

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 472**

51 Int. Cl.:

C07D 237/28 (2006.01)

A61K 31/502 (2006.01)

A61P 25/22 (2006.01)

A61P 25/24 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06824527 .3**

96 Fecha de presentación: **18.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1966158**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **Derivados de cinnolina sustituidos como moduladores del receptor de GABAA y método para su síntesis**

30 Prioridad:

20.12.2005 US 752137 P
28.08.2006 US 823693 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

27.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

27.11.2012

73 Titular/es:

ASTRAZENECA AB (100.0%)
151 85 Södertälje, SE

72 Inventor/es:

CHAPDELAIN, MARC;
OHNMACHT, CYRUS;
BECKER, CHRISTOPHER;
CHANG, HUI-FANG y
DEMBOFSKY, BRUCE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 391 472 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

Derivados de cinnolina sustituidos como moduladores del receptor del GABAA y método para su síntesis

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes Provisionales de Estados Unidos 60/752,137, presentada el 20 de Diciembre, 2005 y 60/823,693, presentada el 28 de Agosto, 2006 bajo 35 U.S.C. § 119(e), la totalidad de las cuales son incorporadas aquí como referencia.

Campo de la invención

10 La presente invención se relaciona con nuevos compuestos de cinnolina, sus composiciones farmacéuticas, métodos de uso y procesos para fabricar tales compuestos. En adición, la presente invención se relaciona con compuestos para en el uso métodos terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de trastornos de ansiedad, trastornos cognitivos, y/o trastornos del estado de ánimo.

Antecedentes de la invención

15 La presente invención comprende, *inter alia*, compuestos de cinnolina, su uso como depresores del sistema nervioso central (CNS) (especialmente ansiolíticos), y herramientas farmacológicas, métodos para su preparación, composiciones farmacéuticas que contienen los mismos, e intermediarios usados en su preparación.

20 Algunos compuestos de cinnolina, incluyendo las 4-amino- y 4-oxo-cinnolina-3-carboxamidas, seleccionados son descritos en la Patente de Alemania del Este 123525 (Verfahren zur Herstellung von substituierten 4-Aminocinnolinen); Pat. U.S. No. 4.379.929 de Conrad y otros; Pat. U.S. Nos. 4.886.800 y 4,925,844 de Resch; Daunis y otros., "Preparation et proprietes de cinnolones-3 et cinnolones-4," Bull. de la Societe Chimique de France, 8:3198-3202 (1972); Lunt y otros. "A New Cinnoline Synthesis," J. Chem. Soc. (C), 687-695 (1968); Gewalt, y otros., "Synthese von 4-Aminocinnolinen aus (Arylhydrazono) (cyan)-essigsäurederivaten," Liebigs Ann. Chem., 1390-1394 (1984); y Pat. U.S. No. 3.657.241 de Kurihara. Adicionalmente, los compuestos de cinnolina seleccionados, incluyendo los derivados de cinnolina 3-acil-4-sustituidos son descritos en Liebigs Ann. Chem. 1390-1394 (1984) supra y Sandison, y otros., "A New Heterocyclisation Reaction Leading to Cinnolin-4(IH)-one Derivatives," J. Chem. Soc. Chem. Comm., 752-753 (1974). Adicionalmente, compuestos de cinnolina son también descritos en EP205272 y EP 328282. Sin embargo, ninguna de las anteriores describe o sugiere los nuevos compuestos de la presente invención ni sugiere su uso como depresores del CNS.

35 El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es un neurotransmisor inhibitor común en el cerebro de mamíferos y se estima que estará presente en alrededor de un tercio de todas las sinapsis. Cuando el GABA se une a un receptor del GABA, este afecta la capacidad de las neuronas que expresan receptores para llevar a cabo los impulsos neuronales. En el sistema nervioso de los mamíferos adultos, típicamente el GABA inhibe a la neurona dispararse (despolarización). Las neuronas en el cerebro expresan tres tipos principales de receptores del GABA: receptores del GABA tipo A (GABAA), receptores del GABA tipo B (GABAB), y receptores del GABA tipo C (GABAC). Los receptores del GABAA funcionan como canales iónicos dependientes de ligandos para mediar la rápida transmisión sináptica inhibitora que regula la excitabilidad neuronal que participa en tales respuestas como el umbral del ataque, el tono del músculo esquelético, y el estado emocional. Los receptores del GABAA son blancos de muchos medicamentos sedantes, tal como las benzodiazepinas, los barbitúricos y los neuroesteroides.

45 La señal inhibitora intrínseca del GABA es transducida principalmente por los receptores del GABAA. Los receptores del GABAA son canales de ión cloruro (Cl⁻) dependientes de ligandos pentaméricos, que pertenecen a una superfamilia de receptores ionotrópicos dependientes de ligandos que incluye el receptor de acetilcolina nicotínico. Los receptores del GABAA son muy heterogéneos, con al menos 16 diferentes subunidades produciendo potencialmente miles de diferentes tipos de receptores.

50 Las subunidades del receptor del GABAA se agregan a los complejos que forman los canales selectivos de iones cloruro y contienen sitios que se unen a GABA junto con una variedad de sustancias farmacológicamente activas. Cuando GABA se une a este receptor, el canal del anión es activado, causando que se abra y permita que los iones cloruro (Cl⁻) entren en la neurona. Este influjo de iones Cl⁻ hiperpolariza la neurona, lo que la hace menos excitable. La consiguiente disminución en la actividad neuronal tras la activación del complejo del receptor del GABAA puede alterar rápidamente la función cerebral, a tal punto que la conciencia y el control motor pueden verse afectados.

55 Las numerosas combinaciones posibles de subunidades del receptor del GABAA y la distribución generalizada de estos receptores en el sistema nervioso probablemente contribuye a las diversas y variables funciones fisiológicas de los receptores del GABAA, que han estado implicados en muchos trastornos psiquiátricos y neurológicos, y condiciones relacionadas incluyendo: accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico, epilepsia, dolor, migraña, trastornos del estado de ánimo, ansiedad, trastorno por estrés postraumático, trastornos obsesivo-compulsivos, esquizofrenia, ataques, convulsiones, tinnitus, enfermedades neurodegenerativas incluida la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, Corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson, depresión, trastornos bipolares, manía, trigémino y otras neuralgias, dolor neuropático, hipertensión, isquemia cerebral, arritmia cardíaca, miotonía, abuso de sustancias, mioclonus, temblor esencial, disquinesia y otros

trastornos del movimiento, hemorragia cerebral neonatal, y la espasticidad. Los receptores del GABAA también se cree que desempeñan un papel en la cognición, la conciencia, y el sueño.

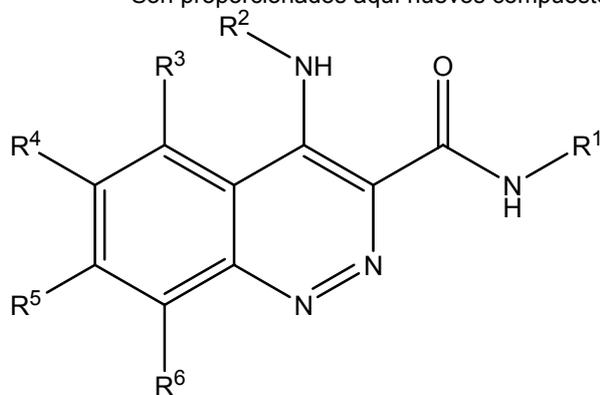
5 Actualmente los fármacos disponibles para modular la actividad del receptor del GABAA incluyen barbitúricos, tal como el pentobarbital y secobarbital, y benzodiazepinas tal como el diazepam, clordiazepóxido y midazolam. Los barbitúricos pueden activar directamente los receptores del GABAA, lo que aumenta significativamente las corrientes de Cl⁻ en la ausencia de una intervención adicional del GABA en sí y también puede aumentar indirectamente la transmisión neuronal GABAérgica. En contraste, las benzodiazepinas actúan como moduladores alostéricos indirectos, y son en gran medida incapaces de aumentar las corrientes Cl⁻ en ausencia del GABA, pero mejoran los aumentos activados por GABA en la conductancia Cl⁻. Esta última propiedad se piensa que es responsable de la utilidad de las benzodiazepinas para el tratamiento de una serie de enfermedades, incluyendo el trastorno de ansiedad generalizada, trastorno del pánico, convulsiones, trastornos del movimiento, epilepsia, psicosis, trastorno del estado de ánimo, y espasmos musculares, como así como la relativa seguridad de las benzodiazepinas en comparación con los barbitúricos.

15 Tanto los barbitúricos y las benzodiazepinas son adictivos y pueden causar somnolencia, pobre concentración, ataxia, disartria, incoordinación motora, diplopía, debilidad muscular, vértigo y confusión mental. Estos efectos secundarios pueden interferir con la capacidad del individuo para llevar a cabo las rutinas diarias tal como conducir, operar maquinaria pesada o realizar otras tareas motoras complejas mientras se está bajo terapia, haciendo a los barbitúricos y las benzodiazepinas inferiores al óptimo para el tratamiento de trastornos crónicos que involucran el GABA y receptores del GABAA.

25 Los receptores del GABAA y las transmisiones neuronales GABAérgicas están implicados como dianas para la intervención terapéutica en un sinnúmero de trastornos neurológicos y psiquiátricos. Efectos secundarios adversos, incluyendo las propiedades adictivas exhibidas por los fármacos moduladores del GABAA y GABA actualmente disponibles, hacen estos fármacos inadecuados en muchos contextos terapéuticos. En consecuencia, sigue existiendo una importante e insatisfecha necesidad en el arte de otras composiciones alternativas, métodos y herramientas que serán de utilidad en aplicaciones clínicas amplias para modular la función y la actividad del GABA y de los receptores del GABA en los sujetos mamíferos, incluidos los seres humanos, y/o para la transmisión neuronal GABAérgica diana. La presente invención es también, entre otras cosas, dirigida hacia este fin.

Descripción de las realizaciones

Son proporcionados aquí nuevos compuestos de fórmula estructural I:



seleccionado de:

40 4-Amino-8-(2, 5-dimetoxifenil)-N-propil-cinnolina-3-carboxamida; 4-Amino-8-(2, 4-dimetoxifenil)-7-fluoro-N-propilcinnolina-3-carboxamida; y 4-Amino-8-(2-fluoro-6-metoxi-fenil)-N-propilcinnolina-3-carboxamida; o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

45 La presente invención proporciona adicionalmente composiciones que comprenden un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Se describen aquí compuestos para el uso en métodos de tratar o prevenir un trastorno de ansiedad en un paciente, que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se describen aquí compuestos para el uso en métodos de tratar o prevenir un trastorno cognitivo en un paciente, que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 También se describen aquí compuestos para el uso en métodos de tratar o prevenir un trastorno del estado de ánimo en un paciente, que comprenden administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

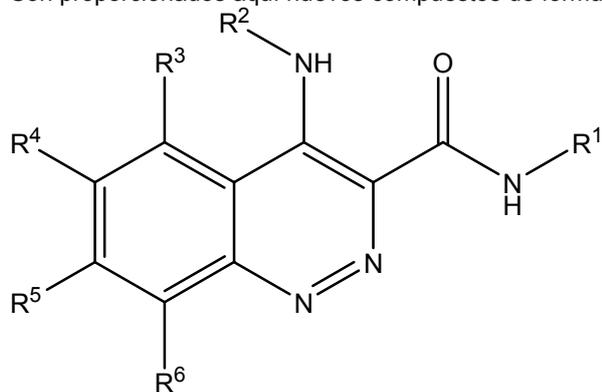
10 La presente invención proporciona adicionalmente un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, descrito aquí para su uso como un medicamento.

La presente invención proporciona adicionalmente un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, descrito aquí para la fabricación de un medicamento.

15 También se describen aquí compuestos para el uso en métodos de modular la actividad del receptor del GABAA que comprenden contactar el receptor del GABAA con un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 La presente invención proporciona adicionalmente métodos sintéticos de hacer un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Son proporcionados aquí nuevos compuestos de fórmula estructural I:



25 I seleccionado de:

4-Amino-8-(2, 5-dimetoxifenil)-N-propil-cinnolina-3-carboxamida; 4-Amino-8-(2, 4-dimetoxifenil)-7-fluoro-N-propilcinnolina-3-carboxamida; y 4-Amino-8-(2-fluoro-6-metoxi-fenil)-N-propilcinnolina-3-carboxamida; o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los compuestos de la presente invención también incluyen sales y tautómeros farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula I. Los compuestos de la invención incluyen adicionalmente hidratos y solvatos.

30 Los compuestos de la invención pueden ser usados como medicamentos. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos de fórmula I, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, para el uso como medicamentos. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona los compuestos descritos aquí para su uso como medicamentos para tratar o prevenir un trastorno de ansiedad, trastorno cognitivo, o trastorno del estado de ánimo.

35 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos de fórmula I, o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un trastorno de ansiedad, trastorno cognitivo, o trastorno del estado de ánimo.

40 En algunas realizaciones, se describe aquí un compuesto para el uso en un método para el tratamiento o profilaxis de un trastorno de ansiedad que comprende administrar a un mamífero (incluyendo un humano) una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Como es usada aquí, la frase "trastorno de ansiedad" incluye, pero no está limitado a, uno o más de los siguientes: trastorno del pánico, trastorno del pánico sin agorafobia, trastorno del pánico con agorafobia, agorafobia sin historia de trastorno del pánico, fobia específica, fobia social, trastorno de ansiedad social, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno por estrés postraumático, trastorno por estrés agudo, trastorno de ansiedad generalizado, trastorno de ansiedad generalizado debido a una condición médica general, y similares.

50 En algunas realizaciones, se describe aquí un compuesto para el uso en un método para el tratamiento o profilaxis de un trastorno cognitivo que comprende administrar a un mamífero (incluyendo un humano) una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Como

es usada aquí, la frase “trastorno cognitivo” incluye, pero no está limitado a, uno o más de los siguientes: enfermedad de Alzheimer, demencia, demencia debida a la enfermedad de Alzheimer, demencia debida a enfermedad de Parkinson, y similares.

5 En algunas realizaciones, se describe aquí un compuesto para el uso en un método para el tratamiento o profilaxis de un trastorno del estado de ánimo que comprende administrar a un mamífero (incluyendo un humano) una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Como es usada aquí, la frase “trastorno del estado de ánimo” es un trastorno depresivo incluyendo pero no está limitado a, uno o más de los siguientes: trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, depresión bipolar y/o manía bipolar, bipolar I con o sin manías, episodios mezclados o depresivos, bipolar II, trastorno ciclotímico, trastorno del estado de ánimo debido a una condición médica general, episodios maníacos asociados con trastorno bipolar, episodios mezclados asociados con trastorno bipolar, y similares.

15 Trastornos de ansiedad, trastornos cognitivos, y trastornos del estado de ánimo son definidos, por ejemplo, en la Asociación Americana de Psiquiatría: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Cuarta Edición, Revisión de Textos, Washington, DC, American Psychiatric Association, 2000.

20 En algunas realizaciones, se describe aquí un compuesto para el uso en un método de tratar o prevenir un trastorno de ansiedad, trastorno cognitivo, o trastorno del estado de ánimo (tal como cualquiera de aquellos descritos aquí), administrando a un mamífero (incluyendo un humano) un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable y un agente que mejora la memoria y/o cognitivo.

25 En algunas realizaciones, se describe aquí un compuesto para el uso en un método de tratar o prevenir un trastorno de ansiedad, trastorno cognitivo, o trastorno del estado de ánimo (tal como cualquiera de aquellos descritos aquí), administrando a un mamífero (incluyendo un humano) un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo donde los miembros constituyentes son proporcionados aquí, y un inhibidor de colina ésterasa o agente antiinflamatorio.

30 En algunas realizaciones, se describe aquí un compuesto para el uso en un método de tratar o prevenir un trastorno de ansiedad, trastorno cognitivo, o trastorno del estado de ánimo (tal como cualquiera de aquellos descritos aquí), administrando a un mamífero (incluyendo un humano) un compuesto de la presente invención, y un agente antipsicótico atípico. Agentes antipsicóticos atípicos incluyen, pero no están limitados a, Olanzapina (comercializado como Zyprexa), Aripiprazol (comercializado como Abilify), Risperidona (comercializado como Risperdal), Quetiapina (comercializado como Seroquel), Clozapina (comercializado como Clozaril), Ziprasidona (comercializado como Geodon) y Olanzapina/Fluoxetina (comercializado como Symbyax).

40 En algunas realizaciones, el mamífero o ser humano tratado con un compuesto de la presente invención, ha sido diagnosticado con una enfermedad o trastorno particular, tal como aquellos descritos aquí. En estos casos, el mamífero o ser humano tratado está en necesidad de tal tratamiento. El diagnóstico, sin embargo, no necesita ser previamente realizado.

45 La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como ingrediente activo, uno o más de los compuestos de la invención aquí descritos junto con al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 Cuando son usados para composiciones farmacéuticas, medicamentos, fabricación de un medicamento, o tratar o prevenir un trastorno de ansiedad, trastorno cognitivo, o trastorno del estado de ánimo (tal como cualquiera de aquellos descritos aquí), los compuestos de la presente invención incluyen los compuestos fórmula I descritos aquí, y sales farmacéuticamente aceptables, tautómeros y precursores hidrolizables *in vivo* de los mismos. Los compuestos de la presente invención incluyen adicionalmente hidratos y solvatos.

Las definiciones establecidas en esta solicitud pretenden aclarar los términos usados a través de esta solicitud. El término “aquí” significa la solicitud completa.

55 Una variedad de compuestos en la presente invención pueden existir en formas particulares estereoisométricas. La presente invención tiene en cuenta todos esos compuestos, incluyendo los isómeros *cis* y *trans*, enantiómeros R- y S-, diastereómeros, (D)-isómeros, (L)-isómeros, mezclas racémicas de los mismos, y otras mezclas de los mismos, estando cubiertos dentro del alcance de esta invención. Átomos de carbono asimétricos adicionales pueden estar presentes en un sustituyente tal como un grupo de alquil. Todos estos isómeros, así como las mezclas de los mismos, están destinados a ser incluidos en esta invención. Los compuestos aquí descritos pueden tener centros asimétricos. Los compuestos de la presente invención que contienen un átomo asimétricamente sustituido pueden ser aislados en formas ópticamente activa o racémica. Es bien conocido en el arte la manera de preparar las formas ópticamente activas, tal como por resolución de formas racémicas o por síntesis de materiales de partida ópticamente activos. Cuando es necesario, la separación del material racémico puede ser lograda por métodos conocidos en el arte. Muchos estereoisómeros de olefinas, dobles enlaces C = N, y similares pueden también estar presentes en los compuestos descritos aquí, y todos esos isómeros estables se contemplan en la presente

invención. Isómeros cis y trans de los compuestos de la presente invención se describen y pueden ser aislados como una mezcla de isómeros, o como formas isoméricas separadas. Todas las formas quirales, diastereoméricas, racémicas y todas las formas estereoisoméricas de una estructura están previstas, a menos que la estereoquímica específica o forma isomérica sea específicamente indicada.

Los compuestos de la invención pueden formar atropisómeros aislables en algunos solventes (por ejemplo CO₂ supercrítico que contiene 25-35% de metanol) a temperatura ambiente. Los atropisómeros de los compuestos pueden ser aislados usando quirales LC. Todos los atropisómeros de una estructura están destinados, a menos que el atropisómero específico sea específicamente indicado.

Cuando un enlace a un sustituyente se muestra que cruza un enlace que conecta a dos átomos de un anillo, entonces esos sustituyentes pueden estar enlazados a cualquier átomo en el anillo. Cuando un sustituyente es listado sin indicar el átomo a través del cual tal sustituyente está enlazado al resto de los compuestos de una determinada fórmula, entonces esos sustituyentes pueden estar enlazados a través de cualquier átomo en ese sustituyente. Las combinaciones de sustituyentes y/o variables son admisibles sólo si tales combinaciones resultan en compuestos estables.

Como es usado aquí, "farmacéuticamente aceptable" es empleado aquí para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas de dosificación que son, dentro del alcance del criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales sin irritación, respuesta alérgica, toxicidad excesiva u otro problema o complicación, recomendada con una relación beneficio/riesgo razonable.

Como es usado aquí, "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a derivados de los compuestos descritos donde el compuesto madre es modificado haciendo sales de ácidos o de base de los mismos (es decir, también incluyen contraiones). Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no están limitados a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tal como aminas; álcali o sales orgánicas de residuos ácidos tal como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternarios del compuesto madre formado, por ejemplo, de ácidos orgánicos inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tal como clorhídrico, fosfórico, y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tal como láctico, maleico, cítrico, benzoico, metanosulfónico, y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden ser sintetizadas del compuesto madre que contiene una fracción básica o ácida por métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales pueden ser preparadas por la reacción de formas de ácido o base libres de estos compuestos con una cantidad estequiométrica del ácido o base apropiada en agua o en solvente orgánico, o en una mezcla de los dos; un medio no acuoso tipo éter, etil acetato, etanol, isopropanol, o acetonitrilo puede ser usado.

Como es usado aquí, "tautómero" significa otros isómeros estructurales que existen en equilibrio resultando de la migración de un átomo de hidrógeno. Por ejemplo, tautomerismo ceto-enol donde el compuesto resultante tiene las propiedades de ambos una cetona y un alcohol insaturado.

Como es usado aquí "compuesto estable" y "estructura estable" indican un compuesto que es suficientemente robusto para sobrevivir al aislamiento a un grado de pureza útil de una mezcla de reacción, y formulación en un agente terapéutico eficaz.

La presente invención incluye adicionalmente los compuestos isotópicamente-marcados de la invención. Un compuesto "isotópicamente" o "radiomarcado" es un compuesto de la invención donde uno o más átomos son reemplazados o sustituidos por un átomo que tiene una masa atómica o número de masa diferente de la masa atómica o número de masa típicamente encontrado en la naturaleza (es decir, que existe de manera natural). Radionuclidos adecuados que pueden ser incorporados en los compuestos de la presente invención incluyen pero no están limitados a ²H (también escrito como D por deuterio), ³H (también escrito como T por tritio), ¹¹C, ¹³C, ¹⁴C, ¹³N, ¹⁵N, ¹⁵O, ¹⁷O, ¹⁸O, ¹⁸F, ³⁵S, ³⁶Cl, ⁸²Br, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I y ¹³¹I. El radionuclido que es incorporado en los compuestos radiomarcados presentes dependerá de la aplicación específica de ese compuesto radiomarcado. Por ejemplo, para ensayos de competencia y marcado del receptor *in vitro*, compuestos que incorporan ³H, ¹⁴C, ⁸²Br, ¹²⁵I, ¹³¹I, o ³⁵S serán generalmente más útiles. Para aplicaciones de radioimagen ¹¹C, ¹⁸F, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹³¹I, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br ó ⁷⁷Br serán generalmente más útiles.

Se entiende que un "compuesto radiomarcado" es un compuesto que tiene incorporado al menos un radionuclido. En algunas realizaciones el radionuclido es seleccionado del grupo que consiste de ³H, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³⁵S y ⁸²Br.

El tratamiento de antedemencia definido aquí puede ser aplicado como una terapia única o puede incluir, en adición a los compuestos de la invención, quimioterapia convencional.

Tal tratamiento conjunto puede ser logrado por medio de dosificaciones simultáneas, secuenciales o separadas de los componentes individuales del tratamiento. Tales productos de combinación emplean los compuestos de esta invención.

5 Los compuestos de la presente invención pueden ser administrados oralmente, parenteral, bucal, vaginal, rectal, inhalación, insuflado, sublingualmente, intramuscularmente, subcutáneamente, tópicamente, intranasalmente, intraperitonealmente, intratoraxialmente, intravenosamente, epiduralmente, intratecalmente, intracerebroventricularmente y por inyección en las uniones.

10 La dosificación dependerá de la ruta de administración, la severidad de la enfermedad, edad y peso del paciente y otros factores normalmente considerados por el médico que lo atiende, al determinar el nivel de dosificación y régimen individual como el más apropiado para un paciente particular.

15 Una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención para uso en terapia de demencia es una cantidad suficiente para aliviar sintomáticamente en un animal de sangre caliente, particularmente un humano los síntomas de demencia, para ralentizar la progresión de la demencia, o para reducir en los pacientes con síntomas de demencia el riesgo de empeorarse.

20 Para preparar composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos de esta invención, portadores inertes, farmacéuticamente aceptables pueden ser tanto sólidos o líquidos. Preparaciones en forma sólida incluye polvos, tabletas, gránulos dispersables, cápsulas, sobres y supositorios.

25 Un portador sólido puede ser una o más sustancias, que también pueden actuar como diluyentes, agentes saborizantes, solubilizadores, lubricantes, agentes de suspensión, aglomerantes, o agentes de desintegración de tableta; también puede ser un material de encapsulación.

30 En polvos, el portador en un sólido finamente dividido, el cual es una mezcla con el componente activo finamente dividido. En tabletas, el componente activo es mezclado con el portador que tiene las propiedades de unión necesarias en proporciones adecuadas y compactada en la forma y tamaño deseados.

35 Para preparar composiciones de supositorios, una cera de baja fusión tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos y manteca de cacao es primero fundida y el ingrediente activo es dispersado allí, por ejemplo, por agitación. La mezcla homogénea fundida es entonces vertida en moldes de tamaño conveniente y se deja enfriar y solidificar.

40 Portadores adecuados incluyen carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, azúcar, pectina, dextrina, almidón, tragacanto, metil celulosa, sodio carboximetil celulosa, una cera de baja fusión, manteca de cacao, y similares.

45 Algunos de los compuestos de la presente invención son capaces de formar sales con varios ácidos y bases inorgánicas y orgánicas y tales sales están también dentro del alcance de esta invención. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tal como clorhídrico, fosfórico, y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tal como láctico, maleico, cítrico, benzoico, metanosulfónico, trifluoroacetato y similares.

50 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos para el tratamiento terapéutico (incluyendo tratamiento profiláctico) de mamíferos incluyendo humanos, es normalmente formulado de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar como una farmacéutica composición.

55 En adición a los compuestos de la presente invención, la composición farmacéutica de esta invención puede contener también, o ser coadministrada (simultáneamente o secuencialmente) con, uno o más agentes farmacológicos de valor en tratar una o más condiciones de enfermedad requeridas aquí.

60 El término composición se pretende que incluya la formulación del componente activo o una sal farmacéuticamente aceptable con un portador farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo esta invención puede ser formulada por medios conocidos en el arte en la forma de, por ejemplo, tabletas, cápsulas, soluciones aceitosas o acuosas, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, geles, sprays nasales, supositorios, polvos finamente divididos o aerosoles o nebulizadores para la inhalación, y emulsiones estériles o suspensiones o soluciones aceitosas o acuosas estériles para uso parenteral (incluyendo intravenosa, intramuscular o infusión).

65 Composiciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones, y emulsiones. Soluciones de agua-propileno glicol o de agua estériles de los compuestos activos pueden ser mencionadas como un ejemplo de preparaciones líquidas adecuadas para administración parenteral. Las composiciones líquidas pueden ser también formuladas en solución de polietileno glicol acuosa. Soluciones acuosas para la administración oral pueden ser preparadas disolviendo el componente activo en agua y adicionando colorantes adecuados, agentes saborizantes, estabilizadores, y agentes de espesado como se desee. Suspensiones acuosas para uso oral pueden ser hechas

dispersando el componente activo finamente dividido en agua junto con un material viscoso tal como gomas naturales sintéticas, resinas, metil celulosa, sodio carboximetil celulosa, y otros agentes de suspensión conocidos en el arte de la formulación farmacéutica.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de dosificación unitaria. En tal forma, la composición es dividida en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación empacada, el paquete conteniendo cantidades discretas de las preparaciones, por ejemplo, tabletas empacadas, cápsulas, y polvos en frascos o ampulas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una cápsula, sobre, o tableta propiamente, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estas formas empacadas.

10 Las composiciones pueden ser formuladas por cualquier medio o ruta adecuada de administración. Portadores farmacéuticamente aceptables o diluyentes incluyen aquellos usados en formulaciones adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradermal, intratecal y epidural). Las formulaciones pueden convenientemente ser presentadas en forma de dosificación unitaria y pueden ser preparadas por cualquiera de los métodos bien conocidos en el arte de la farmacia.

15 Para composiciones sólidas, portadores no tóxicos convencionales sólidos incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, celulosa, derivados de celulosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, glucosa, sucrosa, carbonato de magnesio, y similares pueden ser usados. Composiciones líquidas farmacéuticamente administrables pueden, por ejemplo, ser preparadas disolviendo, dispersando, etc, un compuesto activo como se definió anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, tal como, por ejemplo, agua, dextrosa salina acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar de esta forma una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica a ser administrada puede contener también menores cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas tal como agentes humectantes o emulsificantes, agentes buffer de pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio, sorbitan monolaurato, trietanolamina acetato de sodio, sorbitan monolaurato, trietanolamina oleato, etc. Métodos actuales de preparar tales formas de dosificación son conocidas, o serán evidentes, para aquellos expertos en este arte; por ejemplo, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, 15 Edición, 1975.

20 Los compuestos de la invención pueden ser derivados de varias maneras. Como es usado aquí "derivados" de los compuestos incluye sales (por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables), cualquier complejo (por ejemplo complejos de inclusión o clatratos con compuestos tal como ciclodextrinas, o complejos de coordinación con iones de metal tal como Mn^{2+} y Zn^{2+}), ésteres tal como ésteres hidrolizables *in vivo*, ácidos o bases libres, formas polimórficas de los compuestos, solvatos (por ejemplo hidratos), profármacos o lípidos, grupos de protección y pares de acoplamiento. Por "profármacos" se entiende por ejemplo cualquier compuesto que es convertido *in vivo* en un compuesto biológicamente activo.

25 Sales de los compuestos de la invención son preferiblemente fisiológicamente bien tolerados y no tóxicos. Muchos ejemplos de sales son conocidas por aquellos expertos en el arte. Todas esas sales están dentro del alcance de esta invención, y referencias a los compuestos incluyen las formas de sal de los compuestos.

30 Compuestos que tienen grupos ácidos tal como carboxilato, fosfatos o sulfatos, pueden formar sales con metales alcalinos o alcalinos térreos tal como Na, K, Mg y Ca, y con aminos orgánicas tal como trietilamina y Tris (2-hidroxi-etil)amina. Las sales pueden ser formadas entre compuestos con grupos básicos por ejemplo aminos, con ácidos inorgánicos tal como ácido clorhídrico, ácido fosfórico o ácido sulfúrico, o ácidos orgánicos tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido fumárico, o ácido tartárico. Los compuestos que tienen grupos ácidos y básicos pueden formar sales internas.

35 Sales de adición ácidas pueden ser formadas con una amplia variedad de ácidos, tanto inorgánicos y orgánicos. Ejemplos de sales de adición ácidas incluyen las sales formadas con los ácidos clorhídrico, yodídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, cítrico, láctico, succínico, maleico, málico, isetiónico, fumárico, bencenosulfónico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, naftalenosulfónico, valérico, acético, propanoico, butanoico, malónico, glucurónico y lactobiónico.

40 Si el compuesto es aniónico, o tiene un grupo funcional que puede ser aniónico (por ejemplo, COOH puede ser COO), entonces una sal puede ser formada con un catión adecuado. Ejemplos de cationes inorgánicos adecuados incluyen, pero no están limitados a, iones de metal alcali tal como Na^+ y K^+ , cationes alcalinos térreos tal como Ca^{2+} y Mg^{2+} , y otros cationes tal como Al^{3+} . Ejemplos de cationes orgánicos adecuados incluyen, pero no están limitados a, ión amonio (es decir, NH_4^+) e iones amonio sustituidos (por ejemplo, NH_3R^+ , $NH_2R_2^+$, NHR_3^+ , NR_4^+). Ejemplos de algunos iones amonio sustituidos adecuados son aquellos derivados de: etilamina, dietilamina, dicitlohexilamina, trietilamina, butilamina, etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, bencilamina, fenilbencilamina, colina, meglumina, y trometamina, así como amino ácidos, tal como lisina y arginina. Un ejemplo de un ión de amonio cuaternario común es $N(CH_3)_4^+$.

Quando los compuestos contienen una función amina, estos pueden formar sales de amonio cuaternario, por ejemplo por la reacción con un agente alquilante de acuerdo a métodos bien conocidos por la persona experta. Tales compuestos de amonio cuaternario están dentro del alcance invención.

- 5 Compuestos que contiene una función amina pueden también formar N-óxidos. Una referencia aquí a un compuesto que contiene una función amina también incluye el N-óxido.

10 Cuando un compuesto contiene varias funciones amina, uno o más que el átomo de nitrógeno puede ser oxidado para formar un N-óxido. Ejemplos particulares de N-óxidos son los N-óxidos de una amina terciaria o un átomo de nitrógeno de un heterociclo que contiene nitrógeno.

15 Los N-óxidos pueden ser formados por tratamiento de la amina correspondiente con un agente de oxidación tal como peróxido de hidrógeno o un per-ácido (por ejemplo un ácido peroxycarboxílico), ver por ejemplo *Advanced Organic Chemistry*, de Jerry March, 4^{ta} Edición, páginas de Wiley Interscience. Más particularmente, los N-óxidos pueden ser hechos por el procedimiento de L. W. Deady (*Syn. Comm.* 1977, 7, 509-514) en el cual el compuesto de amina es reaccionado con ácido *m*-cloroperoxi benzoico (MCPBA), por ejemplo, en un solvente inerte tal como diclorometano.

20 Los ésteres pueden ser formados entre los grupos hidroxilo o ácido carboxílico presentes en los compuestos y un ácido carboxílico apropiado o una pareja de reacción con alcohol, usando técnicas bien conocidas en el arte. Ejemplos de ésteres son los compuestos que contienen el grupo C(=O)OR, donde R es un éster sustituyente, por ejemplo, un grupo C₁₇ alquil, un grupo C₃₂₀ heterociclicil, o un grupo C₅₂₀ aril, preferiblemente un grupo C₁₇ alquil. Ejemplos particulares de grupos éster incluyen, pero no están limitados a, C(=O)OCH₃, C(=O)OCH₂CH₃, C(=O)OC(CH₃)₃, y -C(=O)OPh. Ejemplos de grupos aciloxi (éster invertido) son representados por OC(=O)R, donde
25 R es un sustituyente aciloxi, por ejemplo, un grupo C₁₇ alquil, un grupo C₃₂₀ heterociclicil, o un grupo C₅₂₀ aril, preferiblemente un grupo C₁₇ alquil. Ejemplos particulares de grupos aciloxi incluyen, pero no están limitados a, OC(=O)CH₃ (acetoxi), OC(=O)CH₂CH₃, OC(=O)C(CH₃)₃, OC(=O)Ph, y OC(=O)CH₂Ph.

30 Derivados que son profármacos de los compuestos son convertibles *in vivo* o *in vitro* en uno de los compuestos madres. Típicamente, al menos una de las actividades biológicas del compuesto será reducida en la forma de profármaco de los compuestos, y puede ser activada por conversión del profármaco para liberar los compuestos o un metabolito de éste. Algunos profármacos son ésteres del compuesto activo (por ejemplo, un éster fisiológicamente aceptable metabólicamente inestable). Durante el metabolismo, el grupo éster (-C(=O)OR) es escindido para producir el fármaco activo. Tales ésteres pueden ser formados por esterificación, por ejemplo, de
35 cualquiera de los grupos ácido carboxílicos (-C(=O)OH) en el compuesto madre, con, donde sea apropiado, protección previa de cualquier otro grupo reactivo presente en el compuesto madre, seguido por la desprotección si se requiere.

40 Ejemplos de tales ésteres metabólicamente inestables incluyen aquellos de la fórmula -C(=O)OR donde R es: C₁₇alquil (por ejemplo, Me, Et, -nPr, -iPr, -nBu, -sBu, -iBu, tBu); C₁₇aminoalquil (por ejemplo, aminoetil; 2-(N,N-dietilamino)etil; 2(4morfolino)etil); y aciloxi-C₁₇alquil (por ejemplo, aciloximetil; aciloxietil; pivaloiloximetil; acetoximetil; 1acetoxietil; 1-(1-metoxi-1-metil)etil-carboniloxietil; 1-(benzoiloxi)etil; isopropoxi-carboniloximetil; 1isopropoxi-carboniloxietil; ciclohexil-carboniloximetil; 1ciclohexil-carboniloxietil; 1-ciclohexiloxi-carboniloxietil; (4-tetrahidropiraniloxi) carboniloximetil; 1-(4-tetrahidropiraniloxi)carboniloxietil; (4-tetrahidropiranil)carboniloximetil; y 1(4tetrahidropiranil)carboniloxietil).

45 Además, algunos profármacos son activados enzimáticamente para producir el compuesto activo, o un compuesto el cual, después de reacciones químicas posteriores, produce el compuesto activo (por ejemplo, como un ADEPT, GDEPT, LIDEPT, etc.). Por ejemplo, el profármaco puede ser un azúcar derivada u otro glicósido conjugado, o puede ser un derivado éster de amino ácido.

50 Otros derivados incluyen parejas de acoplamiento de los compuestos en los cuales los compuestos están enlazados a una pareja de acoplamiento, por ejemplo siendo químicamente acoplado a los compuestos o físicamente asociados con éstos. Ejemplos de parejas de acoplamiento incluyen una molécula marcada o reportera, un sustrato de soporte, un portador o molécula de transporte, un efector, un fármaco, un anticuerpo o un inhibidor. Las parejas de acoplamiento pueden estar covalentemente enlazadas a los compuestos de la invención a través de un grupo funcional apropiado en los compuestos tal como un grupo hidroxil, un grupo carboxilo o un grupo amino. Otros derivados incluyen formular los compuestos con liposomas.

60 Cuando los compuestos contienen centros quirales, todas las formas ópticas individuales tal como enantiómeros, epímeros, atropisómeros y diastereoisómeros, así como mezclas racémicas de los compuestos están dentro del alcance de la invención.

65 Los compuestos pueden existir en un número de formas tautoméricas y las referencias a compuestos incluyen todas esas formas. Para evitar dudas, cuando un compuesto puede existir en una de las muchas formas tautoméricas y

solamente una es específicamente descrita o mostrada, todas las otras son sin embargo abarcadas por el alcance de esta invención.

La cantidad del compuesto a ser administrada variará para el paciente que está siendo tratado y variará desde alrededor de 100 ng/kg de peso corporal a 100 mg/kg de peso corporal por día y preferiblemente estará desde 10 pg/kg a 10 mg/kg por día. Por ejemplo, dosificaciones pueden ser fácilmente establecidas por aquellos expertos en el arte a partir de esta divulgación y del conocimiento en el arte. Así, el experto puede fácilmente determinar la cantidad de compuesto y aditivos, vehículos, y/o portador opcionales en las composiciones y a ser administrados en métodos de la invención.

En algunas realizaciones, los compuestos descritos aquí son depresores del sistema nervioso central y pueden ser usados como tranquilizantes o agentes atarácicos para aliviar los estados de ansiedad y tensión, por ejemplo, en ratones, gatos, ratas, perros y otras especies de mamíferos tal como humanos, de la misma manera que el clordiazepóxido. Para este propósito un compuesto o mezcla de compuestos de fórmula I, o sales no tóxicas fisiológicamente aceptables, tal como sales de adición ácidas de los mismos, pueden ser administradas oralmente o parenteralmente en una forma de dosificación convencional tal como tableta, píldora, cápsula, inyectable o similares. La dosificación en mg/kg de peso corporal de los compuestos de la presente invención en mamíferos variará de acuerdo al tamaño del animal y particularmente con respecto a la relación cerebro/peso del cuerpo. En general, una dosificación en mg/kg mayor para un animal pequeño tal como un perro tendrá el mismo efecto que una dosificación en mg/kg menor en un adulto humano. Una dosificación efectiva mínima para un compuesto de fórmula (I) será de al menos alrededor de 0.1 mg/kg de peso corporal por día para mamíferos con una dosificación máxima para un mamífero pequeño tal como un perro, de alrededor de 100 mg/kg por día. Para humanos, una dosificación de alrededor de 0.1 a 12 mg/kg por día será efectiva, por ejemplo, alrededor de 5 a 600 mg/día para un hombre promedio. La dosificación puede ser dada una vez al día o en dosis divididas, por ejemplo, 2 a 4 dosis al día, y esa dosificación dependerá de la duración y máximo nivel de actividad de un compuesto particular. La dosis puede ser convencionalmente formulada en una forma de dosificación oral o parenteral componiendo alrededor de 5 a 250 mg por unidad de dosificación de vehículo, excipiente, aglomerante, preservativo, estabilizador, saborizante convencionales o similares aceptados por la práctica farmacéutica, por ejemplo, como es descrito en la Pat. U.S. No. 3,755,340. Los compuestos de esta invención pueden ser usados en composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula I o pueden ser contenidos en la misma formulación con o coadministrados con uno o más fármacos conocidos.

Algunas pruebas ejemplo que pueden ser llevadas a cabo para demostrar la actividad ansiolítica de los presentes compuestos incluyen pruebas de unión de los receptores del GABAA. En algunas realizaciones, la prueba de unión fue dirigida a un subtipo de los receptores del GABAA, tal como receptores del GABAA1 (es decir, aquellos que contienen la subunidad α_1), receptores del GABAA2 (es decir, aquellos que contienen la subunidad α_2), receptores del GABAA3 (es decir, aquellos que contienen la subunidad α_3) y receptores del GABAA5 (es decir, aquellos que contienen la subunidad α_5).

Los ansiolíticos moduladores del GABAA actualmente disponibles trabajan a través de interacciones en el sitio de unión de la benzodiazepina clásica. En gran medida estos ansiolíticos pierden selectividad para el subtipo de receptor del GABAA. Los moduladores del receptor del GABAA de subtipo selectivo pueden ofrecer más ventajas. Por ejemplo, un grupo creciente de trabajos sugiere que la actividad ansiolítica deseable es conducida primariamente por interacciones con los receptores del GABAA que contienen la subunidad α_2 . El efecto sedante, un efecto secundario común de todas las benzodiazepinas comercializadas, se cree que sea mediado por interacciones en los GABAAR que contienen la subunidad α_1 . Para desarrollar ansiolíticos con desventajas mínimas debido a las interacciones con otras subunidades, un ensayo electrofisiológico fue desarrollado para seleccionar los efectos moduladores de varios compuestos en diferentes combinaciones de subunidades GABA heterológamente expresadas en oocitos *Xenopus*.

Los receptores del GABAA fueron heterológamente expresados en oocitos *Xenopus* inyectando ARNc correspondiente a las subunidades humanas α_1 , α_2 , α_3 , α_5 , β_2 , β_3 y γ_2 de los genes del receptor del GABAA. Las combinaciones de subunidades específicas (subtipos) fueron como sigue: $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_3\beta_3\gamma_2$, y $\alpha_5\beta_3\gamma_2$. La EC10 del GABA fue aproximada para cada célula. La estabilidad de la corriente (EC10) mediada por el GABA fue establecida. El efecto modulador del compuesto de prueba fue determinado y comparado a través de los subtipos. El ensayo desarrollado tiene reproducibilidad lo que permite la discriminación de la actividad moduladora hacia abajo al efecto mínimo de alrededor de 25% potenciación (antes de la normalización al estándar) para los cuatro subtipos. De esta forma, el ensayo puede caracterizar los efectos moduladores y determinar la selectividad del subtipo de los compuestos de prueba en subtipos mayores de los receptores del GABAA. En algunas realizaciones, un compuesto puede selectivamente unirse a un subtipo del receptor del GABAA (mostrando alrededor de 25% o más de unión comparado con otro subtipo del receptor del GABAA).

La actividad ansiolítica es indicada en la prueba de unión del GABAA por un desplazamiento del flunitrazepam tal como es exhibido por las benzodiazepinas o por el realce de la unión tal como es mostrado por el cartazolato y tracazolato.

En algunas realizaciones, los compuestos de la invención pueden unirse a los receptores del GABAA. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención pueden unirse a los receptores del GABAA por desplazamiento de las benzodiazepinas. Correspondientemente, los compuestos de la invención pueden ser usados para modular las actividades de los receptores del GABAA. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención pueden selectivamente unirse a un subtipo de los receptores del GABAA, tal como receptores del GABAA1 (es decir, aquellos que contienen la subunidad α_1), receptores del GABAA2 (es decir, aquellos que contienen la subunidad α_2), receptores del GABAA3 (es decir, aquellos que contienen la subunidad α_3) o receptores del GABAA5 (es decir, aquellos que contienen la subunidad α_5). En algunas realizaciones, los compuestos de la invención pueden selectivamente unirse a un subtipo de los receptores del GABAA por desplazamiento de las benzodiazepinas. En consecuencia, los compuestos de la invención pueden ser usados para selectivamente modular las actividades de un subtipo de los receptores del GABAA, tal como receptores del GABAA1, receptores del GABAA2, receptores del GABAA3 o receptores del GABAA5.

En algunas realizaciones, ciertos compuestos de la invención son antagonistas del receptor del GABAA1 y agonistas del receptor del GABAA2.

Debido a que los compuestos de la invención pueden ser usados para modular las actividades de los receptores del GABAA, o para selectivamente modular las actividades de un subtipo de los receptores del GABAA, los compuestos de la invención son previstos para ser útiles para tratar o prevenir enfermedades mediadas por los receptores del GABAA o un subtipo de los receptores del GABAA. Tal enfermedad, incluye, pero no está limitada a, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico, epilepsia, dolor, migraña, trastornos del estado de ánimo, ansiedad, trastorno por estrés posttraumático, trastornos obsesivo-compulsivos, esquizofrenia, ataques, convulsiones, tinnitus, enfermedades neurodegenerativas incluida la enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica, Corea de Huntington, la enfermedad de Parkinson, depresión, trastornos bipolares, manía, trigémino y otras neuralgias, dolor neuropático, hipertensión, isquemia cerebral, arritmia cardíaca, miotonía, abuso de sustancias, mioclonus, temblor esencial, disquinesia y otros trastornos del movimiento, hemorragia cerebral neonatal, espasticidad, trastorno cognitivo, y trastorno del sueño.

Es conocido que los agonistas del receptor de melatonina son efectivos para tratar la depresión. Encontramos que los compuestos de la invención pueden selectivamente modular las actividades de un subtipo de receptores de melatonina, receptor de melatonina 1 (MT-1). En ciertas realizaciones, ciertos compuestos de la invención son agonistas de MT1. Como resultado, los compuestos de la invención pueden ser efectivos en tratar los trastornos de depresión tal como trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, depresión bipolar y/o manía bipolar, bipolar I con o sin manías, episodios mezclados o depresivos, bipolar II, trastorno ciclotímico, trastorno del estado de ánimo debido a una condición médica general, episodios maniacos asociados con trastorno bipolar, episodios mezclados asociados con trastorno bipolar. Para tratar los trastornos de depresión, una cantidad efectiva de uno o más de los compuestos de la invención es administrada a un paciente con esa necesidad.

En otra realización, ciertos compuestos de la presente invención pueden ser efectivos en tratar el insomnio.

En una realización adicional, un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable, o una formulación o composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I puede ser administrado concurrentemente, simultáneamente, secuencialmente o separadamente con uno o más compuesto(s) farmacéuticamente activo(s) seleccionado de los siguientes:

(i) antidepresivos tal como amitriptilina, amoxapina, bupropión, citalopram, clomipramina, desipramina, doxepin, duloxetina, elzasonan, escitalopram, fluvoxamina, fluoxetina, gepirona, imipramina, ipsapirona, maprotilina, nortriptilina, nefazodona, paroxetina, fenelzina, protriptilina, reboxetina, robalzotan, sertralina, sibutramina, tionisoxetina, tranilcipromina, trazodona, trimipramina, venlafaxina y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos;

(ii) antipsicóticos atípicos incluyendo, por ejemplo, la quetiapina e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de la misma; amisulprida, aripiprazol, asenapina, benzisoxidil, bifeprunox, carbamazepina, clozapina, clorpromazina, debenzapina, divalproex, duloxetina, eszopiclona, haloperidol, iloperidona, lamotrigina, litio, loxapina, mesoridazina, olanzapina, paliperidona, perlapina, perfenazina, fenotiazina, fenilbutilpiperidina, pimozida, proclorperazina, risperidona, quetiapina, sertindol, sulpirida, suproclona, suriclona, tioridazina, trifluoperazina, trimetozina, valproato, ácido valproico, zopiclona, zotepina, ziprasidona y equivalentes de los mismos;

(iii) antipsicóticos incluyendo, por ejemplo, amisulprida, aripiprazol, asenapina, benzisoxidil, bifeprunox, carbamazepina, clozapina, clorpromazina, debenzapina, divalproex, duloxetina, eszopiclona, haloperidol, iloperidona, lamotrigina, loxapina, mesoridazina, olanzapina, paliperidona, perlapina, perfenazina, fenotiazina, fenilbutilpiperidina, pimozida, proclorperazina, risperidona, sertindol, sulpirida, suproclona, suriclona, tioridazina, trifluoperazina, trimetozina, valproato, ácido valproico, zopiclona, zotepina, ziprasidona y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos;

- 5 (iv) ansiolíticos incluyendo, por ejemplo, alnespirona, azapironas, benzodiazepinas, barbitúricos, como adinazolam, alprazolam, balezepam, bentazepam, bromazepam, brotizolam, buspirona, clonazepam, clorazepato, clorodiazepóxido, ciprazepam, diazepam, difenhidramina, estazolam, fenobam, flunitrazepam, flurazepam, fosazepam, lorazepam, lormetazepam, meprobamato, midazolam, nitrazepam, oxazepam, prazepam, quazepam, reclazepam, tracazolato, trepipam, temazepam, triazolam, uldazepam, zolazepam y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos;
- 10 (v) anticonvulsivos incluyendo, por ejemplo, carbamazepina, valproato, lamotrogina, gabapentina y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos;
- 15 (vi) terapias contra el Alzheimer incluyendo, por ejemplo, donepezil, memantina, tacrina y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos;
- (vii) terapias contra el Parkinson incluyendo, por ejemplo, deprenil, L-dopa, Requip, Mirapex, inhibidores de MAOB tales como selegina y rasagilina, inhibidores de comP tales como Tasmara, inhibidores de A-2, inhibidores de la recaptación de dopamina, antagonistas de NMDA, agonistas de la Nicotina, agonistas de la Dopamina e inhibidores de la óxido nítrico sintasa neuronal y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos;
- 20 (viii) terapias contra la migraña incluyendo, por ejemplo, almotriptán, amantadina, bromocriptina, butalbital, cabergolina, dicloralfenazona, eletriptán, frovatriptán, lisurida, naratriptán, pergolida, pramipexol, rizatriptán, ropinirol, sumatriptán, zolmitriptán, zomitriptán, y equivalentes e isómero(s) farmacéuticamente activo(s) y metabolito(s) de los mismos;
- 25 (ix) terapias contra los accidentes cerebrovasculares incluyendo, por ejemplo, abciximab, activasa, NXY-059, citicolina, crobenetina, desmoteplasa, repinotan, traxoprodil y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos;
- 30 (x) terapias contra la incontinencia urinaria por vejiga hiperactiva incluyendo, por ejemplo, darafenacina, falvoxato, oxibutinina, propiverina, robalzotan, solifenacina, tolterodina y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos;
- (xi) terapias contra el dolor neuropático incluyendo, por ejemplo, gabapentina, lidoderm, pregabina y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos;
- 35 (xii) terapias contra el dolor nociceptivo como celecoxib, etoricoxib, lumiracoxib, rofecoxib, valdecoxib, diclofenaco, loxoprofeno, naproxeno, paracetamol y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos;
- 40 (xiii) terapias contra el insomnio incluyendo, por ejemplo, alobarbital, alonimida, amobarbital, benzoctamina, butabarbital, capurida, cloral, cloperidona, cloretato, dexclamol, etclorvinol, etomidato, glutetimida, halazepam, hidroxizina, mecloqualona, melatonina, mefobarbital, metacualona, midaflur, nisobamato, pentobarbital, fenobarbital, propofol, roletamida, triclofos, secobarbital, zaleplon, zolpidem y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos; y
- 45 (xiv) estabilizadores del humor incluyendo, por ejemplo, carbamazepina, divalproex, gabapentina, lamotrigina, litio, olanzapina, quetiapina, valproato, ácido valproico, verapamilo, y equivalentes e isómero(s) y metabolito(s) farmacéuticamente activo(s) de los mismos.
- 50 Tales combinaciones emplean los compuestos de esta invención con el rango de dosificación descrito aquí y el otro compuesto o compuestos farmacéuticamente activos dentro del rango de dosificación aprobado y/o la dosificación descrita en la referencia de la publicación.

55 **Los procedimientos generales para hacer los compuestos de la invención son como sigue:**

Algunos compuestos ejemplos de la invención en la Tabla 1 fueron hechos de acuerdo a los métodos descritos aquí a continuación.

Tabla 1

Número del Ejemplo	Método de Síntesis	Nombre del Compuesto	Estructura
20	B	4-amino-8-(2,5-dimetoxifenil)-N-propil-cinnolina-3-carboxamida	
64	A	4-amino-8-(2-fluoro-6-metoxifenil)-N-propil-cinnolina-3-carboxamida	
78	A	4-Amino-8-(2,4-dimetoxifenil)-7-fluoro-N-propilcinnolina-3-carboxamida	

5 Síntesis

Los compuestos de la presente invención pueden ser preparados en un número de formas bien conocidas para un experto en el arte de la síntesis orgánica. Los compuestos de la presente invención pueden ser sintetizados usando los métodos descritos a continuación, junto con los métodos sintéticos conocidos en el arte de la química orgánica sintética, o variaciones de estos como sea apreciado por aquellos expertos en el arte. Los materiales de partida y precursores usados en los procesos aquí descritos estaban disponibles comercialmente o ya preparados por métodos de síntesis orgánica establecidos. Se entiende por un experto en el arte de la síntesis orgánica que la funcionalidad presente en varias porciones de la molécula debe ser compatible con los reactivos y reacciones propuestas. Tales restricciones a los sustituyentes que son compatibles con las condiciones de la reacción serán fácilmente evidentes para un experto en el arte y métodos alternativos deben ser entonces usados.

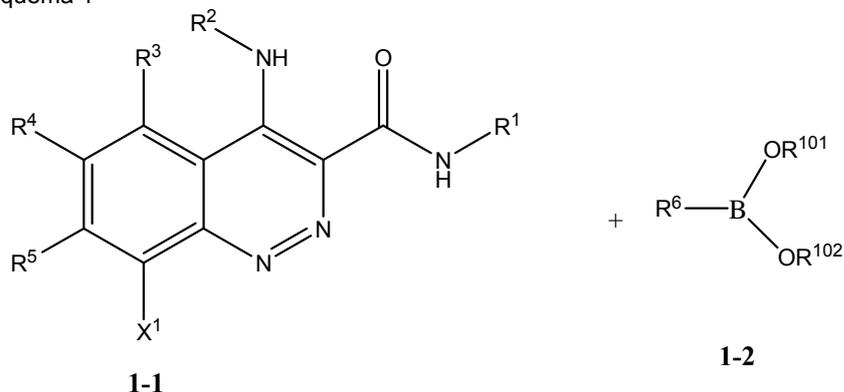
Las abreviaciones químicas usadas en los Ejemplos son definidas como sigue: "DMSO" denota dimetilsulfóxido, "THF" denota tetrahidrofurano, "DMF" denota N,N-dimetilformamida. A menos que otra cosa sea establecida el progreso de la reacción fue monitoreado por HPLC, LC-MS o TLC. Recipientes de vidrio de laboratorio estándares secados al horno fueron usados y las manipulaciones rutinarias fueron hechas a temperatura ambiente bajo una capa de nitrógeno a menos que se indique lo contrario. Reactivos disponibles comercialmente y solventes anhidro fueron típicamente usados como fueron recibidos. Las evaporaciones fueron típicamente realizadas bajo presión reducida usando un evaporador rotatorio. La cromatografía preparativa fue realizada usando gel de sílice 60 de ICN, 32-63 μ o un equivalente adecuado. Los productos fueron secados bajo presión reducida a 40°C o una temperatura adecuada.

Los datos de HPLC-Espectroscopía de Masas fueron recogidos utilizando una columna Agilent Zorbax 5 μ SB-C8 de 2.1mm x 5 cm. Con una temperatura de la columna de 30°C. Solventes: A = 98:2 Agua : Acetonitrilo con 0.1% ácido fórmico añadido, B = 98:2 Acetonitrilo: Agua con 0.05% ácido fórmico añadido. Tasa de flujo 1.4 mL/min, volumen de inyección 2.0 μ L, condiciones iniciales 5% B, eluyendo con un gradiente lineal desde 5 hasta 90% B desde el tiempo cero hasta 3 minutos manteniendo un 90% B hasta 4 minutos. La detección UV por arreglo de fotodiodos fue usada promediando la señal desde 210 a través de 400 nm. Los datos de Espectros de Masas fueron recogidos usando Full Scan APCI (+), índice de pico base, 150.0 a 900.0 amu., 30 voltios de cono con una temperatura de la sonda de 450°C.

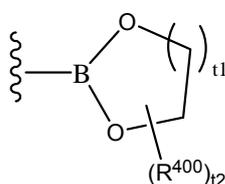
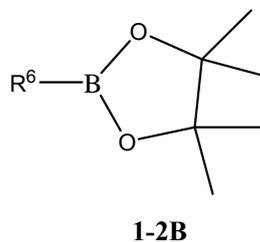
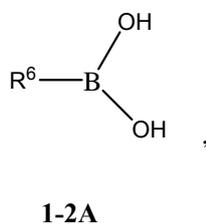
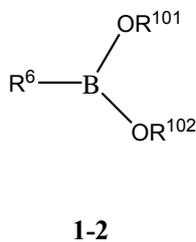
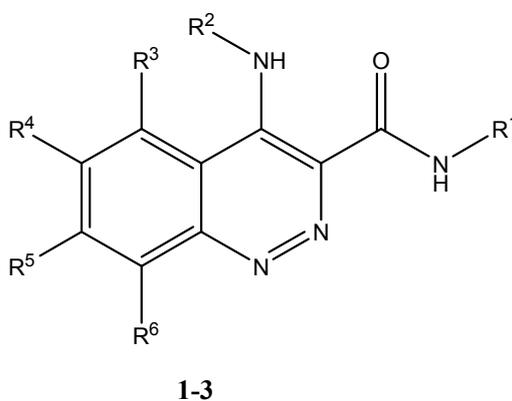
Los datos de la ^1H NMR (δ , ppm) fueron obtenidos en un instrumento Bruker 300 MHz a 30°C con tetrametilsilano como un estándar interno ajustado a 0.00 ppm. Las multiplicidades de las absorciones de los espectros de la NMR pueden ser abreviadas mediante s, singlete; br, pico ancho; bs, singlete ancho; d, doblete; t, triplete; q, cuarteto; dd, doblete de dobletes; dt, doblete de tripletes; m, multiplete. En muchos casos la resonancia de protón asociada con los protones del grupo cinnolina 4-amino no fueron fácilmente observables en los espectro de NMR de protón registrados a 30°C en cloroformo-d debido a un ensanchamiento severo en la línea base. Estos protones pueden ser claramente observados registrando el espectro a -20°C .

Como es mostrado en el Esquema 1, un compuesto **1-3** puede ser hecho mediante el acoplamiento del derivado de cinnolina halogenado **1-1** (donde X^1 es halo tal como bromo o yodo) con un compuesto de boro **1-2** donde R^6 puede ser un aril o heteroaril opcionalmente sustituido (sustituyentes adecuados pueden ser alquil, CN, etc.), R^{101} y R^{102} son cada uno, independientemente, hidrógeno o C_{1-6} alquil; o R^{101} y R^{102} , juntos con los dos átomos de oxígeno a los cuales están unidos y el átomo de boro al cual los dos átomos de oxígeno están unidos, forman un anillo heterocíclico de 4-7 miembros cuyos átomos que forman el anillo comprenden átomos de B, O y C y el cual es opcionalmente sustituido por 1, 2, 3, ó 4 C_{1-6} alquil (es decir, una fracción mostrada como **1-2B-R** donde t1 es 0, 1, 2 ó 3; t2 es 0, 1, 2, 3 ó 4; y R^{400} es cada uno, independientemente, C_{1-6} alquil). Dos ejemplos del compuesto de boro **1-2** son **1-2A** (un derivado de ácido borónico) y **1-2B** (un derivado de 4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolano). La reacción de acoplamiento puede ser llevada a cabo en presencia de un catalizador adecuado, tal como un catalizador de metal. Algunos catalizadores de metal ejemplares adecuados incluyen el catalizador de paladio, tal como bis(trifenilfosfina)paladio(II) dicloruro y tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0). La reacción de acoplamiento puede ser llevada a cabo en presencia de una base adecuada tal como una base inorgánica. Algunas bases inorgánicas ejemplares adecuadas incluyen el carbonato de cesio, carbonato de sodio, y fosfato de potasio. La reacción de acoplamiento puede ser llevada a cabo en un solvente adecuado tal como un solvente orgánico. Algunos solventes orgánicos adecuados incluyen los solventes orgánicos polares, tal como un éter y un alcohol. Éteres adecuados incluyen 1,2-dimetoxietano y tetrahidrofurano. Alcoholes adecuados incluyen, propanol e isopropanol. Un solvente adecuado también incluye una mezcla de dos o más solventes individuales. Solventes adecuados pueden adicionalmente contener agua. La reacción de acoplamiento puede ser llevada a cabo a una temperatura adecuada para proporcionar los compuesto **1-3**. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción es calentada hasta una temperatura elevada (es decir, por encima de la temperatura ambiente). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción es calentada hasta una temperatura de alrededor de 40°C , alrededor de 50°C , alrededor de 60°C , alrededor de 70°C , alrededor de 80°C , alrededor de 90°C , alrededor de 100°C , alrededor de 110°C , alrededor de 120°C , alrededor de 130°C , alrededor de 140°C , alrededor de 150°C , alrededor de 160°C . El progreso de la reacción puede ser monitoreado por métodos convencionales tal como TLC o NMR.

Esquema 1



catalyst, base
catalizador, base



5 Como es mostrado en el Esquema 2, un compuesto **2-3** puede ser hecho mediante el acoplamiento de un derivado de cinnolina halogenado **2-1** (donde X^2 es halo tal como bromo o yodo) con un compuesto de estaño **2-2** donde R^6 puede ser un aril o heteroaril opcionalmente sustituido (sustituyentes adecuados pueden ser alquil, CN, etc.), R^{201} , R^{202} y R^{203} son cada uno, independientemente, C_{1-6} alquil. La reacción de acoplamiento puede ser llevada a cabo en presencia de un catalizador adecuado, tal como un catalizador de metal. Algunos catalizadores de metal ejemplares adecuados incluyen el catalizador de paladio, tal como bis(trifenilfosfina)paladio(II) dicloruro y tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0). La reacción de acoplamiento puede ser llevada a cabo en un solvente adecuado tal como un solvente orgánico. Algunos solventes orgánicos adecuados incluyen los solventes orgánicos polares. Algunos solventes orgánicos adecuados incluyen el solvente aprótico. Algunos solventes orgánicos adecuados incluyen el solvente orgánico aprótico polar tal como N,N-dimetilformamida. La reacción de acoplamiento puede ser llevada a cabo a una temperatura adecuada por un tiempo suficiente para proporcionar los compuesto **2-3**. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción es calentada hasta una temperatura elevada (es decir, por encima de

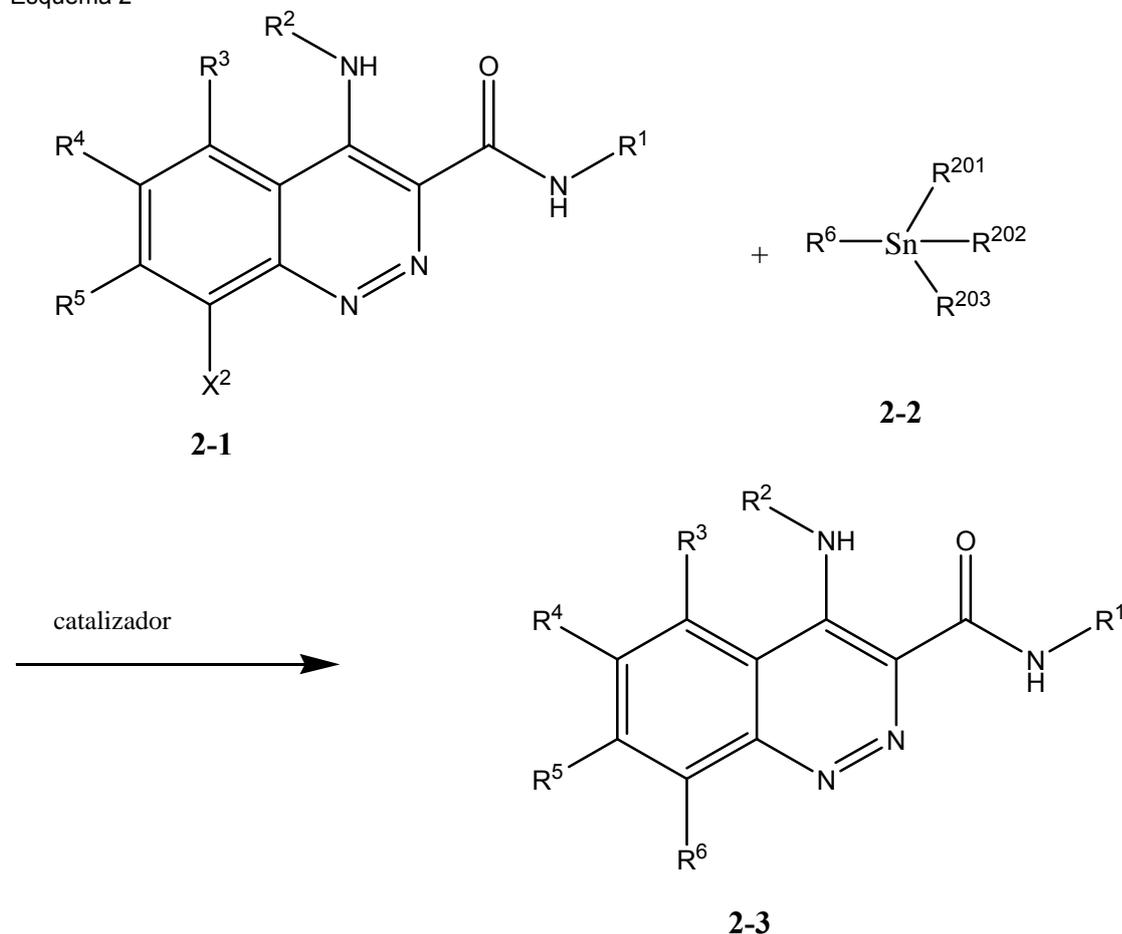
10

15

la temperatura ambiente). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción es calentada hasta una temperatura de alrededor de 40 °C, alrededor de 50 °C, alrededor de 60 °C, alrededor de 70 °C, alrededor de 80 °C, alrededor de 90 °C, alrededor de 100 °C, alrededor de 110 °C, alrededor de 120 °C, alrededor de 130 °C, alrededor de 140 °C, alrededor de 150 °C, alrededor de 160 °C. El progreso de la reacción puede ser monitoreado por métodos convencionales tal como TLC o NMR.

5

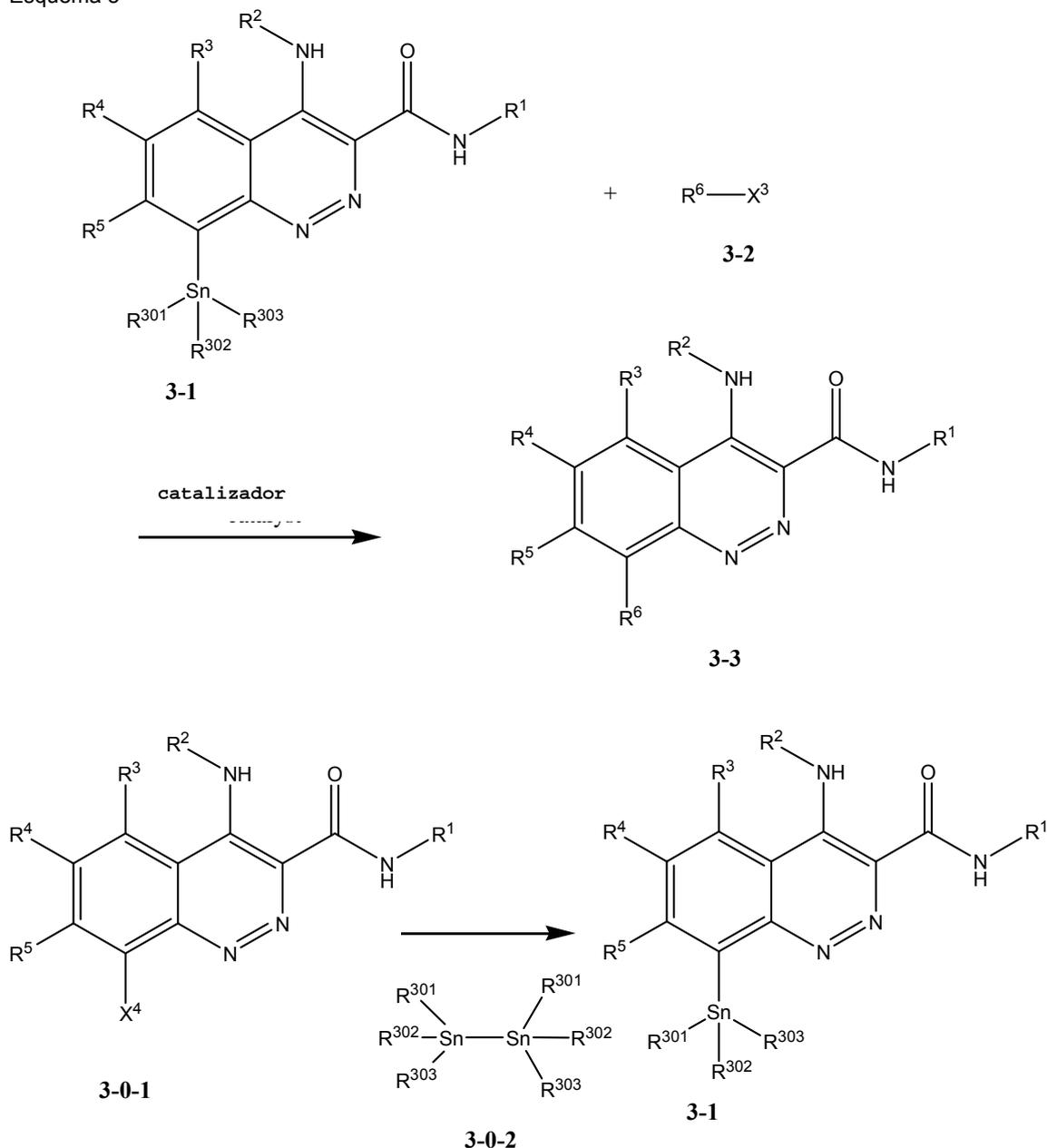
Esquema 2



10 Como es mostrado en el Esquema 3, un compuesto **3-3** puede ser hecho mediante el acoplamiento de un derivado de cinnolina trialquilestanil **3-1** (donde R^{301} , R^{302} y R^{303} son cada uno, independientemente, C_{1-6} alquil) con un compuesto halogenado R^6X^3 **3-2** donde X^3 es halo tal como bromo o yodo, y donde R^6 puede ser un aril o heteroaril opcionalmente sustituido (sustituyentes adecuados pueden ser alquil, CN etc.). La reacción de acoplamiento puede ser llevada a cabo en presencia de un catalizador adecuado, tal como un catalizador de metal. Algunos catalizadores de metal ejemplares adecuados incluyen el catalizador de paladio, tal como bis(trifenilfosfina)paladio(II) dicloruro y tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0). La reacción de acoplamiento puede ser llevada a cabo en un solvente adecuado orgánico. Algunos solventes orgánicos adecuados incluyen los solventes orgánicos polares. Algunos solventes orgánicos adecuados incluyen el solvente aprótico. Algunos solventes orgánicos adecuados incluyen solventes orgánicos apróticos polares tal como N,N-dimetilformamida. La reacción de acoplamiento puede ser llevada a cabo a una temperatura adecuada por un tiempo suficiente para proporcionar los compuesto **2-3**. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción es calentada hasta una temperatura elevada (es decir, por encima de la temperatura ambiente). En algunas realizaciones, la mezcla de reacción es calentada hasta una temperatura de alrededor de 40 °C, alrededor de 50 °C, alrededor de 60 °C, alrededor de 70 °C, alrededor de 80 °C, alrededor de 90 °C, alrededor de 100 °C, alrededor de 110 °C, alrededor de 120 °C, alrededor de 130 °C, alrededor de 140 °C, alrededor de 150 °C, alrededor de 160 °C. El progreso de la reacción puede ser monitoreado por métodos convencionales tal como TLC o NMR.

30 También como es mostrado en el Esquema 3, el derivado de cinnolina trialquilestanil **3-1** puede ser hecho mediante el acoplamiento de un derivado de cinnolina halogenado **3-0-1** (donde X^4 es halo tal como bromo o yodo) con una compuesto de di-estaño **3-0-2** (donde R^{301} , R^{302} y R^{303} son cada uno, independientemente, C_{1-6} alquil) en presencia de un catalizador adecuado, tal como un catalizador de paladio. Algunos catalizadores de paladio ejemplares incluyen bis(trifenilfosfina)paladio(II) dicloruro y tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0).

Esquema 3



- 5 Debe notarse que en todos los esquemas descritos aquí, si existen grupos funcionales (reactivos) presentes en un grupo sustituyente tal como R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, etc., puede ser hecha una modificación adicional si es apropiado y/o deseado. Por ejemplo, un grupo CN puede ser hidrolizado para proporcionar un grupo amida; un ácido carboxílico puede ser convertido a una amida; un ácido carboxílico puede ser convertido a un éster, el cual a su vez puede ser reducido a un alcohol, el cual a su vez puede ser adicionalmente modificado. En otro ejemplo, un grupo
- 10 OH puede ser convertido a un mejor grupo de salida tal como mesilato, el cual a su vez es adecuado en la sustitución nucleofílica, tal como por CN. Un experto en el arte reconocerá en más detalle tales modificaciones. De esta manera, un compuesto de fórmula I (tal como el compuesto 1-3 del Esquema 1, el compuesto 2-3 en el Esquema 2 y el compuesto 3-3 del Esquema 3) teniendo un sustituyente que contiene un grupo funcional puede ser convertido a otro compuesto de fórmula I que tiene un grupo sustituyente diferente.

15 Como es usado aquí, el término "reaccionar" se refiere a la unión de reactivos químicos designados de manera tal que tenga lugar una transformación química que genera un compuesto diferente de cualquiera inicialmente introducido en el sistema. La reacción puede tener lugar en presencia o ausencia de solvente.

Algunos métodos, procedimientos y precursores más detallados como los esbozados en los Esquemas 1–3 y procedimientos detallados y datos de caracterización adicionales para ciertos compuestos ejemplificados anteriormente son adicionalmente descritos aquí a continuación.

5 4-Amino-8-bromo-N-propil-cinnolina-3-carboxamida

Un matríz de 3 cuellos de 22 L equipado con un agitador mecánico, termómetro, entrada de nitrógeno, condensador de reflujo, y embudo de adición fue cargado con N-propil-2-ciano-2-[(2-bromofenil)hidrazono]acetamida (195.4 g, 0.632 mol) en tolueno (4 L). Cloruro de aluminio (295 g, 2.21 mol) fue añadido en tres porciones. La mezcla fue calentada con una manta hasta 90°C en aproximadamente 30 minutos. Después de 2.5 horas, el calor fue eliminado y la mezcla de reacción se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente durante la noche. La mezcla de reacción fue enfriada en un baño de hielo hasta ≤ 10 °C y celita fue añadida. Agua (680 mL) fue añadida en forma de gotas durante 1 hr a ≤ 10 °C. Después de agitar durante 30 minutos, cloruro de metileno fue añadido (8 L). La mezcla de reacción fue enfriada hasta ≤ 10 °C y 10% hidróxido de sodio (5.8 L) fue añadido en forma de gotas durante 45 minutos a ≤ 10 °C. Después de agitar durante 30 minutos, tetrahidrofurano (2 L) fue añadido y las fases se dejaron separar. La capa acuosa fue eliminada, filtrada a través de celita, y la torta del filtro lavada con 2:1 cloruro de metileno: tetrahidrofurano (4 L). Nota: La adición de nuevas porciones de cloruro de metileno ayudaron a acelerar la filtración bastante tediosa. Las fases del filtrado fueron separadas y la fase orgánica fue transferida a un embudo de decantación. La separación de la fase orgánica de la base acuosa lo más rápido posible ayudó a evitar la hidrólisis indebida de propil amida en el producto. Los sólidos que quedaron en el matríz de reacción fueron disueltos con 2:1 tetrahidrofurano:metanol (4 L) y luego 10% metanol en cloroformo (4 L). Las capas fueron separadas y la capa orgánica fue lavada con salmuera (500 mL), secada sobre sulfato de magnesio, filtrada, y concentrada bajo presión reducida hasta un sólido marrón oscuro. El sólido fue hecho una pasta en dietil éter, recogido por filtración y secado. El sólido crudo (188 g) fue luego disuelto en metanol caliente (6 L), tratado con carbón activado (19 g), agitado 15 minutos a reflujo, filtrado a través de celita mientras estaba caliente, concentrado a aproximadamente 3 L, y dejado cristalizar durante la noche. Los sólidos fueron recogidos, lavados con dietil éter (400 mL) y secados en un horno de vacío a 50°C para dar un sólido cristalino blanco. El filtrado fue concentrado hasta aproximadamente 1 L y una segunda cosecha fue obtenida. A los licores madres se les quita la superficie y una tercera y cuarta cosecha fueron obtenidas a partir de recristalizaciones adicionales para proporcionar un total de 164.6 g del compuesto deseado como un sólido cristalino blanco (84%). ¹H NMR (300.132 MHz, CDCl₃) δ 8.57 (bs, 1H), 8.12 (dd, *J* = 7.6, 1.1 Hz, 1H), 7.83 (dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz, 1H), 7.50 (dd, *J* = 8.4, 7.5 Hz, 1H), 3.48 (q, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.69 (sexteto, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.03 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). MS APCI, *m/z* = 309/311 (M+H). HPLC 1.66 min.

35 Procedimientos/Método de Síntesis detallados:

Método A: El cinnolina-haluro, un ácido aril borónico, ácido heteroaril borónico opcionalmente sustituido, o un compuesto de boro **1-2B** del Esquema 2 (típicamente 2–3 equivalentes molares), carbonato de cesio (2 equivalentes molares) y bis(trifenilfosfina)paladio(II) dicloruro (0.025 equivalentes molares) fueron colocados en un recipiente de reacción de un microondas y disueltos en 7:3:2 (v/v/v) 1,2-dimetoxietano: agua: etanol (5 mL/mmol de cinnolina-haluro) a temperatura ambiente. El recipiente de reacción fue tapado, es espacio entre la tapa y el producto fue purgado con nitrógeno seco y la mezcla agitada fue calentada en un sistema de microondas Biotage Optimizer (300W) manteniendo una temperatura de la reacción de 150°C durante 30– 90 minutos, presiones de la reacción de 7 bar fueron típicamente observadas. La reacción fue luego enfriada hasta la temperatura ambiente y extraída con etil acetato. El residuo de los extractos orgánicos fue purificado por cromatografía flash en gel de sílice eluyendo con un gradiente polar creciente de etil acetato en hexanos para proporcionar el compuesto deseado.

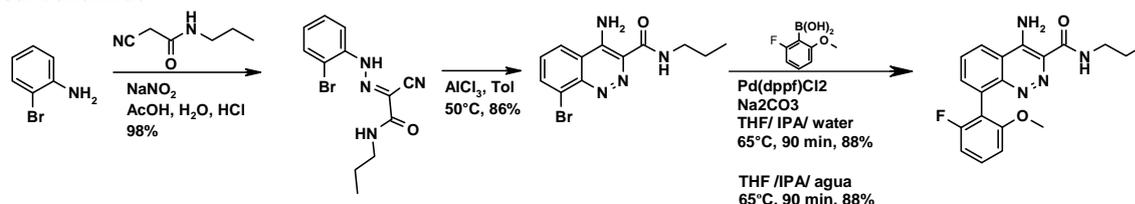
Método B: A una solución del cinnolina-haluro en 1,2-dimetoxietano (10 mL/mmol de cinnolina-haluro) bajo nitrógeno a temperatura ambiente fue añadido tetrakis(trifenilfosfina)paladio (0) (0.05–0.15 equivalentes molares). Después de agitar 10–20 min un ácido aril borónico, ácido heteroaril borónico, o un compuesto de boro **1-2B** del Esquema 2 (1– 4 equivalentes molares) fue añadido seguido por una solución de carbonato de sodio (2.5 equivalentes molares) en agua (3 mL/mmol de haluro). La mezcla resultante fue calentada a reflujo durante 2– 24h. La reacción fue luego enfriada hasta la temperatura ambiente y extraída con etil acetato. El residuo de los extractos orgánicos fue purificado por cromatografía flash en gel de sílice eluyendo con un gradiente polar creciente de etil acetato en hexanos para proporcionar el compuesto deseado.

55 Ejemplo 1: 4-amino-8-(2,5-dimetoxifenil)-N-propil-cinnolina-3-carboxamida

Usando el método B, 4-amino-8-bromo-N-propil-cinnolina-3-carboxamida (13.0 g, 42.1 mmol), ácido 2,5-dimetoxifenil borónico (15.4 g, 84.6 mmol) y bis(trifenilfosfina) paladio(II) dicloruro (886 mg, 1.3 mmol) fueron reaccionados para proporcionar el compuesto del título (13.51 g, 87.7 % de rendimiento) como una aguja casi blanca. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.59 (br, 1H), 7.89 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J'* = 1.9 Hz, 1H), 7.65–7.77 (m, 2H), 6.85–7.20 (m, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.64 (s, 3H), 3.35–3.55 (m, solapado con H₂O), 1.64 (m, *J* = 7.3 Hz, 2H), 0.99 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H) MS APCI, *m/z* = 367 (M+H) HPLC 1.72 min.

Ejemplo 2: 4-amino-8-(2-fluoro-6-metoxi-fenil)-N-propil-cinnolina-3-carboxamida

Usando el método A, 4-amino-8-bromo-N-propil-cinnolina-3-carboxamida (150 mg, 0.485 mmol) y ácido 2-fluoro-6-metoxi-fenil borónico (170 mg, 1.000 mmol) fueron reaccionados para proporcionar el compuesto del título (73 mg, 42 % de rendimiento) como un sólido blanco. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (br, 1H), 7.93 (m, 1H), 7.78–7.69 (m, 2H), 7.42–7.31 (m, 1H), 6.89–6.80 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.44 (aparente cuarteto, J = 7.0 Hz, 2H), 1.64 (aparente sexteto, J = 7.0 Hz, 2H), 0.99 (t, J = 7.0 Hz, 3H). MS APCI, m/z = 355 (M+H). HPLC 1.68 min.

Ejemplo 2A: Síntesis a Gran Escala de 4-Amino-8-(2-fluoro-6-metoxi-fenil)-N-propilcinnolina-3-carboxamida

Un matraz de 3 cuellos de 2L equipado con un condensador de reflujo, agitador mecánico, y embudo de adición de 250 mL fue cargado con 4-amino-8-bromo-N-propil-cinnolina-3-carboxamida (36.80 g, 119.09 mmol), ácido 2-fluoro-6-metoxi-fenil borónico (60.70g, 357.06 mmol), y Pd(dppf)Cl₂·CH₂Cl₂ (7.40 g, 9.06 mmol) bajo argón a temperatura ambiente. Un vacío moderado fue aplicado y el aparato fue rellenado con argón dos veces. Tetrahidrofurano (515 mL, anhídrido) e isopropanol (147 mL, anhídrido) fueron añadidos y la suspensión roja resultante fue agitada a temperatura ambiente durante 15 minutos. Una solución de carbonato de sodio (57.0 g, 537.7 mmol) en agua (220 mL) fue añadida rápidamente a través de un embudo de adición y la mezcla resultante fue colocada inmediatamente en un baño de aceite a 80°C precalentado. Después de 90 minutos a reflujo (temperatura interna observada 65°C), la mezcla de reacción fue enfriada hasta la temperatura ambiente y filtrada a través de un lecho de celita soportado sobre un embudo de cristal sinterizado rematado con carbón activado Norita (30 g). Las sales residuales y la torta del filtro fueron lavadas con 4:1 (v/v) THF: isopropanol hasta que no se pudo detectar material adicional en el eluyente por TLC (gel de sílice, 1:1 (v/v) hexanos: etil acetato, detección UV, R_f = 0.25). La solución rojo oscuro fue concentrada hasta un pequeño volumen bajo presión reducida y luego diluida con etil acetato (250 mL). La fase orgánica fue separada y la fase acuosa extraída con etil acetato (2 x 250 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron lavadas con salmuera, secadas sobre sulfato de sodio, filtradas y luego concentradas bajo presión reducida. Los residuos fueron pasados a través de una pequeña almohadilla de gel de sílice en un embudo de vidrio sinterizado lavando con etil acetato hasta que no se detectó más material en el eluyente. La solución fue evaporada para proporcionar el producto crudo como un sólido espumoso rojo marrón. Este material fue purificado por cromatografía flash en gel de sílice usando un gradiente de 40 a 50% etil acetato en hexanos. Las fracciones que contenían el producto fueron combinadas y evaporadas. El residuo fue precipitado a partir de diclorometano mediante la adición de hexanos a temperatura ambiente. La recristalización de este material a partir de metanol caliente etanol: agua 1:1 (v/v) proporcionó el compuesto del título como cristales blanco opacos (32.78 g, 78% de rendimiento). Compuesto del título adicional (4.30 g, 10% de rendimiento) fue aislado procesando los residuos de los licores de la cristalización a través de un tratamiento extractivo ácido-base.

¹H NMR (500.3 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (br, 1H), 7.90 (dd, J = 8, 1Hz, 1H), 7.75–7.67 (m, 2H), 7.37–7.31 (m, 1H), 6.86–6.80 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.44 (qd, J = 7, 1Hz, 2H), 1.64 (aparente sexteto, J = 7Hz, 2H), 0.99 (t, J = 7Hz, 3H). Los 4-amino protones no fueron observables en los espectros NMR de protón reportados, registrados a 30°C debido al severo ensanchamiento en la línea base. Estos protones pueden ser claramente observados registrando el espectro a -20°C. HRMS (C₁₉H₁₉FN₄O₂) Calculado = 355.1570, Observado = 355.1531. HPLC 1.68 min.

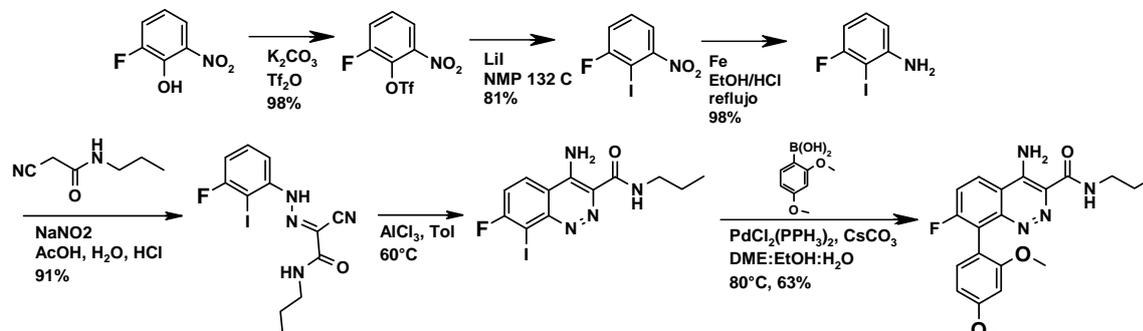
Se encontró que el compuesto del título puede ser separado en dos atropisómeros usando Cromatografía de Fluidos Supercríticos. Generalmente, en CO₂ supercrítico modificado con metanol, estos atropisómeros son estables y por lo tanto son separables en soporte quiral. Sin embargo, en medio acuoso y medio ácido, en particular, la interconversión de atropisómeros es considerablemente facilitada.

4-Amino-8-bromo-N-propil-cinnolina-3-carboxamida

Preparado de acuerdo la método descrito en la patente US 4,886,800 ejemplo 35a.

Ejemplo 3: 4-Amino-8-(2,4-dimetoxifenil)-7-fluoro-N-propilcinnolina-3-carboxamida

Esquema Sintético para hacer el compuesto 78:



- 5 Un matraz de tres cuellos de 2L equipado con un agitador mecánico fue cargado con 4-amino-7-fluoro-8-yodo-N-propilcinnolina-3-carboxamida (40.5 g, 108.2 mmol), DME (700 mL, anhidro), y etanol (200 mL, absoluto). Un tubo de dispersión de nitrógeno fue instalado en la suspensión y la mezcla fue agitada hasta que una solución fue obtenida. Agua (300 mL) y PdCl₂(PPh₃)₂ (7.6 g, 10 mol%) fueron añadidos. Después de 5 minutos, ácido 2,4-
- 10 dimetoxifenil borónico (39.4 g, 216.5 mmol) fue añadido seguido por carbonato de cesio (70.3 g, 216.5 mmol). Nitrógeno fue burbujeado a través de la suspensión durante 5 minutos. La mezcla fue calentada hasta aproximadamente 80°C. DME:H₂O:EtOH 7:3:2 adicional (340 mL) fue añadido cuando comenzó el reflujo. La reacción fue refluída 18 horas y luego enfriada hasta temperatura ambiente, diluida con etil acetato (1.5 L), y lavada con agua (3 x 500 mL). Las capas acuosas fueron extraídas con etil acetato (3 x 150 mL). Las capas orgánicas combinadas fueron agitadas durante 1 hora con 40 g de DARCO, secadas sobre sulfato de sodio, y filtrada a través
- 15 de celita. Los sólidos fueron lavados con 5% metanol en cloroformo (3 x 200 mL) y los filtrados concentrados hasta un semisólido oscuro. Esto fue tomado en 200 mL 1% metanol en cloroformo y calentado hasta solubilizar el material. La solución fue dividida en dos porciones. Cada porción fue filtrada a través de papel filtro corrugado de Whatman sobre una columna de gel de sílice de 330 g eluida con 5% etil acetato en diclorometano. (Nota: Algún catalizador sólido pareció ser eliminado a través del papel filtro). Las fracciones más puras de cada columna fueron combinadas en 5–10% etil acetato en diclorometano. La solución fue concentrada hasta aproximadamente 200 mL, diluida con hexano (200 mL), y dejada reposar a temperatura ambiente durante la noche. Los sólidos resultantes fueron aislados por filtración, lavados con éter (3 veces), y secados al vacío a temperatura ambiente para proporcionar el producto deseado. (26.4 g, 63%). ¹H NMR (500.333 MHz, CDCl₃) δ 8.51 (bs, 1H), 7.86 (dd, J = 9.4, 5.2 Hz, 1H), 7.50 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 9.2, 1H), 6.66 (dd, J = 8.2, 2.3 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.44 (q, J = 6.7 Hz, 2H), 1.64 (sexteto, J = 7.3 Hz, 2H), 0.99 (t, J = 7.4 Hz, 3H). MS APCI, m/z = 385 (M+H). HPLC: 2.61 min.

4-Amino-7-fluoro-8-yodo-N-propilcinnolina-3-carboxamida

- 30 A un matraz de 3 cuellos de 1L equipado con un agitador mecánico cargado con (2E)-2-ciano-2-[(3-fluoro-2-yodofenil)hidrazono]-N-propilacetamida (43.9 g, 117 mmol) en tolueno anhidro (Aldrich, 600 mL) bajo N₂ fue añadido cloruro de aluminio en forma de porciones (Aldrich, 46.8 g, 352 mmol) durante 20 minutos. La mezcla fue calentada hasta 60°C con agitación vigorosa durante 2 horas luego enfriada hasta ~15°C. Etil acetato (30 mL) fue cuidadosamente añadido mientras se mantiene la temperatura interna entre 20–25°C. Etil acetato adicional (900 mL) fue luego añadido, seguido por la adición cuidadosa de sal de Rochelle (tratado de sodio potasio acuoso saturado, 500 mL). Después de la adición de los primeros 50 mL, la temperatura se elevó desde 20 hasta 36°C. La reacción fue calentada con agitación a 60°C durante 30 minutos. La capa acuosa contenía un precipitado blanco grueso y la capa orgánica solubilizó lentamente el sólido amarillo parduzco. (Nota: Si un sólido no blanco (marrón/amarillo) todavía existía en la interfase acuosa/orgánica, la extracción caliente era repetida). La mezcla fue colocada en un embudo de decantación y la capa acuosa fue eliminada. La capa orgánica fue lavada con sal de Rochelle (500 mL), lavada con salmuera, secada sobre sulfato de magnesio, filtrada y concentrada para dar 38 g del producto ligeramente crudo (86.5%). Purificación adicional por trituración con etil acetato/hexanos fue llevada a cabo cuando fue apropiado. Una muestra analíticamente pura fue obtenida por recristalización a partir de etil acetato. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.54 (br, 1H), 7.84 (dd, J = 5.3, 9.2 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 7.0, 9.2 Hz, 1H), 3.47 (aparente q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.68 (aparente sexteto, J = 7.0 Hz, 2H), 1.03 (t, J = 7.4 Hz, 3H). MS APCI, m/z = 375 (M+H). HPLC 2.13 min.

(2E)-2-Ciano-2-[(3-fluoro-2-yodofenil)hidrazono]-N-propilacetamida

- 50 Usando el procedimiento esbozado en la patente US 4,886,800 ejemplo 89b sustituyendo 3-fluoro-2-yodoanilina hidrocloreto (8.8 g, 32.5 mmol) por 2-yodoanilina, el compuesto del título (2E)-2-ciano-2-[(3-fluoro-2-yodofenil)hidrazono]-N-propilacetamida fue obtenido como un sólido marrón claro (8.5g, 70% de rendimiento). Una

muestra analíticamente pura fue obtenida por recristalización a partir de etil acetato como un sólido cristalino amarillo.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 14.39, (s, 1H), 8.67 (bm, 1H), 7.45 (m, 1H), 7.32 (m, 1H), 7.03 (m, 1H), 3.1 (aparente q, J = 6.6 Hz, 2H), 1.53 (aparente sexteto, J = 7.4 Hz, 2H), 0.88 (t, J = 7.4 Hz, 3H).

3-Fluoro-2-yodoanilina hidrocloreuro

A un matríz de fondo redondo de 3 cuellos de 1L equipado con un agitador mecánico fue añadido 3-fluoro-2-yodonitrobenzoceno (3B Medical, 47.7g, 179 mmol) y 500 mL etanol absoluto. A esta solución agitada fue añadido polvo de hierro (325 mesh, Aldrich, 30 g, 537 mmol) seguido por la adición en forma de gotas de HCL concentrado (30 mL, 360 mmol). La temperatura interna se elevó desde 23 hasta ~60°C durante la adición. El matríz fue equipado con una manta de calentamiento y calentado con agitación vigorosa durante 90 minutos. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, 1 N Na₂CO₃ (300 mL) fue añadido seguido por EtOAc (200 mL). La mezcla fue agitada durante 30 minutos y luego filtrada a través de una almohadilla de celita. La celita fue lavada con EtOAc (3 x 150 mL). Los filtrados fueron colocados en un embudo de decantación y la capa de agua fue eliminada. La capa orgánica fue concentrada bajo presión reducida para reducir el volumen hasta ~200 mL, colocada en un embudo de decantación, diluida con EtOAc (400 mL), lavado el producto orgánico con salmuera, secado sobre sulfato de sodio, filtrado y concentrado hasta secarse. El producto crudo fue tomado en éter (300 mL) y se hizo ácido hasta pH 1 con 2M HCl/éter (Aldrich). Después de 1 hora, el sólido canela fue aislado por filtración (39.2 g, 80%). Las capas acuosas anteriores fueron extraídas con dietil éter (300 mL), secadas sobre sulfato de sodio, combinadas con el filtrado de la 1ra cosecha, se hicieron ácidas hasta pH 1, y aisladas como anteriormente para dar un sólido canela adicional (9.0 g, 18%) para un rendimiento total de 98%. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.06 (m, 1H), 6.58 (m, 1H), 6.39 (m, 1H), 5.73 (bm, 1H). MS APCI, m/z = 238 (M+H). HPLC 2.19min.

Se encontró que el compuesto del título puede formar atropisómeros aislables en ciertos solventes orgánicos (por ejemplo 25–35% metanol) a temperatura ambiente. Los dos atropisómeros del compuesto del título pueden ser aislados usando LC quiral. Sin embargo, estos isómeros recemizarán rápidamente bajo soluciones neutrales o ácidas.

Método AA

Preparación de oocitos de Xenopus

Sapos *Xenopus laevis* (*Xenopus* I, Kalamazoo, MI) fueron anestesiados usando 0.15% tricaina. Lóbulos ováricos eliminados quirúrgicamente fueron extraídos cuidadosamente en solución OR2 (82 NaCl, 2.5 KCl, 5 HEPES, 1.5 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 0.1 EDTA, en mM, pH 7.4). Los oocitos fueron defoliculados por incubación en 25 mL OR2 que contiene 0.2% de colagenasa 1A (SIGMA) dos veces durante alrededor de 60 minutos sobre un agitador de plataforma y almacenados en medio de Leibovitz L-15. Los oocitos fueron inyectados el día siguiente en medio de Leibovitz L-15 0.5 X que contiene 50mg/ml de gentamicina, 10 unidades/ml penicilina, y 10mg/ml estreptomina.

Método BB

Preparación e inyección de ARNc

ARNc con capuchón a partir de los vectores linearizados que contienen subunidades α_1 , β_2 y γ_2 humanas de los genes del Receptor GABAA fueron mezclados en una relación de 1:1:30. Los oocitos fueron inyectados con 25–50 nL de ARN mezclado con una relación molar appx de α_1 , β_2 , y γ_2 como 1:1:10. Los registros de los oocitos fueron hechos 2–10 días después de la inyección. Los mismos métodos se aplican a los subtipos derivados de $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_3\beta_3\gamma_2$, y $\alpha_5\beta_3\gamma_2$, excepto para la relación 1:1:1 que fue usada para las subunidades α , β , y γ .

Método CC

Mediciones de Fijación de Voltaje con Dos Electrodos

Todas las mediciones fueron hechas en un medio que contiene ND-96 (96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂·2H₂O, 1 MgCl₂·6H₂O, 5 HEPES, en mM, pH 7.5). El registro de la fijación de voltaje con dos electrodos fue llevado a cabo usando el amplificador OpusXpress (Axon Instruments, Foster City, CA), que permite el registro simultáneo desde 8 oocitos. Los oocitos fueron empalados con dos electrodos de resistencia de punta de 1–2 M Ω cuando están llenos con 3M KCl. Los registros fueron iniciados cuando el potencial de membrana se hizo estable a potenciales negativos hasta –50– –60mV. El potencial de membrana fue mantenido a –60mV. Las corrientes de fuga típicamente estaban entre 0–40 nA, y de manera extraña si algunas células tenían verdaderamente una fuga relativamente alta (>100 nA) estas un fueron usadas. Para la determinación de GABA EC10, una serie de pulsos de 30 s con concentraciones crecientes de GABA fueron aplicados a las células cada 5 minutos. Después de calcular EC10 para GABA para cada oocito, una serie de pulsos de GABA de 30 s fueron aplicados a intervalos de 5 minutos, con dosis incrementadas del modulador. La concentración de GABA correspondió al valor de EC10 calculada para cada oocito. Los pulsos del modulador comenzaron 30 s antes que el pulso de GABA de manera que permita la preincubación con el modulador. Un conjunto de 3 pulsos con solamente GABA sin modulador fue dado antes de los pulsos que contienen el modulador para definir la respuesta de GABA de línea base. Dos oocitos por cada

experimento fueron dedicados a observar el efecto del diazepam en la respuesta de GABA para garantizar la presencia de la subunidad γ_2 en el complejo pentamérico de GABAA, el cual imparte a los complejos sensibilidad al diazepam.

5 Método DD Cálculo de la amplitud de la corriente y ajuste de curvas

La amplitud de la corriente (i) fue medida desde la línea base hasta el pico usando Clampfit (Axon Inst., Foster City, CA). La potenciación fue calculada como el cambio en por ciento a partir del flujo de corriente de GABA de la línea base $100 \times (i_{\text{mod}}/i_{\text{control}}) - 1$ donde i_{mod} = corriente mediada por el modulador + GABA e i_{control} = corriente mediada por GABA solo. Un valor de 100% de potenciación significa que el modulador ha provocado que la corriente de control sea el doble. Similarmente, un valor de -50% de potenciación significa que la presencia del modulador provocó un decrecimiento del 50% en la corriente de control. Varios otros datos mostrados aquí fueron ajustados y trazados usando GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA). El porcentaje de potenciación fue convertido a potenciación relativa dividiéndola con el valor del porcentaje de potenciación que fue obtenido del mismo ensayo con el diazepam como un control.

Método EE Método de Unión al GABAA1

20 Reactivos

Ensayo y Buffer de Lavado: 50 mM Tris-Citrato, 200 mM NaCl, pH 7.8

Compuestos a 10mM en DMSO: Poner 75 μ l en la columnas 1 de la placa del compuesto.

Flumazenil, 10 mM (para NSB)

25 Membranas (α_1 , β_2 , γ_2 subunidades del receptor transfectadas en células Sf9 y recolectadas; preparadas por Cell Trends, almacenadas a -80°C). Sonicar las membranas descongeladas durante alrededor de 5-10 segundos al ajuste 3 en un sonicador Brinkman, luego diluir las membranas 1:71 en buffer de ensayo (conc. del trabajo = 100 ug/ml de proteínas). Mantener en hielo.

[³H]-Flunitrazepam (Cat #NET567): Preparar 10x solución madre = 30 nM, [F] en el ensayo = ~3 nM

Ensayo (*Ver a continuación los Programas de Automatización.*)

30 1. En PlateMate, preparar 1:3 diluciones en serie (30 μ l+60 μ l) en DMSO para concentraciones finales del ensayo de 10 μ M hasta 170pM (Programas de Automatización 1 y 2). Añadir 5 μ l de 30 μ M flumazenil a los pocillos 12 D-E para 50% pocillos de control.

2. Teñir 2 μ l de las diluciones del compuesto en una placa seca (Programa de Automatización 3). Teñir manualmente 2 μ l de 10 mM flumazenil en los pocillos 12 F-H para un control no específico.

35 3. Hacer 1:100 dilución en buffer de ensayo (2 μ l en 200 μ l) y dispensar 25 μ l compuesto en las placas de ensayo (Programa de Automatización 4).

4. Dispensar 200 μ l de membranas en la placa de ensayo (Programa de Automatización 5).

5. Añadir 25 μ l [³H]-Flunitrazepam (Programa de Automatización 6). Incubar durante 1hr a 4°C.

40 6. Recolectar las membranas en un recolector de células sobre placas filtro GF/B (presecar con dH₂O y lavar 5x 400 μ l/pocillo, con buffer de ensayo frío. (Los primeros 3 lavados son considerados calientes, los últimos dos fríos.)

7. Secar las placas durante 2-3 horas a TA.

8. Añadir 40 μ l de Microscint 40/pocillo (Programa de Automatización 7); sellar las placas. Contar en un TopCount.

45 Programas de Automatización

1. Usando *PlateMate* añadir 60ul de DMSO para diluciones 96p: 96/300ul cabeza, 5516 puntas en las columnas 2-12, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A, el depósito de DMSO en la etapa 2

2. Usando *PlateMate* diluir-11pt un tercio de GABAA: 96/300ul cabeza, 5516 puntas en la columna 1 del cargador de diluciones en serie, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A

50 3. Usando *PlateMate* adición 2 ul del compuesto secar lavar de nuevo: 96/30ul cabeza, 5506 puntas, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A, la placa de dilución en el apilador derecho A, 100% DMSO en el depósito en la etapa 2, se debe cambiar a DMSO fresco cada 4-6 placas.

4. Usando *PlateMate* verter camb mezcla y disp 25 ul en la placa de ensayo 96p: 96/300ul cabeza, 5516 puntas, la placa de dilución en el apilador izquierdo A, placas de ensayo en el apilador derecho A, autollenar el depósito del buffer de ensayo en la etapa 2, se necesita cambiar las puntas después de cada placa.

55 5. Usando *PlateMate* añadir 200ul de membranas 96p: 96/300ul cabeza, 5516 puntas, placas de ensayo en el apilador izquierdo A, el depósito de membranas en la etapa 2.

6. Usando *RapidPlate* añadir 25ul caliente (número de placas): 100 μ l (caja amarilla) puntas en la posición 1, depósito caliente en la posición 2, placas comenzando en la posición 3

60 7. Usando *RapidPlate* añadir microscint 40ul (número de placas): 200 μ l (caja burdeo) puntas en la posición 1, el depósito de Microscint 40 en la posición 2, placas comenzando en la posición 3.

Análisis de los Datos

Los datos son analizados calculando el por ciento de control, IC₅₀, y Ki en un patrón XLfit. La siguiente fórmula es usada en los patrones:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [\text{ligando}]/K_D}$$

Método FF**GABAA2 Método de Unión**5 **Reactivos**

Ensayo y Buffer de lavado: 50 mM Tris–Citrato, 200 mM NaCl, pH 7.8

Compuestos a 10mM en DMSO: Poner 75µl en la columna 1 de la paca del compuesto.

Flumazenil, 10 mM (para NSB)

10 Membranas (α2,β3,γ2 subunidades del receptor transfectadas en células Sf9 y recolectadas; preparadas por Paragon a 12.5 mg/ml, almacenadas a –80°C). Sonicar las membranas descongeladas durante alrededor de 5–10 segundos al ajuste 3 en un sonicador Brinkman, luego diluir las membranas 1:50 en buffer de ensayo (conc. del trabajo = 250 ug/ml de proteínas). Mantener en hielo.

[³H]–Flunitrazepam (Cat #NET567): Preparar 10x solución madre = 20 nM, [F] en el ensayo = ~2 nM
Ensayo (Ver a continuación los Programas de Automatización.)

15 1. En PlateMate, preparar 1:3 diluciones en serie (30µl+60µl) en DMSO para concentraciones finales del ensayo de 10µM hasta 170pM (Programas de Automatización 1 y 2). Añadir 5 ul de 30 uM flumazenil a los pocillos 12 D–E para 50% pocillos de control.

2. Teñir 2µl de las diluciones del compuesto en una placa seca (Programa de Automatización 3). Teñir manualmente 2µl 10 mM flumazenil en los pocillos 12 F–H para un control no específico.

20 3. Hacer 1:100 dilución en buffer de ensayo (2µl en 200µl) y dispensar 25µl compuesto en las placas de ensayo (Programa de Automatización 4).

4. Dispensar 200µl membranas en la placa de ensayo (Programa de Automatización 5).

5. Añadir 25µl [³H]–Flunitrazepam (Programa de Automatización 6). Incubar durante 1hr a 4°C.

25 6. Recolectar membranas en un recolector de células sobre placas filtro GF/B (presecar con dH₂O y lavar 5x 400µl/pocillo, con buffer de ensayo frío. (Los primeros 3 lavados son considerados calientes, los últimos dos fríos.)

7. Secar las placas durante 2–3 horas a TA.

8. Añadir 40µl Microscint 40/pocillo (Programa de Automatización 7); sellar las placas. Contar en un TopCount.

30 **Programas de Automatización**

1. Usando *PlateMate* añadir 60ul de DMSO para diluciones 96p: 96/300ul cabeza, 5516 puntas en las columnas 2–12, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A, el depósito de DMSO en la etapa 2.

2. Usando *PlateMate* diluir–11pt un tercio de GABAA: 96/300ul cabeza, 5516 puntas en la columna 1 del cargador de diluciones en serie, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A.

35 3. Usando *PlateMate* adición de 2 ul del compuesto secar lavar de nuevo: 96/300ul cabeza, 5506 puntas, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A, la placa de dilución en el apilador derecho A, 100% DMSO en el depósito en la etapa 2, se debe cambiar a DMSO fresco cada 4–6 placas.

4. Usando *PlateMate* verter camb mezcla y disp 25 ul en la placa de ensayo 96p: 96/300ul cabeza, 5516 puntas, la placa de dilución en el apilador izquierdo A, placas de ensayo en el apilador derecho A, autollenar el depósito del buffer de ensayo en la etapa 2, se necesita cambiar las puntas después de cada placa.

40 5. Usando *PlateMate* añadir 200ul de membranas 96p: 96/300ul cabeza, 5516 puntas, placas de ensayo en el apilador izquierdo A, el depósito de membranas en la etapa 2.

6. Usando *RapidPlate* añadir 25ul caliente (número de placas): 100µl (caja amarilla) puntas en la posición 1, depósito caliente en la posición 2, placas comenzando en la posición 3.

45 7. Usando *RapidPlate* añadir microscint 40ul (número de placas): 200µl (caja burdeo) puntas en la posición 1, el depósito de Microscint 40 en la posición 2, placas comenzando en la posición 3.

Análisis de los Datos

Los datos son analizados calculando el por ciento de control, IC₅₀, y K_i en un patrón XLfit. La siguiente fórmula es usada en los patrones:

$$50 \quad K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [\text{ligando}]/K_D}$$

Método GG**GABAA3 Método de Unión**55 **Reactivos**

Ensayo y Buffer de lavado: 50 mM Tris–Citrato, 200 mM NaCl, pH 7.8

Compuestos a 10mM en DMSO: Poner 75 ul en la columna 1 de la paca del compuesto.

Flumazenil, 10 mM (para NSB)

60 Membranas (α3, β3, γ2 subunidades del receptor transfectadas en células Sf9 y recolectadas; preparadas por Cell Trends, almacenadas a –80°C). Sonicar las membranas descongeladas durante alrededor de 5–10 segundos al ajuste 3 en un sonicador Brinkman, luego diluir las membranas 1:125 para hacer una solución de 200 ug/mL en buffer de ensayo. Mantener en hielo.

[³H]–Flunitrazepam (Cat #NET567): Preparar 10x solución madre = 30 nM, [F] en el ensayo = ~3 nM
Ensayo (Ver a continuación los Programas de Automatización.)

1. En PlateMate, preparar 1:3 diluciones en serie (30µl+60µl) en DMSO para concentraciones finales del ensayo de 10µM hasta 170pM (Programas de Automatización 1 y 2). Añadir 5 µl de 30 µM flumazenil a los pocillos 12 D–E para 50% pocillos de control.

5 2. Teñir 2µl de diluciones del compuesto en una placa seca (Programa de Automatización 3). Teñir manualmente 2 µl 10 mM flumazenil en los pocillos 12 F–H para un control no específico.

3. Hacer 1:100 dilución en buffer de ensayo (2 µl en 200 µl) y dispensar 25 µl compuesto en las placas de ensayo (Programa de Automatización 4).

4. Dispensar 200µl membranas en la placa de ensayo (Programa de Automatización 5).

5. Añadir 25µl [³H]–Flunitrazepam (Programa de Automatización 6). Incubar durante 1hr a 4°C.

10 6. Recolectar membranas en un recolector de células sobre placas filtro GF/B (presecar con dH₂O y lavar 5x 400 µl/pocillo, con buffer de ensayo frío. (Los primeros 3 lavados son considerados calientes, los últimos dos fríos.)

7. Secar las placas durante 2–3 horas a TA.

15 8. Añadir 40 µl Microscint 40/pocillo (Programa de Automatización 7); sellar las placas. Contar en un TopCount.

Programas de Automatización

1. Usando *PlateMate* añadir 60 µl DMSO para diluciones 96p: 96/300 µl cabeza, 5516 puntas en las columnas 2–12, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A, el depósito de DMSO en la etapa 2.

20 2. Usando *PlateMate* diluir–11pt un tercio de GABAA: 96/300 µl cabeza, 5516 puntas en la columna 1 del cargador de diluciones en serie, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A.

3. Usando *PlateMate* adición de 2µl del compuesto secar lavar de nuevo: 96/30 µl cabeza, 5506 puntas, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A, la placa de dilución en el apilador derecho A, 100% DMSO en el depósito en la etapa 2, se debe cambiar a DMSO fresco cada 4–6 placas.

25 4. Usando *PlateMate* verter camb mezcla y disp 25 µl en la placa de ensayo 96p: 96/300 µl cabeza, 5516 puntas, la placa de dilución en el apilador izquierdo A, placas de ensayo en el apilador derecho A, autollenar el depósito del buffer de ensayo en la etapa 2, se necesita cambiar las puntas después de cada placa.

5. Usando *PlateMate* añadir 200 µl de membranas 96p: 96/300 µl cabeza, 5516 puntas, placas de ensayo en el apilador izquierdo A, el depósito de membranas en la etapa 2.

30 6. Usando *RapidPlate* añadir 25 µl caliente (número de placas): 100 µl (caja amarilla) puntas en la posición 1, depósito caliente en la posición 2, placas comenzando en la posición 3.

7. Usando *RapidPlate* añadir microscint 40 µl (número de placas): 200 µl (caja burdeo) puntas en la posición 1, el depósito de Microscint 40 en la posición 2, placas comenzando en la posición 3.

Análisis de los Datos

35 Los datos son analizados calculando el por ciento de control, IC₅₀, y K_i en un patrón XLfit. La siguiente fórmula es usada en los patrones:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [ligando]/K_D}$$

Método HH

Método de Unión al GABA_A5

Reactivos

Ensayo y Buffer de lavado: 50 mM Tris–Citrato, 200 mM NaCl, pH 7.8

Compuestos a 10mM en DMSO: Poner 75µl en la columna 1 de la paca del compuesto.

Flumazenil, 10 mM (para NSB)

45 Membranas (α5, β3, γ2 subunidades del receptor transfectadas en células Sf9 y recolectadas; preparadas por Cell Trends, almacenadas a –80°C). Sonicar las membranas descongeladas durante alrededor de 5–10 segundos al ajuste 3 en un sonicador Brinkman, luego diluir las membranas 1:31 en buffer de ensayo (conc. del trabajo = 500 ug/ml de proteínas). Mantener en hielo.

[³H]–Flunitrazepam (Cat #NET567): Preparar 10x solución madre = 20 nM, [F] en el ensayo = ~2 nM

50 *Ensayo (Ver a continuación los Programas de Automatización.)*

1. En PlateMate, preparar 1:3 diluciones en serie (30µl+60µl) en DMSO para concentraciones finales del ensayo de 10µM hasta 170pM (Programas de Automatización 1 y 2). Añadir 5 ul de 30 uM flumazenil a los pocillos 12 D–E para 50% pocillos de control.

55 2. Teñir 2µl de diluciones del compuesto en una placa seca (Programa de Automatización 3). Teñir manualmente 2µl 10 mM flumazenil en los pocillos 12 F–H para un control no específico.

3. Hacer 1:100 dilución en buffer de ensayo (2µl en 200µl) y dispensar 25µl compuesto en las placas de ensayo (Programa de Automatización 4).

4. Dispensar 200µl membranas en la placa de ensayo (Programa de Automatización 5).

5. Añadir 25µl [³H]–Flunitrazepam (Programa de Automatización 6). Incubar durante 1hr a 4°C.

60 6. Recolectar membranas en un recolector de células sobre placas filtro GF/B (presecar con dH₂O y lavar 5x 400µl/pocillo, con buffer de ensayo frío. (Los primeros 3 lavados son considerados calientes, los últimos dos fríos.)

7. Secar las placas durante 2–3 horas a TA.

65 8. Añadir 40µl Microscint 40/pocillo (Programa de Automatización 7); sellar las placas. Contar en un TopCount.

Programas de Automatización

1. Usando *PlateMate* añadir 60ul de DMSO para diluciones 96p: 96/300ul cabeza, 5516 puntas en las columnas 2–12, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A, el depósito de DMSO en la etapa 2.

5 2. Usando *PlateMate* diluir–11pt un tercio de GABAA: 96/300ul cabeza, 5516 puntas en la columna 1 del cargador de diluciones en serie, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A.

3. Usando *PlateMate* adición de 2 ul del compuesto secar lavar de nuevo: 96/30ul cabeza, 5506 puntas, la placa del compuesto en el apilador izquierdo A, la placa de dilución en el apilador derecho A, 100% DMSO en el depósito en la etapa 2, se debe cambiar a DMSO fresco cada 4–6 placas.

10 4. Usando *PlateMate* verter camb mezcla y disp 25 ul en la placa de ensayo 96p: 96/300ul cabeza, 5516 puntas, la placa de dilución en el apilador izquierdo A, la placas de ensayo en el apilador derecho A, autollenar el depósito del buffer de ensayo en la etapa 2, se necesita cambiar las puntas después de cada placa.

5. Usando *PlateMate* añadir 200ul de membranas 96p: 96/300ul cabeza, 5516 puntas, placas de ensayo en el apilador izquierdo A, el depósito de membranas en la etapa 2.

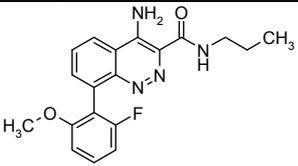
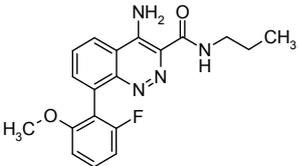
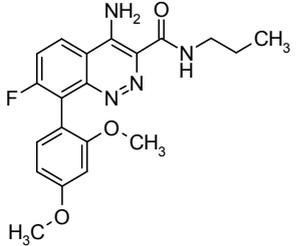
15 6. Usando *RapidPlate* añadir 25ul caliente (número de placas): 100µl (caja amarilla) puntas en la posición 1, depósito caliente en la posición 2, placas comenzando en la posición 3.

7. Usando *RapidPlate* añadir microscint 40ul (número de placas): 200µl (caja burdeo) puntas en la posición 1, el depósito de Microscint 40 en la posición 2, placas comenzando en la posición 3.

Análisis de los Datos

20 Los datos son analizados calculando el por ciento de control, IC50, y Ki en un patrón XLfit. La siguiente fórmula es usada en los patrones:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + [ligando]/K_D}$$

Compuesto	Ki de la unión GABAA2 (M)	Potenciación relativa para GABAA1	Potenciación relativa para GABAA2
 <p>ISÓMERO 2</p>	1.44E-10	-0.015	0.15
	2.66E-10	-0.008	0.18
	4.03E-10	0.063	0.13

25

Método II

Ensayo MT1 GTP³⁵S-SPA

Estándares de validación de pruebas

30

2–Yodometatonin y 6–Clorometatonin con actividades conocidas fueron usados como estándar de validación durante el desarrollo del ensayo. La EC50 de 2–Yodometatonin y 6–Clorometatonin fueron $\sim 3E-11$ M y $\sim 1.5E-10$ M respectivamente en el ensayo GTP γ S de las membranas de células recombinantes hMT1.

5 Células y/o microorganismos

HEK293F (línea celular flotante 293 del riñón embrionario humano) fue cultivada por suspensión en un Medio de Expresión Free Stile 293, y expandida en casa y almacenada en nitrógeno líquido en un medio de congelación de células.

10 Buffers, Soluciones, Medio de Células

Buffer de Ensayo Lazareno GTPγS		Hacer 2 Litros de Buffer
20 mM HEPES	Sigma H-4034, FW 238.3	9.532 g
100 mM NaCl	Sigma S-9625, FW 58.44	11.688 g
10 mM MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma M-2670, FW 203.3	4.066 g
pH 7.4		Ajustar con NaOH
Buffer de Preparación de Membranas		Hacer 2 Litros de Buffer
20 mM HEPES	Sigma H-4034, FW 238.3	9.532 g
3 mM MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma M-2670, FW 203.3	1.220 g
1 mM EGTA	Sigma E-3889, FW 380.4	0.761 g
pH 7.4		Ajustar con NaOH

15 Preparación de los compuestos de prueba

Los compuestos de prueba fueron sintetizados en casa. Los compuestos sólidos fueron solubilizados a 10mM en DMSO; luego 1:3 adicionalmente diluidos en DMSO en placas de 96 pocillos con fondo en forma de U usando PlateMate en el día del ensayo. 2 μ l de los compuestos diluidos fueron transferidos a placas de ensayo Opti.

20 Preparación de los compuestos de referencia

El compuesto de referencia, 2–Yodometatonin, fue preparado de la misma forma que el compuesto de prueba.

Compuestos usados para normalizar los resultados experimentales

2–Yodometatonin para la normalización fue diluido en DMSO a una concentración de 50x3 nM (su concentración EC100 = 3 nM). 2 μ l de 150nM 2–Yodometatonin fueron luego transferidos a placas de ensayo Opti.

25 Líneas celulares y microorganismos

Células HEK293F (línea celular flotante 293 del riñón embrionario humano) que transitoriamente expresaron el receptor 1 de la Melatonina humana (MT1) fueron cosechadas 48 horas posterior a la transfección. Los pellets celulares fueron homogeneizados usando Polytron; y las membranas celulares fueron preparadas del ensayo GTP γ S.

Preparación de proteínas/membranas que contienen la diana

Los pellets celulares fueron homogeneizados con Polytron en buffer helado: 20mM HEPES, 3mM MgCl₂, 1mM EGTA, pH7.4. (Añadir tabletas frescas del cóctel inhibidor de la proteasa de Roche). Las muestras fueron centrifugadas a 18,500 rpm durante 30mins a 4°C en un rotor Sorvall SS–34. Los pellets de membranas fueron recogidos y lavados con buffer helado. Las muestras fueron centrifugadas a 18,500 rpm durante 30mins a 4°C nuevamente. Las membranas fueron resuspendidas en buffer helado con los inhibidores de la proteasa. La concentración de las proteínas de la membrana fue determinada. Las membranas fueron tomadas en alícuotas y almacenadas a –80°C.

40 Método de prueba

Formato de las placas (si son usadas placas, como es mostrado en la tabla a continuación)

* Números denotan “Compuesto #, Dilución #, Replicado #”

*La dirección de las placas se mueve desde la concentración más alta hasta la concentración más baja.

Número de compuestos por placa: 8

Número de replicados por compuesto: 1

Número de diluciones por compuesto: 11

Placa de Prueba: DR96_02_C12[LR.1]

ES 2 391 472 T3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1,1,1	1,2,1	1,3,1	1,4,1	1,5,1	1,6,1	1,7,1	1,8,1	1,9,1	1,10,1	1,11,1	MAX
B	2,1,1	2,2,1	2,3,1	2,4,1	2,5,1	2,6,1	2,7,1	2,8,1	2,9,1	2,10,1	2,11,1	MAX
C	3,1,1	3,2,1	3,3,1	3,4,1	3,5,1	3,6,1	3,7,1	3,8,1	3,9,1	3,10,1	3,11,1	MAX
D	4,1,1	4,2,1	4,3,1	4,4,1	4,5,1	4,6,1	4,7,1	4,8,1	4,9,1	4,10,1	4,11,1	MAX
E	5,1,1	5,2,1	5,3,1	5,4,1	5,5,1	5,6,1	5,7,1	5,8,1	5,9,1	5,10,1	5,11,1	MIN
F	6,1,1	6,2,1	6,3,1	6,4,1	6,5,1	6,6,1	6,7,1	6,8,1	6,9,1	6,10,1	6,11,1	MIN
G	7,1,1	7,2,1	7,3,1	7,4,1	7,5,1	7,6,1	7,7,1	7,8,1	7,9,1	7,10,1	7,11,1	MIN
H	8,1,1	8,2,1	8,3,1	8,4,1	8,5,1	8,6,1	8,7,1	8,8,1	8,9,1	8,10,1	8,11,1	MIN

Respuesta MAX (efecto 100%) fue determinada como el efecto de 3 nM de 2-Yodometatonin.

Respuesta MIN (efecto 0% efecto) fue determinada como el efecto del vehículo control.

5

Descripción del procedimiento experimental

10 La membrana MT1 humana /HEK293F (10 µg/pocillo) fue mezclada con perlas WGA-SPA (300 µg/pocillo) y GDP (10 µM) en cierto volumen de buffer de ensayo Lazareno (20mM HEPES, 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, pH7.4). La membrana combo fue mantenida en hielo durante 30-60 mins. Los compuestos de prueba fueron 1:3 diluidos en DMSO a partir de 10mM solución madre, y transferidos 2 µl de los compuestos diluido a placas de ensayo de 96 Opti usando PlateMate. GTPγ³⁵S fue añadido a la mezcla de la membrana antes de dispensar 100 µl de la membrana combo a las placas de ensayo de 96. La concentración final de GTPγ³⁵S fue 200 pM. Las placas de ensayo estuvieron agitándose en un agitador de placas durante 1.5 horas a temperatura ambiente. Las placas de ensayo fueron rotadas a 2000rpm durante 5 mins en una centrifuga del banco de trabajo. Las placas de ensayo fueron medidas en el TopCount para capturar los datos durante 4 horas.

15

Resumen de diferentes condiciones experimentales (el papel de varios tipos de resultados)

20 Concentraciones finales de los constituyentes
 10 µg/pocillo membranas hMT1/HEK293F
 300 µg/pocillo perlasWGA-SPA
 10 µM GDP
 200 pM GTPγ³⁵S
 25 10 µM Concentración inicial del compuesto de prueba
 2% DMSO
 20mM HEPES
 100mM NaCl
 10mM MgCl₂
 30 pH7.4

Tratamientos usados en diferentes condiciones experimentales

35 Los compuestos de prueba serían calentados hasta 65°C si no fueron solubles a 10 mM en DMSO. La concentración inicial en general fue 10 µM, pero pudo ser ajustada en base a su potencia. Cada lote individual de membranas tenía que ser validado para sus condiciones óptimas de ensayo, tal como, definir la concentración optima de GDP, cantidad de perlas SPA y concentración EC100 del compuesto de normalización.

40 Cálculo de los resultados

Los compuestos fueron evaluados para su eficacia (Emax) y potencia (EC50) agonista. Las curvas de respuesta a la concentración fueron analizadas para determinar la EC50 mediante el ActivityBase usando el modelo de ecuación #205. El % de actividad de los compuestos fue calculado de acuerdo a actividades al 100% y 0% definidas en la misma placa como los datos de la muestra. Los pocillos A12 - C12 fueron usados para definir la actividad al 100%, y D12 - G12 durante la actividad al 0%. Más detalles pueden ser encontrados del Formato de las Placan anterior.

45

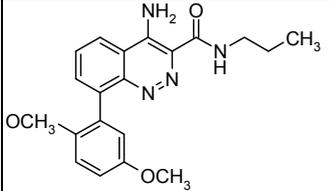
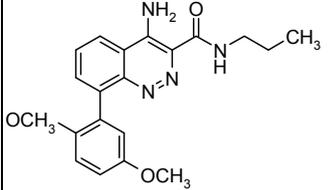
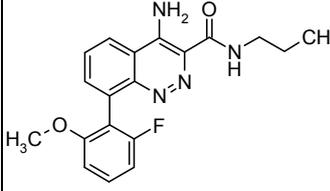
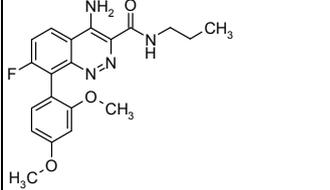
Resultados (variables dependientes, mediciones dependientes) y Su Método de Cálculo

50 Los valores sin procesar para los replicados en la condición experimental de Control Mínimo fueron promediados. Los valores sin procesar para los replicados en la condición experimental de Control Máximo fueron promediados. El Control Mínimo promedio fue sustraído del Control Máximo promedio resultando en el Data Window. El Control Mínimo promedio fue sustraído de cada uno de los valores sin procesar en la condición experimental por datos de los compuesto resultando en la Respuesta Especifica para cada valor de los datos en la condición por datos de los compuestos. Cada Respuesta Especifica en la condición por datos de los compuestos fue dividida por el Data Window y luego multiplicada por 100 resultando en el por ciento de Respuesta. La EC50 y SlopeFactor fueron

55

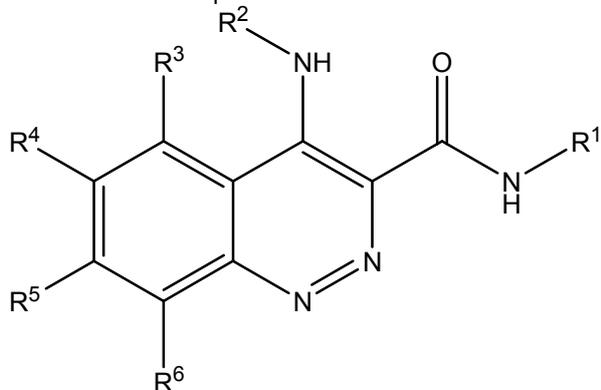
determinadas ajustando el por ciento de inhibición y las concentraciones del compuesto de prueba al modelo 205 en XLfit $y = A + ((B-A)/(1+(C/x)^D))$ con el parámetro A restringido a 0 y el parámetro B restringido a 100.

5. Ciertos compuestos de la invención han sido analizados usando el ensayo anteriormente identificado (Método II). Los resultados son mostrados en la siguiente tabla.

	Receptor MT1			
	Unión		GTPγS	
	% Inhibición a 1 μM	Ki (M)	EC50 (M)	E _{max}
	86	6.00E-08	3.75E-08	100
	91	3.6E-08	2.67E-08	61
	89	4.9E-08	3.43E-08	60
	88	9.0E-08	1.55E-08	54

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula I:



5 I
seleccionado de:

4-Amino-8-(2,5-dimetoxifenil)-N-propil-cinnolina-3-carboxamida; 4-Amino-8-(2,4-dimetoxifenil)-7-fluoro-N-propilcinnolina-3-carboxamida; y 4-Amino-8-(2-fluoro-6-metoxi-fenil)-N-propilcinnolina-3-carboxamida; o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

10 2. Un compuesto de fórmula I como el reivindicado en la reivindicación 1 que es 4-Amino-8-(2,5-dimetoxifenil)-N-propil-cinnolina-3-carboxamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

15 3. Un compuesto de fórmula I como el reivindicado en la reivindicación 1 que es 4-Amino-8-(2-fluoro-6-metoxi-fenil)-N-propilcinnolina-3-carboxamida, o sales farmacéuticamente aceptables de la misma.

4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

20 5. Un compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso como un medicamento.

6. Un compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en el tratamiento del trastorno de ansiedad.

25 7. Un compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en el tratamiento del trastorno cognitivo.

30 8. El compuesto para el uso de acuerdo a la reivindicación 7 donde el trastorno cognitivo es la enfermedad de Alzheimer, demencia, demencia debido a la enfermedad de Alzheimer, o demencia debido a la enfermedad de Parkinson.

9. Un compuesto de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para el uso en el tratamiento del trastorno del estado de ánimo.

35 10. El compuesto para el uso de acuerdo a la reivindicación 9 donde el trastorno del estado de ánimo es un trastorno depresivo.