

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 378 452**

51 Int. Cl.:  
**A61K 31/553** (2006.01)  
**A61P 25/00** (2006.01)  
**C07D 267/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05801120 .6**  
96 Fecha de presentación: **21.09.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1804804**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2007**

54 Título: **Ácido 3-[4-(dibenzo[b,f][1,4]oxazepin-11-il)-piperazin-1-il]-2,2-dimetil-propanoico para usarlo en el tratamiento de trastornos del sueño**

30 Prioridad:  
**21.09.2004 US 611849 P**  
**19.04.2005 US 673198 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**12.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**12.04.2012**

73 Titular/es:  
**HYPNION, INC.**  
**ELI LILLY AND COMPANY LILLY CORPORATE**  
**CENTER**  
**INDIANAPOLIS, IN 46285, US**

72 Inventor/es:  
**EDGAR, Dale, M.;**  
**HANGAUER, David, G.;**  
**SHIOSAKI, Kazumi;**  
**SOLOMON, Michael y**  
**WHITE, James, F.**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 378 452 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

Ácido 3-[4-(dibenzo[b,f][1,4]oxazepin-11-il)-piperazin-1-il]-2,2-dimetil-propanoico para usarlo en el tratamiento de trastornos del sueño

**Descripción**

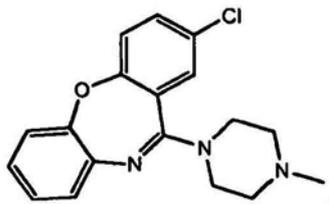
5 La invención se refiere a procedimientos para tratar trastornos del sueño y a composiciones útiles en tales procedimientos.

La dificultad para quedarse dormido o permanecer dormido es un problema médico de relevancia por una variedad de razones. A veces, estos problemas se deben a afecciones endógenas, tales como la apnea del sueño o el insomnio. Otras veces, estos problemas surgen por condiciones de estrés exógeno, tales como el efecto perturbador producido por cambios en los turnos de trabajo y el *jet lag*. Ya tenga un origen endógeno o exógeno, la dificultad para quedarse dormido o permanecer dormido puede provocar somnolencia diurna que afecte a la salud, la calidad de vida y la seguridad de aquéllos que la padecen.

Los tratamientos farmacéuticos existentes para inducir el sueño incluyen sedantes o hipnóticos, tales como derivados de benzodiazepina y de barbiturato. Estos tratamientos tienen numerosos inconvenientes, incluyendo el insomnio de rebote, retraso en la aparición de los efectos sedantes deseados, persistencia de los efectos sedantes tras el periodo de sueño deseado y efectos secundarios debidos a una actividad inespecífica, tal como déficits psicomotores y de memoria, miorrelajación y alteración de los patrones del sueño, incluyendo la inhibición del sueño MOR. Además, los sedantes e hipnóticos pueden crear dependencia, pueden perder su eficacia tras un uso prolongado y algunas personas los pueden metabolizar más lentamente. Por consiguiente, los médicos habitualmente recomiendan o prescriben antihistaminas como tratamientos más suaves para los trastornos del sueño, en los casos en los que los hipnóticos son menos apropiados. Sin embargo, muchas antihistaminas tienen una serie de efectos secundarios. Estos efectos secundarios incluyen la prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma de un sujeto, así como efectos secundarios en el sistema nervioso central (SNC), tales como la disminución del tono muscular y la caída de párpados. Finalmente, tales compuestos se pueden unir a receptores muscarínicos, lo que conduce a efectos secundarios anticolinérgicos, tales como visión borrosa, sequedad de boca, estreñimiento, problemas urinarios, mareos y ansiedad.

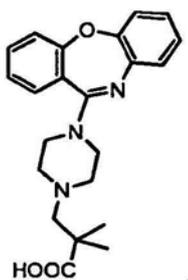
Como resultado de ello, existe la necesidad de tratamientos que promuevan el sueño con reducidos efectos secundarios. Además, aunque los compuestos inductores del sueño conocidos son eficaces para tratar el insomnio inicial, i.e., la dificultad de un sujeto para conciliar el sueño al acostarse, actualmente, no hay fármacos indicados para tratar el insomnio de mantenimiento del sueño, i.e., mantener el sueño de un sujeto durante un período normal de sueño tras haberlo conciliado. Por lo tanto, también existe la necesidad de mejores tratamientos farmacéuticos para mantener el sueño en sujetos en necesidad de tal tratamiento.

La presente invención se refiere a análogos de loxapina y a su uso para modular el sueño. La loxapina (LOXAPAC™, LOXITANE™) es un agente antipsicótico tricíclico de dibenzoxazepina que se usa en el tratamiento de las manifestaciones de esquizofrenia. La loxapina (2-cloro-11-(4-metil-1-piperazinil)dibenz[b,f][1,4]oxazepina) tiene la siguiente estructura:



En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto que tiene la fórmula de

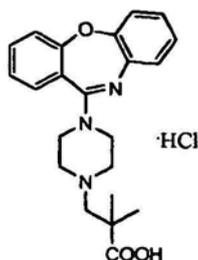
Compuesto 1:



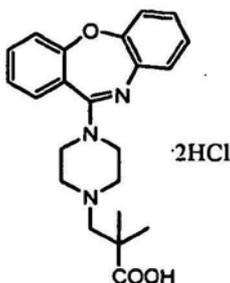
o una sal, un solvato o un hidrato del mismo. Por ejemplo, la invención se refiere a un solvato del Compuesto 1. En una realización, la invención se refiere a un hidrato del Compuesto 1.

En otra realización, la invención se refiere a una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 1. Por ejemplo, la sal puede ser una sal de adición de ácido, tal como una sal clorhidrato.

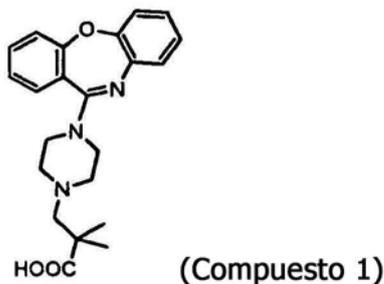
5 En un aspecto, la invención se refiere al compuesto:



En otro aspecto, la invención se refiere al compuesto:

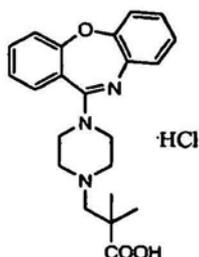


En otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende un compuesto de fórmula:



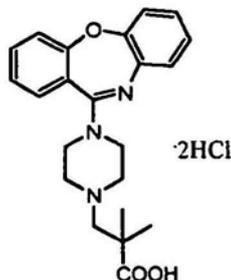
10 o una sal, un solvato o un hidrato del mismo, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición incluye un solvato del Compuesto 1. En otra realización, la composición incluye un hidrato del Compuesto 1. En otra realización, la composición incluye una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 1. Por ejemplo, la sal puede ser una sal de adición de ácido. Una realización de una sal de adición de ácido es una sal clorhidrato.

15 En una realización, la invención se refiere a una composición de



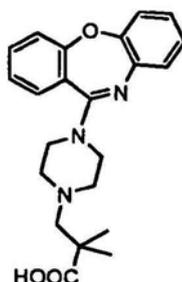
y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención se refiere a una composición de



y, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 En otro aspecto, la invención se refiere al Compuesto 1:



o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la modulación del sueño. Por ejemplo, el sujeto es un ser humano. En una realización, la modulación del sueño se selecciona entre, por ejemplo, disminución del tiempo hasta que se concilia el sueño, aumento de la duración media de la sesión de sueño y aumento de la duración máxima de la sesión de sueño. En una realización, la modulación del sueño trata un trastorno del sueño. Los ejemplos de trastornos del sueño incluyen alteraciones del ritmo circadiano, insomnio, parasomnia, síndrome de la apnea del sueño, narcolepsia e hipersomnía.

En una realización, el Compuesto 1, o una sal, un solvato o un hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo se administran en combinación con una o más terapias adicionales para modular el sueño en un sujeto. Por ejemplo, el sujeto es un ser humano.

La descripción anterior expone de manera bastante general las características más importantes de la presente invención para permitir la comprensión de la descripción detallada de la misma que se presenta a continuación y para que se puedan apreciar mejor las presentes contribuciones realizadas a la técnica. Otros objetivos y características de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada considerada en combinación con los ejemplos.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción que se presenta a continuación. Aunque es posible usar cualquier procedimiento y material similar o equivalente a aquéllos descritos en la presente memoria en la práctica o en la prueba de la presente invención, ahora se describen los procedimientos y los materiales. Hay otras características, objetivos y ventajas de la invención que resultarán evidentes a partir de la descripción. A lo largo de la memoria, las formas en singular también incluyen el plural, a no ser que el contexto establezca claramente lo contrario. A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que son comúnmente conocidos por cualquier experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, habrá que atenerse a la presente memoria.

### 30 *Definiciones*

Por comodidad, aquí se recogen ciertos términos y expresiones usados en la memoria, los ejemplos y las reivindicaciones anexas.

“Tratar” incluye cualquier efecto, p.ej., que disminuya, reduzca, module o elimine, que dé por resultado la mejora de la afección, la enfermedad, el trastorno, etc. “Tratar” incluye cualquier efecto, p.ej., que disminuya, reduzca, module o elimine, que dé por resultado la mejora de la afección, la enfermedad, el trastorno, etc. “Tratar” o “tratamiento” de un

estado patológico incluye: (1) prevenir el estado patológico, i.e., hacer que los síntomas clínicos del estado patológico no se desarrollen en un sujeto que puede estar expuesto o predispuesto al estado patológico, pero que no presente todavía síntomas del estado patológico; (2) inhibir el estado patológico, i.e., deteniendo el desarrollo del estado patológico o de sus síntomas clínicos; o (3) aliviar el estado patológico, i.e., provocar un retroceso temporal o permanente del estado patológico o de sus síntomas clínicos. “Estado patológico” significa cualquier enfermedad, afección, síntoma o indicio.

Los términos “polimorfos cristalinos” o “polimorfos” o “formas cristalinas” significan estructuras cristalinas en las que un compuesto (o una sal o un solvato del mismo) puede cristalizar en diferentes distribuciones de empaquetamiento de los cristales, la totalidad de las cuales tiene la misma composición elemental. Las diferentes formas cristalinas tienen habitualmente diferentes patrones de difracción de rayos X, espectros de infrarrojos, punto de fusión, densidad, dureza, forma cristalina, y propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad y solubilidad. El disolvente de recristalización, la velocidad de cristalización, la temperatura de almacenamiento y otros factores pueden hacer que una forma cristalina domine sobre otra. Los polimorfos cristalinos de los compuestos se pueden preparar mediante cristalización en diferentes condiciones. Por ejemplo, mediante el uso de diferentes disolventes o diferentes mezclas de disolventes para la recristalización; cristalización a diferentes temperaturas; diversos modos de enfriamiento, variando de un enfriamiento muy rápido a uno muy lento durante la cristalización, y similares. También se pueden obtener polimorfos mediante el calentamiento o la fusión de los compuestos revelados seguida de un enfriamiento gradual o rápido. La presencia de polimorfos se determina mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear en muestra sólida, espectroscopia de infrarrojos, calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X en polvo y otras técnicas conocidas por el experto en la técnica.

Además, los compuestos de la presente invención, por ejemplo, las sales de los compuestos, pueden existir bien de forma hidratada o deshidratada (la forma anhidra) o como solvatos con otras moléculas disolventes. Los ejemplos no restrictivos de hidratos incluyen monohidratos, dihidratos, etc. Los ejemplos no restrictivos de solvatos incluyen solvatos de etanol, solvatos de acetona, etc.

“Solvatos” significa formas de adición de disolvente que contienen bien cantidades estequiométricas o no estequiométricas de disolvente. Algunos compuestos tienen tendencia a atrapar una proporción molar fija de moléculas de disolvente en estado de sólido cristalino, formando así un solvato. Si el disolvente es agua, el solvato formado es un hidrato, cuando el disolvente es alcohol, el solvato formado es un alcoholato. Los hidratos se forman mediante la combinación de una o más moléculas de agua con una de las sustancias en la que el agua conserva su estado molecular como H<sub>2</sub>O, siendo tal combinación capaz de formar uno o más hidratos.

Como se usa en la presente memoria, el término “análogo” se refiere a un compuesto químico que es estructuralmente similar a otro, pero que difiere ligeramente en su composición (como en la sustitución de un átomo por un átomo de un elemento diferente o en presencia de un determinado grupo funcional, o la sustitución de un grupo funcional por otro grupo funcional). Así pues, un análogo es un compuesto que es similar o comparable en función y aspecto, pero no en estructura ni en origen al compuesto de referencia.

Según lo definido en la presente memoria, el término “derivado” se refiere a compuestos que tienen una estructura común del núcleo y están sustituidos con diversos grupos según lo descrito en la presente memoria. Por ejemplo, todos los compuestos representados por la Fórmula I son derivados de loxapina, y tienen la Fórmula I como núcleo común.

La expresión “compuestos de tipo loxapina” o “compuestos análogos de loxapina” o “compuestos derivados de loxapina” pretende incluir análogos de loxapina o antihistaminas que incluyen dos grupos arilo unidos al mismo átomo que están unidos a través de un sistema de anillos tricíclico, p.ej., un anillo que contiene oxígeno y nitrógeno de siete miembros (i.e., similar al de la loxapina) unido para colocar un anillo de piperazina.

El término “antihistamina” se refiere a un compuesto que se une a un receptor H1 y bloquea la actividad de la histamina y/o reduce la actividad constitutiva del receptor.

Como se usa en la presente memoria, la expresión “trastorno del sueño” incluye afecciones reconocidas por el experto en la técnica como trastornos del sueño, por ejemplo, afecciones conocidas en la técnica o afecciones que se proponen como trastornos del sueño o que se ha descubierto que son trastornos del sueño. Un trastorno del sueño también aparece en un sujeto que tenga otros trastornos, enfermedades o lesiones médicas, o en un sujeto que esté siendo tratado con otras medicaciones o tratamientos médicos, de manera que el sujeto, como resultado de ello, tenga dificultad para conciliar el sueño y/o permanecer dormido o no tenga un sueño reparador o reconstituyente, p.ej., el sujeto sufre privación del sueño.

La expresión “tratamiento de un trastorno del sueño” también incluye tratar un componente de trastorno del sueño de otros trastornos, tales como los trastornos del SNC (p.ej., trastornos mentales o neurológicos, tales como ansiedad). Además, la expresión “tratar un trastorno del sueño” incluye el efecto beneficioso de mejorar otros síntomas asociados con el trastorno.

La expresión “tiempo máximo de sueño no MOR” se define como una cantidad máxima absoluta de sueño no MOR por hora tras el tratamiento, produciéndose la administración del fármaco en la hora circadiana (HC) 18, que corresponde

a 6 horas después de que la luz se apague en una rata de laboratorio nocturno sometida a un ciclo de luz–oscuridad de 12:12 LO (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad). Los criterios nominales del 55% de sueño no MOR por hora equivalen a 33 minutos de sueño no MOR por hora.

5 Como se usa en la presente memoria, la expresión “sueño no MOR acumulativo”, se define como el aumento total neto acumulado del número de minutos de sueño no MOR, medido a lo largo de la duración completa del efecto soporífero de un fármaco, lo que comúnmente, pero no siempre, tiene lugar en las 6 primeras horas posteriores al tratamiento, ajustado para el número total neto acumulado de minutos de sueño no MOR producido durante las correspondientes horas de referencia sin tratamiento del día registrado 24 horas antes en comparación con el tratamiento con vehículo control.

10 Según lo definido en la presente memoria, la expresión "sesión de sueño" se refiere a un episodio diferenciado de sueño continuo o casi continuo compuesto de sueño no MOR, sueño MOR o fases de sueño tanto MOR como no MOR, que está delimitado antes y después por más de dos épocas contiguas de 10 segundos de estado de vigilia.

15 Como se usa en la presente memoria, la expresión “duración más larga de la sesión de sueño” se define como el número total de minutos que un animal permanece dormido (fases de sueño no MOR y/o MOR) durante el único episodio o “sesión” de sueño más largo que tuvo lugar partiendo de una hora dada posterior al tratamiento. Los criterios de medida de la “duración de la sesión de sueño” suponen que el sueño se mide de manera continua en épocas de 10 segundos y la asignación del valor se realiza en base al estado predominante, contabilizado o determinado de otro modo como una fase de sueño diferenciada (estando las fases del sueño definidas como sueño no MOR, sueño MOR o estado de vigilia) durante el intervalo de 10 segundos que define la época.

20 La expresión “duración media de la sesión de sueño” se define como la duración media (en minutos) de cada sesión de sueño que comienza en una hora dada, con independencia de la duración individual de cada episodio o sesión.

“Insomnio de rebote” se define como período de estado de vigilia de rebote, paradójico o compensatorio que tiene lugar tras los efectos promotores del sueño de un agente hipnótico o soporífero.

25 “Inhibición del sueño MOR” se define como la reducción del tiempo de sueño MOR tras el tratamiento a la HC 18 (6 horas después de que se apague la luz, LO 12:12) o a HC 5 (5 horas después de que se encienda la luz; LO 12:12). Los compuestos que reducen el tiempo de sueño MOR en más de 15 minutos (con respecto a la referencia y ajustado para el tratamiento con vehículo) cuando se administran bien a la HC 18 o HC 5 se consideran inaceptables.

30 Comparado con el sueño no MOR o el estado de vigilia, el sueño MOR provoca depresión ventiladora y cambios cardiovasculares episódicos. Durante el insomnio de rebote, se magnifican los efectos fisiológicos del sueño MOR y se interrumpen los ciclos normales del sueño.

Como se define en la presente memoria "inhibición desproporcionada de la actividad locomotora" es una reducción de la actividad locomotora que supera la reducción normal y esperada del comportamiento atribuible al sueño.

35 “Terapia de combinación” (o “coterapia”) incluye la administración de un compuesto de la invención y, al menos, un segundo agente como parte de una pauta de tratamiento específica destinada a proporcionar el efecto beneficioso a partir de la acción conjunta de estos agentes terapéuticos. El efecto beneficioso de la combinación incluye, pero no se limita a, la acción farmacocinética o farmacodinámica conjunta que resulta de la combinación de los agentes terapéuticos. Las combinaciones de los compuestos de la presente invención y los otros agentes activos se pueden administrar conjuntamente en una sola combinación o por separado. Cuando se emplea una administración separada, la administración de un elemento puede ser anterior, simultánea o posterior a la administración de otros agentes.

40 La administración de estos agentes terapéuticos en combinación se lleva a cabo, comúnmente, en un período de tiempo definido (habitualmente, en minutos, horas, días o semanas en función de la combinación seleccionada). En una realización, “terapia de combinación” engloba la administración de dos o más de estos agentes terapéuticos como parte de pautas monoterapéuticas separadas que intencionada o arbitrariamente resultan en las combinaciones de la presente invención. En otra realización, “terapia de combinación” pretende englobar la administración de estos

45 agentes terapéuticos de una manera secuencial. Es decir, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, así como que la administración de estos agentes terapéuticos, o de al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea. La administración sustancialmente simultánea se puede realizar, por ejemplo, mediante la administración al sujeto de una sola cápsula que tenga una proporción fija de cada agente terapéutico o en múltiples cápsulas individuales para cada uno de los agentes terapéuticos. La administración

50 secuencial o sustancialmente simultánea de cada agente terapéutico se puede efectuar mediante cualquier vía apropiada que incluya, pero no se limite a, vías orales, vías intravenosas, vías intramusculares y absorción directa a través de tejidos de membrana mucosa.

Los agentes terapéuticos se pueden administrar mediante la misma vía o mediante vías diferentes. Por ejemplo, se puede administrar un primer agente terapéutico de la combinación seleccionada mediante inyección intravenosa,

55 mientras que los otros agentes terapéuticos de la combinación se pueden administrar oralmente. Alternativamente, por ejemplo, se pueden administrar todos los agentes terapéuticos oralmente o todos los agentes terapéuticos se pueden administrar mediante inyección intravenosa. El orden en el que se administran los agentes terapéuticos es irrelevante. “Terapia de combinación” también engloba la administración de los agentes terapéuticos según lo descrito

anteriormente en otra combinación con otros ingredientes biológicamente activos y terapias no farmacológicas (p.ej., cirugía, tratamiento de radiación o un dispositivo médico). Cuando la terapia de combinación comprende además un tratamiento no farmacológico, el tratamiento no farmacológico se puede aplicar en un momento adecuado, siempre y cuando se consiga un efecto beneficioso de la acción conjunta de la combinación de los agentes terapéuticos y el tratamiento no farmacológico. Por ejemplo, en casos apropiados, todavía se puede conseguir un efecto beneficioso cuando el tratamiento no farmacológico se retira temporalmente de la administración de los agentes terapéuticos, quizás durante días o incluso semanas.

Las expresiones “administración parenteral” y “administrado parenteralmente” como se usan en la presente memoria, se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral o tópica, habitualmente, mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

El término “pulmonar”, como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier parte, tejido u órgano cuya función principal sea el intercambio de gas con el entorno exterior, p.ej., intercambio de  $O_2/CO_2$ , en un paciente. “Pulmonar” habitualmente se refiere a los tejidos del tracto respiratorio. Así pues, la frase “administración pulmonar” se refiere a la administración de las formulaciones descritas en la presente memoria en cualquier parte, tejido u órgano cuya función principal sea el intercambio gaseoso con el entorno exterior (p.ej., boca, nariz, faringe, orofaringe, laringofaringe, laringe, traquea, carina, bronquios, bronquiolos, alvéolos). A efectos de la presente invención, “pulmonar” también incluye un tejido o una cavidad que sea contiguo al tracto respiratorio, en particular, a los senos nasales.

Una “composición farmacéutica” es una formulación que contiene los compuestos revelados en una forma adecuada para su administración a un sujeto. En una realización, la composición farmacéutica está en una forma farmacéutica de carga o unitaria. La forma farmacéutica unitaria es cualquiera de una variedad de formas que incluye, por ejemplo, una cápsula, una bolsa IV, un comprimido, una bomba simple sobre un inhalador de aerosol o un vial. La cantidad de ingrediente activo (p.ej., una fórmula del compuesto revelado o sales del mismo) en una dosis unitaria de composición es una cantidad eficaz y se varía según el tratamiento en cuestión. El experto en la técnica apreciará que a veces es necesario realizar variaciones rutinarias de la dosis dependiendo de la edad y del estado del paciente. La dosis también dependerá de la vía de administración. Se contempla una variedad de vías, incluyendo oral, pulmonar, rectal, parenteral, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal y similares. Las formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un compuesto de la presente invención incluyen polvos, pulverizados, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. En una realización, el compuesto activo se mezcla en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propulsor que sea necesario.

La expresión “dosis instantánea” se refiere a formulaciones de compuestos que son formas farmacéuticas que se dispersan rápidamente.

La expresión “liberación inmediata” se define como una liberación de compuesto de una forma farmacéutica en un período de tiempo relativamente breve, generalmente, de hasta aproximadamente 60 minutos. La expresión “liberación modificada” se define para incluir la liberación retardada, liberación prolongada y liberación pulsada. La expresión “liberación pulsada” se define como una serie de liberaciones de fármaco desde una forma farmacéutica. La expresión “liberación sostenida” o “liberación prolongada” se define como la liberación continua de un compuesto desde una forma farmacéutica durante un periodo de tiempo prolongado.

Un “sujeto” incluye mamíferos, p.ej., seres humanos, animales de compañía (p.ej., perros, gatos, aves y similares), animales de granja (p.ej., vacas, ovejas, cerdos, caballos, aves de corral y similares) y animales de laboratorio (p.ej., ratas, ratones, cobayas y similares). Lo más preferible es que el sujeto sea un ser humano.

Como se usa en la presente memoria, el término “farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, vehículos y/o formas farmacéuticas que son, en base a una opinión médica sólida, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin provocar una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una proporción razonable de beneficio/riesgo.

“Excipiente farmacéuticamente aceptable” significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que sea, en general, seguro, no tóxico y ni biológicamente ni de otro modo indeseable, e incluye excipientes que sean aceptables para un uso veterinario, así como un uso farmacéutico en seres humanos. Un “excipiente farmacéuticamente aceptable”, como se usa en la memoria y en las reivindicaciones, incluye tanto uno como más de uno de tales excipientes.

Los compuestos de la invención además pueden formar sales. Todas estas formas también se contemplan dentro del alcance de la invención reivindicada.

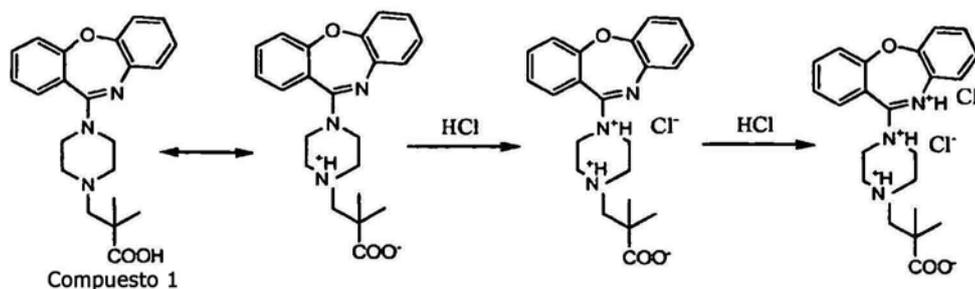
La “sal farmacéuticamente aceptable” de un compuesto significa una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto precursor.

Como se usa en la presente memoria, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos revelados en los que el compuesto precursor es modificado mediante la formación de sales de ácido o de base del mismo. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales minerales o de ácidos orgánicos de residuos básicos, tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos, tales como ácidos carboxílicos y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto precursor formado, por ejemplo, a partir de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen, pero no se limitan a, aquellas derivadas de ácidos orgánicos e inorgánicos seleccionados entre 2-acetoxibenzoico, 2-hidroxietan-sulfónico, acético, ascórbico, benceno-sulfónico, benzoico, bicarbónico, carbónico, cítrico, edético, etanodisulfónico, 1,2-etano-sulfónico, fumárico, glucoheptónico, glucónico, glutámico, glicólico, glicoliarsanílico, hexilresorcínico, hidrabámico, bromhídrico, clorhídrico, yodhídrico, hidroximaleico, hidroxinaftoico, isetiónico, láctico, lactobiónico, lauril-sulfónico, maleico, málico, mandélico, metano-sulfónico, napsílico, nítrico, oxálico, pamoico, pantoténico, fenilacético, fosfórico, poligalacturónico, propiónico, salicílico, esteárico, subacético, succínico, sulfámico, sulfanílico, sulfúrico, tánico, tartárico, tolueno-sulfónico, y los aminoácidos comunes, p.ej., glicina, alanina, fenilalanina, arginina, etc.

Otros ejemplos incluyen ácido hexanoico, ácido ciclopentano-propiónico, ácido pirúvico, ácido malónico, ácido 3-(4-hidroxi-benzoil)benzoico, ácido cinnámico, ácido 4-clorobencenosulfónico, ácido 2-naftalenosulfónico, ácido 4-toluenosulfónico, ácido alcanforsulfónico, ácido 4-metilbicyclo-[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido mucónico y similares. La invención también engloba sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto precursor bien es reemplazado por un ión metálico, p.ej., un ión de metal alcalino, un ión de metal alcalinotérreo o un ión de aluminio; o se coordina con una base orgánica tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, *N*-metilglucamina y similares.

Se ha de entender que todas las referencias realizadas a las sales farmacéuticamente aceptables incluyen formas de adición de disolvente (solvatos) o formas cristalinas (polimorfos) según lo definido en la presente memoria de la misma sal.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención se pueden formar a partir de un compuesto precursor que contenga un resto básico o ácido mediante procedimientos químicos convencionales. Generalmente, es posible preparar tales sales haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o del ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de ambos; generalmente, se usan medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Por ejemplo, el esquema que figura a continuación muestra la formación de una sal clorhídrica farmacéuticamente aceptable del compuesto precursor, el Compuesto 1, tras su tratamiento con ácido clorhídrico.



El número de átomos protonados y de contraiones asociados con la sal se puede controlar y depende del número de átomos ácidos/básicos del compuesto precursor y de la cantidad de ácido que se use para tratar el compuesto precursor. En una realización de la invención, se forma la sal monoclóridato del compuesto precursor tras un tratamiento con ácido clorhídrico. En otra realización, se forma la sal diclorhidrato del compuesto precursor tras un tratamiento con ácido clorhídrico.

En "Remington's Pharmaceutical Sciences", XVIII ed. (Mack Publishing Company, 1990), se encuentran listas de sales adecuadas. Por ejemplo, las sales pueden incluir, pero sin limitarse a, sales clorhidrato y acetato de los compuestos de la presente invención que contienen amina alifática, que contienen hidroxilamina y que contienen imina.

Los compuestos de la presente invención también se pueden preparar como ésteres, por ejemplo, ésteres farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, es posible convertir un grupo de función ácido carboxílico de un compuesto en su correspondiente éster, p.ej., un metiléster, etiléster u otro éster. Además, se puede convertir un grupo alcohol de un compuesto en su correspondiente éster, p.ej., un acetato, propionato u otro éster.

En la memoria, las formas en singular también incluyen el plural, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que son comúnmente entendidos por cualquier experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. En caso de conflicto, se tomará como referencia la presente memoria.

Todos los porcentajes y proporciones usados en la presente memoria, a no ser que se indique lo contrario, están dados en peso.

Una “cantidad eficaz” de un compuesto de la invención revelada es la cantidad que, cuando se administra a un sujeto que tiene una enfermedad o trastorno, produce la regresión de la enfermedad o del trastorno en el sujeto. La cantidad del compuesto revelado que se administrará a un sujeto dependerá del trastorno en particular, del modo de administración, de los compuestos coadministrados, si los hay, y de las características del sujeto, tales como estado de salud general, otras enfermedades, edad, sexo, genotipo, peso corporal y tolerancia a fármacos. El experto en la técnica podrá determinar las dosis apropiadas en función de estos y de otros factores.

Como se usa en la presente memoria, el término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de un compuesto, o una combinación de compuestos, de la presente invención eficaz cuando se administra sola o en combinación en forma de un agente inductor del sueño. Por ejemplo, una cantidad eficaz se refiere a una cantidad del compuesto presente en una fórmula o en un dispositivo médico administrado a un paciente o sujeto receptor suficiente para provocar una actividad biológica. La combinación de compuestos opcionalmente es una combinación sinérgica. La sinergia, según lo descrito, por ejemplo, por Chou y Talalay, *Adv. Enzyme Regul.* vol. 22, pp. 27–55 (1984), se produce cuando el efecto de los compuestos administrados en combinación es mayor que el efecto aditivo de los compuestos cuando se administran solos como un solo agente. En general, los efectos sinérgicos se demuestran más claramente a concentraciones sub-óptimas de los compuestos. La sinergia se puede dar en términos de una menor citotoxicidad o un mayor efecto promotor del sueño, un menor efecto de resaca o algún otro efecto beneficioso de la combinación en comparación con los componentes individuales.

“Una cantidad terapéuticamente eficaz” significa la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento de la enfermedad. La “cantidad terapéuticamente eficaz” variará en función del compuesto, de la enfermedad y de su gravedad, y de la edad, peso, etc. del mamífero que se vaya a tratar.

“Efecto farmacológico”, como se usa en la presente memoria, engloba efectos producidos en el sujeto que consiguen el propósito pretendido de una terapia. En una realización, un efecto farmacológico significa que las indicaciones principales del sujeto que está siendo tratado son prevenidas, aliviadas o reducidas. Por ejemplo, un efecto farmacológico sería aquél que produjera la prevención, el alivio o la reducción de las indicaciones principales en un sujeto tratado. En otra realización, un efecto farmacológico significa que los trastornos o síntomas de las principales indicaciones del sujeto que está siendo tratado son prevenidos, aliviados o reducidos. Por ejemplo, un efecto farmacológico sería aquél que produjera la prevención o la reducción de las principales indicaciones en un sujeto tratado.

La invención proporciona un procedimiento para modular el sueño mediante la administración de una cantidad eficaz de un análogo de loxapina de la invención que es un resto que antagoniza un receptor de histamina o un grupo de receptores de histamina. La invención también se refiere a nuevos análogos de loxapina.

Los moduladores eficaces del sueño tienen ciertas características que corresponden a una mayor eficacia y a menores efectos secundarios. Estas características incluyen una semivida deseada en un sujeto, el control del inicio de los efectos secundarios deseados y un efecto mínimo e incluso indetectable sobre los efectos secundarios producidos en el sistema psicomotor o el sistema nervioso central (SNC) (p.ej., déficit de memoria, disminución del tono muscular, caída de párpados o somnolencia diurna). Por ejemplo, los moduladores del sueño eficaces tienen una semivida en seres humanos de menos de 7 horas, menos de 6 horas, menos de 5 horas, menos de 4 horas, aproximadamente, 3 horas, o en el intervalo de 3 a 7 horas.

Un enfoque hacia el desarrollo de un modulador del sueño eficaz es la derivación estratégica de un compuesto conocido o familia conocida de compuestos con actividad moduladora del sueño. La derivación de un compuesto conocido puede aumentar una o más propiedades biológicas para permitir que el compuesto resultante funcione de una mejor manera. Los ejemplos de propiedades biológicas favorables incluyen, pero no se limitan a, la inducción de un estado hipnótico o de sueño diferenciado, la actividad del compuesto terapéutico durante un periodo de tiempo diferenciado, la penetración a través de la barrera hematoencefálica en el SNC, p.ej., como consecuencia de la lipofilidad de los sustituyentes o la lipofilidad configuracional (i.e., la lipofilidad como resultado de una determinada configuración, tal como la formación de sales internas entre un anión carboxilato y una amina protonada), la modulación de la semivida del compuesto terapéutico, una modificación de la carga, una modificación de la farmacocinética, una modificación del log P en un valor de uno o más de uno, un aumento de la selectividad del receptor, una disminución de la semivida periférica, la capacidad de aumentar la dosis, el aumento de la eliminación periférica, la disminución de la actividad anti-muscarínica, la disminución anticolinérgica y cualquier combinación de los mismos.

La derivación de un compuesto produce una variedad de efectos y puede modificar el mecanismo de acción. Por ejemplo, en algunos casos, un compuesto que contiene un determinado grupo funcional, tal como, p.ej., un grupo éster, ácido carboxílico o alcohol, posee una mejor selectividad por un receptor deseado frente a receptores no deseados en comparación con un compuesto sin este grupo. En otros casos, el compuesto que contiene el grupo

funcional en cuestión es más activo como agente terapéutico para tratar los trastornos del sueño que el correspondiente compuesto sin este grupo. El efecto del compuesto derivado depende de la identidad de la adición.

5 Mediante la derivación de un compuesto con el fin de aumentar propiedades biológicas favorables y disminuir efectos secundarios no deseados, es posible implantar una estrategia basada en posibles efectos o interacciones mecanicistas. Por ejemplo, en algunos compuestos, la presencia de un ácido carboxílico da como resultado la capacidad para formar un enlace iónico intramolecular que incluye el correspondiente ión carboxilato, p.ej., formación de especies zwitteriónicas con un átomo de nitrógeno en el compuesto o formación de un enlace con la sal. Estas interacciones producen efectos biológicos favorables tales como lipofilidad configuracional, i.e., aumento de la lipofilidad como consecuencia de una determinada configuración, tal como formación de sales internas entre un anión carboxilato y una amina protonada. Tal lipofilidad configuracional permite la penetración a través de la barrera hematoencefálica en el SNC, a pesar de que se cree que la presencia de dos iones polares inhibe el cruce de la barrera hematoencefálica no polar. Otro beneficio de la presencia del ácido carboxílico es una mayor capacidad del compuesto para unirse selectivamente al receptor deseado.

15 Hay un grupo de compuestos útiles en la modulación del sueño que se relaciona con la loxapina, que es un agente psicoterapéutico que pertenece a la familia de los compuestos comúnmente conocidos como antidepresivos tricíclicos (TCA). La loxapina es un agente antipsicótico de dibenzoxazepina que produce respuestas farmacológicas en diversas especies animales que son características de las observadas en la mayoría de los fármacos antipsicóticos. Aunque se desconoce el mecanismo de acción exacto, la administración de succinato de loxapina produce una potente inhibición de la actividad motora espontánea. La loxapina está recomendada para tratar la esquizofrenia.

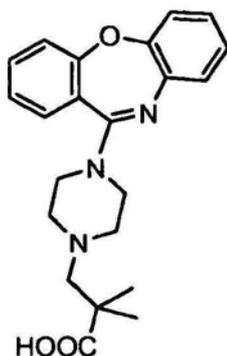
20 En una realización, los análogos de loxapina de la invención se usan en el tratamiento de una alteración del ritmo circadiano, tal como, por ejemplo, el *jet lag*, trastornos de cambio de turno laboral, síndrome de la fase del sueño retardada, síndrome de la fase del sueño adelantada y trastorno por ciclo sueño-vigilia diferente de 24 horas.

25 En otra realización, los análogos de loxapina se usan en el tratamiento del insomnio, incluyendo, por ejemplo, el insomnio extrínseco, insomnio psicofisiológico, insomnio de altura, síndrome de piernas inquietas, trastorno de movimiento periódico de extremidades, insomnio dependiente de una medicación, insomnio por dependencia a un fármaco, insomnio por alcoholismo e insomnio asociado con trastornos mentales.

En una realización, los análogos de loxapina de la invención se usan para tratar un trastorno de parasomnia, tal como, p. ej., sonambulismo, pavor nocturno, trastorno del comportamiento asociado al sueño MOR, bruxismo del sueño y enuresis del sueño.

30 En otra realización, los análogos de loxapina se usan para tratar un trastorno de apnea del sueño, tal como, por ejemplo, la apnea central del sueño, apnea obstructiva del sueño y apnea mixta del sueño.

Algunos ejemplos incluyen:



**Compuesto 1**

35 Preferiblemente, los compuestos de la presente invención modulan el sueño con menos efectos secundarios: p.ej., los compuestos no inhiben el sueño MOR (por consiguiente, el sueño inducido por estos compuestos se puede parecer más a los ciclos del sueño naturales de la persona), el uso de los compuestos no provoca insomnio de rebote y/o los compuestos no inhiben la actividad locomotora ni afectan negativamente a la temperatura corporal.

Los criterios de selección *in vitro* para los análogos de loxapina de la invención se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Unión a H1 (Diana principal)	$K_i < 500\text{nMolar}$
Unión sin diana	
• Colinérgicos M1, M2, M3	• $K_i > 10$ veces la $K_i$ medida del receptor H1
• Dopamina D1, D2	• $K_i > 10$ veces la $K_i$ medida del receptor H1
• Adrenérgicos $\alpha_1$ , $\alpha_2$	• $K_i > 10$ veces la $K_i$ medida del receptor H1

En una realización, la  $K_i$  de unión sin diana es 50 veces la  $K_i$  medida del receptor H1. En algunas realizaciones, la  $K_i$  de unión sin diana es 100 veces la  $K_i$  medida del receptor H1.

- 5 Se usan ensayos de unión *in vitro* para determinar la unión a H1 (i.e., la unión a la diana principal) y la unión a M1, M2 y M3 (i.e., la unión sin diana). Estos ensayos de unión miden la capacidad de los análogos de loxapina para desplazar patrones conocidos desde los receptores H1, M1, M2 y M3, en los que H1 es un receptor de histamina, y M1, M2 y M3 son receptores colinérgicos (muscarínicos). Se realizan ensayos similares con los receptores H1 y de dopamina (D1 y D2) y con los receptores H1 y adrenérgicos ( $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ).
- 10 Los estudios de unión para el receptor de la histamina, H1, indican una afinidad de unión y, por tanto, los resultados de los ensayos de unión indican la existencia actividad del compuesto de análogo de loxapina. Los estudios de unión para los receptores muscarínicos indican el grado hasta el que los compuestos se unen con los receptores muscarínicos responsables de la actividad anticolinérgica del compuesto. La unión a receptores muscarínicos provoca varios efectos secundarios no deseados de muchas antihistaminas conocidas, p. ej., sequedad de boca. Una disminución de la unión
- 15 de los compuestos con los receptores M1–M3 en comparación con la unión del compuesto con el receptor H1 indica una mayor especificidad del compuesto por el receptor de histamina frente al receptor muscarínico. Además, un fármaco con una mayor especificidad por el receptor de histamina posee menos efectos secundarios anticolinérgicos.

La unión a H1 de los análogos de loxapina de la invención (también denominados en la presente memoria “compuestos de prueba” o “compuestos de la invención”) se determina midiendo la unión específica de un compuesto de prueba dado o una serie de compuestos de prueba con el receptor H1 y comparándola con la unión específica de un patrón conocido (i.e., compuesto de referencia). Los compuestos de referencia usados en este ensayo de unión a H1 incluyen, por ejemplo, triprolidina ( $K_i$  3,3nM), clorfeniramina ( $K_i$  103,0nM), pirlamina ( $K_i$  1,9nM), ciproheptadina ( $K_i$  8,5nM), cimetidina ( $K_i > 10.000$ ) y dimaprit ( $K_i > 10.000$ ). (Véase, p.ej., Chang *et al.*, *J. Neurochem.*, 32:1653–63 (1979) (con modificaciones); Martínez–Mir, *et al.*, *Brain Res.*, 526:322–27 (1990); y Haaksme, *et al.*, *Pharmac. Ther.*, 47:73–104 (1990).

20

25

Por ejemplo, en una realización del ensayo de unión a H1, el receptor H1 procede de membranas celulares bovinas, y se usa un radioligando [ $^3\text{H}$ ]Pirilamina (15–25 Ci/mmol) a una concentración final de ligando de 2,0nM para detectar la unión específica para el receptor H1. Las características del ensayo incluyen una  $K_D$  (afinidad de unión) de 1,3nM y un  $B_{\text{max}}$  (número de receptores) de 6,2 fmol/mg de tejido (peso húmedo). Se usó triprolidina (10 $\mu\text{M}$ ) como determinante inespecífico, compuesto de referencia y control positivo. Las reacciones de unión se llevan a cabo en  $\text{NA-KPO}_4$  50Mm (pH 7,5) a 25°C durante 60 minutos. La reacción se terminó con una filtración rápida al vacío sobre filtros de fibra de vidrio. Se mide el nivel de radiactividad atrapada sobre los filtros y se compara con los valores del control para determinar cualquier interacción entre un compuesto de prueba dado y el sitio de unión a H1.

30

El ensayo de unión a M1 determina la unión a M1 de un compuesto de prueba mediante la medición de la unión específica de un compuesto de prueba dado a M1 y su comparación con la unión específica de un compuesto de referencia. (Véase, p.ej., Buckley, *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 35:469–76 (1989) (con modificaciones)). Los compuestos de referencia usados en el ensayo de unión a M1 incluyen, por ejemplo, escopolamina, MetilBr ( $K_i$  0,09nM); yodometilato de 4–DAMP ( $K_i$  0,27nM); pirenzepina ( $K_i$  2,60nM); HHSID ( $K_i$  5,00nM); y metoctramina ( $K_i$  29,70nM).

35

Por ejemplo, en una realización del ensayo de unión a M1, el receptor muscarínico M1 es un M1 recombinante humano expresado en células CHO, y se usa un radioligando, [ $^3\text{H}$ ]–escopolamina, cloruro de *N*–metilo (80–100 Ci/mmol) a una concentración final de ligando de 0,5nM para detectar la unión específica hacia M1. Las características del ensayo incluyen una  $K_D$  (afinidad de unión) de 0,05nM y un  $B_{\text{max}}$  (número de receptores) de 4,2 pmol/mg de proteína. Se usa (–)–escopolamina, metil–, bromuro de metilescopolamina (1,0 $\mu\text{M}$ ) como determinante inespecífico, compuesto de referencia y control positivo. Las reacciones de unión se llevan a cabo en PBS durante 60 minutos a 25°C. La reacción se terminó con una filtración rápida al vacío sobre filtros de fibra de vidrio. Se mide el nivel de radiactividad atrapada sobre los filtros y se compara con los valores del control para determinar cualquier interacción entre un compuesto de prueba dado y el sitio de unión a M1 muscarínico clonado.

40

45

El ensayo de unión a M2 determina la unión a M2 de un compuesto de prueba mediante la medición de la unión específica de un compuesto de prueba dado a M2 y su comparación con la unión específica de un compuesto de referencia. (Véase, p.ej., Buckley, *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 35:469–76 (1989) (con modificaciones)). Los compuestos de referencia usados en el ensayo de unión a M2 incluyen, por ejemplo, escopolamina, MetilBr ( $K_i$  0,3nM); yodometilato de 4–DAMP ( $K_i$  20,7nM); metoctramina ( $K_i$  20,460nM); HHSID ( $K_i$  212,7nM); y pirenzepina ( $K_i$  832,9nM).

50

- Por ejemplo, en una realización del ensayo de unión a M2, el receptor muscarínico M2 es un M2 recombinante humano expresado en células CHO, y se usa un radioligando, [<sup>3</sup>H]–escopolamina, cloruro de N–metilo (80–100 Ci/mmol) a una concentración final de ligando de 0,5nM para detectar la unión específica hacia M1. Las características del ensayo incluyen una K<sub>D</sub> (afinidad de unión) de 0,29 y un B<sub>max</sub> (número de receptores) de 2,1 pmol/mg de proteína. Se usa (–)–escopolamina, metil–, bromuro (bromuro de metilescopolamina) (1,0μM) como determinante inespecífico, compuesto de referencia y control positivo. Las reacciones de unión se llevan a cabo en PBS durante 60 minutos a 25°C. La reacción se terminó con una filtración rápida al vacío sobre filtros de fibra de vidrio. Se mide el nivel de radiactividad atrapada sobre los filtros y se compara con los valores del control para determinar cualquier interacción entre un compuesto de prueba dado y el sitio de unión a M2 muscarínico clonado.
- El ensayo de unión a M3 determina la unión a M3 de un compuesto de prueba mediante la medición de la unión específica de un compuesto de prueba dado a M3 y su comparación con la unión específica de un compuesto de referencia. (Véase, p.ej., Buckley, *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 35:469–76 (1989) (con modificaciones)). Los compuestos de referencia usados en el ensayo de unión a M3 incluyen, por ejemplo, escopolamina, MetilBr (K<sub>i</sub> 0,3nM); yodometilato de 4–DAMP (K<sub>i</sub> 0,8nM); HHSID (K<sub>i</sub> 14,5nM); pirenzepina (K<sub>i</sub> 153,3nM) y metoctramina (K<sub>i</sub> 700,0nM).
- Por ejemplo, en una realización del ensayo de unión a M3, el receptor muscarínico M3 es un M3 recombinante humano expresado en células CHO, y se usa un radioligando, [<sup>3</sup>H]–escopolamina, cloruro de N–metilo (80–100 Ci/mmol) a una concentración final de ligando de 0,2nM para detectar la unión específica hacia M1. Las características del ensayo incluyen una K<sub>D</sub> (afinidad de unión) de 0,14nM y un B<sub>max</sub> (número de receptores) de 4,0 pmol/mg de proteína. Se usa (–)–escopolamina, metil–, bromuro (bromuro de metilescopolamina) (1,0μM) como determinante inespecífico, compuesto de referencia y control positivo. Las reacciones de unión se llevan a cabo en Tris–HCl 50mM (pH 7,4) que contenía MgCl<sub>2</sub> 10mM, EDTA 1mM durante 60 minutos a 25°C. La reacción se terminó con una filtración rápida al vacío sobre filtros de fibra de vidrio. Se mide el nivel de radiactividad atrapada sobre los filtros y se compara con los valores del control para determinar cualquier interacción entre un compuesto de prueba dado y el sitio de unión a M3 muscarínico clonado.
- Los criterios de selección *in vitro* para los análogos de loxapina de la invención se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3**

Unión a H1 (Diana principal)	K <sub>i</sub> < 300nMolar
Unión sin diana	
• M1 colinérgico	• K <sub>i</sub> > 1uM
• M2 colinérgico	• K <sub>i</sub> > 1uM
• M3 colinérgico	• K <sub>i</sub> > 1uM

Otros criterios de selección *in vitro* para los análogos de loxapina de la invención se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4**

Unión a H1 (Diana principal)	K <sub>i</sub> < 150nMolar
Unión sin diana	
• M1 colinérgico	• K <sub>i</sub> > 10uM
• M2 colinérgico	• K <sub>i</sub> > 10uM
• M3 colinérgico	• K <sub>i</sub> > 10uM

- La unión a H1 (unión a la diana principal) y la unión a M1, M2 y M3 (unión sin diana) se determinan usando los ensayos de unión a H1, M1, M2 y M3 descritos anteriormente.
- Otros criterios de selección *in vitro* para los análogos de loxapina incluyen la unión a hERG. Se determinan la unión a la diana principal y la unión sin diana según lo descrito anteriormente. Si el compuesto de prueba muestra la unión a la diana principal (H1) y la proporción entre la unión a la diana principal/unión sin diana deseadas, se determina la unión a hERG (unión sin diana) usando un estudio comparativo de bloqueo de hERG para evaluar el efecto de un compuesto de prueba dado en canales de hERG clonados expresados en células de mamífero. (Véase, p. ej., Brown y Rampe, *Pharmaceutical News* 7:15–20 (2000); Rampe *et al.*, *FEBS Lett.*, 417:28–32 (1997); Weirich y Antoni, *Basic Res. Cardiol.* 93 Supl. 1:125–32 (1998); y Yap y Camm, *Clin. Exp. Allergy*, 29 Supl 3, 174–81 (1999)).
- La unión sin diana de hERG, el canal del potasio cardiaco responsable de la corriente rectificadora retardada rápida (I<sub>Kr</sub>) de los ventrículos humanos, se evalúa porque la inhibición de I<sub>Kr</sub> es la causa más común de posible prolongación de la acción cardiaca mediante fármacos no cardiacos. (Véase Brown y Rampe (2000), Weirich y Antoni (1998); y Yap y Camm (1999)). La posible duración de la acción aumentada provoca la prolongación del intervalo QT que se ha asociado con una peligrosa arritmia ventricular, la torsión de las puntas. (Brown y Rampe (2000)).
- En el ensayo de hERG, se expresan canales de hERG en una línea celular de riñón embrionario humano (HEK293) que carece de I<sub>Kr</sub> endógeno. Se prefiere la expresión en una línea celular de mamífero a la expresión transitoria en



valor se asigna en base al estado predominante, calculado o determinado de otro modo como una fase de sueño diferenciada (en la que las fases del sueño se definan como sueño no MOR, sueño MOR o estado de vigilia) durante el intervalo de 10 segundos que define la época.

- 5 La expresión “duración media de la sesión de sueño” se define como la duración media (en minutos) de cada uno y todos los episodios o sesiones de sueño que comienzan a una hora dada con independencia de la duración individual de cada episodio o sesión.

10 **Efectos secundarios medidos simultáneamente:** se seleccionan análogos de loxapina si, en ratas Wistar macho adultas, estos compuestos (i) no producen cantidades apreciables de insomnio de rebote; (ii) no inhiben notablemente el sueño MOR; e (iii) no inhiben desproporcionadamente la actividad locomotora y/o el tono motor en comparación con los efectos normales del propio sueño. El umbral de las definiciones de estas tres variables de efectos secundarios es el siguiente:

15 “insomnio de rebote” se define como el periodo de vigilia de rebote, paradójica o compensatoria que tiene lugar tras los efectos promotores del sueño de un agente hipnótico o soporífero. El insomnio de rebote se observa comúnmente durante la fase de descanso habitual del ciclo circadiano 6–18 horas después del tratamiento a la HC 18 (6 horas después de apagarse la luz, LO 12:12), pero se puede producir a cualquiera de las 30 primeras horas posteriores al tratamiento. El rebote se considera inaceptable cuando, en una rata Wistar macho adulta, el exceso de vigilia acumulada asociada con el insomnio de rebote es mayor del 10% de la reducción de la media de los tiempos de sueño no MOR por hora durante la fase de descanso del ciclo circadiano posterior al tratamiento (luces encendidas).

20 En las ratas Wistar macho adultas, el insomnio de rebote se manifiesta como un aumento del estado de vigilia con respecto a los correspondientes tiempos de referencia (24 horas antes) posterior al efecto inductor del sueño del fármaco, y el insomnio de rebote se mide acumulativamente.

25 La “inhibición del sueño MOR” se define como la reducción del tiempo de sueño MOR tras el tratamiento a la HC 18 (6 horas después de apagarse la luz, LO 12:12) o a la HC 5 (5 horas después de encenderse la luz; LO 12:12). Se consideran inaceptables los compuestos que reducen el tiempo de sueño MOR en más de 15 minutos (en relación con la referencia y ajuste realizado para el tratamiento con vehículo) cuando se administran bien a la HC 18 o a la HC 5.

30 Según lo definido en la presente memoria, “inhibición desproporcionada de la actividad locomotora” es una reducción de la actividad locomotora superior a la normal y a la reducción esperada de la actividad conductual atribuible al sueño. La lógica dicta que si un animal está dormido, normalmente, habrá una correspondiente reducción de la actividad locomotora. Si el compuesto hipnótico o soporífero reduce los niveles de actividad locomotora en un exceso de un 20% más de lo únicamente atribuible al sueño, el compuesto se considera inaceptable. Es posible cuantificar la actividad locomotora (ALM) o el tono motor objetivamente usando cualquier forma de monitorización de la actividad locomotora conductual (movimientos inespecíficos, monitorización telemétrica de la actividad, dispositivos de detección tridimensional del movimiento, actividad de movimiento sobre ruedas, medidas de exploración, registro electromiográfico, etc.), siempre y cuando la medición se realice simultáneamente a las mediciones de sueño–vigilia deseadas en el mismo animal.

40 En una realización, se mide la actividad locomotora en la jaula del animal usando un dispositivo biotelemétrico implantado quirúrgicamente en la cavidad peritoneal del animal; el dispositivo implantado y el receptor telemétrico asociado detecta si y cuánto se mueve el animal en la jaula. Se mide el sueño y la vigilia en épocas de 10 segundos simultáneamente. Los recuentos de actividad locomotora por unidad de tiempo se dividen entre la cantidad concurrente de vigilia por la misma unidad, obteniéndose una medida de la “intensidad de la actividad locomotora” (IALM) para esa unidad de tiempo. Se considerarían inaceptables los compuestos hipnóticos o soporíferos administrados a la HC 18 (6 horas después de apagarse la luz; LO 12:12) que disminuyeran la actividad locomotora por unidad de tiempo de vigilia en más del 20% con respecto al vehículo.

45 En otra realización, los análogos de loxapina de la invención se seleccionan usando criterios de sueño–vigilia y de medición fisiológica in vivo mostrados en la Tabla 5:

Tabla 5

SCORE-2000	Valor absoluto	Cambio del valor de referencia con respecto a sólo vehículo
Tiempo máximo de no MOR	> 55% del máximo de sueño/hora	No aplicable
No MOR acumulativo	No aplicable	> 20 minutos a ED 100 para MSBL a T <sub>1-6</sub>
Sesión más larga de sueño	Máximo absoluto de > 17 minutos	> 5 minutos
Sesión media de sueño	Máximo absoluto de > 6 minutos	No se usa en cortes SAR
Insomnio de rebote	Reducción < 10% de media de los tiempos de sueño no MOR a la hora durante la fase de descanso del ciclo circadiano posterior al tratamiento (luces encendidas)	No aplicable
Inhibición del sueño MOR	No aplicable	No supera los 15 minutos, Rx a la HC 5
IALM	No aplicable	No supera el 20% de la reducción de la IALM

5 Los procedimientos para evaluar estos criterios de sueño-vigilia y fisiológicos se describen anteriormente. El "valor absoluto" mostrado en la segunda columna de la Tabla 5 se refiere al valor determinado para cada compuesto de prueba, mientras que el valor de "cambio" mostrado en la tercera columna de la Tabla 5 refleja un valor ajustado en el que el valor absoluto es la diferencia con respecto al vehículo, cuando los valores de vehículo están ajustados con respecto al valor de referencia.

10 En algunas realizaciones, la sesión de sueño más larga tiene una duración mayor de 13 minutos. En otros, tiene una duración de más de 17 minutos. En algunas realizaciones, la sesión de sueño más larga neta después del tratamiento tiene una duración mayor o igual a 3 minutos. En otras, tiene una duración mayor o igual a 6 minutos.

15 Otros criterios de evaluación del sueño-vigilia y fisiológica *in vivo* usados para seleccionar los análogos de loxapina de la invención incluyen la medición de la temperatura corporal aguda y la temperatura corporal latente como un cambio en el valor de referencia con respecto al vehículo. El cambio de la temperatura corporal aguda no debe superar -0,50°C y el cambio de la temperatura corporal latente no debe superar +0,50°C en el tiempo de 1-6 horas. La temperatura corporal aguda (T<sub>1-6</sub>) se ajusta con respecto al correspondiente valor de referencia medido 24 horas antes con respecto al vehículo (la disminución con respecto al vehículo). La temperatura corporal latente, medida a la 7-18 horas después del tratamiento con el fármaco (T<sub>7-18</sub>), se ajusta con respecto al correspondiente valor de referencia medido 24 horas antes con respecto al vehículo (la disminución con respecto al vehículo).

20 Los compuestos modulan el sueño de varios modos, incluyendo la disminución del tiempo hasta que se concilia sueño, el aumento de la duración media de la sesión de sueño y el aumento de la duración máxima de la sesión de sueño.

Los compuestos, o sus sales farmacéuticamente aceptables, se administran oral, nasal, transdérmica, pulmonar, por inhalación, bucal, sublingual, intraperitoneal, intravenosa, rectal, intrapleurales, intratecal y parenteralmente. En una realización, el compuesto se administra oralmente. Cualquier experto en la técnica reconocerá las ventajas de ciertas vías de administración.

25 Los compuestos de la presente invención sirven para el tratamiento de una variedad de trastornos del sueño, incluyendo alteración del ritmo circadiano, insomnio, parasomnia, síndrome de la apnea del sueño, narcolepsia y/o hipersomnia. En una realización, los compuestos tratan alteraciones del ritmo circadiano, tales como, por ejemplo, el *jet lag*, trastornos de cambio de turno laboral, síndrome de la fase del sueño retardada, síndrome de la fase del sueño adelantada y trastorno por ciclo sueño-vigilia diferente de 24 horas. En otra realización, los compuestos tratan el insomnio, incluyendo, por ejemplo, el insomnio extrínseco, insomnio psicofisiológico, insomnio de altura, síndrome de piernas inquietas, trastorno de movimiento periódico de extremidades, insomnio dependiente de una medicación, insomnio por drogodependencia, insomnio por alcoholismo e insomnio asociado con trastornos mentales.

35 En otra realización, los compuestos tratan parasomnias, incluyendo sonambulismo, pavor nocturno, trastorno del comportamiento asociado al sueño MOR, bruxismo del sueño y enuresis del sueño. En otra realización más, el procedimiento trata el trastorno de la apnea del sueño, incluyendo la apnea central del sueño, la apnea obstructiva del sueño y la apnea mixta del sueño. Además, los compuestos tratan otros trastornos del sueño tales como narcolepsia o hipersomnia.

40 En algunas realizaciones, se administra un compuesto en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cualquier experto en la técnica reconocerá los diversos procedimientos para crear sales farmacéuticamente aceptables e identificar la sal apropiada. En una realización, el compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptables está incluido en una composición farmacéutica.

- 5 Como se usa en la presente memoria, la expresión "trastorno del sueño" incluye las afecciones reconocidas por un experto en la técnica como trastornos del sueño, por ejemplo, la afecciones conocidas en la técnica o las afecciones propuestas como trastornos del sueño o descubiertas como trastornos del sueño. Véase, por ejemplo, Thorpy, M.J., "International Classification of Sleep Disorders"; Revisado: Diagnostic and Coding Manual. American Sleep Disorders Association; Rochester, Minnesota 1997; y "ICD-9-CM, International Classification of Diseases", novena revisión, modificado clínicamente, National Center for Health Statistics, Hyattsville, MD.
- 10 Por ejemplo, los trastornos del sueño se pueden clasificar en general en disomnias, p.ej., trastornos intrínsecos, extrínsecos o del ritmo circadiano; parasomnias, p.ej., trastornos asociados con el despertar, la transición sueño-vigilia y el movimiento ocular rápido (MOR), y otras parasomnias; trastornos asociados con trastornos mentales, neurológicos y otros trastornos médicos; y otros trastornos del sueño.
- 15 Los trastornos del sueño intrínsecos incluyen, por ejemplo, insomnio psicofisiológico, percepción errónea del estado del sueño, insomnio idiopático, narcolepsia, hipersomnias recurrente, hipersomnias idiopáticas, hipersomnias post-traumáticas, síndrome de la apnea obstructiva del sueño, síndrome de la apnea central del sueño, síndrome de hipoventilación alveolar central, trastorno de movimiento periódico de extremidades y síndrome de piernas inquietas.
- 20 Los trastornos del sueño extrínsecos incluyen, por ejemplo, higiene inadecuada del sueño, trastorno del sueño ambiental, insomnio de altura, trastorno de ajuste del sueño, síndrome insuficiencia de sueño, trastorno de pautas de conducta del sueño, trastorno de asociación con el inicio del sueño, insomnio por alergia alimentaria, síndrome de ingesta nocturna de comida o bebida, trastorno del sueño por dependencia de hipnóticos, trastorno del sueño por dependencia de estimulantes, trastorno del sueño por alcoholismo o trastorno del sueño inducido por toxinas.
- 25 Los trastornos del sueño relacionados con el ritmo circadiano incluyen, por ejemplo, el síndrome de cambio de zona horaria (*jet lag*), trastorno del sueño por cambios de turno laboral, patrón irregular de sueño-vigilia, síndrome de la fase del sueño retardada, síndrome de la fase del sueño adelantada y trastorno por ciclo sueño-vigilia diferente de 24 horas.
- Los trastornos del sueño al despertar incluyen, por ejemplo, despertares confusos, sonambulismo y terrores nocturnos.
- Los trastornos de transición sueño-vigilia incluyen, por ejemplo, trastorno de movimientos rítmicos, inicios del sueño, hablar en sueños y calambres nocturnos en extremidades inferiores.
- 30 Los trastornos del sueño asociados con MOR incluyen, por ejemplo, pesadillas, parálisis del sueño, problemas de erección relacionados con el sueño, erecciones dolorosas relacionadas con el sueño, parada sinusal relacionada con el sueño MOR y trastorno conductual del sueño MOR.
- Otras parasomnias incluyen, por ejemplo, bruxismo del sueño, enuresis del sueño, síndrome de dificultad para tragar asociado con el sueño, distonía paroxística nocturna, síndrome de muerte súbita e inexplicable nocturna, ronquido primario, apnea infantil del sueño, síndrome de hipoventilación central congénita, síndrome de muerte súbita infantil y mioclonia neonatal benigna del sueño.
- 35 Los "trastornos del sueño" también aparecen en sujetos que sufren otros trastornos, enfermedades o lesiones médicas, o en sujetos que estén siendo tratado con otras medicaciones o tratamientos médicos y que, como consecuencia de ello, tengan dificultad para conciliar el sueño y/o permanecer dormidos, o no gocen de un sueño reparador o reconstituyente, p.ej., un sujeto con privación de sueño. Por ejemplo, algunos sujetos tienen dificultad para dormir tras un tratamiento médico por otras afecciones, p. ej., quimioterapia o cirugía, o por sufrir dolor u otros efectos de lesiones físicas.
- 40 Es ampliamente conocido en la técnica que ciertos trastornos médicos, por ejemplo, trastornos del sistema nervioso central (SNC), p.ej., trastornos mentales o neurológicos, p.ej., ansiedad, pueden tener un componente de trastorno del sueño, p.ej., privación del sueño. Así pues, el "tratamiento de un trastorno del sueño" también incluye tratar un componente de trastorno del sueño de otros trastornos, p. ej, trastornos del SNC. Además, el tratamiento del componente de trastorno del sueño de los trastornos del SNC también puede tener un efecto beneficioso de mejora de otros síntomas asociados con dicho trastorno. Por ejemplo, en algunos sujetos que padecen ansiedad vinculada a una privación del sueño, al tratar el componente de privación del sueño también se trata el componente de ansiedad. Así pues, la presente invención también incluye un procedimiento para tratar tales trastornos médicos.
- 45 Por ejemplo, los trastornos del sueño vinculados a trastornos mentales incluyen psicosis, trastornos del estado de ánimo, trastornos de ansiedad, trastorno de pánico, adicciones y similares. Los trastornos mentales específicos incluyen, por ejemplo, depresión, trastorno obsesivo compulsivo, trastorno/neurosis afectiva, neurosis/trastorno depresivo, neurosis por ansiedad, trastorno distímico, trastorno del comportamiento, trastornos del estado de ánimo, esquizofrenia, depresión maníaca, delirio y alcoholismo.
- 50 Los trastornos del sueño asociados con trastornos neurológicos incluyen, por ejemplo, trastornos de degeneración cerebral, demencia, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, insomnio familiar fatal, epilepsia relacionada con el sueño, estado epiléptico eléctrico del sueño y dolores de cabeza
- 55

relacionados con el sueño. Los trastornos del sueño asociados con otros trastornos médicos incluyen, por ejemplo, tripanosomiasis africana, isquemia cardiaca nocturna, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma relacionada con el sueño, reflujo gastrointestinal relacionado con el sueño, enfermedad de úlcera péptica y síndrome de fibrositis.

5 En algunas circunstancias, los trastornos del sueño también se asocian con el dolor, p.ej., dolor neuropático vinculado al síndrome de piernas inquietas; migraña; hiperalgesia; fibromialgia, dolor; aumento normal o exagerado de la sensación de dolor, tal como hiperalgesia, causalgia y alodinia; dolor agudo; dolor de quemaduras; dolor facial atípico; dolor neuropático; dolor de espalda; síndromes del dolor regional complejo de tipo I y II; dolor artrítico; dolor por lesión deportiva; dolor relacionado con una infección, p.ej., VIH, síndrome postpolio y neuralgia post-herpética; dolor en extremidad fantasma; dolor de parto; dolor por cáncer; dolor posterior a la quimioterapia; dolor tras una apoplejía; dolor tras una operación; neuralgia; condiciones asociadas con el dolor visceral, incluyendo el síndrome del intestino irritable, migraña y angina.

15 Otros trastornos del sueño incluyen, por ejemplo, persona que duerme poco, persona que duerme mucho, síndrome de subvigilia, mioclonía fragmentaria, hiperhidrosis del sueño, trastorno del sueño asociado con el ciclo menstrual, trastorno del sueño asociado con la gestación, alucinaciones hipnagógicas terroríficas, taquipnea neurogénica relacionada con el sueño, laringoespasmos relacionados con el sueño y síndrome de asfixia del sueño.

20 El insomnio se clasifica comúnmente en insomnio inicial, en el que el sujeto necesita más de 30 minutos para conciliar el sueño; e insomnio de mantenimiento del sueño, en el que el sujeto pasa más de 30 minutos despierto durante un periodo esperado de sueño o, por ejemplo, que se despierta antes de la hora a la que desea despertarse con dificultades o incapacidad para volver a quedar dormido. Los compuestos revelados pueden ser eficaces en el tratamiento de lo insomnios inicial y de mantenimiento del sueño, del insomnio como consecuencia de trastornos de ajuste del ritmo circadiano o insomnio provocado por trastornos del SNC. Una realización consiste en tratar a un sujeto de un trastorno de ajuste del ritmo circadiano. Otra realización consiste en tratar a un sujeto de insomnio provocado por un trastorno del estado de ánimo. En otras realizaciones, se trata a un sujeto de apnea del sueño, sonambulismo, terrores nocturnos, síndrome de piernas inquietas, insomnio inicial y/o insomnio de mantenimiento del sueño; o más preferiblemente, insomnio inicial o insomnio de mantenimiento del sueño. Los compuestos revelados pueden ser eficaces en el tratamiento del insomnio de aparición del sueño. Los compuestos revelados también pueden ser eficaces en el tratamiento del insomnio de mantenimiento del sueño.

25 La pauta de dosificación de los compuestos se selecciona según una variedad de factores que incluyen tipo, especie, edad, peso, sexo y estado de salud del paciente; gravedad de la afección que se va a tratar; vía de administración; función renal y hepática del paciente; y el compuesto o la sal del mismo empleado en particular. Cualquier médico o veterinario experto en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz del fármaco necesaria para prevenir, contrarrestar o detener el progreso de la afección.

30 Las dosis orales de la presente invención, cuando se usan para los efectos indicados, variarán entre aproximadamente 0,05 a 5.000 mg/día oralmente. Las cantidades eficaces de los compuestos revelados varían comúnmente entre aproximadamente 0,01 mg/kg al día y aproximadamente 100 mg/kg al día y, preferiblemente, entre 0,1 mg/kg al día y aproximadamente 10 mg/kg/día. En "Remington: the Science and Practice of Pharmacy", XIX edición, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995), se pueden encontrar técnicas para la administración de los compuestos revelados de la invención.

35 Por ejemplo, en algunas realizaciones, se obtiene una sal de ácido de un compuesto que contiene una amina u otro grupo básico haciendo reaccionar el compuesto con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, tal como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido acético, ácido perclórico y similares. Los compuestos con un grupo de amonio cuaternario también contienen un contraión, tal como cloruro, bromuro, yoduro, acetato, perclorato y similares. Otros ejemplo de tales sales incluyen clorhidratos, bromhidratos, sulfatos, metanosulfonatos, nitratos, maleatos, acetatos, citratos, fumaratos, tartratos (p.ej., (+)-tartratos, (-)-tartratos o mezclas de los mismos, incluyendo mezclas racémicas), succinatos, benzoatos y sales con aminoácidos tales como ácido glutámico.

40 Las sales de los compuestos que contienen un ácido carboxílico u otros grupos funcionales ácidos se preparan mediante la reacción con una base adecuada. Tal sal farmacéuticamente aceptable se forma con una base que proporciona un catión farmacéuticamente aceptable, que incluye sales de metales alcalinos (especialmente de sodio y potasio), sales de metales alcalinotérreos (especialmente, de calcio y magnesio), sales de aluminio y amonio, así como sales formadas a partir de bases orgánicas fisiológicamente aceptables, tales como trimetilamina, trietilamina, morfina, piridina, piperidina, picolina, dicitclohexilamina, *N,N'*-dibenciletildiamina, 2-hidroxiethylamina, bis-(2-hidroxiethyl)amina, tri-(2-hidroxiethyl)amina, procaína, dibencil-piperidina, *N*-bencil- $\beta$ -fenetilamina, deshidroabietilamina, *N,N'*-bisdeshidroabietilamina, glucamina, *N*-metilglucamina, colidina, quinina, quinolina y un aminoácido básico tal como lisina y arginina.

45 En algunas realizaciones, ciertos compuestos y sus sales también se presentan en forma de solvatos, por ejemplo, hidratos, y la presente invención incluye cada solvato y sus mezclas.

En una realización, los compuestos descritos en la presente memoria, y sus sales farmacéuticamente aceptables, se usan en preparaciones farmacéuticas en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los

- vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen cargas o diluyentes sólidos inertes y soluciones orgánicas o acuosas estériles. Los compuestos estarán presentes en tales composiciones farmacéuticas en cantidades suficientes para proporcionar la cantidad de dosis deseada en el intervalo descrito en la presente memoria. En "Remington: the Science and Practice of Pharmacy" anterior, se encuentran técnicas para la formulación y administración de los compuestos revelados de la invención.
- 5
- Comúnmente, el compuesto se prepara para una administración oral en la que los compuestos revelados o sus sales se combinan con un vehículo o diluyente líquido o sólido adecuado para formar cápsulas, comprimidos, píldoras, polvos, jarabes, soluciones, suspensiones y similares.
- 10 Los comprimidos, las píldoras, las cápsulas y similares contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 99 por ciento en peso del ingrediente activo y un aglutinante, tal como goma tragacanto, acacia, almidón de maíz o gelatina; excipientes tales como fosfato de dicalcio; un agente desintegrante, tal como almidón de maíz, almidón de patata o ácido algínico; un lubricante tal como estearato de magnesio; y/o un agente edulcorante tal como sacarosa, lactosa, sacarina, xilitol y similares. Cuando una forma farmacéutica unitaria es una cápsula, habitualmente contiene, además de materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como un aceite graso.
- 15 En algunas realizaciones, hay presentes otros diversos materiales como recubrimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los comprimidos están revestidos de laca, azúcar o ambas. En algunas realizaciones, un jarabe o elixir contiene, además del ingrediente activo, sacarosa como agente edulcorante, metil y propilparabenos como conservantes, un colorante y un aromatizante, tal como aroma de cereza o de naranja y similares.
- 20 Para algunas realizaciones relacionadas con la administración parenteral, los compuestos revelados, o sus sales, solvatos o polimorfos, se pueden combinar con medios orgánicos o acuosos estériles para formar soluciones o suspensiones inyectables. Las composiciones inyectables son preferiblemente soluciones o suspensiones isotónicas acuosas. Las composiciones pueden estar esterilizadas y/o contener adyuvantes tales como agentes conservantes, estabilizadores, humectantes o emulsionantes, promotores de disolución, sales para regular la presión osmótica y/o
- 25 tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según procedimientos de mezclado, granulación o revestimiento convencionales, respectivamente, y contienen aproximadamente del 0,1 al 75%, preferiblemente, del aproximadamente 1 al 50%, del ingrediente activo.
- Por ejemplo, las soluciones inyectables se producen usando disolventes tales como aceite de sésamo o aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso, así como soluciones acuosas de sales farmacéuticamente aceptables hidrosolubles de los compuestos. En algunas realizaciones, las dispersiones se preparan en glicerol, polietilenglicoles
- 30 líquidos y sus mezclas en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Las expresiones "administración parenteral" y "parenteralmente administrado", como se usan en la presente memoria, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente, mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión
- 35 intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intrasternal.
- Para la administración rectal, las composiciones farmacéuticas adecuadas son, por ejemplo, preparaciones tópicas, supositorios o enemas. Los supositorios se preparan ventajosamente a partir de emulsiones o suspensiones grasas.
- 40 Las composiciones pueden estar esterilizadas y/o contener adyuvantes tales como agentes conservantes, estabilizadores, humectantes o emulsionantes, promotores de disolución, sales para regular la presión osmótica y/o tampones. Además, también pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas. Las composiciones se preparan según procedimientos de mezclado, granulación o revestimiento convencionales, respectivamente, y contienen aproximadamente del 0,1 al 75%, preferiblemente, del aproximadamente 1 al 50%, del ingrediente activo.
- 45 En algunas realizaciones, los compuestos se formulan para administrar el agente activo mediante administración pulmonar, p.ej., la administración de una formulación en aerosol que contiene el agente activo desde, por ejemplo, una bomba de pulverización manual, un nebulizador o un inhalador dosificador presurizado. En algunas realizaciones, las formulaciones adecuadas de este tipo también incluyen otros agentes, tales como agentes antiestáticos, para mantener los compuestos revelados como aerosoles eficaces.
- 50 Un dispositivo de administración de fármaco para administrar aerosoles comprende un bote de aerosol adecuado con una válvula dosificadora que contiene la formulación farmacéutica en aerosol según lo descrito y una carcasa de accionamiento adaptada para sujetar el bote y permitir la administración del fármaco. El bote del dispositivo de administración de fármaco tiene una cámara de aire que representa más del aproximadamente 15% del volumen total del bote. Habitualmente, el polímero destinado a una administración pulmonar está disuelto, suspendido o emulsionado en una mezcla de un disolvente, tensioactivo y propulsor. La mezcla se mantiene a presión en un bote que ha sido sellado con una válvula dosificadora.
- 55
- Para una administración nasal, se puede usar bien un vehículo sólido o líquido. El vehículo sólido incluye un polvo de grano grueso que tiene un tamaño de partícula en el intervalo de, por ejemplo, aproximadamente 20 a

aproximadamente 500 micrómetros, y tal formulación se administra mediante inhalación rápida a través de las fosas nasales. En algunas realizaciones en las que se usa el vehículo líquido, la formulación se administra como un pulverizado o gotas nasales e incluye soluciones oleaginosas o acuosas de los ingredientes activos.

5 También se contemplan las formulaciones que son formas farmacéuticas de dispersión rápida, también conocidas como formas de "dosis instantánea". En particular, algunas realizaciones de la presente invención están formuladas como composiciones que liberan sus ingredientes activos en un breve periodo de tiempo, p.ej., comúnmente, en menos de aproximadamente cinco minutos, preferiblemente, en menos de aproximadamente noventa segundos, más preferiblemente, en menos de aproximadamente treinta segundos, y lo más preferible, en menos de aproximadamente diez o quince segundos. Tales formulaciones son adecuadas para su administración a un sujeto mediante una  
10 variedad de vías, por ejemplo, mediante la introducción en una cavidad corporal o la aplicación sobre una superficie corporal húmeda o una herida abierta.

Comúnmente, una "dosis instantánea" es una forma farmacéutica sólida que se administra oralmente, que se dispersa rápidamente en la boca y de ahí que no requiera un gran esfuerzo para tragarla y permita que el compuesto sea ingerido o absorbido de manera rápida a través de las membranas mucosas orales. En algunas realizaciones, las  
15 formas farmacéuticas que se dispersan rápidamente también se usan en otras aplicaciones, incluyendo el tratamiento de heridas, y otras lesiones corporales y estados patológicos en los que no sea posible liberar el medicamento mediante una loción suministrada externamente.

Las formas de "dosis instantánea" son conocidas en la técnica; véase, por ejemplo, las formas farmacéuticas efervescentes y los recubrimientos de liberación rápida de micropartículas insolubles en las patentes estadounidenses n.º 5.578.322 y 5.607.697; espumas y líquidos liofilizados en las patentes estadounidenses n.º 4.642.903 y 5.631.023; hilado por fusión de formas farmacéuticas, en las patentes estadounidenses n.º 4.855.326; 5.380.473 y 5.518.730; fabricación de formas libres sólidas, en la patente estadounidense n.º 6.471.992; matriz de vehículo basada en sacarina y un aglutinante líquido, en las patentes estadounidenses n.º 5.587.172; 5.616.344; 6.277.406 y 5.622.719; y otras formas conocidas en la técnica.

25 Los análogos de loxapina de la invención también se formulan como formulaciones "de liberación pulsada" en las que el análogo se libera de las composiciones farmacéuticas en una serie de liberaciones (i.e., pulsos). Los análogos de loxapina también se formulan como formulaciones de "liberación sostenida", en las que el análogo se libera de manera continua de la composición farmacéutica durante un periodo prolongado.

También se contemplan formulaciones, p.ej., formulaciones líquidas, que incluyen agentes de encapsulación o solvatación cíclicos o acíclicos, p.ej., ciclodextrinas, poliéteres o polisacáridos (p.ej., metilcelulosa) o, más preferiblemente, derivados de  $\beta$ -ciclodextrina polianiónica con un grupo de sal de sulfonato de sodio separado de la cavidad lipófila por un grupo espaciador de alquiléter o polisacáridos. En una realización, el agente es metilcelulosa. En otra realización, el agente es un derivado de  $\beta$ -ciclodextrina polianiónico con una sal sulfonato de sodio separada de la cavidad lipófila por un grupo espaciador de butiléter, p.ej., CAPTISOL® (CyDex, Overland, KS). El experto en la  
35 técnica puede evaluar las proporciones de la formulación entre el agente adecuado y el compuesto revelado preparando una solución del agente en agua, p.ej., una solución del 40% en peso; preparando diluciones en serie, p.ej., para hacer soluciones del 20%, 10%, 5%, 2,5%, 0% (control) y similares; añadiendo un exceso (en comparación con la cantidad que se puede disolver mediante el agente) del compuesto revelado; mezclando en condiciones apropiadas, p.ej., mediante calentamiento, agitación, tratamiento de ultrasonidos y similares; centrifugando o filtrando  
40 las mezclas resultantes para obtener soluciones transparentes; y analizando la concentración del compuesto revelado de las soluciones.

Además de las formulaciones terapéuticas anteriormente descritas, una terapia que incluya los compuestos de la presente invención incluye opcionalmente la administración junto con una o más terapias adicionales, p.ej., fármacos o tratamientos físicos o conductuales (p.ej., terapia de luz, electroestimulación, modificación de hábitos, terapia cognitiva, modificación del ritmo circadiano y similares). Tal práctica se denomina "terapia de combinación". La otra u  
45 otras terapias de la terapia de combinación incluyen terapias reconocidas por el experto en la técnica como deseables en combinación con el compuesto de la invención, por ejemplo, terapias conocidas en la técnica o terapias que han sido propuestas o descubiertas en la técnica para el tratamiento de trastornos del sueño o el tratamiento de enfermedades asociadas con los trastornos del sueño, por ejemplo, terapias para cualquiera de los trastornos del  
50 sueño u otras afecciones reveladas en la presente memoria. En algunas realizaciones, el compuesto se administra como una terapia de combinación mientras que, en otras realizaciones, se administra como una única terapia.

Comúnmente, el compuesto se administra como una sola terapia.

El experto en la técnica apreciará que una terapia administrada en combinación con los compuestos de la presente invención se dirige al mismo o a un trastorno diana diferente al que se están dirigiendo los compuestos de la presente invención. Primero se realiza la administración del compuesto de la invención, seguida de la otra terapia o,  
55 alternativamente, puede ser que la administración de la otra terapia se realice primero. La otra terapia es cualquiera conocida en la técnica para tratar, prevenir o reducir los síntomas del trastorno diana, p.ej., un trastorno del sueño u otros trastornos, p.ej., otros trastornos del SNC. Además, algunas realizaciones de la presente invención tienen compuestos administrados en combinación con otras terapias conocidas para el trastorno diana. Es más, la otra

terapia incluye cualquier agente beneficioso para el paciente cuando se administre en combinación con el compuesto revelado.

5 Por ejemplo, en algunas realizaciones en las que la otra terapia es un fármaco, se administra como una formulación separada o en la misma formulación que el compuesto de la invención. Un compuesto de la invención se administra en una terapia de combinación con una cualquiera o más de las medicaciones que requieren o no requieren receta médica comercialmente disponibles, incluyendo, pero no limitándose a, antihistaminas, antimicrobianos, fungicidas, germicidas, hormonas, antipiréticos, antidiabéticos, bronquodilatadores, antidiarreicos, agentes antiarrítmicos, agentes de dilatación coronaria, glucósidos, espasmolíticos, agentes antihipertensivos, antidepresivos, ansiolíticos, otros agentes psicoterapéuticos, esteroides, corticosteroides, analgésicos, medicaciones para resfriados, vitaminas, sedantes, hipnóticos, anticonceptivos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, hipoglucemiantes, hipocolesterolémicos, anticonvulsivos, otros antiépilépticos, inmunomoduladores, anticolinérgicos, simpatomiméticos, vasodilatadores, anticoagulantes, antiarrítmicos, prostaglandinas que tienen diversas actividades farmacológicas, diuréticos, inductores del sueño, antihistamínicos, antineoplásicos, oncolíticos, antiandrógenos, antipalúdicos, antileproso y otros diversos tipos de fármacos. Véase Goodman y Gilman, "The Basis of Therapeutics" (VIII edición, Pergamon Press, Inc., EE.UU., 1990) y "The Merck Index" (XI edición, Merck & Co., Inc., EE.UU., 1989).

10 Los ejemplos de fármacos usados en combinación con los compuestos de la invención incluyen, pero no se limitan a, AMBIEN® STILNOX® (tartrato de zolpidem), indiplón, ESTORRA™ (eszopiclona), NEURONTIN® (gabapentín), LYRICA® (pregabalín), eplivanserín, SONATA® (zaleplón), ESTORRA™ (eszopiclona), ZOPICLONE™ (imovane), DESYREL™ (clorhidrato de trazodona), SEROQUEL® (fumarato de quetiapina), CLOZARIL® (clozapina), ZYPREXA™ (olanzapina), RISPERDAL® (risperidona), M100907 y LUNESTA™.

15 En una realización, los compuestos de la invención son útiles en combinación con una terapia mecánica tal como PPC. La "PPC de las vías respiratorias" o la "presión positiva continua (PPC) de las vías respiratorias" es un dispositivo mecánico para el tratamiento de la apnea del sueño y otros trastornos de la respiración relacionados con el sueño (incluyendo el ronquido). El tratamiento con un dispositivo PPC de las vías respiratorias se administra comúnmente por la nariz o la boca del paciente.

20 Un sujeto sometido a un tratamiento con PPC de las vías respiratorias debe llevar una mascarilla de plástico ajustada sobre la nariz mientras duerme. La mascarilla está unida a un compresor que fuerza el aire por la nariz creando una presión positiva sobre las vías respiratorias del sujeto. El principio del procedimiento es que la presión generada sobre las vías respiratorias produce una acción de "entablillado" que previene o disminuye el colapso de las vías respiratorias y, por tanto, la apnea obstructiva del sueño. Aunque en la mayoría de los sujetos que reciben el tratamiento de PPC de las vías respiratorias se observa una respuesta terapéutica eficaz, muchos sujetos no pueden aguantar el aparato o la presión y rechazan el tratamiento. Además, recientes estudios de monitorización encubierta demostraron que el mantenimiento a largo plazo del tratamiento de PPC de las vías respiratorias es muy poco satisfactorio. Se sabe que los sujetos se quitan las mascarillas mientras duermen.

25 En un aspecto, el compuesto de la invención se administra en combinación con un dispositivo PPC de las vías respiratorias para potenciar el sueño. En otro aspecto, el compuesto de la invención se administra en combinación con un dispositivo PPC de las vías respiratorias para mejorar el sueño. En otro aspecto, el compuesto de la invención se administra en combinación con un dispositivo PPC de las vías respiratorias para mejorar el mantenimiento del tratamiento de PPC de las vías respiratorias. Sin el deseo de quedar vinculados a la teoría, se cree que mediante la administración de una cantidad eficaz de un compuesto promotor del sueño de la invención a un sujeto en combinación con un tratamiento de PPC de las vías respiratorias, el sujeto dormirá mejor y más profundamente y, por tanto, no tenderá a quitarse la mascarilla.

30 En una realización, el compuesto de la presente invención se administra antes del tratamiento de PPC de las vías respiratorias. En otra realización, el compuesto de la presente invención se administra sustancialmente al mismo tiempo que el tratamiento de PPC de las vías respiratorias. En una realización, se realiza la administración en paralelo de una cantidad eficaz del compuesto añadiendo un canal de aerosol adicional a la parte de tratamiento de presión de aire del dispositivo PPC de las vías respiratorias, administrando así el compuesto de la presente invención en una forma nebulizada mediante una mascarilla nasal u oral del dispositivo PPC de las vías respiratorias. Alternativamente, se puede añadir una cantidad eficaz del compuesto al agua o al reservorio de líquido que comúnmente forma parte del dispositivo de tratamiento de PPC de las vías respiratorias.

35 Con el uso del tratamiento de mascarilla PPC de las vías respiratorias, el compuesto de la invención se administra a una baja concentración durante toda la noche o a concentraciones más altas, en forma de bolos, en diferentes momentos al comienzo y durante la noche.

40 Todas las publicaciones y documentos de patente citados en la presente memoria se incorporan en la presente memoria por referencia como si se indicara que cada uno de tales documentos o publicaciones estuviera incorporado específica e individualmente en la presente memoria por referencia. No se pretende que las citas de las publicaciones y los documentos de patente sean reconocidos como la técnica anterior pertinente, ni que constituyan reconocimiento alguno en cuanto su contenido o sus fechas. A partir de la descripción por escrito de la invención, los expertos en la técnica apreciarán que es posible ponerla en práctica en una variedad de realizaciones, y que la descripción anterior y

los ejemplos que se presentan a continuación tienen el objetivo de ser ilustrativos y no restrictivos de las reivindicaciones que figuran a continuación.

#### **Ejemplo 1: Síntesis de análogos de loxapina**

5 El compuesto de la invención, y sus sales, solvatos o hidratos relacionados, se pueden sintetizar mediante procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. El Ejemplo 10 revela la síntesis del Compuesto 1.

#### **Ejemplo 2: Propiedades inductoras del sueño de los compuestos de la invención**

10 El sueño de los mamíferos se puede dividir en el sueño que tiene lugar durante los periodos de movimiento ocular rápido (MOR), acompañado por una actividad cerebral sustancial, y los periodos de sueño no MOR (NMOR), acompañado por una disminución de la actividad cerebral. Comúnmente, un periodo de sueño nocturno normal está ocupado fundamentalmente por el sueño NMOR y, por tanto, la acumulación de NMOR puede servir para medir la acumulación total de sueño, p.ej., una disminución significativa de NMOR puede estar asociada con el insomnio y una acumulación de “falta de sueño”, p.ej., una necesidad fisiológica acumulada de dormir que tiende a perdurar hasta que se acumula una cantidad de sueño adicional suficiente. Así pues, un aumento de NMOR vinculado a un tratamiento puede indicar la eficacia del tratamiento en el tratamiento del insomnio.

15 La calidad del sueño se puede asociar con la continuidad o el mantenimiento del sueño. Por ejemplo, un sujeto con apnea del sueño se despierta numerosas veces durante un periodo de sueño, p.ej., el sujeto tienen dificultad para mantenerse dormido de forma continua. Aunque tal sujeto puede acumular una duración de sueño nocturno común, p.ej., 8 horas, el sueño no resulta reparador ni reconstituyente debido al despertar provocado por la apnea del sueño. Así pues, un aumento de la sesión de sueño ininterrumpida más largo (SSIL, también conocida como sesión de sueño más larga) asociado con un tratamiento puede indicar la eficacia del tratamiento en el aumento de la continuidad del sueño y, por tanto, en el tratamiento del insomnio de mantenimiento del sueño.

25 Se monitorizan el sueño–vigilia, la actividad locomotora y la temperatura corporal en ratas Wistar macho tratadas con un compuesto de prueba (i.e., análogo de loxapina) inicialmente a una concentración de 10 mg/kg. Se analizan dosis más altas y más bajas de los compuestos seleccionados (p.ej., tan altas como 45 mg/kg y tan bajas como sea necesario para establecer una dosis sin efecto). Los tratamientos se administran a la HC 18, el máximo del periodo dominando por actividad (6 horas después de apagarse la luz) y provoca efectos soporíferos (inductores del sueño) caracterizados por un aumento del tiempo de sueño no MOR, un aumento de la continuidad del sueño, pero sin pruebas de inhibición del sueño MOR ni de insomnio de rebote.

30 Se monitorizaron el sueño–vigilia, la actividad locomotora y la temperatura corporal *in vivo* con compuesto. Se anestesiaron ratas Wistar macho adultas (250 g en el momento de la cirugía, Charles River Laboratories, Wilmington MA) (isoflourano al 2% en oxígeno de calidad médica) y se prepararon quirúrgicamente con un implante craneal para permitir el registro de electroencefalograma (EEG) crónico y electromiograma (EMG). Se monitorizaron la temperatura corporal y la actividad locomotora mediante un transmisor en miniatura (Mini–Mitter, Bend, OR) colocado mediante intervención quirúrgica en el abdomen. El implante craneal consistía en tornillos de acero inoxidable (dos frontales (+3,2 AP de bregma, ± 2,0 ml) y dos occipitales (–6,9 AP, ± 5,5 ml)) para el registro mediante EEG. Se colocaron dos cables de acero inoxidable revestidos con Teflon® bajo los músculos de trapecio en la nuca para un registro mediante EMG. Se soldaron todos los extremos a un conector en miniatura antes de la cirugía y se esterilizaron con gas de óxido de etileno. Se fijó al cráneo el ensamblaje del implante con un acrílico dental. Se dejó un mínimo de tres semanas para la recuperación quirúrgica.

40 Cada rata permaneció en su jaula de registro individual ubicada en compartimentos separados ventilados de armarios de acero inoxidable con el diseño habitual. Se incorporaron en cada jaula un elevador superior del filtro y un conmutador giratorio de bajo par de torsión. Se les administró alimento y agua a voluntad. Durante el estudio, se mantuvo un ciclo de luz–oscuridad de 24 h (12 horas de luz, 12 horas de oscuridad). No se molestó a los animales durante al menos 48 horas antes y después de los tratamientos.

45 Se determinaron el sueño y la vigilia usando “SCORE–2000™” (Hypnion, Worcester, MA), un sistema de monitorización fisiológica y de sueño–vigilia basado en Internet. El sistema monitorizó EEG amplificado (filtro pasabanda de 1–30 Hz), EMG integrado (filtro pasabanda de 10–100 Hz), temperatura corporal y actividad locomotora inespecífica (ALM) mediante telemetría, y la actividad de ingestión de líquidos de manera continua y simultánea. Se clasificaron on–line Los estados de despertar como sueño no MOR (NMOR), sueño MOR, despertar o despertar dominado por el rango theta cada 10 segundos. Se cuantificaron y registraron cada minuto la ingesta total de líquidos, la actividad locomotora y la temperatura corporal, usando algoritmos de correspondencia con patrones y de extracción de características de EEG. A partir de estos datos, se obtuvo la sesión de sueño ininterrumpida más larga (SSIL). El algoritmo de clasificación usó plantillas del estado de despertar de EEG mostradas individualmente más criterios de EMG para diferenciar el sueño MOR del estado de vigilia dominado por el rango theta, más las reglas contextuales dependientes del comportamiento (p.ej., si el animal estaba bebiendo, estaba despierto). Se registró la ingesta de líquidos y la intensidad de la actividad locomotora (ALM) cada 10 segundos, mientras se registraba la temperatura corporal cada minuto. La actividad locomotora se detectó mediante un receptor telemétrico (Mini–Mitter) situado bajo la

jaula. Las medidas de telemetría (ALM y temperatura corporal) no formaban parte del algoritmo de puntuación; así pues, la puntuación del sueño y los datos telemétricos eran medidas independientes.

- 5 El Compuesto 1 se administró a la HC 18, el punto máximo del periodo dominado por la actividad, dejándose tiempo suficiente para observar cómo transcurría en el tiempo el efecto del tratamiento antes de encender la luz (6 horas después del tratamiento). Se suspendió el Compuesto 1 en metilcelulosa al 0,25% o al 0,5% estéril (1–2 ml/kg). Los tratamientos se administraron oralmente en forma de un bolo.

Se empleó un diseño de estudio de grupos en paralelo. Los vehículos control se extrajeron de una mezcla de gran tamaño (N> 200): se seleccionó un subconjunto de los vehículos control mezclados en base a la coincidencia informatizada con el valor de referencia de 24 h antes del tratamiento del grupo de tratamiento activo.

- 10 Se midieron los resultados de los parámetros de NMOR y SSIL para el Compuesto 1. En la Tabla 6, se muestran los resultados representativos.

**Tabla 6: Propiedades\* inductoras del sueño de los compuestos**

N.º	Dosis	NMOR	SSIL
1	1		6,0 ± 2,3
	3	39 ± 6	18,8 ± 3,0
	10		19,7 ± 6,7
* la dosis está en mg/kg; NMOR y SSIL están en minutos.			

### Ejemplo 3: Efectos secundarios del rastreo de Irwin

- 15 El rastreo de Irwin puede proporcionar información útil sobre los posibles efectos secundarios de los compuestos en las funciones fisiológicas y conductuales generales. El rastreo se realiza mediante la administración de los compuestos de prueba oralmente en metilcelulosa acuosa al 0,25% usando ratas Wistar macho, una especie usada frecuentemente en tales estudios y para la que hay disponibles datos de referencia.

- 20 El rastreo de Irwin analiza numerosos parámetros en animales que han recibido el compuesto de prueba. Por ejemplo, el rastreo puede incluir: efectos en la jaula, p.ej., dispersión, velocidad respiratoria, actividad locomotora, inquietud, agresividad, actitud de alerta, apatía y exoftalmia; efectos en el ruedo, p.ej., despertar de transferencia, locomoción espacial, ptosis, sobresalto, elevación de la cola, piloerección, escape al tacto, pasividad posicional, catalepsia, reflejo de apretar fuerte, posicionamiento visual, fuerza de sujeción, pabellón auditivo, córnea, respuesta al dolor y manipulación de cables; los parámetros observados durante el tratamiento, p.ej., cianosis, riego sanguíneo cutáneo, hipotermia, tono corporal, tamaño de las pupilas, respuesta de las pupilas a la luz, lacrimo, hábitos de limpieza, enrojecimiento, salivación y provocación de mordiscos; puntuaciones generales, p.ej., temor, irritabilidad, modo de andar anormal, postura corporal anormal, temblores, tics, convulsiones, comportamiento extraño, torsión, vocalización, diarrea, número de deposiciones, número de micciones, estado moribundo, letalidad y anomalías detectadas. En Irwin, S; "Comprehensive observational assessment: I a. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioural and physiological state of the mouse". *Psychopharmacologia* (Berl.) 13: 222–257, 1968, cuyas enseñanzas se encuentran incorporadas en la presente memoria por referencia en su totalidad, se puede encontrar más información al respecto.

- 35 El rastreo de Irwin de los agentes inductores del sueño revelados es realizado por Covance (Princeton, NJ) según Irwin anterior; Procedimiento Operativo Estándar de Covance (revisión actual de SOP PHARM 8.10); Guía del ICH (Comité Internacional de Armonización) de directrices de los organismos reguladores competentes (Tema S7A; CPMP/ICH/539/00) sobre estudios de seguridad farmacológica para compuestos farmacéuticos en seres humanos (noviembre de 2000); y todos los procedimientos llevados a cabo en animales vivos atienden a lo dispuesto en la legislación británica, en particular, a la Ley de (procedimientos científicos con) animales de 1986, que obliga a todos los laboratorios del RU a mantener un procedimiento de revisión ético a nivel local que garantice un uso respetuoso y justificado de todos los animales en las instalaciones; que se tome debida cuenta de todas las posibilidades de reducción, mejora o sustitución, y de que se cumplan los altos estándares de alojamiento y cuidados.

- 45 Todos los compuestos químicos se adquirieron en Colorcon, Ltd, Dartford Kent, RU, a no ser que se indique lo contrario y son de una pureza de calidad de reactivo ACS o superior. Todas las formulaciones de los compuestos de prueba son preparadas el día de la dosificación por parte de la farmacia de Covance Harrogate. Los compuestos de prueba se formulan en metilcelulosa acuosa al 0,25% a la concentración más alta requerida. Las dosis inferiores se obtienen por dilución en serie de la concentración más alta, usando metilcelulosa acuosa al 0,25%. Los niveles de dosis se expresan en términos de cantidad del compuesto de prueba administrada con independencia de la pureza o del contenido activo. Todas las formulaciones se almacenan a temperatura ambiente (normalmente, de 10 a 30°C) en recipientes cerrados herméticamente y se protegen de la luz.

- 50 Se obtiene un número adecuado de ratas Wistar (Cri:WI(Glx/BRL/Han) BR:WH) macho de Charles River Ltd. (Margate, Kent, Reino Unido). Las ratas tienen aproximadamente 5 semanas de vida y pesan entre 150 y 170 g al

llegar. Los animales se introducen en grupos de no más de seis individuos en jaulas de polipropileno (33 x 15 x 13 cm) o (45 x 28 x 20 cm) con suelos macizos y laminillas de madera de calidad 10 (Datesand Ltd., Cheshire, Reino Unido) como lechos. Las jaulas se limpian y secan antes de su uso. Se colocan bloques masticables Aspen en las jaulas como forma de enriquecimiento ambiental. Habitualmente, las salas de confinamiento se mantienen entre unos límites aceptables de temperatura y humedad relativa (nominalmente 19 a 25°C y del 40% al 70%, respectivamente). Estas salas están iluminadas con luz fluorescente durante 12 de las 24 horas del ciclo y están diseñadas para recibir al menos 15 cambios de aire puro a la hora. Se proporcionan a voluntad (excepto durante el tratamiento) dieta (RM1 (E).SQC. (Special Diets Services Ltd. Witham, Reino Unido) y agua del grifo principal. Se analizan periódicamente sus constituyentes específicos y no se encuentra que contengan ninguna entidad biológica ni química que pueda interferir en el sistema de análisis. Al llegar, se examina el estado de salud de todos los animales. El periodo de aclimatación de los animales es de al menos 5 días. Durante este tiempo, los animales se identifican sus etiquetas de jaula. El veterinario realiza un examen antes de iniciar cualquier procedimiento experimental para garantizar su idoneidad para el estudio. Antes de comenzar el estudio, los animales se distribuyen aleatoriamente en grupos de tratamiento y se marcan individualmente en la cola a medida que van viniendo a la mano. Al final del estudio, los animales son sometidos a una eutanasia.

Cada animal recibe una sola administración oral de vehículo o artículo de prueba, usando una dosis constante de 1 mg/kg. Las dosis individuales se basan en los pesos corporales individuales obtenidos el día de la dosificación.

Se analizan sistemáticamente los parámetros de rastreo de Irwin anteriores según los controles pertinentes. En general, se registran los cambios inducidos por el fármaco, ausentes en los animales normales, usando números enteros crecientes, en los que 0 equivale a normal (pudiéndose usar también +/- = presente/ausente). Los parámetros presentes en los animales normales se puntúan usando un número entero que permita el registro de los aumentos y las disminuciones. Las observaciones detalladas se realizan a los 30, 60, 90, 180 y 300 minutos posteriores a la dosis. Los animales se mantienen durante un periodo de 7 días después de la dosis, tiempo durante el cual se observan diariamente en busca de signos brutos de toxicidad y mortalidad.

#### 25 Ejemplo 4: Efectos secundarios sobre hERG de los agentes revelados

El canal del potasio cardiaco, hERG, es responsable de la corriente rectificadora retardada rápida (I<sub>Kr</sub>) producida en los ventrículos de los seres humanos. Se ha elegido este canal para su evaluación, porque la inhibición de I<sub>Kr</sub> es la causa más común de posible prolongación de la acción cardiaca no deseable mediante fármacos no cardiacos. El aumento de la posible duración de la acción provoca la prolongación del intervalo QT, que se ha asociado con una peligrosa arritmia ventricular, la torsión de las puntas (Brown, AM; Rampe, D. (2000). "Drug-induced long QT syndrome: is hERG the root of all evil?"; y *Pharmaceutical News* 7, 15–20; Rampe, D; Roy, ML; Dennis, A; Brown, AM. (1997), la totalidad de cuyas enseñanzas se incorpora en la presente memoria por referencia). Se expresaron los canales de hERG en una línea celular de riñón embrionario humano (HEK293) que carecía de I<sub>Kr</sub> endógeno. Se prefiere la expresión en una línea celular de mamífero a la expresión transitoria en *Xenopus oocytes*, pues éste demuestra una sensibilidad constante de 10–100 veces inferior hacia los bloqueadores del canal hERG. Véase, por ejemplo: "A mechanism for the pro-arrhythmic effects of cisapride (Propulsid): high affinity blockade of the human cardiac potassium channel hERG". *FEBS Lett.* 417, 28–32; Weirich, J; Antoni, H. (1998); "Rate-dependence of anti-arrhythmic and pro-arrhythmic properties of class I and class III anti-arrhythmic drugs". *Basic Res Cardiol* 93 Supl 1, 125–132; y Yap, YG; Camm, AJ. (1999); y "Arrhythmogenic mechanisms of non-sedating antihistamines". *Clin. Exp. Allergy* 29 Supl 3, 174–181. Todas las enseñanzas de los artículos anteriores se incorporan en la presente memoria por referencia.

Se determinaron los efectos *in vitro* de los agentes inductores del sueño revelados sobre la corriente del canal hERG (gen relacionado con éter-a-go-go humano) (I<sub>Kr</sub>, la corriente de potasio cardiaco rectificadora retardada rápidamente activadora) mediante la prueba de Chan (Cheveland, OH) según los procedimientos operativos estándar de la prueba de Chan.

Todos los compuestos químicos usados se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO) a no ser que se indique lo contrario y fueron de una pureza de grado de reactivo ACS o superior. Las soluciones madre de los artículos de prueba y la terfernadina (control positivo) se prepararon usando dimetilsulfóxido (DMSO) y se almacenaron en un congelador. Las concentraciones del artículo de prueba y del control positivo se prepararon diluyendo las soluciones madre en una solución salina fisiológica tamponada con HEPES (ácido *N*-[2-hidroxi-etil]piperazin-*N*-[2-etanosulfónico]) (composición en mM): NaCl, 137; KCl, 4,0; CaCl<sub>2</sub>, 1,8; MgCl<sub>2</sub>, 1; HEPES, 10; Glucosa, 10; pH ajustado a 7,4 con NaOH (preparada semanalmente y refrigerada antes de su uso). Como los resultados previos han demostrado que el DMSO al 0,3% no afecta a la corriente del canal, todas las soluciones de prueba y control contendrán DMSO al 0,1%. Si la concentración de DMSO final debe ser mayor del 0,3%, para alcanzar una concentración del artículo de prueba especificada, se realizó una prueba separada con vehículo control con *n* > 2 a la concentración de DMSO final más alta. Las soluciones de prueba y control se prepararon diariamente a partir de soluciones madre.

Las células usadas eran células de riñón epiteliales embrionarias humanas (HEK293; cepa de origen, Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA; subcepa, ChanTest, Cleveland, OH) transformadas con ADN de adenovirus 5 y transfectadas con ADNc de hERG. Se seleccionaron transfectantes estables mediante la coexpresión con el gen de resistencia a G418 incorporado en el plásmido de expresión. La presión de selección se mantuvo

incluyendo G418 en el medio de cultivo. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco/mezcla de nutrientes F-12 (D-MEM/F-12) complementada con suero bovino fetal al 10%, 100 U/ml de sodio de penicilina G, 100 µg/ml de sulfato de estreptomina y 500 µg/ml de G418.

5 La adquisición y el análisis de los datos se realizaron usando un paquete de programas pCLAMP (Axon Instruments, CA). El estado estable fue un incremento constante restrictivo con el tiempo (dependencia lineal en el tiempo) antes y después de la aplicación del artículo de prueba. Se usó la disminución de la amplitud de la corriente tras alcanzar el estado estable para calcular el porcentaje de bloqueo con respecto al control.

10 Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (18°C–24°C). Cada célula actuó como su propio control. Se aplicó una concentración (10 µM) de cada artículo de prueba a las células que expresaban hERG ( $n > 3$ , siendo  $n$  = el número de células). Se limitó la duración de la exposición a cada concentración al tiempo necesario para alcanzar el bloque del estado estable, pero no a más de 10 minutos. Se aplicó una concentración del artículo de control positivo (terfenadina 60 nM) a dos células ( $n > 2$ ). Se transfirieron las células a la cámara de registro y se superfusionaron con solución de HB-PS. La solución en pipeta para los registros de células enteras fueron (composición en mM): aspartato de potasio, 130; MgCl<sub>2</sub>, 5; EGTA (tetraacetato de etilenglicol), 5; ATP (trifosfato de adenosina), 4; HEPES, 10; pH ajustado hasta 7,2 con KOH. La solución en pipeta se preparó en lotes, se tomaron alícuotas, se almacenaron en congelador y se descongeló un alícuota fresca cada día. Se hicieron pipetas de *patch* con tubos capilares de vidrio usando un extractor de micropipetas P-97 (Sutter Instruments, CA). Se usó un amplificador de *patch clamp* comercial para los registros de las células enteras. Antes de la digitalización, se pasaron los registros de las corrientes por filtros de paso bajo a un quinto de la frecuencia de muestreo.

20 Se midieron el bloqueo inicial y en estado estable de la corriente de hERG debidos al artículo de prueba usando un patrón de pulsos con amplitudes fijas (despolarización: +20 mV durante 2 s; repolarización: -50 mV durante 2 s) repetido a intervalos de 10 s, a partir de un potencial de sujeción de -80 mV. Se midió la corriente máxima de cola durante la etapa de 2 segundos hasta -50 mV. Se mantuvo un estado estable durante al menos 30 segundos antes de aplicar el artículo de prueba o el control positivo. Las corrientes máximas de cola se midieron hasta que se alcanzó un nuevo estado estable.

25 La Tabla 7 muestra el % de bloqueo del canal hERG a las concentraciones indicadas para diversos agentes inductores del sueño revelados. Comúnmente, los valores del aproximadamente 10% o inferiores se consideran deseables, los valores del aproximadamente 12% al aproximadamente 30% pueden ser aceptables si el compuesto tiene un buen comportamiento inductor del sueño y no produce otros efectos secundarios; y los valores mayores del aproximadamente 30% se consideran no deseables.

**Tabla 7: Bloqueo del hERG**

Compuesto	hERG a 10 micromolar	Compuesto	hERG a 10 micromolar
1	6,2%	30	4,50%

### Ejemplo 5: Especificidad por los receptores de la histamina H1

35 Los ensayos de unión se realizaron usando el compuesto 1 agente inductor del sueño revelado en ensayos de unión competitiva con patrones conocidos para el receptor de la histamina H1 y los receptores muscarínicos M1, M2 y M3, receptores alfa 1 y alfa 2, y los receptores D1 y D2.

40 Los análisis de la histamina H1 se describen en Chang, *et al.*, "Heterogeneity of Histamine H1-Receptors: Species Variation in [3H]Mepyramine Binding of Brain Membranes". *Journal of Neurochemistry*. 32: 1653–1663 (1979); Martínez-Mir, M.I., Pollard, H., Moreau, J., *et al.* "Three Histamine Receptors (H1, H2, and H3) Visualized in the Brain of Human and Non-Human Primates". *Brain Res*. 526: 322–327 (1990); Haaksma, E.E.J., Leurs, R. y Timmerman, H. "Histamine Receptors: Subclasses and Specific Ligands". *Pharmac. Ther.* 47: 73–104 (1990). Los análisis muscarínicos se describen en Buckley, N. J., Bonner, T. I., Buckley, C.M., y Brann, M.R. "Antagonist Binding Properties of Five Cloned Muscarinic Receptors Expressed in CHO-K1 Cells". *Mol. Pharmacol.* 35: 469–476 (1989). Los análisis se realizaron conforme a los artículos anteriores con las siguientes modificaciones. Los reactivos químicos que se utilizan en lo que se describe a continuación se obtuvieron en Sigma, St. Louis, MO.

45 Para los análisis de la histamina H1, los receptores se obtuvieron a partir de tejido de membrana cerebelar bovina con un B<sub>max</sub> (número receptores) de 6,2 femtomol/mg de tejido (peso húmedo) y una K<sub>D</sub> (afinidad de unión) de 1,3 nM. Se empleó un radioligando ([<sup>3</sup>H]pirilamina (15–25) Ci/mmol), K<sub>i</sub> 1,9 nM, concentración final de 2,0 nM, y 10 µM de triprolidina (K<sub>i</sub> 3,3 nM) como determinante inespecífico, compuesto de referencia y control positivo. Se combinaron el receptor y el ligando radiactivo con el compuesto de prueba a un intervalo de concentraciones de compuesto de prueba de aproximadamente 10<sup>-10</sup> a aproximadamente 10<sup>-7</sup> M, y se incubó la muestra en Na-KPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,5) a 25°C durante 60 minutos. La reacción se terminó con una filtración rápida al vacío sobre filtros de fibra de vidrio. Se determinó la radiactividad del ligando radiactivo desplazado atrapado sobre los filtros y se comparó con los valores control para medir cualquier interacción del compuesto de prueba con el sitio de unión a la histamina H1.

55 Para los ensayos muscarínicos, los receptores se obtuvieron de receptores recombinantes humanos expresados en células CHO (PerkinElmer, Inc., Wellesley, MA). El ligando radiactivo empleado fue [<sup>3</sup>H]-escopolamina, cloruro de

N-metilo (80–100 Ci/mmol). Se empleó bromuro de (–)-metilescopolamina (1,0µM) como determinante inespecífico, compuesto de referencia y control positivo. Tras la incubación, se terminaron las reacciones con una filtración rápida al vacío sobre filtros de fibra de vidrio. Se determinó la radiactividad del ligando radiactivo desplazado atrapado sobre los filtros y se comparó con los valores control para medir cualquier interacción del compuesto de prueba con el respectivo receptor.

Para el ensayo con el receptor M1, el B<sub>max</sub> (número de receptores) fue de 4,2 picomol/mg de proteína y la K<sub>D</sub> (afinidad de unión) del receptor fue de 0,05nM. El ligando radiactivo se empleó a una concentración final de 0,5nM, mientras que el bromuro de (–)-metilescopolamina tenía una K<sub>i</sub> de 0,09nM. Se combinaron el receptor y el ligando radiactivo con el compuesto de prueba a un intervalo de concentraciones del compuesto de prueba de aproximadamente 10<sup>-12</sup> a aproximadamente 10<sup>-6</sup>M, se incubaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco durante 60 minutos a 25°C y se procesaron según lo descrito anteriormente.

Para el ensayo con el receptor M2, el C<sub>max</sub> (número de receptores) fue de 2,1 picomol/mg de proteína y la K<sub>D</sub> (afinidad de unión) del receptor fue de 0,29nM. El ligando radiactivo se empleó a una concentración final de 0,5nM, mientras que el bromuro de (–)-metilescopolamina tenía una K<sub>i</sub> de 0,3nM. Se combinaron el receptor y el ligando radiactivo con el compuesto de prueba a un intervalo de concentraciones del compuesto de prueba de aproximadamente 10<sup>-12</sup> a aproximadamente 10<sup>-6</sup>M, se incubaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco durante 60 minutos a 25°C y se procesaron según lo descrito anteriormente.

Para el ensayo con el receptor M3, el B<sub>max</sub> (número de receptores) fue de 4,0 picomol/mg de proteína y la K<sub>D</sub> (afinidad de unión) del receptor fue de 0,14nM. El ligando radiactivo se empleó a una concentración final de 0,2nM, mientras que el bromuro de (–)-metilescopolamina tenía una K<sub>i</sub> de 0,3nM. Se combinaron el receptor y el ligando radiactivo con el compuesto de prueba a un intervalo de concentraciones de compuesto de prueba de aproximadamente 10<sup>-12</sup> a aproximadamente 10<sup>-6</sup>M, se incubaron en Tris-HCl 50mM (pH 7,4) que contenía MgCl<sub>2</sub> 10mM, EDTA 1mM durante 60 minutos a 25°C, y se procesaron según lo descrito anteriormente.

El ensayo de unión a A<sub>1</sub> purinérgico, adenosina, se realizó según los procedimientos publicados. Véase, p.ej., Bruns, *et al.*, *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.*, 335(1): 59–63 (1987), con modificaciones mínimas; y Ferlany, *et al. Drug Dev. Res.* 9: 85–93 (1986).

El ensayo de unión a A<sub>2</sub> purinérgico, adenosina, se realizó según los procedimientos publicados. Véase, p.ej., Jarvis, *et al.*, *J. Phannacol. Exper. Ther.* 251(3): 888–93 (1989) con modificaciones; y Bruns, *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 29(4): 331–46 (1986) con modificaciones.

El ensayo de unión a D<sub>1</sub> (humana recombinante), dopamina, se realizó según procedimientos publicados. Véase, p.ej.: Jarvie, *et al. J. Recept Res.*, 13(1–4): 573–90 (1993); y Billard, *et al. Life Sciences*, 35(18): 1885–93 (1984), con modificaciones.

El ensayo de unión a D<sub>1</sub> (humana recombinante), dopamina, se realizó según procedimientos publicados. Véase, p.ej.: Jarvie, *et al. J. Recept Res.*, 13(1–4): 573–90 (1993); y Gundlach, *et al. Life Sciences*, 35(19): 1981–8 (1984), con modificaciones.

La unión a H1 puede indicar la actividad inductora del sueño deseada del compuesto. La unión a los receptores muscarínicos muestra una unión inespecífica y puede indicar actividad anticolinérgica que puede resultar en efectos secundarios no deseados, p. ej., los efectos secundarios de muchas antihistaminas conocidas, p.ej., visión borrosa, sequedad de boca, estreñimiento, problemas urinarios, mareo, ansiedad y similares. Una disminución de la unión de los compuestos con los receptores M1–M3 en comparación con la unión del compuesto con el receptor H1 indica una mayor especificidad del compuesto por el receptor de histamina frente al receptor muscarínico. Además, un fármaco con una mayor especificidad por el receptor de histamina poseería menos efectos secundarios anticolinérgicos.

La Tabla 8 muestra la constante de inhibición K<sub>i</sub> en nM para H1 y los receptores muscarínicos. Se puede observar que el compuesto revelado es muy específico de H1 frente a los receptores muscarínicos. Así pues, cabe esperar que el compuesto revelado presente una buena actividad inductora del sueño con efectos secundarios limitados asociados con la inhibición del receptor muscarínico.

**Tabla 8: Especificidad por los receptores de la histamina H1**

N.º de comp.	H1 (bovina)	M1	M2	M3	Alfa 1	Alfa 2	D1	D2
1	40,3 <sup>1</sup>	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000	>10.000 rata y ser humano	>10.000 rata y ser humano
<sup>1</sup> 11,5 en rata, 23,7 en ser humano								

**Ejemplo 6: Evaluación de los análogos de loxapina**

Se calculan los siguientes parámetros farmacocinéticos a partir de las concentraciones en plasma individuales del compuesto antihistamínico modificado usando un enfoque sin compartimentos y un programa informático farmacocinético validado apropiado (p.ej., WinNonlin Profesional). Los valores de concentración publicados como BLQ se fijan en cero. Si hay datos de concentración disponibles, si es posible, se realizan cálculos intermedios (datos no QC.d) entre los periodos. El aumento de la dosis no depende de los cálculos farmacocinéticos.

Para cada parámetro farmacocinético por grupo de dosis, se calculan los datos estadísticos descriptivos, incluyendo la media, la desviación estándar, el coeficiente de variación, la media geométrica, la mediana, el mínimo y el máximo. Para cada nivel de dosis, se proporcionan los datos estadísticos descriptivos para ABC(0-t), ABC(0-inf) y Cmax transformados por logaritmos naturales. Además, se proporcionan la concentración media y mediana frente a las gráficas de tiempo.

Se examina la proporcionalidad de la dosis tras la medicación de estudio mediante el análisis de las variables farmacocinéticas ABC(0-t), ABC(0-inf) y Cmax transformadas por logaritmos naturales con un modelo lineal que incluye la dosis transformada por logaritmos naturales a medida que covaría. Se concluye que existe proporcionalidad de la dosis si el intervalo de confianza del 95% para la pendiente de la covariante incluye el valor 1. También se examina la linealidad de la dosis para ABC(O-t), ABC(O-inf) y Cmax mediante un modelo lineal. Véase, p.ej.: Gibaldi y Perrier, *Pharmacokinetics*, II Ed., Marcel Dekker: Nueva York, Nueva York (1982). En los cálculos, se usaron tiempos de recogida de muestras nominales, a excepción de cuando los tiempos de muestreo reales no estaban incluidos en los intervalos de tiempo aceptables especificados por protocolo. Se estimaron los siguientes parámetros:

- 20 C<sub>max</sub> Concentración máxima en plasma
- T<sub>max</sub> Tiempo hasta alcanzarse la concentración máxima
- C<sub>max</sub> y T<sub>max</sub> se presentaron directamente a partir de los datos de concentración-tiempo.
- ABC<sub>0-t</sub> Superficie bajo la curva de concentración en plasma-tiempo desde la hora 9 hasta el último punto temporal con concentraciones medibles, estimada mediante la ley del trapecio lineal.
- 25 ABC<sub>0-∞</sub> Superficie bajo la curva de concentración en plasma-tiempo extrapolada al infinito, calculada usando la siguiente fórmula

$$ABC_{0-\infty} = ABC_{0-t} + C_t/\lambda_z$$

En la que C<sub>t</sub> es la última concentración medible en plasma y λ<sub>z</sub> es la constante de velocidad de eliminación de fase terminal estimada usando una regresión log-lineal durante la fase de eliminación terminal. El número de puntos usados en el cálculo de λ<sub>z</sub> se determinó mediante la inspección ocular de los datos que describen la fase terminal. Se usaron al menos los tres últimos puntos temporales con valores medibles en el cálculo de λ<sub>z</sub>. El número de puntos usados en el cálculo de λ<sub>z</sub> se basa en la mejor correlación (ajustada con respecto a r<sub>2</sub>) obtenida para los puntos temporales que describen la fase de eliminación terminal. Se considera que un valor ajustado con respecto a r<sub>2</sub> para la línea de regresión define con exactitud la fase de eliminación terminal si el valor es > 0,7.

- T<sub>1/2</sub> Semivida de eliminación determinada por ln(2) λ<sub>z</sub>.
- CL Aclaramiento sistémico; para inyección en embolada o infusión intravenosas, calculado usando la fórmula:

$$CL = Dosis/ABC_{0-\infty}$$

Se da como CL/F, en el que F = biodisponibilidad absoluta para la totalidad del resto de vías de administración.

- V<sub>2</sub> Volumen de distribución para todas las vías de administración calculado usando la siguiente fórmula:

$$V_z = CL/\lambda_z$$

Se usa CL/F para calcular V<sub>2</sub>/F para las vías de administración extravasculares.

El análisis farmacocinético se realiza usando la edición profesional del programa WinNonlin (Pharsight Corporation, Versión 3.3 o 4.1). Los datos estadísticos descriptivos tales como la media y la desviación estándar se calculan en Microsoft Excel (versión 8.0e).

Se analizó el metabolismo de los artículos de prueba en hepatocitos crioconservados de mono y de ser humano de la siguiente manera:

**MATERIALES**

<b>Materiales:</b>	<b>Fabricante, número de lote y fecha de caducidad</b>	
Hepatocitos de Cellzdirect	Mono	
	Ser humano	
Medio E de Williams	Sigma W1878, caducidad: 11-2004	
Suero bovino fetal	Fisher BW 14-501F, lote 01104637, caducidad 17 de febrero de 2010.	
Azul de tripano 0,45	Biowhittaker 17-942E, lote 01104637, caducidad 14 de enero.	
Solución madre del material de prueba	CB-1/III/6	
DMSO	Fisher BP231-100, lote 041215, caducidad 12 de julio de 2009	
Etoxicumarina 10mM en metanol	PSLB 22-A-15, caducidad 25-09-04	
ACN	Fisher A998-4, lote 041181, caducidad 07/6	
Ácido fórmico	Fisher 032879, caducidad 14-03-06	

**5 Preparación previa a la incubación:**

Se diluye la muestra con DMSO para preparar soluciones madre 100µM y 10µM. Se prepara ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo mediante la adición de 1 ml de ácido fórmico por cada litro de acetonitrilo (se almacena a T.A. durante 3 meses). Se preparan placas de 96 pocillos de enfriamiento súbito a los 10 minutos, 60 y 120 minutos con 150 µl de acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1% en cada pocillo. Se almacenan en hielo o se refrigeran.

- 10 A continuación, se descongelan los hepatocitos y se colocan 100 µl de suspensión celular en un tubo de microcentrifugación con 100 µl de solución azul tripano al 0,4% y se agita suavemente mediante inversión. Se coloca una pequeña cantidad de suspensión celular teñida (aproximadamente 15 µl) en un hemacitómetro limpio con una tapa. Se coloca el hemacitómetro sobre a platina del microscopio, y se ajustan el enfoque y la potencia hasta que un solo cuadrado de recuento llena el campo. Se cuenta el número de células en los cuatro cuadrados subdivididos en esquinas exteriores del hemacitómetro. Las células viables son opalescentes, redondas y pálidas con un contorno más oscuro. Las células no viables son oscuras y de un color azul opaco.
- 15

Se calcula el % de viabilidad como el número de células viables dividido entre el total de células x 100.

Se calcula la densidad de las células viables y el número total de las células viables:

$$\text{Densidad de las células viables (D)} = \text{Media de 3 recuentos de células viables (C)} \times 10^{4 \times t^2};$$

20 
$$\text{Número total de células viables (E)} = D \times 26 \text{ (volumen de resuspensión).}$$

Se calculó el medio adicional necesario para alcanzar una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml:

$$\text{Volumen de medio adicional} = \frac{\text{células viables totales (E)}}{1 \times 10^6} - 26 \text{ ml}$$

Las células se diluyen de esa manera y se almacenan a la temperatura ambiente.

**25 Incubaciones**

Se transfieren 198 µl de hepatocitos a los pocillos pertinentes de una placa de dosificación. Se combina el resto de suspensión de hepatocitos, y se coloca en un recipiente adecuado de agua casi en ebullición y se deja durante 5 minutos para desactivar las células (para los controles desactivados y la preparación de la curva estándar).

- 30 Se transfieren 198 µl de hepatocitos desactivados a pocillos control y se transfieren 198 µl de medios vacíos a los pocillos control con tampón. Se preincuban las placas durante al menos 15 min. Las reacciones se inician con 2 µl de dilución apropiada de compuesto de prueba de la placa de dosificación. Se incuban las placas en una incubadora a 37°C durante aproximadamente 10 minutos, luego se retiran 50 µl de incubado a una placa de enfriamiento de 10 minutos que contienen 150 µl de acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1% y se almacenan con refrigeración o sobre hielo. Tras 60 minutos, se retiran 50 µl de incubado a una placa de enfriamiento súbito en 60 minutos que contiene 150 µl de acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1% y se almacena con refrigeración o sobre hielo. Tras 120 minutos, se retiran 50 µl de incubado a una placa de enfriamiento súbito en 120 minutos que contiene 150 µl de acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1% y se almacenan con refrigeración o sobre hielo. Se congelan los 50 µl restantes en placas de incubación. Entonces se
- 35

centrifugan los tubos a  $-4^{\circ}\text{C}$  a  $-1.400$  xg durante  $-10$  minutos. Se diluyen  $100\ \mu\text{l}$  de sobrenadante con  $100\ \mu\text{l}$  de agua en placas de análisis, se almacenan las placas con refrigeración a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes del análisis.

#### Preparación de las curvas estándar

5 Se prepara patrón  $0,1\ \mu\text{M}$  mediante la adición de  $2\ \mu\text{l}$  de soluciones de dosificación  $10\ \mu\text{M}$  a  $198\ \mu\text{l}$  de hepatocitos desactivados en una placa de preparación estándar. Se añaden  $150\ \mu\text{l}$  de acetonitrilo + ácido fórmico al  $0,1\%$  a la placa de enfriamiento súbito estándar. Se transfieren  $150\ \mu\text{l}$  del patrón  $0,1\ \mu\text{M}$  a una columna de una placa estándar. Se añaden  $75\ \mu\text{l}$  de hepatocitos desactivados a los pocillos restantes. Se transfieren  $75\ \mu\text{l}$  de patrón  $0,1\ \mu\text{M}$  al pocillo adyacente de la columna de la placa y se mezcla el pocillo mediante valoración. Se continúa con la dilución en serie. Se retiran  $75\ \mu\text{l}$  del patrón final (cuando los pocillos contienen  $75\ \mu\text{l}$ ). Se incuban las placas a aproximadamente  $37^{\circ}\text{C}$  durante  $10$  minutos. Se transfieren  $50\ \mu\text{l}$  a la placa de enfriamiento súbito estándar que contiene  $150\ \mu\text{l}$  de acetonitrilo + ácido fórmico al  $0,1\%$ . Se centrifugan las placas junto con muestras y se diluye el sobrenadante  $1:1$  con agua como se explica anteriormente. Se almacenan las muestras congeladas a  $\sim 20^{\circ}\text{C}$ .

#### Ejemplo 7: Evaluación clínica de los análogos de loxapina

15 El objetivo de un ensayo clínico con seres humanos consiste en recoger la información sobre los efectos de los derivados de loxapina. Tal información incluye, por ejemplo, signos y síntomas clínicos procedentes de un examen físico, hechos adversos, seguridad en laboratorio (p.ej., hematología, química clínica de sueros, análisis de orina), signos vitales (p.ej., presión sanguínea, frecuencia cardíaca, temperatura, velocidad respiratoria) y datos de electrocardiogramas (ECG).

Los ensayos clínicos se realizan de la siguiente manera:

##### 20 I. Elección del sujeto

Se usa un mínimo de  $18$  sujetos ( $2$  grupos inscritos de  $9$  sujetos cada uno). Formarán parte del estudio los candidatos que cumplan los siguientes criterios de inclusión:

- Sujetos varones adultos sanos con edades comprendidas entre  $18-45$  años.
- 25 • Sujetos con un peso de al menos  $60$  kg y que tienen una diferencia del  $15\%$  respecto de su peso ideal (véase la Tabla de pesos deseables de adultos de Metropolitan Life Insurance Company, 1983).
- Sujetos sanos con resultados del rastreo irrelevantes clínicamente (p.ej., perfiles de laboratorio, historiales médicos, ECG, examen físico).

No formarán parte del estudio los candidatos que cumplan uno los siguientes criterios de exclusión:

- 30 • Historial o presencia de enfermedad cardiovascular, pulmonar, hepática, renal, hematológica, gastrointestinal, endocrina, inmunológica, dermatológica, neurológica o psiquiátrica relevante.
- Historial o presencia de trastorno del sueño.
- Historial de alergias crónicas o estacionales que requieran un tratamiento con antagonistas del receptor H1 (i.e., terfenadina, astemizol) en los  $90$  días anteriores al estudio.
- Historial o presencia de alcoholismo o toxicomanía en los  $2$  últimos años.
- 35 • Consumo de tabaco o nicotina en los  $90$  días anteriores al estudio.
- Hipersensibilidad o reacción idiosincrática conocida hacia el fármaco de estudio, posibles excipientes de la formulación de estudio (Captisol®; sacarina de sodio, F.C.C.; glicerina, U.S.P.; aroma de naranja, metilcelulosa  $400$  cps, U.S.P.; agua purificada) o compuestos relacionados.
- 40 • Donación (cantidad de donación estándar o mayor) de sangre o de productos sanguíneos en los  $90$  días anteriores al estudio.
- Participación en otro ensayo clínico en los  $90$  días anteriores al estudio.
- Historial o presencia de cualquier enfermedad, afección médica o cirugía, que pueda tener un efecto sobre la absorción, el metabolismo, la distribución o la excreción del fármaco.
- Pérdida o ganancia de peso ( $\geq 10\%$ ) en los  $30$  días anteriores al estudio.
- 45 • Consumo regular de (p.ej., más días que sí consume de los que no consume) cantidades excesivas de bebidas que contienen cafeína (p.ej., más de  $5$  tazas de café o equivalente al día) en los  $30$  días anteriores al estudio.

- Cualquier afección que, en opinión del investigador o del patrocinador haga que el sujeto no sea adecuado para el estudio.
- Uso de cualquier medicación anterior o concomitante prohibida.

5 A cada uno de los sujetos que cumplimente las evaluaciones de selección del estudio, cumpla con todos los criterios de selección y sea aceptado para el estudio se le asigna un único número de identificación y recibe dosis designadas de antihistamina modificada o placebo según un esquema aleatorio. El esquema aleatorio sólo está al acceso del personal farmacéutico que prepara el fármaco (que no participa en la administración del fármaco) y no es accesible a los sujetos, analistas o miembros del personal responsable de la monitorización y evaluación de los hechos adversos.

El investigador principal puede expulsar a los sujetos del estudio por las siguientes razones:

- 10 • ocurrencia secundaria de un criterio de exclusión principal;
- para proteger su salud;
- hechos adversos;
- dificultades en la recogida de sangre;
- para proteger la integridad del estudio;
- 15 • por violación del protocolo; y
- por incumplimiento de las instrucciones del estudio.

20 El informe clínico incluye las razones de la expulsión del sujeto, así como los datos relativos a dicha expulsión. Los sujetos retirados del ensayo antes de la finalización del estudio pasarán todos los procedimientos programados para la finalización del estudio. El investigador o un médico supervisor evaluará a los sujetos retirados por cualquier hecho adverso (bien grave o no grave) o por valores de análisis de laboratorio anormales clínicamente relevantes, y serán tratados y/o sometidos a un seguimiento hasta que los síntomas o los valores vuelvan a los niveles normales o aceptables, según la opinión del investigador.

## II. Restricciones del estudio

25 Los sujetos no toman medicación que requiera o que no requiera receta médica (incluyendo productos de herbolario) durante los 7 días que precedan al estudio hasta que se haya recogido la última muestra del periodo de recogida de muestras farmacocinéticas final. Además, queda prohibido el consumo de alimentos y bebidas que contengan las siguientes sustancias como se indica:

- etilxantina: 72 horas antes de cada dosis y durante el periodo de recogida de muestras, i.e., se prohíben las bebidas de cafeína y equivalentes (p.ej., barras de chocolate).
- 30 • Alcohol: 72 horas antes de cada dosis y durante el periodo de recogida de muestras.

Se registran todas las medicaciones tomadas durante los 30 días antes del inicio del estudio. Se registra cualquier medicación tomada por alergias crónicas o estacionales en los 90 días anteriores al estudio.

35 **Selección del sujeto previo al estudio:** para el rastreo, se administra un formulario de consentimiento informado. En los 14 días anteriores a la dosificación, se registran el historial médico y los datos demográficos, incluyendo el nombre, el sexo, la edad, la raza, el peso corporal (kg), la altura (cm), el consumo de alcohol y de tabaco. Cada sujeto es sometido a una exploración física que incluye los signos vitales, ECG de 12 derivaciones y análisis de laboratorio según lo especificado. Los análisis de laboratorio incluyen lo siguiente:

- 40 a) La hematología, que incluye hemoglobina, MCV, recuento de glóbulos rojos, hematocritos, MCHC, recuento de glóbulos blancos con recuento diferencial de plaquetas y MCH;
- b) Química del suero, que incluye albúmina, ALT (SGOT), creatinina, fosfatasa alcalina, glucosa, bilirrubina total, creatina–fosfoquinasa (CPK), sodio, ácido úrico, AST (SGOT) y triglicéridos;
- c) Análisis de orina, que incluyen el aspecto y el color, glucosa, nitrito, pH, cetonas, urobilinógeno, gravedad específica, bilirrubina, leucocitos, proteína y sangre;
- 45 d) Otros análisis, que incluyen VIH, rastreo de drogas en orina, HbsAg, cannabinoides, VHC, benzodiazepinas, VHC, anfetaminas, hepatitis A (1gM), opiatos, alcohol, cocaína y continina.

**Tratamiento de los sujetos:** los sujetos se encierran al menos 36 horas antes de la dosificación hasta que finalizan los eventos de las 24 horas posteriores a la dosis. Regresarán para hacer una visita de seguimiento una semana después de la última dosis o tras la retirada temprana.

5 Los sujetos permanecen semirrecostados en la cama durante las 4 primeras horas posteriores a la administración del fármaco. Sin embargo, en caso de producirse hechos adversos en cualquier momento, los sujetos se colocan en una posición apropiada o se les permite tumbarse sobre su lado derecho. Los sujetos no realizan ninguna actividad física extenuante en ningún momento del periodo de confinamiento.

10 Se proporcionan comidas estándar el día 1 y el día 2. El día 1, los sujetos deben permanecer en ayunas durante un mínimo de 10 horas durante la noche antes de recibir la dosis y durante al menos las 4 horas posteriores. Sin embargo, si se emplea la opción de una dosis previa en el estado de alimentación en el periodo 3 del Grupo 2, se administra una comida rica en grasas estándar 30 minutos antes de la dosis. En este caso, el desayuno rico en grasas (i.e., aproximadamente el 50% de la calorías proceden de grasas) consiste en dos huevos fritos en mantequilla, dos tiras de bacon, dos tostadas con mantequilla, aprox. 120 g de patatas fritas y aprox. 235 ml de leche entera. Durante el confinamiento, están prohibidos los alimentos y las bebidas que contengan cafeína o equivalentes (p.ej., barras de chocolate).

15 No se permite beber agua desde las 2 horas anteriores hasta pasadas 2 horas de la dosis. Se permite beber agua el resto de las horas. Se proporcionan comidas estándar aproximadamente a las 4 y 9 horas después de la dosificación y en las horas posteriores apropiadas.

### *III. Administración del fármaco*

20 Los sujetos reciben la dosis de cada periodo según lo asignado según el programa aleatorio de secuencia de dosis para cada grupo de dosis (inscripción). Los sujetos reciben la dosis asignada en una taza dosificadora de vidrio y, dentro de cada grupo de dosis, se administran todas las dosis, activas y de placebo, al mismo volumen para mantener el doble ciego. Se indica a los sujetos que se traguen la dosis.

25 Se administra un total de 240 ml de agua con la dosis. Se añade una parte designada de agua (asignada por el farmacéutico en base al volumen de dosificación) a la taza dosificadora vaciada, se mueve para enjuagar y se traga. Se repite este procedimiento dos veces y luego el sujeto se bebe el resto de agua.

30 La dosis inicial para el primer nivel de dosis en seres humanos se basa en la toxicidad y los perfiles de seguridad de los estudios preclínicos. La conversión de la superficie corporal equivalente de ser humano en rata es de 1/6 ("Toxicological Handbook", Michael J. Dereleko, CRC press, Boca Raton, FL). En base a NOAEL de 30 mg/kg/día para rata y los criterios de equivalencia de superficie corporal, la dosis equivalente en un individuo de 60 kg es de 300 mg/día ( $1/6 \times 30 \text{ mg/kg/día [NOAEL en rata]} \times 60 \text{ kg}$ ). En base a la dosis de NOAEL en rata (30 mg/kg/día), la dosis de 3 mg es aproximadamente 1/10 de la dosis de NOAEL en ratas. La dosis más alta propuesta de 160 mg también está por debajo de NOAEL en ratas.

35 Si se observa una toxicidad limitadora de la dosis (grado 3 ó 4 según la escala de grados modificada según los criterios de toxicidad comunes de la WHO, Anexo I) en relación con la medicación de estudio en 2 cualquiera de los 6 sujetos a cualquier nivel de dosis, se detienen los aumentos de dosis y la dosis anterior se considera la máxima dosis tolerada (MDT).

40 Si un sujeto en cualquier nivel de dosis presenta una toxicidad limitadora de la dosis, el investigador principal (en conferencia con el patrocinador) decide, con un buen juicio clínico, si continuar hasta el siguiente nivel de dosis planificado o ajustar el siguiente nivel de dosis hacia abajo con respecto a la dosis planificada. Esta consulta se realiza para todos los grupos que van detrás del grupo de dosis previo para decidir si continuar con las dosis planificadas o reducir las dosis. Además, es posible sustituir las dosis planeadas con dosis intermedias si se observan evidentes problemas de seguridad o tolerabilidad (i.e., no tiene que haber un hecho de grado 3 ó 4) a partir de la dosis anterior que sugieran la necesidad de realizar los aumentos más lentamente.

45 Los incrementos de dosis sólo están permitidos si, en opinión del investigador principal, se ha demostrado una seguridad y tolerabilidad adecuadas en la dosis inferior previa. En todos los casos, el investigador principal se basa en un buen juicio clínico para decidir si ajustar la dosis o detener el estudio en base a la evaluación de todos los factores relevantes de seguridad de los sujetos.

50 El investigador principal revisa los datos de registro de entrada (p. ej., los antecedentes de la exploración física, los signos vitales, el cuestionario y los resultados clínicos de laboratorio (p.ej., la química del suero, hematología, análisis de orina y rastreo de drogas en orina)) en busca de cambios clínicamente relevantes desde el rastreo o el periodo anterior. El investigador principal determina si el sujeto recibirá la dosis o será retirado del estudio en base a esta revisión.

### *IV. Observación clínica*

Se realiza un panel de hematología, un panel de química del suero y un análisis de orina en el rastreo, en cada registro de entrada, 24 horas después de cada dosis y una semana después de la dosis final, o tras una retirada temprana. Se recogen muestras de sangre (de aproximadamente 7 ml) con un catéter intravenoso permanente que se vacían en tubos de vidrio que contienen una predosis de heparina de sodio y a las 0,25, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 18, y 24 horas posteriores a la dosis. Se recogen muestras de orina antes de la dosis y durante el intervalo de 0–8 horas de cada periodo. Las muestra recogidas durante el intervalo no se mezclan. Cada micción se considera una muestra. Las micciones se realizan a discreción, no están programadas (a excepción de la micción previa a la dosis y de la micción al final del intervalo de 8 horas).

Se miden los signos vitales durante los rastreos. Cuando el momento de los signos vitales sólo coincide con un ECG, los signos vitales se toman 10 minutos antes del ECG. Cuando el momento de los signos vitales coincide con una extracción de sangre o con una extracción de sangre y un ECG, los signos vitales se toman 10 minutos antes de la extracción de sangre. Se monitorizan la respiración y la temperatura en la recepción, a las 24 horas de cada dosis y una semana después de la dosis final o tras una retirada temprana. Las medidas individuales de presión sanguínea y frecuencia cardíaca se toman tras un mínimo de 5 minutos en una posición semirrecostada. Las medidas tomadas durante el confinamiento del estudio se monitorizan con una máquina AVS en la recepción; 0 (predosis); a las 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 horas después de la dosis; y una semana después de la dosis final o tras la retirada temprana. Para cualquier medida de la frecuencia cardíaca mayor de 100 pulsaciones por minuto, se volverá a comprobar la frecuencia cardíaca dos minutos después. El día 1, aproximadamente 24 horas antes de la dosificación, se toman 3 medidas de presión sanguínea y frecuencia cardíaca, con 2 minutos de diferencia, según lo descrito anteriormente.

Se realiza un ECG de 12 derivaciones estándar para cada sujeto sometido al rastreo el día 1 a las horas que coinciden con las horas del día 1 de 1 hora antes de la dosis y a las 1, 1,5, 2, 3, 4 y 6 horas después de la dosis; el día 1, 1 hora antes de la dosis y a las 1, 1,5, 2, 3, 4, 6 y 24 horas después de la dosis; y una semana después de la última dosis o tras la retirada temprana. Se pueden realizar más ECG en otros momentos si se considera necesario. Todos los ECG de 12 derivaciones estándar se registran durante 10 segundos. El momento de la realización y la técnica de registro de los ECG se normaliza para todos los sujetos. Los sujetos han de estar tumbados durante al menos 1 minuto antes de cada evaluación de ECG de 12 derivaciones. El investigador principal evalúa los intervalos PR, QRS, QT y QTc. Cuando el momento de los ECG coincide con una extracción de sangre, el ECG se tomará tras la extracción.

Un médico examina a cada sujeto del rastreo, al registrarse, a las 24 horas después de cada dosis y una semana después de la dosis final o tras la retirada temprana. Se pueden realizar más exámenes en otros momentos si se considera necesario.

Inmediatamente antes de la medición de los signos vitales 1 hora antes de la dosis y a las 1, 2, 6 y 24 horas posteriores a la dosis (los signos vitales se toman 10 minutos antes de la extracción de sangre en estos momentos), se presenta a los sujetos una escala visual análoga y se les pide que marquen en una línea vertical de 100 mm el punto que mejor describa su nivel de alerta en ese momento, entre muy somnoliento y en alerta/muy despierto.

Se informa a los sujetos de que comuniquen al médico o al personal del estudio cualquier hecho adverso o enfermedad sobrevenida experimentada durante el ensayo. Además, se realiza una encuesta específica relativa a los hechos adversos antes de la dosificación, a las 2, 4, 8 y 24 horas después de la dosis y una semana después de la última dosis, o tras una retirada temprana. Las preguntas se plantean de una manera inespecífica para no influir en la respuesta.

El investigador o un médico supervisor evalúa a cualquier sujeto que haya sufrido cualquier hecho adverso (bien grave o no grave) o del que se hayan obtenido valores de análisis de laboratorio anormales clínicamente relevantes, y se trata y/o somete a un seguimiento hasta que los síntomas o los valores vuelvan a los niveles normales o aceptables, según la opinión del investigador. Los médicos, bien *in situ* o en el servicio de urgencias de un hospital cercano, administran el tratamiento en caso de cualquier hecho adverso grave. Cuando sea apropiado, se realizan análisis y exámenes médicos para documentar la resolución del/de los hecho/s. Los resultados se clasifican, p.ej., como resueltos, mejorados, inalterados, empeorados, fatales o desconocidos (falta de seguimiento).

#### V. Elaboración de informes

Se registran todos los hechos adversos que se producen durante el ensayo clínico. Los hechos adversos se codifican con MedDRA (versión 4.1). Un hecho/experiencia adversa (HA) es cualquier aparición médica injustificada en un paciente o sujeto sometido a una investigación clínica al que se ha administrado un producto farmacéutico que no tenga necesariamente una relación causal con este tratamiento (ICH/WHO). Por lo tanto, un hecho adverso (HA) es cualquier signo desfavorable o no intencionado (incluyendo, por ejemplo, un hallazgo anormal en laboratorio), síntoma o enfermedad temporalmente asociado con el uso de un producto médico, con independencia de si se considera o no relacionado con el producto médico (ICH/WHO).

El investigador revisa cada hecho y evalúa su relación con el tratamiento farmacológico (i.e., no relacionado, poco probable que esté relacionado, posiblemente relacionado, probablemente relacionado, relacionado con casi total seguridad). Se puntúa cada signo o síntoma en una escala de gravedad de 3 puntos (leve, moderado o grave), y se

anota la fecha y hora de la aparición, relación temporal con la dosificación del fármaco, duración y resultado de cada hecho. Se usan las siguientes definiciones para clasificar la gravedad: (1) Leve: el hecho adverso es fácilmente tolerado y no interfiere en la actividad diaria; (2) Moderado: el hecho adverso interfiere en la actividad diaria, pero el sujeto todavía puede seguir; (3) Grave: el hecho adverso incapacita al sujeto y requiere de una intervención médica.

- 5 Si alguno de los hechos adversos anteriores es grave, se siguen procedimientos especiales. Todos los hechos adversos graves son informados al patrocinador a las 24 horas, información que va seguida de informes a las 48 horas con independencia de si los hechos graves se consideran relacionados con el fármaco o no.

10 Un hecho adverso grave (HAG) es cualquier hecho médico perjudicial que, a cualquier dosis, provoque la muerte, suponga una amenaza para la vida, provoque una discapacidad o incapacitación permanente, requiera la hospitalización del paciente, prolongue la hospitalización del paciente, sea una anomalía congénita, pueda poner en peligro al sujeto o pueda requerir una intervención para evitar uno o más de otros resultados enumerados anteriormente.

#### VI. Farmacocinéticas

15 Se calculan los siguientes parámetros farmacocinéticos a partir de las concentraciones en plasma individuales del compuesto antihistamínico modificado usando un enfoque sin compartimentos y un programa informático farmacocinético validado apropiado (p.ej., WinNonlin Profesional). Los valores de concentración publicados como BLQ se fijan en cero. Si hay datos de concentración disponibles, si es posible, se realizan cálculos intermedios (datos no QC.d) entre los periodos. El aumento de la dosis no depende de los cálculos farmacocinéticos.

20 Para cada parámetro farmacocinético por grupo de dosis, se calculan los datos estadísticos descriptivos, incluyendo la media, la desviación estándar, el coeficiente de variación, la media geométrica, la mediana, el mínimo y el máximo. Para cada nivel de dosis, se proporcionan los datos estadísticos descriptivos para  $ABC(0-t)$ ,  $ABC(0-inf)$  y  $C_{max}$  transformados por logaritmos naturales. Además, se proporcionan la concentración media y mediana frente a las gráficas de tiempo.

25 Se examina la proporcionalidad de la dosis tras la medicación del estudio mediante el análisis de las variables farmacocinéticas  $ABC(0-t)$ ,  $ABC(0-inf)$  y  $C_{max}$  transformadas por logaritmos naturales con un modelo lineal que incluye la dosis transformada por logaritmos naturales a medida que covaría. Se concluye que hay proporcionalidad de la dosis si el intervalo de confianza del 95% para la pendiente de la covariante incluye el valor 1. También se examina la linealidad de la dosis para  $ABC(0-t)$ ,  $ABC(0-inf)$  y  $C_{max}$  mediante un modelo lineal.

#### VII. Evaluación de seguridad

30 Se proporciona una lista de datos de hechos adversos surgidos como consecuencia del tratamiento por paciente que incluye el término literal, el término preferido, el tratamiento, la gravedad y la relación con el tratamiento.

Se hace un resumen el número de sujetos que experimentan hechos adversos y el número de hechos adversos por nivel de dosis usando recuentos de frecuencia.

35 Se resumen los datos de seguridad, incluyendo las evaluaciones de laboratorio y las evaluaciones de los signos vitales, por nivel de dosis y punto temporal de recogida. Se calculan los datos estadísticos descriptivos para los datos de seguridad cuantitativos y se recopilan los recuentos de frecuencia para clasificar los datos de seguridad cuantitativos. Además, se proporciona un cambio medio de la tabla de valores de referencia para los signos vitales y una tabla de cambios que describa los cambios de intervalos normales para los resultados clínicos de laboratorio.

40 Los resultados del ECG se clasifican como normales y anormales, y se resumen usando recuentos de la frecuencia por grupo de dosis y punto temporal de recogida. Se calculan los datos estadísticos descriptivos para los intervalos PR, QRS, QT y QTc.

Los cambios producidos en las exploraciones físicas se describen en el texto del informe final.

45 Los datos de frecuencia cardiaca se resumen por grupo de tratamiento y punto temporal usando datos estadísticos descriptivos, a medida que se producen cambios individuales con respecto a los valores de referencia. Los resultados del cambio medio con respecto a la referencia se usan para comparar los grupos de dosis activa con el placebo en cada punto temporal. Los datos de seis sujetos completados por nivel de dosis proporcionarían un 80% de exactitud en la detección de una diferencia de 20 pulsaciones por minuto. Tras cada periodo, se completa un análisis intermedio.

#### VIII. Evaluación de la eficacia

50 Se resumen las puntuaciones de sedación con VAS por punto temporal de recogida de cada nivel de dosis usando datos estadísticos descriptivos.

**Ejemplo 8: Evaluación preclínica de los análogos de loxapina**

Antes de la prueba clínica de los compuestos en seres humanos, se realiza una prueba preclínica. La evaluación preclínica incluye las siguientes pruebas:

*i. Absorción, distribución, metabolismo y excreción preclínicos*

5 El compuesto se administra a ratas, perros y macacos a una dosis de aproximadamente 3 mg/kg oral e intravenosamente. Se recogen muestras de plasma de todas las especies para el análisis farmacocinético. Se mide el Tmax y la semivida (en horas) en la rata, el perro y el macaco. También se mide el porcentaje de proteína unida en el plasma de rata y ser humano.

10 Se recogen los cerebros de las ratas tras la administración oral para determinar los niveles en cerebro del fármaco precursor.

Se estudia *in vivo* la inhibición del citocromo P450. Además, se determina la velocidad de metabolismo *in vitro* en cultivos de hepatocitos de rata, perro, macaco y ser humano para cada compuesto.

*ii. Foco de efectos cardiacos*

15 El principal aspecto toxicológico estudiado durante la fase clínica de selección de candidatos del proyecto es la prolongación del intervalo QT. Históricamente, los antagonistas de H1 se han asociado con este efecto. La prolongación de QT en raras ocasiones puede evolucionar en arritmias cardiacas peligrosas. Para analizar *in vitro* mejor la probabilidad de que un compuesto provoque una prolongación de QT, se eligió el ensayo de unión a hERG como sistema de prueba para estudiar el potencial de un compuesto para producir este efecto. Se estudia electrofisiológicamente el canal hERG humano, transfectado a una línea celular estable, y se publica el porcentaje de inhibición de la corriente del canal.

20 Para determinar si un compuesto puede provocar cualquier cambio en el intervalo QT, se estudia el compuesto en perros Beagle teleméricamente. Se implantan dispositivos en los perros para monitorizar de manera continua el ECG y la presión sanguínea arterial. Los perros (grupos de 4) se estudian en un diseño de cuadrado latino, en el que cada perro recibe 3 dosis diferentes y un placebo. Se realizan dos estudios con dosis de 0,3, 1, 3, 10 y 30 mg/kg.

*iii. Estudio agudo en ratas*

25 El objetivo de este estudio consiste en evaluar la toxicidad y la máxima dosis tolerada (MDT) de los artículos de prueba administrados por vía oral mediante alimentación forzada a ratas. Se asignan ratas CrI: CD@ (SD)IGS BR macho (3/grupo) a 5 grupos. Al iniciar la dosificación, los animales tienen aproximadamente 7 semanas de vida con pesos corporales que varían de 172 a 206 g. Cada grupo recibe bien 50, 100, 150, 200 o 250 mg/kg del compuesto una vez al día durante 5 días. Todos los animales supervivientes se sacrifican al 6º día.

30 La evaluación de la toxicidad se basa en la mortalidad, las observaciones clínicas y los datos del peso corporal.

*iv. Estudio agudo en perros*

35 El objetivo de este estudio consiste en evaluar la toxicidad y la máxima dosis tolerada (MDT) del compuesto administrado a dosis crecientes por vía oral mediante alimentación forzada a perros. Se asignan al estudio dos perros Beagle macho de pura raza. Al iniciar la dosificación, los animales tienen al menos 6 meses de vida con pesos corporales que varían de 8,0 a 10,9 kg. Los perros reciben preparaciones de dosis que contienen el compuesto una vez al día durante 5 días en dosis crecientes de 25, 50 ó 75 mg/kg.

Se observan los perros a las 0,25, 0,5, 0,75, 1,0 y 2,0 horas ± 5 minutos y a las 4, 6, 8 y 24 horas ± 15 minutos posteriores a la dosis. Se pesan los días 1 y 6.

40 Se realizan electrocardiogramas y se toman las presiones sanguíneas antes de la dosificación y 1, 4 y 24 horas después de la dosis de 40 mg/kg del día 5.

En base al intervalo y a la gravedad de los signos clínicos observados, se calcula la MDT para el compuesto.

*v. Estudio con ratas de 14 días con estudio de recuperación*

45 El objetivo de este estudio consiste en evaluar la toxicidad del compuesto cuando se administra por vía oral forzosamente a ratas durante al menos 14 días y en evaluar la reversibilidad, persistencia o aparición retardada de cualquier efecto tras un periodo de recuperación de hasta 14 días.

50 Se asignan ratas CrI:CD@ (SD)IGS BR macho y hembra a siete grupos, cuatro grupos de estudio principales y tres grupos para las toxicocinéticas. Cada grupo recibe preparaciones de dosis que contienen metilcelulosa 400 cps al 0,25% en tampón de acetato 200mM, o 10, 30 ó 150 mg de artículo de prueba/kg de peso corporal (mg/kg/día) a un volumen de dosis de 5 ml/kg.

La evaluación de la toxicidad se basa en la mortalidad, observaciones clínicas y oftalmológicas, pesos corporales, consumo de alimento, patología clínica, pesos de los órganos y hallazgos macroscópicos y microscópicos. Las muestras de sangre se recogen para su evaluación toxicocinética.

#### *Estudio de 14 días con perros y fase de recuperación*

- 5 Se determina la toxicidad y las toxicocinéticas de un compuesto de la invención cuando se administra diariamente por vía oral forzosamente (Fase 1) o mediante cápsulas (Fase 2) a perros durante al menos 14 días. También se evalúa la reversibilidad, la persistencia o la aparición retardada de efectos observables tras un periodo de recuperación de 7 días (Fase 1) o de 14 días (Fase 2). Se estudian las dosis de 3, 10, 30 y 70 mg/kg/día. Todos los perros de la Fase 1 y la Fase 2 sobrevivieron hasta que fueron sacrificados según lo planificado.
- 10 Los compuestos y los protocolos anteriores son útiles en la evaluación pre-clínica de los compuestos de loxapina de la invención.

#### **Ejemplo 9: Evaluación de la actividad analgésica**

- 15 Se analiza la actividad analgésica de un análogo de loxapina tras su administración oral. Se evalúa la actividad analgésica mediante los análisis de espasmos abdominales en la rata y el ratón. También se evalúa la actividad analgésica usando la prueba de la pinza en la cola en el ratón, la prueba del coletazo de la cola en la rata, la prueba de Randall-Selitto en la rata, y se realizaron comparaciones con el grupo de vehículo control. También se incluyen en la comparación compuestos de referencia de ASA (ácido acetilsalicílico) y morfina.

- 20 La prueba de la pinza en la cola y del coletazo de la cola proporcionan información útil sobre la actividad analgésica central del artículo de prueba. La prueba de Randall-Selitto proporciona información sobre la capacidad del compuesto para modificar un estado hiperalgésico, y la prueba de los espasmos abdominales proporciona información sobre la actividad analgésica periférica del artículo de prueba. El artículo de prueba se administra mediante alimentación forzada oral, siendo esta la vía de administración clínica deseada. Se espera que los niveles de dosis empleados engloben la dosis eficaz y proporcionen un margen de seguridad adecuado.

#### **Artículo de prueba, compuesto de referencia y formulación irritante**

- 25 Todas las formulaciones se preparan cada día de dosificación. El artículo de prueba se formula en MC al 0,25% (p/v) a la concentración más alta requerida. Las dosis inferiores se obtienen por dilución en serie de la concentración más alta, usando MC al 0,25% (p/v). El compuesto de referencia, el ácido acetilsalicílico, se formula en MC al 0,25% (p/v) a las concentraciones requeridas. Se formula levadura de Brewer en agua para inyección a la concentración requerida. Se diluye el ácido acético con agua para su inyección hasta proporcionar la concentración de administración requerida.
- 30 Los niveles de dosis se expresan en términos de la cantidad del compuesto de prueba/compuesto de referencia/irritante administrado con independencia de la pureza o del contenido activo.

#### *Animales*

- 35 Se adquiere un número adecuado de ratones Crl:CD-1(ICR)BR macho y ratas Wistar en Charles River (RU) Ltd., Margate, Kent. Los ratones tienen aproximadamente 4 semanas de vida y pesan entre 18 y 22 g al llegar. Las ratas tienen aproximadamente 5 semanas de vida y pesan entre 150 y 170 g al llegar. La edad y el peso de los animales al inicio del estudio se documentan en los datos brutos y en el informe final.

- 40 Se introducen los animales en grupos apropiados para el tamaño de la jaula usada, en jaulas que cumplen el código de práctica de confinamiento y cuidado de animales usado en la Ley de procedimientos científicos (Ley del Ministerio del Interior sobre procedimientos científicos con animales, 1986). Las virutas de madera de Aspen para las camas se renuevan semanalmente en cada jaula (Dates and Ltd, Manchester, RU). Se analizan los contaminantes específicos de las camas y los resultados se registran en un archivo en Covance. Las jaulas se limpian y secan antes de su uso. Se colocan bloques masticables Aspen en las jaulas como forma de enriquecimiento ambiental. Periódicamente, las salas de confinamiento se mantienen en unos límites aceptables de temperatura y humedad relativa (nominalmente 19 a 25°C y del 40 al 70%, respectivamente). Estas salas están iluminadas con luz fluorescente durante 1,2 de las 24 horas del ciclo y están diseñadas para recibir al menos 15 cambios de aire puro a la hora.
- 45

Se proporcionarán dieta RM1.(E).SQC., (Special Diets Services Ltd., Witham, UK) y agua del grifo principal a voluntad, excepto que se especifique otra cosa a continuación. Se analizan periódicamente los constituyentes específicos y no se encuentra que contengan ninguna entidad biológica ni química que pueda interferir en el sistema de análisis. Los grupos de tratamiento empleados para el estudio son los que se muestran en la Tabla 9:

**Tabla 9. Grupos de tratamiento**

Grupo	Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg)	Conc. (mg/ml)	n.º de animales
1	Vehículo	–	–	8
2	Análogo de loxapina	3	0,3	8
3	Análogo de loxapina	10	1,0	8
4	Análogo de loxapina	30	3,0	8
5	Morfina	100	10,0	8

Las medidas de la presión se toman de las patas traseras izquierda y derecha de cada animal inmediatamente antes de la administración del vehículo, del artículo de prueba o del compuesto de referencia y a los 30, 60, 120 y 240 minutos posteriores a la administración oral. El orden de las mediciones de presión es el de la pata izquierda seguida de la pata derecha.

*Prueba de los espasmos abdominales en rata*

Cada animal recibe una sola administración de vehículo, artículo de prueba o compuesto de referencia mediante alimentación forzada oral, usando un volumen de dosis constante de 10 mg/kg. Los volúmenes de dosis individuales se basan en los pesos corporales individuales obtenidos el día de la dosificación. En la Tabla 10, se muestran los grupos de tratamiento.

**Tabla 10. Grupos de tratamiento**

Grupo	Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg)	Conc. (mg/ml)	n.º de animales
1	Vehículo	–	–	6
2	Análogo de loxapina	3	0,3	6
3	Análogo de loxapina	10	1,0	6
4	Análogo de loxapina	30	3,0	6
5	ASA	100	10,0	6

Cuarenta y cinco minutos después de la administración oral, cada animal recibe una inyección intraperitoneal de 1 ml de ácido acético al 1%. Los animales se colocan inmediatamente en cámaras de observación individuales y se registra el número de espasmos abdominales provocados en un periodo posterior de 25 minutos.

*Prueba de los espasmos abdominales en ratón*

Cada animal recibe una sola administración de vehículo, artículo de prueba o compuesto de referencia mediante alimentación forzada oral, usando un volumen de dosis constante de 10 ml/kg. Los volúmenes de dosis individuales se basan en los pesos corporales individuales obtenidos el día de la dosificación. En la Tabla 11, se muestran los grupos de tratamiento.

**Tabla 11. Grupos de tratamiento**

Grupo	Tratamiento	Nivel de dosis (mg/kg)	Conc. (mg/ml)	n.º de animales
1	Vehículo	–	–	6
2	Análogo de loxapina	3	0,3	6
3	Análogo de loxapina	10	1,0	6
4	Análogo de loxapina	30	3,0	6
5	ASA	100	10,0	6

Cuarenta y cinco minutos después de la administración oral, cada animal recibe una inyección intraperitoneal de 0,25 ml de ácido acético al 0,5%. Los animales se colocan inmediatamente en cámaras de observación individuales y se registra el número de espasmos abdominales provocados en un periodo posterior de 25 minutos.

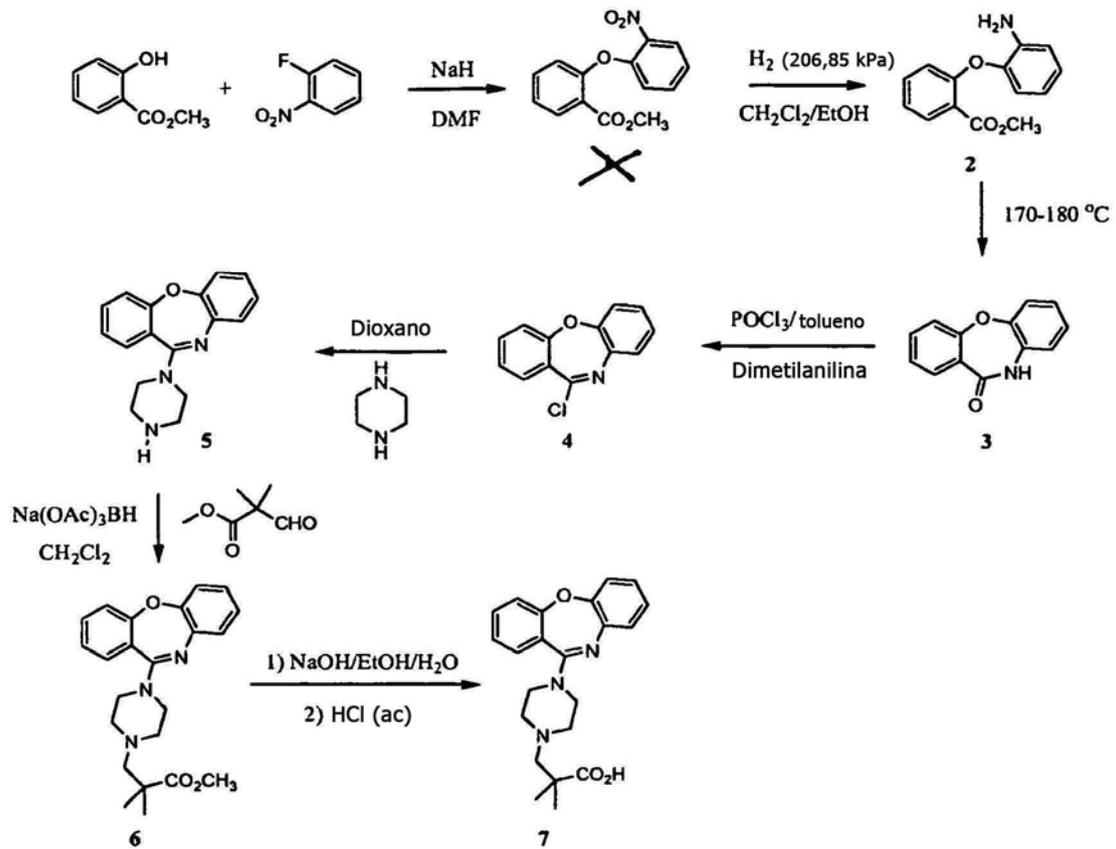
*Procedimientos terminales*

Al final de cada prueba, se sacrificarán los animales sin causarles sufrimiento mediante un compuesto del Programa 1 (p.ej., exposición a gas de dióxido de carbono a una concentración creciente seguida de la dislocación de cuello) y se retirarán sin realizar la necropsia. Si un animal mostrara cualquier signo de molestia grave durante el estudio será sacrificado de inmediato sin provocarle sufrimiento. Cualquier animal encontrado muerto o que muera prematuramente durante el estudio será sometido a una necropsia. Se realiza un examen macroscópico, tras abrir la cavidad torácica y abdominal mediante la observación del aspecto de los tejidos *in situ*. Se registra cualquier anomalía.

**EJEMPLO 10: Síntesis del compuesto 1**

La síntesis del compuesto 1 se resume en el Esquema I.

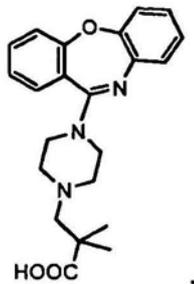
## Esquema I



5 El tratamiento de 10*H*-Dibenzo[b,f][1,4]oxazepin-11-ona tricíclica (3) con oxicloruro de fósforo en presencia de *N,N*-dimetilanilina en amidina (5) con 2-carbometoxi-2-metil-propionaldehído dio piperazina alquilada (6), que se purificó sobre gel de sílice. La hidrólisis básica del metiléster de (5) en etanol acuoso seguida de la acidificación dio el ácido carboxílico (7) que corresponde al compuesto 1.

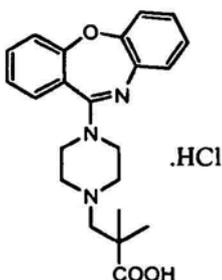
REIVINDICACIONES

1.- Un compuesto que tiene la fórmula:

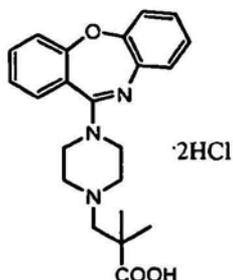


o una sal, solvato o hidrato del mismo.

- 5 2.- El compuesto de la reivindicación 1, siendo el compuesto un solvato.  
 3.- El compuesto de la reivindicación 1, siendo el compuesto un hidrato.  
 4.- El compuesto de la reivindicación 1, siendo el compuesto una sal farmacéuticamente aceptable.  
 5.- El compuesto de la reivindicación 4, siendo la sal una sal de adición de ácido.  
 6.- El compuesto de la reivindicación 5, siendo la sal una sal clorhidrato.  
 10 7.- El compuesto de la reivindicación 6, siendo el compuesto:



8.- El compuesto de la reivindicación 6, siendo el compuesto:



15 9.- Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según lo reivindicado en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10.- Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1–8 para su uso en el tratamiento de un trastorno del sueño.

11.- Un compuesto para su uso según la reivindicación 10, en el que dicho trastorno del sueño se selecciona entre alteración del ritmo circadiano, insomnio, parasomnia, síndrome de la apnea del sueño, narcolepsia e hipersomnia.