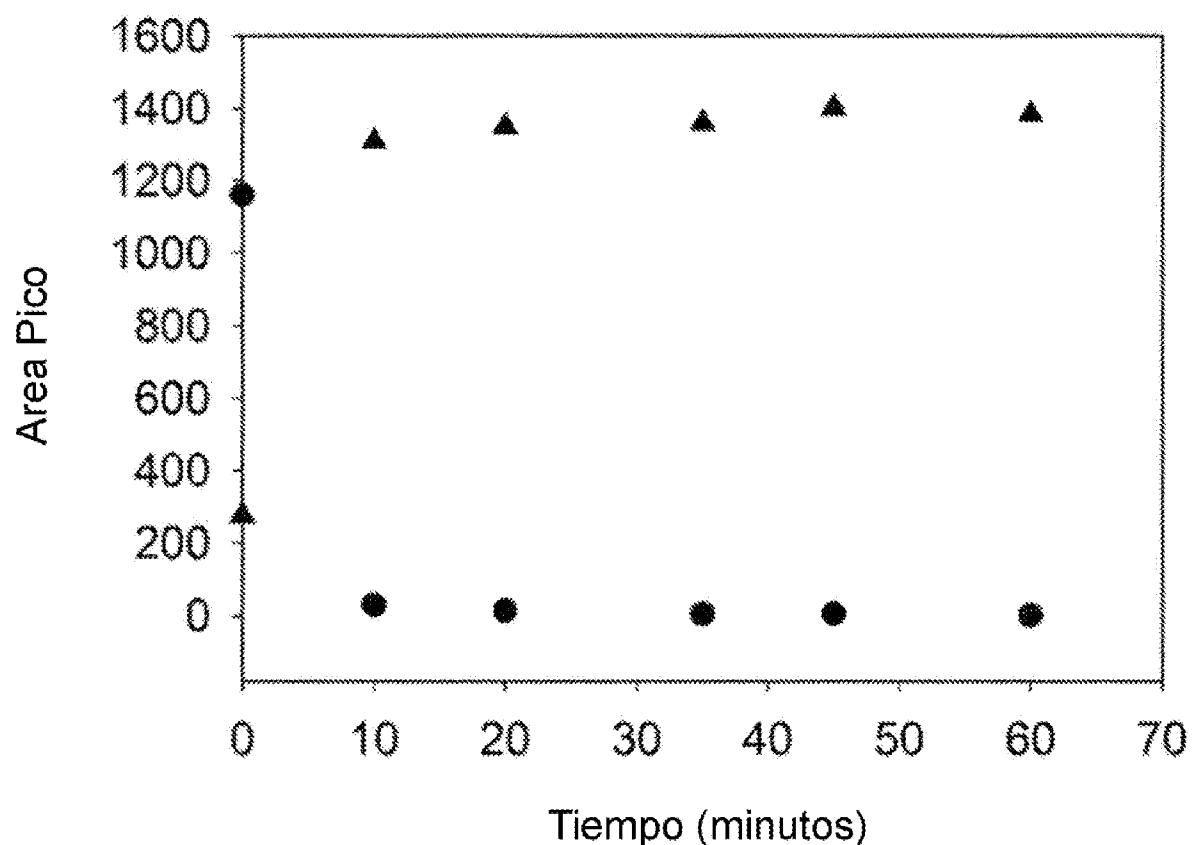


Figura 13

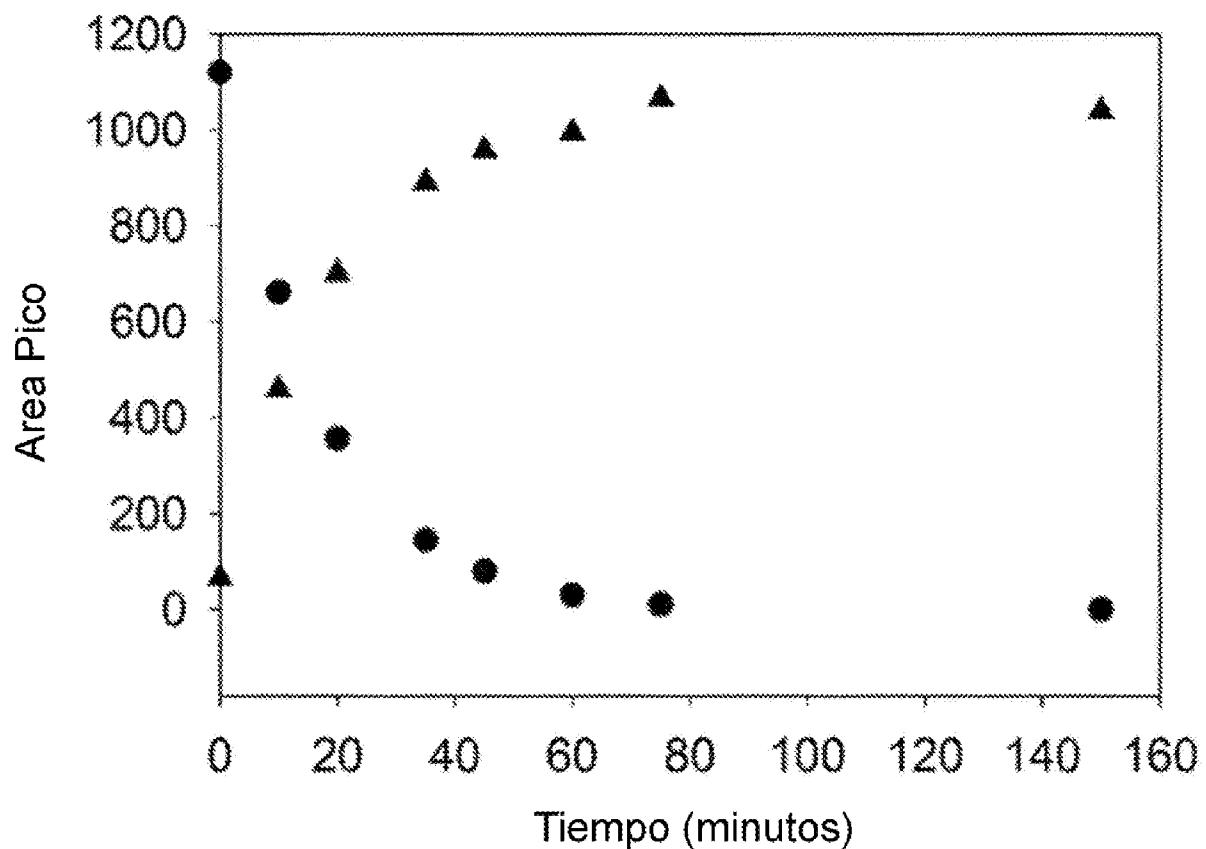


Figura 14

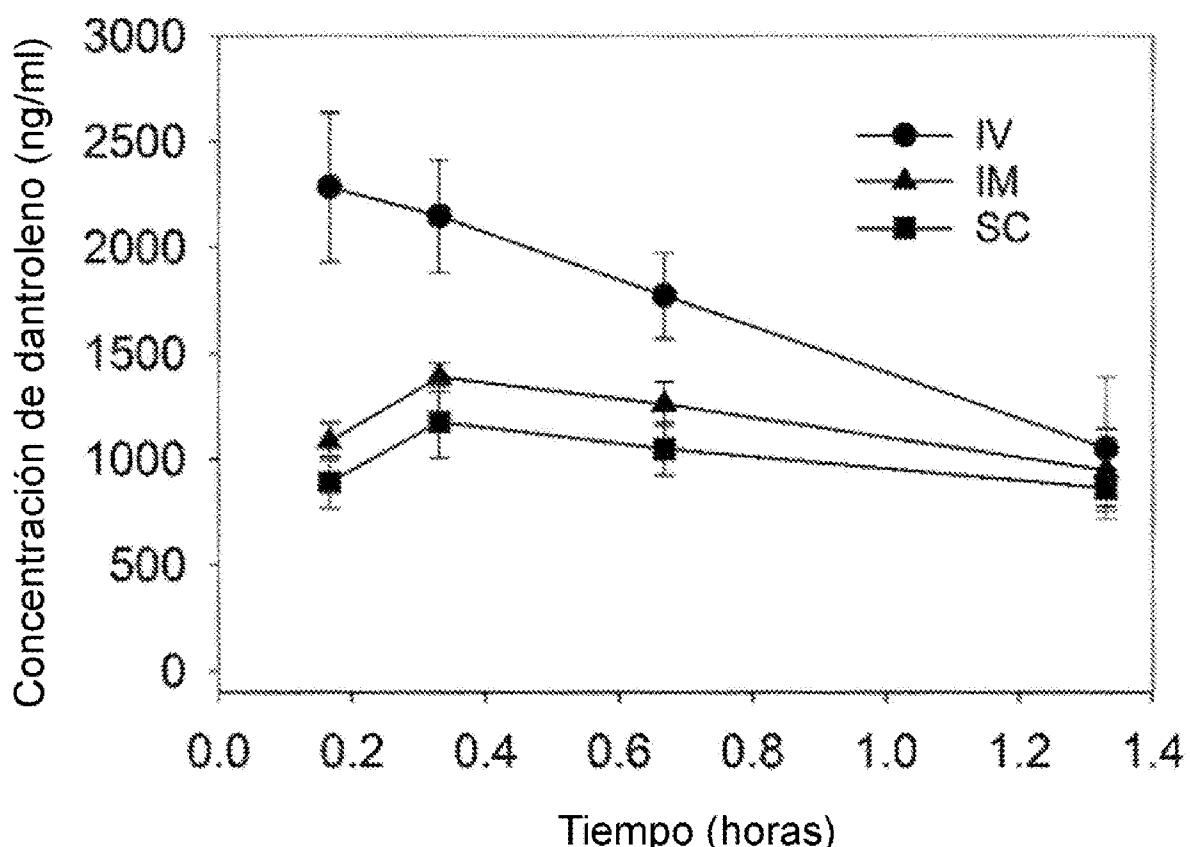


Figura 15

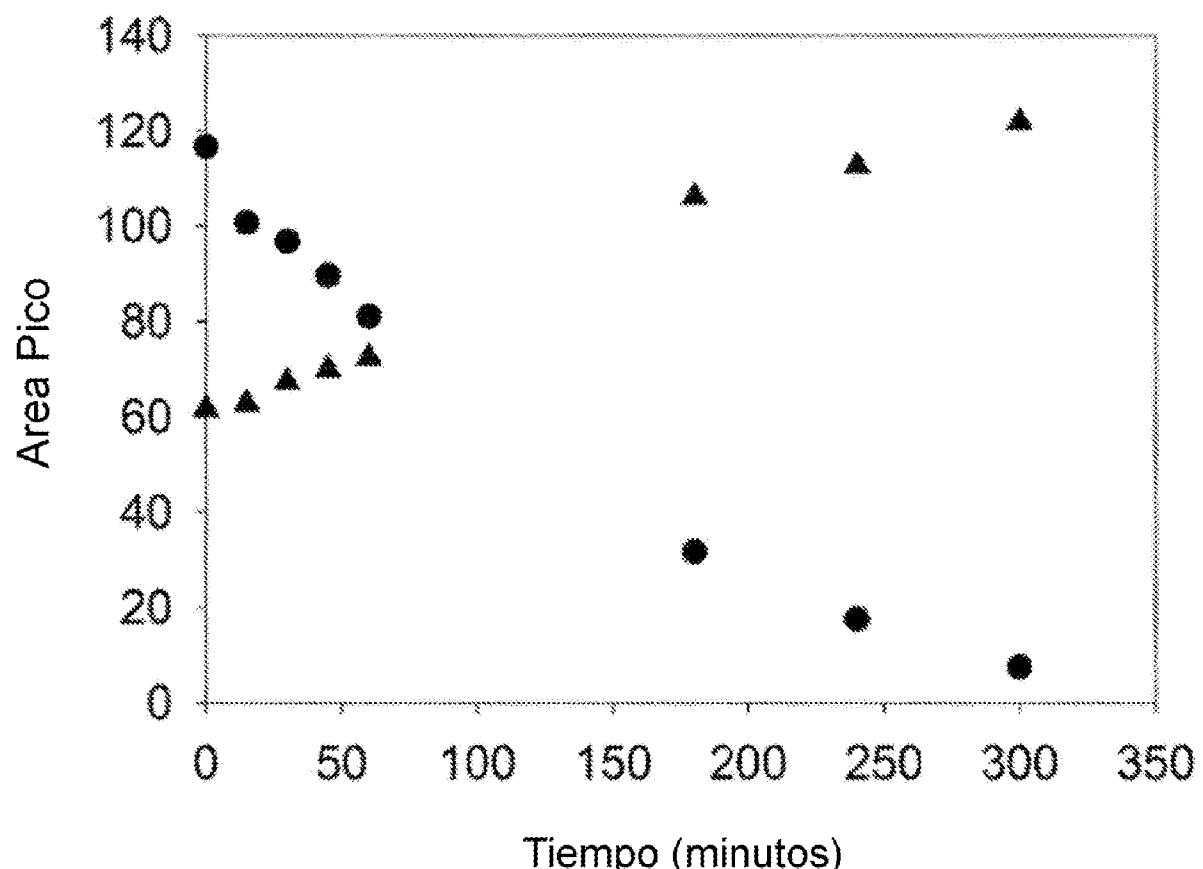


Figura 16

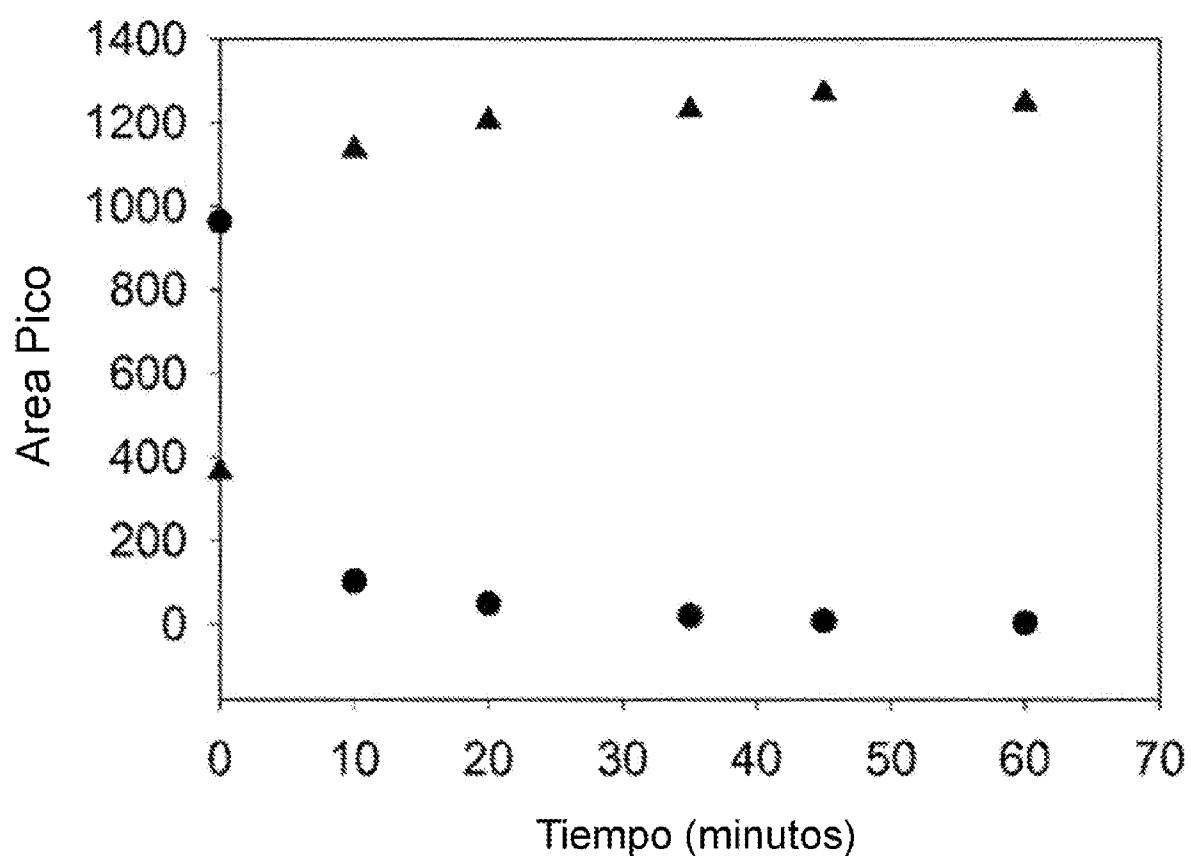


Figura 17

