

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 381**

51 Int. Cl.:
A61K 31/519 (2006.01)
C07D 487/04 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03797233 .8**
96 Fecha de presentación: **11.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1534285**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.06.2005**

54 Título: **INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA FOSFODIESTERASA 9A COMO FÁRMACOS PARA MEJORAR LOS PROCESOS COGNITIVOS.**

30 Prioridad:
23.08.2002 DE 10238722

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.02.2012

73 Titular/es:
**BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH
BINGER STRASSE 173
55216 INGELHEIM AM RHEIN, DE**

72 Inventor/es:
**BÖSS, Frank-Gerhard;
ERB, Christina;
HENDRIX, Martin;
VAN KAMPEN, Marja y
WUNDER, Frank**

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

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).

ES 2 373 381 T3

DESCRIPCIÓN

Inhibidores selectivos de la fosfodiesterasa 9A como fármacos para mejorar los procesos cognitivos

- 5 La presente invención se refiere al uso de inhibidores selectivos de la fosfodiesterasa 9A (PDE 9A) para preparar fármacos destinados a mejorar la percepción y las capacidades de concentración, aprendizaje y/o memoria.

La activación celular de las adenilato- o guanilato-ciclasas produce la ciclación del ATP o GTP a adenosín monofosfato 5'-3' cíclico (cAMP) o guanosín monofosfato 5'-3' cíclico (cGMP). Estos nucleótidos cíclicos (cAMP y cGMP) son importantes como segundo mensajero y juegan un papel esencial en las cascadas de transducción de señales celulares. Ambos, respectivamente, activan a su vez proteíncinasas, entre otras, pero no de modo exclusivo. La proteíncinasa activada por cAMP se designa como proteíncinasa A (PKA), la proteíncinasa activada por cGMP como proteíncinasa G (PKG). A su vez las PKA y PKG activadas pueden fosforilar una serie de proteínas efectoras (p.ej. canales iónicos, receptores acoplados a proteínas G, proteínas estructurales). De esta forma los segundos mensajeros cAMP y cGMP pueden controlar los distintos procesos fisiológicos en los órganos más diversos. Pero los nucleótidos cíclicos también pueden actuar directamente sobre las moléculas efectoras. Así, p.ej., es sabido que el cGMP puede actuar directamente sobre canales iónicos e influir por tanto en la concentración iónica celular (véase un resumen en: Wei y otros, Prog. Neurobiol., 1998, 56: 37 - 64). Las fosfodiesterasas (PDE) son un mecanismo de control para regular la actividad de cAMP y cGMP y, por consiguiente, también estos procesos fisiológicos. Las PDE hidrolizan los monofosfatos cíclicos a los monofosfatos inactivos AMP y GMP. Entretanto se han descrito al menos 21 genes de PDE (Exp. Opin. Investig. Drugs 2000, 9, 1354-3784). Estos 21 genes de PDE se pueden clasificar en 11 familias de PDE según su homología secuencial (véase <http://depts.washington.edu/pde/Nomenclature.html> para la propuesta de nomenclatura). Dentro de una misma familia cada gen de PDE se distingue por letras (p.ej. PDE1A y PDE1B).

25 Cuando hay distintas variantes de empalme dentro de un mismo gen, éste se indica mediante una numeración adicional tras las letras (p.ej. PDE1A1).

Figuras:

30 **Fig. 1:** concentración intracelular de cGMP en cultivos primarios de córtex de ratas (E18) tras el tratamiento con la sustancia del ejemplo 2. Las células se incubaron durante 20 minutos con la sustancia del ejemplo 2 a las concentraciones indicadas. El medio de control indica el valor de cGMP en las células no tratadas. El contenido de DMSO fue del 0,2%, tanto en los medios de control como en las células tratadas con la sustancia. La concentración de cGMP está representada en fmol/150000 células.

35 **Fig. 2:** efecto de la sustancia del ejemplo 2 (10 μ M) en el aumento del potencial de excitación postsináptica focal (fEPSP) tras un tétanos débil. La sustancia del ejemplo 2 reforzó significativamente el incremento del fEPSP al perfundirla entre 10 minutos antes y 30 minutos después de un tétanos débil (símbolo cerrado). El control se trató con 0,01% de DMSO (símbolo abierto). *: $p < 0.05$; análisis de varianza con los factores dosificación (0 y 10 μ M) y tiempo del ensayo con el momento de la medición.

40 **Fig. 3:** efecto de la sustancia del ejemplo 2 en la reducción porcentual (ensayo 2/ensayo1) del tiempo de interacción en la prueba de reconocimiento social (valor medio + E.E.M). A los animales se les inyectó por vía intraperitoneal vehículo (10% de etanol, 20% de solutol, 70% solución salina fisiológica) o 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg o 3,0 mg/kg de la sustancia del ejemplo 2, inmediatamente después de la primera coincidencia (ensayo1). Valoración estadística: * $p < 0,05$.

PDE9A - Descubrimiento, propiedades, distribución

La PDE9A humana (GenBank/EMBL número de acceso NM_002606, ver secuencia de ADNc en el listado de secuencias, SEQ ID NO:1) se clonó y secuenció en 1998. La coincidencia de aminoácidos con otras PDEs es como máximo del 34% (PDE8A) y como mínimo del 28% (PDE5A). Con un valor K_m de 170 nM la PDE9A tiene una gran afinidad por el cGMP. Además la PDE9A es selectiva para cGMP (valor K_m para cAMP = 230 μ M). La PDE9A no presenta ningún dominio de fijación de cGMP (dominio GAF) que haga pensar en una regulación enzimática alostérica mediante cGMP. En un análisis Western Blot se demostró que en el hombre la PDE9A se expresa en los testículos, en el cerebro, en el intestino delgado, en la musculatura esquelética, en el corazón, en los pulmones, en el timo y en el bazo. La mayor expresión se ha encontrado en el cerebro, en el intestino delgado, en el corazón y en el bazo (Fisher y otros, J. Biol. Chem, 1998, 273 (25): 15559 - 15564). El gen para la PDE9A humana se halla en el cromosoma 21q22.3 y contiene 20 exones. Hasta ahora se han identificado 20 variantes de empalme alternativas de la PDE9A (Guipponi y otros, Hum. Genet., 1998, 103: 386 - 392; Rentero y otros, Biochem. Biophys. Res. Commun., 2003, 301: 686 - 692). Los clásicos inhibidores de PDE no inhiben la PDE9A humana. Así, por ejemplo, la IBMX, el dipiridamol, el SKF94120, el rolipram y la vinpocetina, a concentraciones de hasta 100 μ M, no tienen ningún efecto inhibitor en el enzima aislado. Para el zaprinast se halló un valor IC_{50} de 35 μ M (Fisher y otros, J. Biol. Chem, 1998, 273 (25): 15559 -15564).

65 La PDE9A de ratón fue clonada y secuenciada en 1998 por Soderling y otros (J. Biol. Chem, 1998, 273 (19): 15553 - 15558). Al igual que la forma humana tiene gran afinidad por el cGMP, con un valor K_m de 70 nM. En el ratón se

encontró una expresión especialmente alta en riñones, cerebro, pulmones y corazón. La PDE9A de ratón tampoco es inhibida por la IBMX a concentraciones menores de 200 μM ; la IC_{50} para el zaprinast es de 29 μM (Soderling y otros, J. Biol. Chem, 1998, 273 (19): 15553 - 15558). Se demostró que en el cerebro de rata la PDE9A se expresa fuertemente en algunas regiones, entre ellas el bulbo olfatorio, el hipocampo, el córtex, los ganglios basales y el cerebro frontal basal (Andreeva y otros, J. Neurosci., 2001, 21 (22): 9068 - 9076). En particular el hipocampo, el córtex y el cerebro frontal basal tienen un papel importante en los procesos de aprendizaje y memoria.

La PDE9A se caracteriza por una afinidad especialmente alta por el cGMP. El valor K_m para el cGMP es de 170 nM (Fisher y otros, J. Biol. Chem., 1998, 273 (25): 15559 - 15564). Por consiguiente la PDE9A, a diferencia de la PDE2A ($K_m = 10 \mu\text{M}$; Martins y otros, J. Biol. Chem., 1982, 257: 1973 - 1979), de la PDE5A ($K_m = 4 \mu\text{M}$; Francis y otros, J. Biol. Chem., 1980, 255: 620 - 626), PDE6A ($K_m = 17 \mu\text{M}$; Gillespie y Beavo, J. Biol. Chem., 1988, 263 (17): 8133 - 8141) y de la PDE11A ($K_m = 0,52 \mu\text{M}$; Fawcett y otros, PNAS, 2000, 97 (7): 3702 - 3707), ya es activa a pequeñas concentraciones fisiológicas. Al contrario que la PDE2A (Murashima y otros, Biochemistry, 1990, 29: 5285 - 5292) el cGMP no aumenta la actividad catalítica de la PDE9A, ya que ésta no presenta ningún dominio GAF (Beavo y otros, Current Opinion in Cell Biology, 2000, 12: 174 - 179). Por tanto los inhibidores de la PDE9A producen un aumento de la concentración basal de cGMP (ver figura 1). Este aumento de la concentración basal de cGMP mejoró de manera sorprendente la capacidad de aprendizaje y memoria en la prueba de reconocimiento social.

Sorprendente se comprobó que los inhibidores de la PDE9A tienen un efecto en el funcionamiento del sistema nervioso central. En concreto se halló que los inhibidores selectivos de la PDE9A son apropiados para preparar medicamentos destinados a mejorar la percepción y las capacidades de concentración, aprendizaje o memoria.

En el sentido de la presente invención un inhibidor de la PDE9A es un compuesto que en las condiciones indicadas es capaz de inhibir la PDE9A humana con una IC_{50} inferior a 10 μM , preferiblemente inferior a 1 μM .

En el sentido de la presente invención un inhibidor selectivo de la PDE9A es un compuesto que en las condiciones indicadas inhibe la PDE9A humana con mayor fuerza que las PDE1C, PDE2A, PDE3B, PDE4B, PDE5A, PDE7B, PDE8A, PDE10A y PDE11A humanas. Se prefiere que la relación $\text{IC}_{50}(\text{PDE9A})/\text{IC}_{50}(\text{PDE1C, PDE2A, PDE3B, PDE4B, PDE5A, PDE7B, PDE8A, PDE10A y PDE11A})$ sea menor de 0,2.

Los inhibidores selectivos de la PDE9A sirven especialmente para mejorar la percepción y las capacidades de concentración, aprendizaje o memoria tras los trastornos cognitivos que aparecen en situaciones/enfermedades/síndromes como deterioro cognitivo leve, trastornos de aprendizaje y memoria relacionados con la edad, pérdidas de memoria relacionadas con la edad, demencia vascular, traumatismo craneo-encefálico, apoplejía, demencia que se manifiesta tras los ataques de apoplejía (demencia postapoplética), demencia postraumática, trastornos generales de concentración, trastornos de concentración en niños con problemas de aprendizaje y memoria, enfermedad de Alzheimer, demencia con corpúsculos de Lewy, demencia con degeneración de los lóbulos frontales, incluyendo el síndrome de Pick, enfermedad de Parkinson, parálisis nuclear progresiva, demencia con degeneración corticobasal, esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, degeneración del tálamo, demencia de Creutzfeld-Jakob, demencia por VIH, esquizofrenia con demencia o psicosis de Korsakoff.

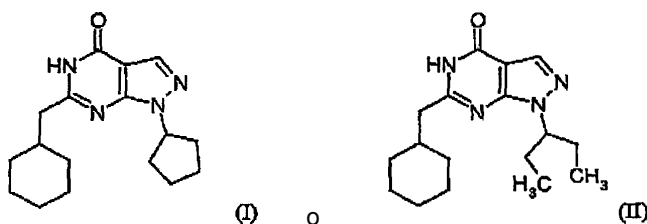
La presente invención se refiere al empleo de inhibidores selectivos de la PDE9A, según la reivindicación 1, para preparar medicamentos destinados a mejorar la percepción, la capacidad de concentración, los procesos cognitivos y las capacidades de aprendizaje y/o de memoria.

Además la presente invención se refiere al uso de inhibidores selectivos de la PDE9A, según la reivindicación 1, para la profilaxis y/o el tratamiento de los trastornos de la percepción, de la capacidad de concentración, de los procesos cognitivos y de las capacidades de aprendizaje y/o de memoria.

El trastorno puede ser la consecuencia, entre otras, de una enfermedad del grupo constituido por demencia, ataque de apoplejía, traumatismo craneo-encefálico, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, depresión o demencia con degeneración de los lóbulos frontales.

La presente invención se refiere asimismo al uso de inhibidores de la PDE9A, según la reivindicación 1, para tratar enfermedades del sistema nervioso central que pueden ser objeto de terapia mediante el nivel de cGMP. Así, por ejemplo, la presente invención se refiere al tratamiento de demencia, ataques de apoplejía, traumatismo craneo-encefálico, enfermedad de Alzheimer, demencia con degeneración de lóbulos frontales, demencia con corpúsculos de Lewy, demencia vascular, síndrome de déficit de atención, trastornos de atención y concentración, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, depresión, enfermedades afectivas, psicosis, neurosis, miedo, manías o afecciones maniaco-depresivas, enfermedad de Pick, dolor y epilepsia.

La presente invención se refiere al empleo de los inhibidores de la PDE9A, conforme a la presente invención, que corresponden a las fórmulas



Los compuestos de las fórmulas (I) y (II) también pueden encontrarse en forma de sus sales, solvatos o solvatos de sus sales. En el marco de la presente invención se prefieren las sales fisiológicamente inocuas.

Las sales fisiológicamente inocuas pueden ser sales de los compuestos según la presente invención con ácidos inorgánicos u orgánicos. Se prefieren las sales con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico, o sales con ácidos orgánicos carboxílicos o sulfónicos como, por ejemplo, ácido acético, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido benzoico o ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido toluensulfónico o ácido naftalensulfónico.

Las sales fisiológicamente inocuas también pueden ser sales metálicas o amónicas de los compuestos conforme a la presente invención. Se prefieren especialmente las sales de metales alcalinos (p.ej. sales de sodio o potasio), las sales de metales alcalinotérreos (p.ej. sales de magnesio o calcio), así como las sales amónicas derivadas de amoníaco o de aminas orgánicas como, por ejemplo, etilamina, di- o trietilamina, di- o trietanolamina, dicitclohexilamina, dimetil-aminoetanol, arginina, lisina, etilendiamina o 2-feniletilamina.

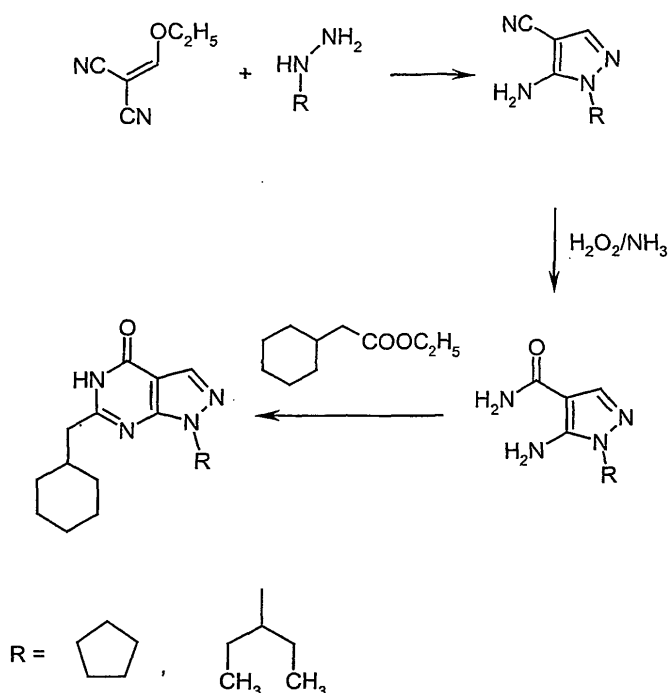
La patente WO 98/40384 revela pirazolopirimidinas caracterizadas como inhibidores de las PDE1-, 2- y 5 que se pueden usar para tratar afecciones cardiovasculares y cerebrovasculares, así como afecciones de ámbito urogenital.

En las patentes CH 396 924, CH 396 925, CH 396 926, CH 396 927, DE 1 147 234, DE 1 149 013, GB 937,726 se describen pirazolopirimidinas con efecto de dilatación coronaria, que pueden usarse para tratar trastornos del riego sanguíneo del músculo cardíaco.

En la patente 3,732,225 se describen pirazolopirimidinas que actúan como antiinflamatorios y disminuyen el nivel de azúcar en sangre.

En la patente DE 2 408 906 se describen unas estirenopirazolopirimidinas que se pueden emplear como agentes antimicrobianos y antiinflamatorios para tratar, por ejemplo, edemas.

Los compuestos conforme a la presente invención se pueden preparar mediante el esquema de síntesis descrito a continuación:



En caso necesario una reacción final de los compuestos de las fórmulas (I) y (II) con los respectivos (i) disolventes y/o (ii) bases o ácidos produce las correspondientes sales, solvatos y/o solvatos de las sales.

El principio activo puede actuar sistémica y/o localmente. Para este fin se puede administrar de forma apropiada, p.ej. por vía oral, parenteral, pulmonar, nasal, sublingual, lingual, bucal, rectal, transdérmica, conjuntiva, ótica o como implante.

Para estas vías de administración el principio activo puede administrarse en formas de aplicación apropiadas.

Para la administración oral son apropiadas las formas de aplicación ya conocidas, que liberan el principio activo de forma rápida y/o modificada como p.ej. tabletas (sin recubrir o recubiertas, p.ej. con recubrimientos resistentes al jugo gástrico), cápsulas, grageas, granulados, píldoras, polvos, emulsiones, suspensiones y soluciones.

La administración parenteral se puede llevar a cabo evitando un movimiento de resorción (por vía endovenosa, intraarterial, intracardiaca, intraespinal o intralumbal) o insertando una resorción (por vía intramuscular, subcutánea, intracutánea, percutánea, o intraperitoneal). Para la administración parenteral son apropiados como medios de aplicación, entre otros, los preparados de inyección e infusión en forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, liofilizados y polvos estériles.

Para otras vías de administración sirven p.ej. los fármacos preparados para inhalar (entre ellos los inhaladores de polvo, nebulizadores), las gotas/soluciones nasales, los aerosoles; las tabletas o cápsulas de administración lingual, sublingual o bucal, los supositorios, los preparados óticos y oftálmicos, las cápsulas vaginales, las suspensiones acuosas (lociones, mezclas agitables), las suspensiones lipófilas, las pomadas, las cremas, las leches, las pastas, los polvos esparcibles o los implantes.

Los principios activos pueden transferirse del modo ya sabido a las formas farmacéuticas mencionadas, lo cual tiene lugar mediante el uso de sustancias auxiliares farmacéuticas inertes y atóxicas adecuadas. Entre ellas cabe citar vehículos (p.ej. celulosa microcristalina), disolventes (p.ej. polietilenglicoles líquidos), emulsionantes (p.ej. dodecil-sulfato sódico), agentes dispersantes (p.ej. polivinilpirrolidona), biopolímeros sintéticos y naturales (p.ej. albúmina), estabilizantes (p.ej. antioxidantes como el ácido ascórbico), colorantes (p.ej. ejemplo, pigmentos inorgánicos como los óxidos de hierro) o correctores del sabor y/o del olor.

En el caso de la aplicación parenteral, para obtener resultados efectivos se ha revelado ventajosa de modo general la administración de cantidades comprendidas aproximadamente entre 0,001 y 30 mg/kg, preferiblemente entre 0,01 y 10 mg/kg de peso corporal. En el caso de la aplicación oral la cantidad está comprendida aproximadamente entre 0,01 y 100 mg/kg, preferiblemente entre 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal.

Sin embargo, dado el caso, puede ser necesario apartarse de las cantidades mencionadas, dependiendo del peso corporal, de la vía de administración, del comportamiento individual frente al principio activo, del tipo de preparado y del momento o intervalo en que tiene lugar la administración.

Inhibición de PDE

Las fosfodiesterasas recombinantes PDE1C (GenBank/EMBL número de acceso: NM_005020, Loughney y otros J. Biol. Chem. 1996 271, 796-806), PDE2A (GenBank/EMBL número de acceso: NM_002599, Rosman y otros Gene 1997 191, 89-95), PDE3B (GenBank/EMBL número de acceso: NM_000922, Miki y otros Genomics 1996 36, 476-485), PDE4B (GenBank/EMBL número de acceso: NM_002600, Obernolte y otros Gene. 1993 129, 239-247), PDE5A (GenBank/EMBL número de acceso: NM_001083, Loughney y otros Gene 1998 216, 139-147), PDE7B (GenBank/EMBL número de acceso: NM_018945, Hetman y otros Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000 97, 472-476), PDE8A (GenBank/EMBL número de acceso: AF_056490, Fisher y otros Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998 246, 570-577), PDE9A (GenBank/EMBL número de acceso: NM_002606, ver secuencia de ADNc en el listado de secuencias, SEQ ID NO:1, Fisher y otros, J. Biol. Chem., 1998, 273 (25): 15559 - 15564), PDE10A (GenBank/EMBL número de acceso: NM_06661, Fujishige y otros J. Biol. Chem. 1999, 274, 18438-45.) y PDE11A (GenBank/EMBL número de acceso: NM_016953, Fawcett y otros Proc. Natl. Acad. Sci. 2000, 97, 3702-3707) se expresaron en células Sf9 mediante el sistema de expresión pFASTBAC baculovirus (GibcoBRL). Las células se recolectan 48 h después de la infección y se suspenden en 20 ml (por 1 l de cultivo) de tampón de lisis (Tris 50 mM-HCl, pH 7,4, NaCl 50 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 1,5 mM, 10% de glicerina más 20 µl del cóctel de inhibidores de proteasa grupo III [CalBiochem, La Jolla, CA USA]). Las células se tratan a 4°C con ultrasonidos durante 1 minuto y a continuación se centrifugan a 10000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante (preparado de PDE) se recogió y se conservó a -20°C.

Las sustancias ensayadas se disuelven en 100% de DMSO para determinar su efecto *in vitro* sobre la PDE9A y se diluyen en serie. Normalmente se preparan series de dilución de 200 µM hasta 1,6 µM (concentraciones finales en el ensayo: 4 µM hasta 0,032 µM). En los pocillos de placas de microvaloración (Isoplate; Wallac Inc., Atlanta, GA) se introducen respectivamente 2 µl de las soluciones diluidas de las sustancias. A continuación se agregan 50 µl de una dilución del preparado de PDE9A arriba descrito, elegida de manera que durante la incubación posterior reaccione

menos del 70% del sustrato (dilución típica: 1: 10000; tampón de dilución: Tris 50 mM/HCl pH 7,5, MgCl₂ 8,3 mM, EDTA 1,7 mM, 0,2% de BSA). El sustrato, [8-H³] guanosín-fosfato 3', 5'-cíclico (1 µCi/µl; Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ), se diluye 1:2000 con tampón de ensayo (Tris 50 mM/HCl pH 7,5, MgCl₂ 8,3 mM, EDTA 1,7 mM) hasta una concentración de 0,0005 µCi/µl. Por último, la reacción enzimática se inicia añadiendo 50 µl (0,025 µCi) del sustrato diluido. Las preparaciones de ensayo se incuban durante 60 min. a temperatura ambiente y la reacción se para agregando 25 µl de un inhibidor de PDE9A disuelto en tampón de ensayo (p.ej. el inhibidor del ejemplo de preparación 2, concentración final 10 µM). Inmediatamente después se añaden 25 µl de una suspensión con 18 mg/ml de perlas de proximidad de centelleo de itrio (Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ.). Las placas de microvaloración se sellan con una lámina y se dejan en reposo durante 60 min. a temperatura ambiente. A continuación las placas se miden durante 30 s por pocillo en un contador de centelleo Microbeta (Wallac Inc., Atlanta, GA). Los valores IC₅₀ se determinan representando gráficamente la concentración de sustancia frente a la inhibición porcentual.

El efecto *in vitro* de las sustancias ensayadas sobre las fosfodiesterasas recombinantes PDE3B, PDE4B, PDE7B, PDE8A, PDE10A y PDE11A se determina según el protocolo de ensayo arriba descrito para la PDE9A, pero con los siguientes ajustes: como sustrato se usa [5'-H³] adenosín-fosfato 3', 5'-cíclico (1 µCi/µl; Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ). No es necesario agregar una solución de inhibidor para detener la reacción. En lugar de ello, tras la incubación del sustrato y la PDE se prosigue directamente con la adición de las perlas de proximidad de centelleo de itrio, tal como se ha descrito arriba, y así se para la reacción. Para determinar el correspondiente efecto en las PDE1C, PDE2A y PDE5A recombinantes, el protocolo se adapta adicionalmente del siguiente modo: para la PDE1C se añade además calmodulina 10⁻⁷ M y CaCl₂ 3 mM a la mezcla reactiva. La PDE2A se estimula en el ensayo mediante la adición de cGMP 1 µM y se prueba con una concentración de BSA del 0,01%. Para la PDE1C y la PDE2A se emplea como sustrato [5'-H³] adenosín-fosfato 3', 5'-cíclico (1 µCi/µl; Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ) y para la PDE5A [8-H³] guanosín-fosfato 3', 5'-cíclico (1 µCi/µl; Amersham Pharmacia Biotech., Piscataway, NJ).

Inhibición de isoenzimas de PDE mediante la sustancia del ejemplo 2:

Isoenzima	Especie	IC ₅₀ [nM]
PDE1C	humana	720
PDE2A	humana	> 4000
PDE3B	humana	> 4000
PDE4B	humana	> 4000
PDE5A	humana	> 4000
PDE7B	humana	> 4000
PDE8A	humana	> 4000
PDE9A	humana	110
PDE10A	humana	> 4000
PDE11A	humana	> 4000

El efecto inhibitor de la PDE9A por la sustancia del ejemplo 1 se puede demostrar experimentalmente con un valor de IC₅₀ = 5 nM.

Aumento de la concentración de cGMP intracelular neuronal en cultivos celulares

Los inhibidores de la PDE9A aumentan el cGMP intracelular neuronal en neuronas corticales primarias cultivadas.

Se decapitaron embriones de rata (edad del embrión E17 - E19), las cabezas se introdujeron en cubetas llenas de medio de preparación (DMEM, penicilina/estreptomicina; ambos de Gibco). Se quitó la piel de la cabeza y la tapa del cráneo y los encéfalos descubiertos se trasladaron a otra placa de Petri con medio de preparación. Mediante unos binoculares y dos pinzas se aisló el cerebro (córtex) y se enfrió con hielo a 4°C. Esta preparación y la separación de las neuronas corticales se realizaron siguiendo un protocolo estándar con el kit de papaína (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey 08701, USA) (Huettnner y otros J. Neurosci. 1986, 6, 3044-3060.). Las neuronas corticales aisladas mecánicamente se cultivaron a razón de 150.000 células/pocillo en 200 µl de medio neurobasal/pocillo (Neurobasal; con suplemento B27; L-Glutamina 2 mM; en presencia de penicilina/estreptomicina; todos los agentes de Gibco) durante 7 días en placas de 96 pocillos (pretratados con poli-D lisina 100 µg/ml durante 30 min.) en condiciones estándar (37°C, 5% de CO₂). A los 7 días se retiró el medio y las células se lavaron con tampón HBSS (solución salina equilibrada de Hank, Gibco/BRL). Seguidamente se añadieron a las células 100 µl de la sustancia de ensayo del ejemplo 2 disuelta en tampón HBSS (antes disuelta en 100% de DMSO). A continuación se añadieron de nuevo 100 µl de tampón HBSS, con lo cual la concentración final de la sustancia de ensayo del ejemplo 2 fue como la indicada en la fig. 1, y se incubó a 37°C durante 20 min. Luego se retiró completamente el tampón de ensayo. A continuación las células se lisaron en 200 µl de tampón de lisis (kit de cGMP código RPN 226; de Amersham Pharmacia Biotech.) y se midió la concentración de cGMP según las indicaciones del fabricante. Las mediciones se efectuaron por triplicado. La valoración estadística se realizó mediante el programa informático Prism Software Versión 2.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA USA).

La incubación de las neuronas primarias con la sustancia del ejemplo 2 aumentó el contenido de cGMP (fig. 1).

Potenciación a largo plazo

- 5 La potenciación a largo plazo se contempla como un correlato celular para los procesos de aprendizaje y memoria. Para determinar si la inhibición de PDE9 tenía influencia en la potenciación a largo plazo se empleó el siguiente método:

Se colocaron hipocampos de rata formando un ángulo de unos 70 grados respecto a la cuchilla de un cortador. El hipocampo se cortó a intervalos de 400 μm . Los cortes se separaron de la cuchilla con la ayuda de un pincel muy suave y empapado (de pelo de marta) y se introdujeron en un recipiente de vidrio con solución nutritiva fría carbogenada (NaCl 124 mM, KCl 4,9 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,3 mM, CaCl_2 anhidro 2,5 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, NaHCO_3 25,6 mM, glucosa 10 mM, pH 7,4). Durante la medición los cortes se encontraban en una cámara temperada bajo un nivel de líquido de 1-3 mm de altura. El caudal era de 2,5 ml/min. La pregasificación tuvo lugar a una ligera sobrepresión (aprox. 1 atm) en la precámara, a través de una microcánula. La cámara de corte estaba conectada con la precámara de manera que pudiera mantenerse una minicirculación. Para impulsar la minicirculación se usó la corriente de carbógeno a través de la microcánula. Los cortes de hipocampo recién preparados se aclimataron durante al menos 1 hora a 33°C en la cámara de corte.

- 20 La intensidad del estímulo se eligió de manera que los potenciales postsinápticos excitatorios focales (fEPSP) fueran el 30% del potencial postsináptico excitatorio máximo (EPSP). Mediante un electrodo de estimulación monopolar de acero inoxidable lacado y un generador de estímulos bifásico de corriente constante (AMSystems 2100) se excitaron localmente las colaterales de Schaffer (tensión: 1-5 V, amplitud de impulso monopolar 0,1 ms, amplitud de impulso total 0,2 ms). Con la ayuda de electrodos de vidrio (vidrio de borosilicato con filamento, 1-5 MOhm, diámetro 1,5 mm, diámetro de la punta 3-20 μm) rellenos de solución nutritiva normal se registraron los potenciales postsinápticos excitatorios (fEPSP) del *stratum radiatum*. Los potenciales de campo se midieron frente a un electrodo de referencia de plata clorado, situado al borde de la cámara de corte, con la ayuda de un amplificador de tensión continua. Los potenciales de campo se filtraron a través de un filtro de paso bajo (5 kHz). Para realizar el análisis estadístico de los experimentos se calculó el incremento (pendiente) de los fEPSP. El registro, análisis y control del experimento se efectuó mediante un programa informático (PWIN) desarrollado en el departamento de neurofisiología del instituto Leibniz de neurobiología, Magdeburg. El valor medio de los incrementos de los fEPSP en los respectivos momentos y la construcción del diagrama se obtuvo mediante el programa informático EXCEL, automatizando la toma de datos con un macro adecuado.

- 35 En los ensayos de control primero se registró la transmisión sináptica basal durante 60 - 120 minutos. A continuación se aplicaron cuatro veces dos impulsos dobles a intervalos de 200 ms, con un intervalo de 10 ms entre cada impulso del impulso doble y una amplitud de 0,2 ms para el impulso individual (tétanos débil) (momento = 0 minutos en la figura 2). La potenciación de los EPSP se registró durante al menos 60 minutos. En el experimento descrito la sustancia del ejemplo 2 se introdujo entre 10 minutos y 30 minutos después de la estimulación.

- 40 La superfusión de los cortes de hipocampo con una solución 10 μM de la sustancia del ejemplo 2 dio lugar a un aumento importante de la LTP (figura 2).

Ensayo de reconocimiento social:

- 45 El ensayo de reconocimiento social es una prueba de aprendizaje y memoria. Mide la capacidad de las ratas para distinguir entre congéneres conocidos y desconocidos. Por tanto esta prueba es adecuada para ver si las sustancias ensayadas mejoran la capacidad aprendizaje o de memoria.

- 50 Ratas adultas, que estaban reunidas en grupos, se metieron individualmente en jaulas de ensayo 30 minutos antes de empezar la prueba. Cuatro minutos antes de empezar la prueba el animal del ensayo se introdujo en una caja de observación. Después de este tiempo de adaptación se colocó un animal joven junto al animal del ensayo y durante 2 minutos se midió el tiempo absoluto en que el animal adulto examinaba al joven (ensayo 1). Se midieron todos los comportamientos dirigidos claramente al animal joven, como inspección anogenital, seguimiento, cuidado de la piel, en los cuales el animal adulto no se apartaba más de 1 cm del animal joven. Luego se sacó el animal joven y el adulto se trató con sustancia del ejemplo 2 o con vehículo y a continuación se devolvió a su jaula de origen. Tras un tiempo de espera de 24 horas se repitió la prueba (ensayo 2). Un menor tiempo de interacción social respecto al ensayo 1 indicaría que el animal adulto se acordaba del animal joven.

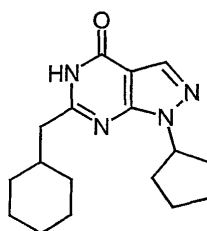
- 60 Inmediatamente después del ensayo 1 a los animales adultos se les inyectó por vía intraperitoneal vehículo (10% de etanol, 20% de solutol, 70% de solución salina fisiológica) o bien 0,1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 1,0 mg/kg y 3,0 mg/kg de sustancia del ejemplo 2 disuelta en 10% de etanol, 20% de solutol, 70% de solución salina fisiológica. Las ratas tratadas con vehículo no mostraron ninguna disminución del tiempo de interacción social en el ensayo 2 respecto al ensayo 1. Por tanto habían olvidado que habían estado una vez en contacto con el animal joven. En el segundo ensayo, después del tratamiento con la sustancia del ejemplo 2, el tiempo de interacción social respecto al vehículo disminuyó sorprendentemente, lo cual significa que las ratas tratadas con la sustancia se acordaban del animal joven y por consiguiente el ejemplo 2 mejoraba la capacidad aprendizaje o de memoria.

Abreviaturas empleadas:

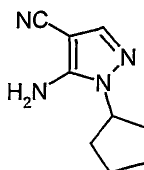
DMSO	dimetilsulfóxido
d.t.	del teórico (rendimiento)
equiv.	equivalente(s)
ESI	ionización por electrospray (en la MS)
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento y alta presión
MS	espectroscopia de masas
RMN	espectroscopia de resonancia magnética nuclear
Pf	punto de fusión

Ejemplos de ejecución:Ejemplo 1

6-(Ciclohexilmetil)-1-ciclopentil-1,5-dihidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona

Etapa 1a)

5-Amino-1-ciclopentil-1H-pirazol-4-carbonitrilo



Una solución de etoximetilenmalondinitrilo (7,93 g, 64,9 mmoles) en 100 ml de metanol se mezcla lentamente a temperatura ambiente, bajo atmósfera de argón, con ciclopentilhidrazina (6,5 g, 64,9 mmoles); a continuación se calienta 3 h a reflujo y luego se agita por la noche a temperatura ambiente. El disolvente se extrae en el evaporador rotativo y el residuo se deslíe con dietiléter. El sólido se aspira, se lava con dietiléter y se seca con vacío elevado.

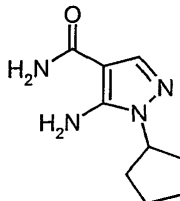
Rendimiento: 7,24 g (63% d.t.)

MS (ESI): $m/z = 177 (M+H)^+$

RMN- 1H (200 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,5$ (s, 1H), 4,45 (br, s, 2H), 4,35 (m, 1H), 2,2-1,55 (m, 6H) ppm.

Etapa 1b)

5-Amino-1-ciclopentil-1H-pirazol-4-carboxamida



Una solución de 5-amino-1-ciclopentil-1H-pirazol-4-carbonitrilo (6,74 g, 38,3 mmoles) en una mezcla de 300 ml de etanol y 371 ml de solución acuosa amoniacal concentrada se mezcla a temperatura ambiente con 85 ml de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% y se agita durante la noche a temperatura ambiente. A continuación los disolventes no acuosos se extraen en el evaporador rotativo. De la mezcla restante precipita el producto y el sólido se aspira, se lava con dietiléter y se seca con vacío elevado.

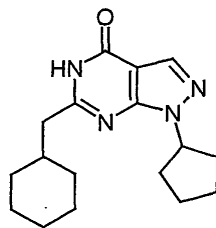
Rendimiento: 5,31 g (71% d.t.)

MS (ESI): $m/z = 195 (M+H)^+$

RMN- 1H (200 MHz, $CDCl_3$): $\delta = 7,5$ (s, 1H), 5,6-4,8 (ancho, 4H), 4,35 (m, 1H), 2,2-1,55 (m, 8H) ppm.

Etapas 1c)

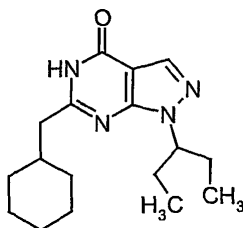
6-(Ciclohexilmetil)-1-ciclopentil-1,5-dihidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona



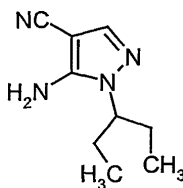
- 5 Bajo una atmósfera de argón se preparan 75 mg (0,39 mmoles) de 5-amino-1-ciclopentil-1H-pirazol-4-carboxamida y 183 mg (1,16 mmoles, 3 equiv.) de ciclohexilacetato de metilo en 1,5 ml de etanol absoluto. Se añaden lentamente a 0°C 54 mg de hidruro sódico (dispersión al 60% en aceite mineral; 1,35 mmoles, 3,5 equiv.) en contracorriente de argón. La mezcla resultante se calienta lentamente y se agita durante 18 h a reflujo. Para la purificación se agregan 20 ml de agua y la mezcla se extrae varias veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se secan sobre sulfato sódico y se concentran al vacío. El producto crudo se purifica por HPLC preparativa.
- 10 Rendimiento: 36 mg (31% d.t.)
MS (ESI): $m/z = 301$ ($M+H$)⁺
Pf: 147°C
- 15 RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 11,95$ (s, 1H), 8,0 (s, 1H), 5,1 (m, 1H), 2,5 (d, 2H), 2,15-1,75 (m, 7H), 1,75-1,55 (m, 7H), 1,3-0,9 (m, 5H) ppm.

Ejemplo 2

- 20 6-(Ciclohexilmetil)-1-(1-etilpropil)-1,5-dihidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona

Etapas 2a)

- 25 5-Amino-1-(1-etilpropil)-1H-pirazol-4-carbonitrilo

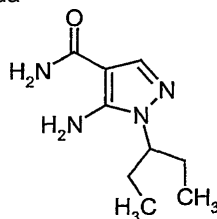


La preparación tiene lugar de modo análogo a lo indicado para el ejemplo 1 / etapa 1a).

- MS (ESI): $m/z = 179$ ($M+H$)⁺
30 RMN-¹H (300 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 7,55$ (s, 1H), 6,45 (s, 2H), 4,0 (m, 1H), 1,8-1,55 (m, 4H), 0,65 (t, 6H) ppm.

Etapas 2b)

5-Amino-1-(1-etilpropil)-1H-pirazol-4-carboxamida



- 35

La preparación tiene lugar de modo análogo a lo indicado para el ejemplo 1 / etapa 1b).

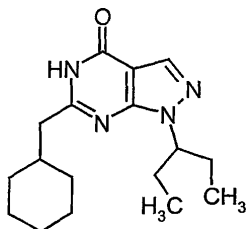
MS (ESI): $m/z = 197$ ($M+H$)⁺

RMN- ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 7,65 (s, 1H), 6,9 (br. s, 2H), 6,1 (s, 2H), 3,9 (m, 1H), 1,85-1,6 (m, 4H), 0,7 (t, 6H) ppm.

Etapas 2c)

5

6-(Ciclohexilmetil)-1-(1-etilpropil)-1,5-dihidro-4H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ona



- 10 El producto se obtiene de manera análoga al ejemplo 1 / etapa 1c) partiendo de 200 mg (1,02 mmoles) de 5-amino-1-(1-etilpropil)-1H-pirazol-4-carboxamida y 482 mg (3,06 mmoles) de ciclohexilacetato de metilo.
Rendimiento: 146 mg (47% d.t.)
MS (ESI): m/z = 303 ($\text{M}+\text{H}$)⁺
Pf: 122°C
- 15 RMN- ^1H (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 12,0 (s, 1H), 8,0 (s, 1H), 4,45 (m, 1H), 2,5 (m, 2H), 2,0-1,5 (m, 10H), 1,4-0,9 (m, 5H), 0,6 (t, 6H, J = 7,5 Hz) ppm

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> Bayer AG, Bayer Health Care
 <120> Inhibidores selectivos de la fosfodiesterasa 9A como fármacos para mejorar los procesos cognitivos
 <130> Le A 36 288
 <160> 1
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 <211> 1991
 10 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

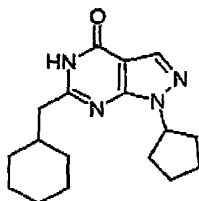
```
cgcgggcggtt ggcgtcggga aagtacagta aaaagtccga gtgcagccgc cgggcgaggg      60
atgggatccg gctcctccag ctaccggccc aaggccatct acctggacat cgatggagcg      120
attcagaagg taatcttcag caagtactgc aactccagcg acatcatgga cctgtttctgc      180
atcgccaccg gctgcctcg gaacacgacc atctccctgc tgaccaccga cgacgccatg      240
gtctccatcg accccaccat gcccgcgaaat tcagaacgca ctccgtacaa agtgagacct      300
gtggccatca agcaactctc cgctgggtgtc gaggacaaga gaaccacaag ccgtggccag      360
tctgctgaga gaccactgag ggacagacgg gttgtggggc tggagcagcc ccggagggaa      420
ggagcatttg aaagtggaca ggtagagccc agggccagag agccccaggg ctgctaccag      480
gaaggccagc gcatccctcc agagagagaa gaattaatcc agagcgtgct ggcgagggtt      540
gcagagcagt tctcaagagc attcaaaatc aatgaactga aagctgaagt tgcaaatac      600
ttggctgtcc tagagaaacg cgtggaattg gaaggactaa aagtgtgga gattgagaaa      660
tgcaagagtg acattaagaa gatgagggag gagctggcgg ccagaagcag caggaccaac      720
```

ES 2 373 381 T3

tgcccctgta agtacagttt ttgggataac cacaagaagt tgactcctcg acgcgatgtt	780
cccacttacc ccaagtacct gctctctcca gagaccatcg aggccctgcg gaagccgacc	840
tttgacgtct ggctttggga gcccaatgag atgctgagct gcctggagca catgtaccac	900
gacctcgggc tggtcaggga cttcagcatc aaccctgtca ccctcaggag gtggctgttc	960
tgtgtccacg acaactacag aaacaacccc ttccacaact tccggcactg cttctgcgtg	1020
gccagatga tgtacagcat ggtctggctc tgcagtctcc aggagaagtt ctcacaaacg	1080
gatatcctga tcctaattgac agcggccatc tgccacgac tggaccatcc cggtacaac	1140
aacacgtacc agatcaatgc ccgcacagag ctggcggtcc gctacaatga catctcaccg	1200
ctggagaacc accactgcgc cgtggccttc cagatcctcg ccgagcctga gtgcaacatc	1260
ttctccaaca tcccacctga tgggttcaag cagatccgac agggaatgat cacattaatc	1320
ttggccactg acatggcaag acatgcagaa attatggatt ctttcaaaga gaaaatggag	1380
aattttgact acagcaacga ggagcacatg accctgctga agatgatttt gataaaatgc	1440
tgtgatatct ctaacgaggt ccgtccaatg gaagtcgcag agccttgggt ggactgttta	1500
ttagaggaat attttatgca gagcgaccgt gagaagtcag aaggccttcc tgtggcaccg	1560
ttcatggacc gagacaaagt gaccaaggcc acagcccaga ttgggttcat caagtttgtc	1620
ctgatcccaa tgtttgaaac agtgaccaag ctcttcccca tggttgagga gatcatgctg	1680
cagccacttt gggaatcccg agatcgctac gaggagctga agcggataga tgacgccatg	1740
aaagagttac agaagaagac tgacagcttg acgtctgggg ccaccgagaa gtocagagag	1800
agaagcagag atgtgaaaaa cagtgaagga gactgtgcct gaggaaagcg gggggcgtgg	1860
ctgcagttct ggacgggctg gccgagctgc gcgggatcct tgtgcagggg agagctgccc	1920
tgggcacctg gcaccacaag accatgtttt ctaagaacca ttttgttcac tgatacaaaa	1980
aaaaaaaaa a	1991

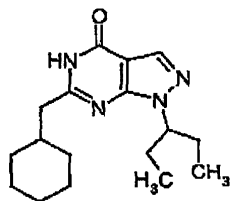
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula



(I)

o



(II),

así como sus sales, solvatos y los solvatos de las sales.

2. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 para preparar un medicamento.
3. Uso de un compuesto según la reivindicación 1, como inhibidor selectivo de la PDE9A, para preparar un medicamento.
4. Uso de un compuesto según la reivindicación 1 para preparar un medicamento destinado al tratamiento y/o profilaxis de enfermedades del sistema nervioso central susceptibles de terapia mediante el nivel de cGMP.
5. Uso según una de las reivindicaciones 2 a 4, **caracterizado porque** el medicamento se ofrece para mejorar la percepción, la capacidad de concentración, los procesos cognitivos y la capacidad de aprendizaje y/o de memoria.
6. Uso según una de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizado porque** el medicamento se proporciona para la profilaxis y/o el tratamiento de los trastornos de la percepción, de la capacidad de concentración, de los procesos cognitivos y de la capacidad de aprendizaje y/o de memoria.
7. Uso según la reivindicación 6, **caracterizado porque** el trastorno es consecuencia de una afección del grupo formado por demencia, ataque de apoplejía, traumatismo craneo-encefálico, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, depresión o demencia con degeneración de los lóbulos frontales.
8. Uso según la reivindicación 4, en que la enfermedad es del grupo constituido por demencia, ataques de apoplejía, traumatismo craneo-encefálico, enfermedad de Alzheimer, demencia con degeneración de lóbulos frontales, demencia con corpúsculos de Lewy, demencia vascular, síndrome de déficit de atención, trastornos de atención y concentración, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, depresión, enfermedades afectivas, psicosis, neurosis, miedo, manías o afecciones maniaco-depresivas, enfermedad de Pick, dolor y epilepsia.

Fig. 1

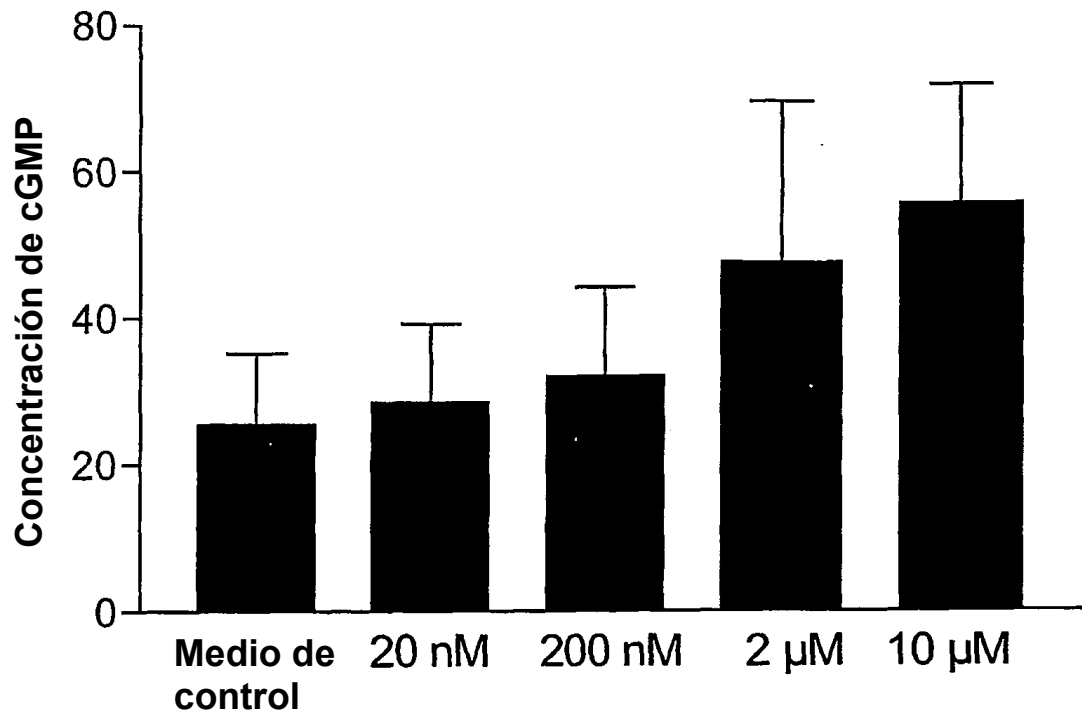


Fig. 2

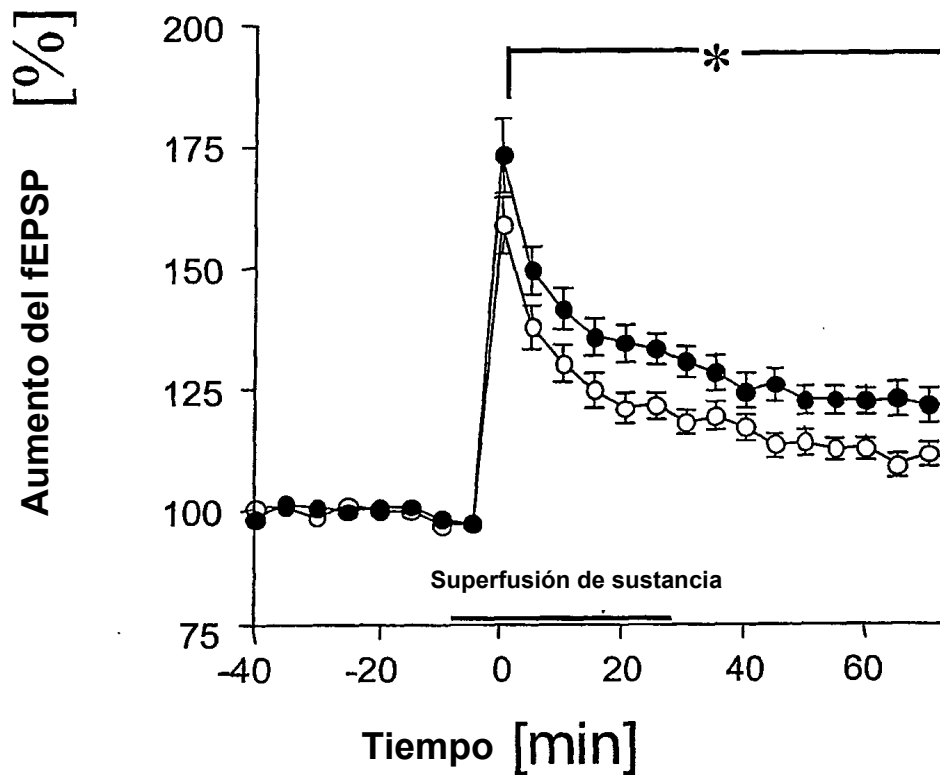


Fig. 3

