

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 503 465**

51 Int. Cl.:

C07D 453/02 (2006.01)
A61K 31/439 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
A61P 25/02 (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)
A61P 25/06 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2010 E 10701307 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 2389378**

54 Título: **Preparación y aplicaciones terapéuticas de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-di-fluorobenzamida**

30 Prioridad:

26.01.2009 US 147260 P

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

06.10.2014

73 Titular/es:

**TARGACEPT, INC. (100.0%)
100 North Main Street, Suite 1510
Winston-Salem, NC 27101, US**

72 Inventor/es:

**BENCHERIF, MEROUANE;
FEDOROV, NIKOLAI;
HAUSER, TERRY;
JORDAN, KRISTEN;
LETCHWORTH, SHARON RAE;
MAZUROV, ANATOLY;
MUNOZ, JULIO A.;
SPEAKE, JASON y
YOHANNES, DANIEL**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 503 465 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

Preparación y aplicaciones terapéuticas de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida.

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos que se unen con y modulan la actividad de receptores nicotínicos neuronales de acetilcolina, a procesos para preparar estos compuestos, a composiciones farmacéuticas que contienen estos compuestos y a compuestos de la presente invención para su uso en el tratamiento de una amplia diversidad de afecciones y trastornos, incluyendo los asociados con la disfunción del sistema nervioso central (SNC).

10

Antecedentes de la invención

El potencial terapéutico de compuestos que se dirigen a receptores nicotínicos neuronales (NNR), también conocidos como receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR), ha sido objeto de varias revisiones (véase, por ejemplo, Breining *et al.*, Ann. Rep. Med. Chem. 40: 3 (2005), Hogg y Bertrand, Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 3: 123 (2004), Suto y Zacharias, Expert Opin. Ther. Targets 8: 61 (2004), Dani *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 14: 1837 (2004), Bencherif y Schmitt, Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 1: 349 (2002)). Entre los tipos de indicaciones para los que se han propuesto ligandos de NNR como terapias están los trastornos cognitivos, incluyendo enfermedad de Alzheimer, trastorno de déficit de atención y esquizofrenia (Newhouse *et al.*, Curr. Opin. Pharmacol. 4: 36 (2004), Levin y Rezvani, Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 1: 423 (2002), Graham *et al.*, Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 1: 387 (2002), Ripoll *et al.*, Curr. Med. Res. Opin. 20(7): 1057 (2004), y McEvoy y Allen, Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 1: 433 (2002)); dolor e inflamación (Decker *et al.*, Curr. Top. Med. Chem. 4(3): 369 (2004), Vincler, Expert Opin. Invest. Drugs 14(10): 1191 (2005), Jain, Curr. Opin. Inv. Drugs 5: 76 (2004), Miao *et al.*, Neuroscience 123: 777 (2004)); depresión y ansiedad (Shytle *et al.*, Mol. Psychiatry 7: 525 (2002), Damaj *et al.*, Mol. Pharmacol. 66: 675 (2004), Shytle *et al.*, Depress. Anxiety 16: 89 (2002)); neurodegeneración (O'Neill *et al.*, Curr. Drug Targets: CNS Neurol. Disord. 1: 399 (2002), Takata *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 306: 772 (2003), Marrero *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 309: 16 (2004)); enfermedad de Parkinson (Jonnala y Buccafusco, J. Neurosci. Res. 66: 565 (2001)); adicción (Dvoskin y Crooks, Biochem. Pharmacol. 63: 89 (2002), Coe *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett. 15(22): 4889 (2005)); obesidad (Li *et al.*, Curr. Top. Med. Chem. 3: 899 (2003)); y síndrome de Tourette (Sacco *et al.*, J. Psychopharmacol. 18(4): 457 (2004), Young *et al.*, Clin. Ther. 23(4): 532 (2001)).

15

20

25

30

35

40

Existe una distribución heterogénea de subtipos de nAChR en los sistemas nerviosos tanto central como periférico. Por ejemplo, los subtipos de nAChR que son predominantes en el cerebro de vertebrados son $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 7$ y $\alpha 3\beta 2$, mientras que los que predominan en los ganglios autónomos son $\alpha 3\beta 4$ y los de la unión neuromuscular son $\alpha 1\beta 1\delta\gamma$ y $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ (véase Dvoskin *et al.*, Exp. Opin. Ther. Patents 10: 1561 (2000) y Holliday *et al.* J. Med. Chem. 40(26), 4169 (1997)).

Una limitación de algunos compuestos nicotínicos es que están asociados con diversos efectos secundarios indeseables debido a la unión no específica con múltiples subtipos de nAChR. Por ejemplo, la unión con y estimulación de subtipos de nAChR musculares y ganglionares puede conducir a efectos secundarios que pueden limitar la utilidad de un compuesto de unión nicotínico particular como un agente terapéutico.

45

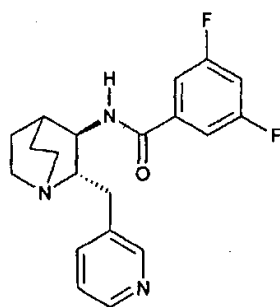
50

Los compuestos de la presente invención muestran un alto grado de unión específica con el subtipo de nAChR $\alpha 7$ y baja afinidad por el subtipo $\alpha 4\beta 2$ así como subtipos de nAChR ganglionares y musculares. Por lo tanto, estos compuestos pueden actuar como moduladores terapéuticos de nAChR $\alpha 7$ en pacientes que necesiten dicho tratamiento, sin producir efectos secundarios provocados por unión de subtipo de nAChR no específica.

Sumario de la invención

La presente invención incluye (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (Fórmula I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55



Fórmula I

5 El compuesto de la presente invención se une con alta afinidad con NNR del subtipo $\alpha 7$ y muestra selectividad por este subtipo frente al subtipo de NNR $\alpha 4\beta 2$, así como frente a los subtipos ganglionares y musculares.

10 La presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir una amplia diversidad de afecciones o trastornos, incluyendo los trastornos caracterizados por disfunción de la neurotransmisión colinérgica nicotínica o la degeneración de las neuronas colinérgicas nicotínicas.

15 La presente invención incluye compuestos de la presente invención para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos y disfunciones, tales como trastornos y disfunciones del SNC, inflamación, respuesta inflamatoria asociada con infección bacteriana y/o viral, dolor, síndrome metabólico, trastornos autoinmunitarios u otros trastornos descritos en más detalle en el presente documento. La presente invención incluye compuestos de la presente invención para su uso en la modulación de la neovascularización. El uso implica administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención, incluyendo una sal del mismo, o una composición farmacéutica que incluye dichos compuestos. Adicionalmente la presente invención incluye compuestos que tienen utilidad como agentes de diagnóstico y en estudios de unión con receptores como se describe en el presente documento.

20 Los anteriores y otros aspectos de la presente invención se explican en más detalle en la descripción y ejemplos detallados expuestos posteriormente.

25 Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** representa reconocimiento de nuevo objeto (NOR) frente a dosis para (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se observó un efecto estadísticamente significativo para dosis tan bajas como 0,1 mg/kg.

30 La **Figura 2** representa los datos usados para la determinación de la dosis eficaz mínima para reconocimiento de nuevo objeto (NOR) tras la administración de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se observó un efecto estadísticamente significativo para dosis tan bajas como 0,03 mg/kg.

35 La **Figura 3** representa reconocimiento de nuevo objeto (NOR) frente al tiempo después de la tercera administración de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se observó un efecto estadísticamente significativo para dosis hasta 6 horas después de la dosificación.

40 La **Figura 4** representa reconocimiento de nuevo objeto (NOR) frente al tiempo después de la tercera administración de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Se observó un efecto estadísticamente significativo para dosis hasta 18 horas después de la dosificación.

La **Figura 5** representa una respuesta a dosis para cada uno del Compuesto A y el Compuesto B con receptores nicotínicos $\alpha 7$.

45 La **Figura 6** representa la respuesta electrofisiológica a la aplicación conjunta de cada uno del Compuesto A y el Compuesto B con acetilcolina (Ach).

Las **Figuras 7A, 7B y 7C** representan la respuesta electrofisiológica para interacción del Compuesto A con Ach, con respecto a la activación del receptor nicotínico $\alpha 7$.

Las **Figuras 8A, 8B y 8C** representan la respuesta electrofisiológica para la interacción del Compuesto B con Ach, con respecto a la activación del receptor nicotínico $\alpha 7$.

50 La **Figura 9** es un patrón de difracción de rayos x para la sal de monoclóhidrato del Compuesto A.

La **Figura 10** es una estructura cristalina para la sal de monoclóhidrato del Compuesto A.

La **Figura 11** es una patrón de difracción de rayos x para la sal de hemi-galactarato del Compuesto A.

55 La **Figura 12** ilustra una superposición de seis (6) patrones de difracción de rayos x diferentes para sales de la exploración de sales para el Compuesto A.

La **Figura 13** ilustra los resultados de la evaluación de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en hiperalgesia térmica inducida por CFA. Se administraron sustancias de ensayo, morfina y vehículo cada uno por vía subcutánea a grupos de 8 ratas SD 24 horas después de la inyección de CFA. La hiperalgesia térmica se realizó antes de la inyección de CFA (pre-CFA) antes del tratamiento, y 1 hora después de la inyección SC. Se aplicó ANOVA de una vía seguido del ensayo de Dunnett para comparar entre los grupos de tratamiento y el grupo controlado por vehículo. Las diferencias se consideran significativas al nivel de *P<0,05.

La **Figura 14** ilustra los resultados de evaluación de Von Frey que indican que (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida es eficaz en la reducción del dolor de la neuropatía diabética a dosis de 1 mg/kg y 10 mg/kg en comparación con el grupo tratado con Vehículo.

La **Figura 15** ilustra la comparación del aumento de peso que es significativamente inferior en los ratones obesos tratados con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida ("Artículo de Ensayo-db"). Notablemente, los animales a los que se administró conjuntamente MLA con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida no consiguieron mostrar el aumento de peso reducido mostrado por las ratas obesas a las que se administró (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida solamente.

La **Figura 16** ilustra que el consumo de alimentos medio fue significativamente inferior en los ratones obesos tratados con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida ("Artículo de Ensayo-db") que en los controles obesos. El consumo de alimentos de los ratones delgados no se vio afectado por (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida ("Artículo de Ensayo-Db"). Los animales a los que se administró conjuntamente MLA con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida no consiguieron mostrar el consumo de alimentos medio diario reducido mostrado por las ratas obesas a las que se administró (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida solamente.

La **Figura 17** ilustra que (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida inhibió significativamente los niveles de glucosa en plasma en ayunas en ratones obesos ("Artículo de Ensayo-db"). Sin embargo, este efecto no se invirtió por la administración conjunta con MLA.

La **Figura 18** ilustra que (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida inhibió significativamente los niveles de HbA1c glucosilados en ratones obesos ("Artículo de Ensayo-db"). La reducción en HbA1c glucosilado por (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida se atenuó por la administración conjunta de MLA.

La **Figura 19** ilustra que (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida redujo significativamente la citocina proinflamatoria TNF alfa en ratones obesos ("Artículo de Ensayo-db"). Estos efectos se inhibieron por la administración conjunta del antagonista de alfa7 MLA.

La **Figura 20** ilustra que (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida dio como resultado niveles de triglicéridos significativamente inferiores en ratones obesos ("Artículo de Ensayo-db") en comparación con controles tratados con vehículo ("db"). La reducción de los triglicéridos por (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida no se vio atenuada por la administración conjunta de MLA.

La **Figura 21** ilustra el efecto de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en los % de cambios en la respuesta de Penh a la exposición a metacolina en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. Se administraron (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida y vehículo por vía subcutánea bid o se proporcionaron por vía intratraqueal qd durante 6 días consecutivos desde el día 21 al día 25 a los 30 minutos antes de la exposición a OVA y la última dosificación se administró a los 30 minutos antes de la provocación con MCh el día 26. Se determinaron los valores de Penh. Se aplicó ANOVA de una vía seguida de ensayo de Dunnett para comparación entre los vehículos inmunizados con OVA y otros grupos de tratamiento. *P<0,05 frente a control de vehículo-OVA.

La **Figura 22** ilustra el efecto de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en los recuentos de glóbulos blancos y recuentos celulares diferenciales en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. Se administraron (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida y vehículo por vía subcutánea bid o se proporcionaron por vía intratraqueal qd durante 6 días consecutivos desde el día 21 al día 25 a los 30 minutos antes de la exposición a OVA y la última dosificación se administró a los 30 minutos antes de la recogida de fluido de lavado broncoalveolar el día 26. Se determinó el recuento de glóbulos blancos totales y los recuentos de células diferenciales. Se aplicó ANOVA de una vía seguido de ensayo de Dunnett para comparación entre los vehículos inmunizados con OVA y otros grupos de tratamiento. *P<0,05 frente a control de vehículo-OVA.

La **Figura 23** ilustra el efecto de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en el porcentaje de recuento de glóbulos blancos y recuento de células diferenciales en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. Se administraron (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida y vehículo por vía subcutánea bid o se proporcionaron por vía intratraqueal qd durante 6 días consecutivos desde el día 21 al día 25 a los 30 minutos antes de la exposición a OVA y la última dosificación se administró a los 30 minutos antes de la recogida de fluido de lavado broncoalveolar el día 26. Se determinaron el recuento de glóbulos blancos totales y los recuentos celulares diferenciales. Se aplicó ANOVA de una vía seguido de ensayo de Dunnett para comparación entre el vehículo inmunizado con OVA y otros grupos de tratamiento. *P<0,05 frente a control de vehículo-OVA.

Descripción detallada

Definiciones

5 Las presentes definiciones pretenden esclarecer, pero no para limitar, los términos definidos. Si un término particular usado en el presente documento no se define específicamente, dicho término no debe considerarse indefinido. En su lugar, los términos se usan dentro de sus significados aceptados.

10 Como se usa en el presente documento, el término "compuesto(s)" puede usarse para referirse a la forma de base libre, o como alternativa, una forma de sal de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, dependiendo del contexto, que será evidente. Los expertos en la materia serán capaces de distinguir la diferencia.

15 Por facilidad de referencia, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (Fórmula I) o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma también se denomina Compuesto A. Adicionalmente, en el presente documento se usa un análogo estructural para propósitos comparativos. (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-4-fluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma se denomina Compuesto B. El Compuesto es un isómero individual de una mezcla racémica como se publica en el documento WO 04/76449.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a vehículo o vehículos, diluyente o diluyentes, excipiente o excipientes o formas salinas del compuesto de la presente invención que son compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no deletéreos para el receptor de la composición farmacéutica.

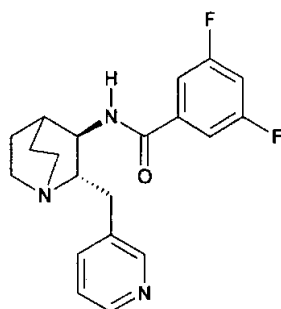
25 Como se usa en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a un compuesto de la presente invención opcionalmente mezclado con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones farmacéuticas muestran preferentemente un grado de estabilidad a las condiciones ambientales para hacerlas adecuadas para fines de fabricación y comercialización.

30 Como se usa en el presente documento, las expresiones "cantidad eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz", "cantidad terapéutica" o "dosis eficaz" se refieren a una cantidad del compuesto de la presente invención suficiente para inducir los efectos farmacológicos o terapéuticos deseados, dando como resultado de este modo prevención o tratamiento eficaz de un trastorno. La prevención del trastorno puede manifestarse retardando o previniendo la progresión del trastorno, así como la aparición de los síntomas asociados con el trastorno. El tratamiento del trastorno puede manifestarse por un aumento o eliminación de los síntomas, inhibición o inversión de la progresión del trastorno, así como cualquier otra contribución al bienestar del paciente.

40 Como se analizará en más detalle posteriormente y con referencia a las Figuras 1, 2, 3 y 4, se observa un efecto estadísticamente significativo para dosis del compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, tan bajas como 0,03 $\mu\text{M}/\text{kg}$, incluyendo efectos observados hasta 18 horas después de la dosificación. La dosis eficaz puede variar, dependiendo de factores tales como la afección del paciente, la gravedad de los síntomas del trastorno y la manera en que se administra la composición farmacéutica. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, la dosis eficaz puede ser menor de 100 mg, preferentemente menor de 50 mg, más preferentemente menor de 10 mg y más preferentemente menor de 1 mg. Estas dosis eficaces normalmente representan la cantidad administrada como una única dosis, o como una o más dosis administradas durante un periodo de 24 horas.

Compuestos

50 Un aspecto de la presente invención incluye un compuesto (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (Fórmula I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.



Fórmula I

55

En una realización, el compuesto está sustancialmente libre de uno o más de (2R,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, (2R,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, y (2S,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida.

5 En una realización, el es una sal de adición de ácidos, donde el ácido se selecciona entre ácido clorhídrico, ácido metanofufónico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido malónico, ácido L-tartárico, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido L-málico, ácido R-mandélico, ácido S-mandélico, ácido succínico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido adípico, ácido galactárico, ácido di-p-toluoil-D-tartárico, ácido oxálico, ácido D-glucurónico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 4-metoxibenzoico, ácido (S)-(+)-10-alcanforsulfónico, ácido (1R,3S)-(+)-alcanfórico, y ácido p-toluenesulfónico, o un hidrato o solvato de los mismos. En una realización adicional, la relación molar de ácido con respecto a (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida es 1:2 o 1:1.

Otro aspecto de la presente invención incluye un compuesto seleccionado entre:

15 mono-clorhidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o solvato del mismo;

mono-fosfato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o solvato del mismo;

20 mono-4-hidroxibenzoato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o solvato del mismo; y

hemi-4-hidroxibenzoato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o solvato del mismo.

25 Otro aspecto de la presente invención incluye un compuesto, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma que contiene menos del 25 %, que contiene preferiblemente menos del 15 %, que contiene preferiblemente menos del 5%, que contiene preferiblemente menos del 2%, que contiene preferiblemente menos del 1 % de (2R,3R)-, (2S,3S)-, o (2R,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)- 3,5-difluorobenzamida, tanto individualmente como en cualquier combinación, en peso.

Otro aspecto de la presente invención incluye un compuesto (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (Fórmula I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que es sustancialmente cristalina. Otro aspecto incluye una forma polimórfica de un compuesto clorhidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida caracterizada por un patrón de difracción de rayos X que comprende uno o más picos dentro de $\pm 0,5$ grados 2θ de los siguientes:

20
8,4
8,8
11,9
13,2
15,2
16,0
17,6
18,4
18,9
19,9
20,1
21,3
23,1
25,4
26,2

40 Otro aspecto de la presente invención es una forma polimórfica de un compuesto clorhidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida caracterizado por un patrón de difracción de rayos X de polvo que se corresponde sustancialmente a la Figura 9.

Otro aspecto de la presente invención incluye el uso de un compuesto de la presente invención, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o disfunción mediada por $\alpha 7$. Otro aspecto de la presente invención incluye un compuesto de la presente invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o disfunción mediada por $\alpha 7$. En una realización, la enfermedad o disfunción se selecciona del grupo que

consiste en:

i) dolor, incluyendo uno o más de dolor agudo, neurológico, inflamatorio, neuropático, crónico, dolor crónico grave, dolor postoperatorio, dolor asociado con cáncer, angina, cólico renal o biliar, menstruación, migraña, gota, artritis, enfermedad reumatoide, tenosinovitis, vasculitis, neuralgia del trigémino o herpética, dolor neuropático diabético, causalgia, dolor lumbar, síndromes de desaferentización, y avulsión del plexo braquial;

ii) síndrome metabólico, aumento de peso, diabetes mellitus de tipo I, diabetes mellitus de tipo II o neuropatía diabética;

iii) inflamación, incluyendo uno o más de psoriasis, asma, aterosclerosis, fibrosis pulmonar idiopática, inflamación crónica y aguda, psoriasis, endotoxemia, gota, seudogota aguda, artritis gotosa aguda, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, rechazo del injerto, rechazo de trasplante crónico, asma, aterosclerosis, lesión pulmonar dependiente de fagocito mononuclear, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, síndrome torácico agudo en anemia falciforme, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colangitis aguda, estomatitis aftosa, pouchitis, glomerulonefritis, nefritis lúpica, trombosis y reacción de injerto contra hospedador; y

iv) cognición, incluyendo uno o más de deterioro de la memoria asociado con la edad, deterioro cognitivo leve, demencia presenil, enfermedad de Alzheimer de aparición temprana, demencia senil, demencia de tipo Alzheimer, demencia de leve a moderada del tipo Alzheimer, demencia de cuerpos de Lewy, demencia vascular, enfermedad de Alzheimer, ictus, complejos de demencia del SIDA, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad de déficit de atención, dislexia, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, déficits cognitivos en esquizofrenia y disfunción cognitiva en esquizofrenia.

Otro aspecto de la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro aspecto incluye compuestos de la presente invención para su uso en la potenciación de corriente inducida por acetilcolina.

Otra realización de la presente invención incluye (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con referencia a uno cualquiera de los Ejemplos.

Otra realización de la presente invención incluye (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso como una sustancia terapéutica activa.

Otra realización de la presente invención incluye un método para modular el NNR en un sujeto que lo necesite mediante la administración de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El alcance de la presente invención incluye combinaciones de aspectos y realizaciones.

A no ser que se indique de otro modo, también se pretende que las estructuras representadas en el presente documento incluyan compuestos que difieran solamente en presencia de uno o más átomos enriquecidos con isótopos. Por ejemplo, los compuestos que tienen la presente estructura excepto por el reemplazo de un átomo de hidrógeno por deuterio o tritio, o el reemplazo de un átomo de carbono por ^{13}C o ^{14}C , o el reemplazo de un átomo de hidrógeno por ^{15}N o el reemplazo de un átomo de oxígeno con ^{17}O o ^{18}O están dentro del alcance de la invención. Dichos compuestos marcados con isótopos son útiles como herramientas de investigación o diagnóstico.

La presente invención incluye una sal o solvato del (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, incluyendo combinaciones de los mismos, tales como un solvato de una sal. Los compuestos de la presente invención pueden existir en formas solvatadas, por ejemplo hidratadas, así como no solvatadas, y la presente invención abarca todas estas formas.

Normalmente, pero no de forma absoluta, las sales de la presente invención son sales farmacéuticamente aceptables. Las sales abarcadas dentro de la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refieren a sales no tóxicas de los compuestos de la presente invención.

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen sales de adición de ácidos inorgánicas tales como cloruro, bromuro, sulfato, fosfato y nitrato; sales de adición de ácidos orgánicas tales como acetato, galactarato, propionato, succinato, lactato, glicolato, malato, tartrato, citrato, maleato, fumarato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato y ascorbato; sales con aminoácidos tales como aspartato y glutamato; sales de metales alcalinos tales como sal sódica y sal potásica; sales de metales alcalinotérreos tales como sal magnésica y sal cálcica; sal de amonio; sales básicas orgánicas tales como sal de trimetilamina, sal de trietilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de dicitlohexilamina y sal de N,N'-dibenciletilendiamina; y sales con aminoácidos básicos tales como sal de lisina y sal de arginina. Las sales pueden ser en algunos casos hidratos o solvatos de etanol.

Como se indica en el presente documento, la presente invención incluye compuestos específicos, que se identifican en el presente documento con particularidad. Los compuestos de esta invención pueden prepararse por diversos métodos, incluyendo métodos sintéticos convencionales bien conocidos. Más adelante se exponen métodos sintéticos generales ilustrativos y después se preparan compuestos específicos de la invención en los Ejemplos funcionales.

En todos los ejemplos que se describen más adelante, se emplean grupos protectores para grupos sensibles o reactivos cuando es necesario de acuerdo con principios generales de química sintética. Los grupos protectores se manipulan de acuerdo con métodos convencionales de síntesis orgánica (véase, por ejemplo, T. W. Green y P. G. M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 3ª Edición, John Wiley & Sons, Nueva York (1999)). Estos grupos se retiran en una etapa conveniente de la síntesis del compuesto usando métodos que son evidentes para los expertos en la materia. La selección de procesos, así como las condiciones de reacción y orden de su ejecución deberán ser coherentes con la preparación de compuestos de la presente invención.

La presente invención también proporciona un método para la síntesis de compuestos útiles como intermedios en la preparación de compuestos de la presente invención, junto con métodos para su preparación.

Los compuestos pueden prepararse de acuerdo con los siguientes métodos usando materiales de partida y reactivos fácilmente disponibles. En estas reacciones, pueden emplearse variantes que son por sí mismas conocidas para los expertos en esta técnica, pero no se mencionan con mayor detalle.

Formas de sal

Un aspecto de la presente invención se refiere a formas de sal de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida.

(2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en la forma de base libre es un sólido con solubilidad en agua limitada. Sin embargo, la base libre reaccionará con ácidos inorgánicos y orgánicos para hacer determinadas sales de adición de ácidos que tiene propiedades físicas que son ventajosas para la preparación de composiciones farmacéuticas, tales como cristalinidad, solubilidad en agua, y estabilidad frente a degradación química. Normalmente, estas formas de sal son sales farmacéuticamente aceptables.

La presente invención incluye sales farmacéuticamente aceptables de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida. Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácidos inorgánicos, tales como cloruro, bromuro, sulfato, fosfato, y nitrato; sales de adición de ácidos orgánicos, tales como acetato, galactarato, propionato, succinato, lactato, glucolato, malato, tartrato, citrato, maleato, fumarato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, y ascorbato; sales con aminoácido ácido, tales como aspartato y glutamato; sales de metal alcalino, tales como sal de sodio y sal de potasio; sales de metal alcalinotérreo, tales como sal de magnesio y sal de calcio; sal de amonio; sales básicas orgánicas, tales como sal de trimetilamina, sal de trietilamina, sal de piridina, sal de picolina, sal de dicitclohexilamina, y sal de N,N'-dibenciletilenediamina; y sales con aminoácido básico, tales como sal de lisina y sal de arginina. Las sales pueden ser en algunos casos hidratos o solvatos, tales como solvatos de etanol.

Un aspecto de la presente invención incluye sales de adición de ácidos de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida donde el ácido se selecciona entre ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido malónico, ácido L-tartárico, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido L-málico, ácido R-mandélico, ácido S-mandélico, ácido succínico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido adípico, ácido galactárico, ácido di-p-toluoil-D-tartárico, ácido oxálico, ácido D-glucurónico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 4-metoxibenzoico, ácido (1S)-(+)-10-alcanforsulfónico, ácido (1R,3S)-(+)-alcanfórico, y ácido p-toluenosulfónico. La presente invención también incluye hidratos y solvatos de estas formas de sal.

La estereoquímica de las sales que comprenden la presente invención puede variar. Por ejemplo, es típico que la relación molar de ácido con respecto a (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida sea 1:2 o 1:1, pero otras proporciones, tales como 3:1, 1:3, 2:3, 3:2 y 2:1, son posibles.

En una realización de la presente invención, las sales tienen una estereoquímica de ácido con respecto a la de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida de 1:2. En otra realización, las sales tienen una estereoquímica de ácido de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida de 1:1.

Como se indica en el presente documento, dependiendo de la manera por la que se forman las sales descritas en el presente documento, las sales pueden tener estructuras cristalinas que ocultan disolventes que están presentes durante la formación de sal. Por tanto, las sales pueden aparecer en forma de hidratos y otros solvatos de diversa estereoquímica de disolvente en relación a (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida.

Otra realización de la presente invención incluye (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-di-

fluorobenzamida o un hidrato o solvato de la misma.

Otra realización de la presente invención incluye mono-clorhidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2] oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o solvato del mismo.

Otra realización de la presente invención incluye mono-fosfato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2] oct-3-il)3,5-difluorobenzamida o un hidrato o solvato del mismo.

Otra realización de la presente invención incluye mono-4-hidroxibenzoato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2] oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o solvato del mismo.

Otra realización de la presente invención incluye hemi-4-hidroxibenzoato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2] oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o solvato del mismo.

Un aspecto adicional de la presente invención incluye procesos para la preparación de las sales. Las condiciones precisas en las que se forman las sales pueden determinarse empíricamente. Las sales pueden obtenerse por cristalización en condiciones controladas.

Una realización de la presente invención incluye un método para la preparación de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma que contiene menos del 25 %, preferiblemente menos del 15 %, más preferiblemente menos del 5 %, incluso más preferiblemente menos del 2 %, y lo más preferido menos del 1 % de (2R,3R)-, (2S,3S)-, o (2R,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5- difluorobenzamida en peso tanto individualmente como en combinación.

El método para preparar las formas de sal puede variar. La preparación de formas de sal de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida implica normalmente:

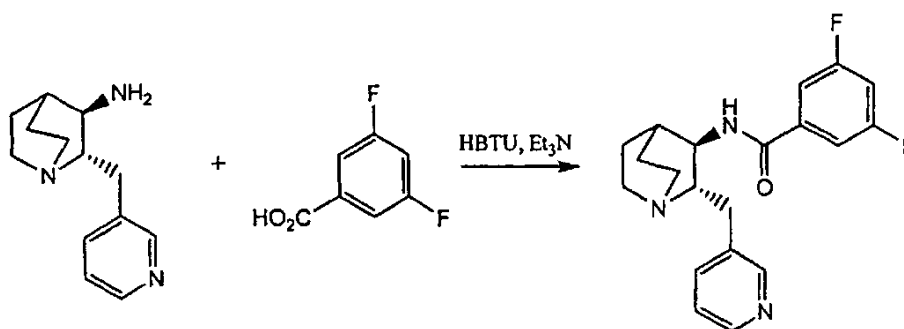
- (i) mezclar la base libre, o una solución de la base libre de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida adecuadamente pura en un disolvente adecuado, con cualquiera de los ácidos en forma pura o en forma de una solución de cualquiera de los añadidos en un disolvente adecuado, normalmente de 0,5 a 1 equivalentes del ácido;
- (ii) (a) enfriar la solución de sal resultante si fuera necesario para provocar precipitación; o
- (ii) (b) añadir un anti-disolvente adecuado para provocar precipitación; o
- (ii) (c) evaporar el primer disolvente y añadir un nuevo disolvente y repetir la (ii) (a) o la etapa (ii) (b); y
- (iii) filtrar y recoger la sal.

La estereoquímica, mezcla de disolventes, concentración de soluto, y temperatura empleadas pueden variar. Los disolventes representativos que pueden usarse para preparar o recristalizar las formas de sal incluyen, sin limitación, etanol, metanol, propanol, alcohol isopropílico, acetato de isopropilo, acetona, acetato de etilo, tolueno, agua, metil etil cetona, metil isobutil cetona, *tert*-butil metil éter, tetrahidrofurano, diclorometano, n-heptano, y acetonitrilo.

Varias de estas sales demuestran estabilidad suficiente para cumplir con su cometido en la producción de preparaciones farmacéuticas. Dicha estabilidad puede demostrarse por diversas maneras. Puede ensayarse la tendencia a ganar o liberar humedad atmosférica mediante sorción de vapor dinámica (DVS).

Métodos sintéticos generales

Una síntesis de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida se consigue mediante acoplamiento mediado por hexafluorofosfato de O-(benzotriazo(-1-il)-N,N,N,1-tetrametiluronio (HBTU) de (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano (obtenido como se describe en el documento PCT/US08/71872) y ácido 3,5-difluorobenzoico como se ilustra en el Esquema 1.



Esquema 1

5 La síntesis de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida puede conseguirse de forma similar mediante el uso de otros agentes para activar el ácido carboxílico. Por ejemplo, el uso de agente de activación, tales como N,N'-diclohexilcarbodiimida (DCC), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-bis(tetrametil)uronio (HBPYU), hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio (TBTU), y (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (EDCI) con 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), así como las que se describen en, por ejemplo, Kiso y Yajima, Peptides, pp 39-91, Academic Press, San Diego, CA (1995), son bien conocidos por los expertos en la materia.

Compuestos de la presente invención para su uso en el tratamiento

15 Los compuestos de la presente invención tienen la capacidad de unirse selectivamente con y modular la actividad de NNR $\alpha 7$. En consecuencia, estos compuestos pueden usarse para la prevención o tratamiento de diversas afecciones o trastornos para los que otros tipos de compuestos nicotínicos se han propuesto o se ha mostrado que son útiles como productos terapéuticos, tales como trastornos del SNC, inflamación, respuesta inflamatoria asociada con infección bacteriana y/o viral, dolor, síndrome metabólico, trastornos autoinmunitarios u otros trastornos descritos en más detalle en el presente documento. Estos compuestos pueden usarse para modular la neovascularización y como agentes de diagnóstico en estudios de unión con receptores (*in vitro* e *in vivo*). Dichas enseñanzas terapéuticas u otras se describen, por ejemplo, en Williams *et al.*, Drug News Perspec. 7(4): 205 (1994), Arneric *et al.*, CNS Drug Rev. 1(1): 1-26 (1995), Arneric *et al.*, Exp. Opin. Invest. Drugs 5(1): 79-100 (1996), Bencherif *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 279: 1413 (1996), Lippie *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 279: 1422 (1996), Damaj *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 291: 390 (1999); Chiari *et al.*, Anesthesiology 91: 1447 (1999), Lavand'homme y Eisenbach, Anesthesiology 91: 1455 (1999), Holladay *et al.*, J. Med. Chem. 40(28): 4169-94 (1997), Bannon *et al.*, Science 279: 77 (1998), documentos PCT WO 94/08992, PCT WO 96/31475, PCT WO 96/40682 y Patentes de Estados Unidos N° 5.583.140 de Bencherif *et al.*, 5.597.919 de Dull *et al.*, 5.604.231 de Smith *et al.* y 5.852.041 de Cosford *et al.*, y otras referencias previamente enumeradas en el presente documento.

Trastornos del SNC

35 Los compuestos y sus composiciones farmacéuticas son útiles en el tratamiento o prevención de diversos trastornos del SNC, incluyendo trastornos neurodegenerativos, trastornos neuropsiquiátricos, trastornos neurológicos y adicciones. Los compuestos y sus composiciones farmacéuticas pueden usarse para tratar o prevenir déficits y disfunciones cognitivos, relacionados con la edad y otros tipos; trastornos de la atención y demencias, incluyendo los debidos a agentes infecciosos o perturbaciones metabólicas; para proporcionar neuroprotección; para tratar convulsiones e infartos cerebrales múltiples; para tratar trastornos anímicos, compulsiones y comportamientos adictivos; para proporcionar analgesia; para controlar la inflamación, tal como mediada por citocinas y factor nuclear kappa B; para tratar trastornos inflamatorios; para proporcionar alivio del dolor; y para tratar infecciones, como agentes antiinfecciosos para tratar infecciones bacterianas, fúngicas y virales. Entre los trastornos, enfermedades y afecciones que pueden tratarse o prevenirse usando los compuestos y composiciones farmacéuticas de la presente invención están: el deterioro de la memoria asociado con la edad (AAMI), el deterioro cognitivo leve (MCI), el deterioro cognitivo relacionado con la edad (ARCD), demencia presenil, enfermedad de Alzheimer de aparición temprana, demencia senil, demencia del tipo Alzheimer, enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo sin demencia (CIND), demencia de cuerpos de Lewy, demencia del VIH, complejo de demencia del SIDA, demencia vascular, síndrome de Down, traumatismo craneal, lesión traumática del cerebro (TBI), demencia pugilística, Enfermedad de Creutzfeld-Jacob y enfermedades priónicas, ictus, isquemia, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad de déficit de atención, dislexia, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, disfunción cognitiva en esquizofrenia, déficits cognitivos en esquizofrenia, parkinsonismo incluyendo enfermedad de Parkinson, parkinsonismo postencefálico, demencia de parkinsonismo de Gaum, demencia frontotemporal de Tipo Parkinson (FTDP), enfermedad de Pick, enfermedad de Niemann-Pick, Enfermedad de Huntington, corea de Huntington,

discinesia tardía, hipercinesia, parálisis supranuclear progresiva, parálisis supranuclear progresiva, síndrome de piernas inquietas, enfermedad de Creutzfeld-Jakob, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedades de neuronas motoras (MND), atrofia sistémica múltiple (MSA), degeneración corticobasal, Síndrome de Guillain-Barré (GBS) y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), epilepsia, epilepsia del lóbulo frontal nocturna dominante autosómica, manía, ansiedad, depresión, disforia premenstrual, trastornos del pánico, bulimia, anorexia, narcolepsia, somnolencia diurna excesiva, trastornos bipolares, trastorno de ansiedad generalizada, trastorno obsesivo compulsivo, brotes de ira, trastorno negativista desafiante, síndrome de Tourette, autismo, adicción a las drogas y al alcohol, adicción al tabaco, obesidad, caquexia, psoriasis, lupus, colangitis aguda, estomatitis aftosa, úlceras, asma, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, distonía espástica, diarrea, estreñimiento, pouchitis, neumonitis viral, artritis (incluyendo artritis reumatoide y osteoartritis), endotoxemia, septicemia, aterosclerosis, fibrosis pulmonar idiopática, dolor agudo, dolor crónico, neuropatías, incontinencia urinaria, diabetes y neoplasias.

Los deterioros o disfunciones cognitivos pueden asociarse con trastornos o afecciones psiquiátricos, tales como esquizofrenia y otros trastornos psicóticos, incluyen pero sin limitación trastorno psicótico, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno delirante, trastorno psicótico breve, trastorno psicótico compartido y trastornos psicóticos debidos a afecciones médicas generales, demencias y otros trastornos cognitivos, incluyendo pero sin limitación deterioro cognitivo leve, demencia presenil, enfermedad de Alzheimer, demencia senil, demencia del tipo Alzheimer, deterioro de la memoria relacionado con la edad, demencia de cuerpos de Lewy, demencia vascular, complejo de demencia del SIDA, dislexia, Parkinsonismo incluyendo enfermedad de Parkinson, deterioro cognitivo y demencia de enfermedad de Parkinson, deterioro cognitivo de esclerosis múltiple, deterioro cognitivo provocado por lesión cerebral traumática, demencias debidas a otras afecciones médicas generales, trastornos de ansiedad, incluyendo pero sin limitación trastorno del pánico sin agorafobia, trastorno del pánico con agorafobia, agorafobia sin historial de trastorno del pánico, fobia específica, fobia social, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de estrés posttraumático, trastorno de estrés agudo, trastorno de ansiedad generalizada y trastorno de ansiedad generalizada debido a una afección médica general, trastornos anímicos, incluyendo pero sin limitación trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, depresión bipolar, manía bipolar, trastorno bipolar I, depresión asociada con episodios maniáticos, depresivos o mixtos, trastorno bipolar II, trastorno ciclotímico y trastornos conductuales debidos a afecciones médicas generales, trastornos del sueño, incluyendo pero sin limitación trastornos de disomnia, insomnio primario, hipersomnia primaria, narcolepsia, trastornos de parasomnia, trastornos de pesadillas, trastorno de terrores nocturnos y trastorno de noctambulismo, retraso mental, trastornos de aprendizaje, trastornos de habilidades motoras, trastornos de comunicación, trastornos del desarrollo generalizados, trastornos de déficit de atención y de comportamiento conflictivo, trastorno del déficit de atención, trastorno de hiperactividad de déficit de atención, trastornos alimentarios y de comida de infancia, niñez o adultos, trastornos de tic, trastornos de eliminación, trastornos relacionados con sustancias, incluyendo pero sin limitación dependencia de sustancias, abuso de sustancias, intoxicación con sustancias, abstinencia de sustancias, trastornos relacionados con el alcohol, trastornos relacionados con anfetamina o de tipo anfetamina, trastornos relacionados con la cafeína, trastornos relacionados con el cannabis, trastornos relacionados con la cocaína, trastornos relacionados con alucinógenos, trastornos relacionados con inhalantes, trastornos relacionados con nicotina, trastornos relacionados con opiáceos, trastornos relacionados con fenciclidina o de tipo fenciclidina y trastornos relacionados con sedantes, hipnóticos o ansiolíticos, trastornos de la personalidad, incluyendo pero sin limitación trastorno de la personalidad obsesivo-compulsivo y trastornos de control de impulsos.

Puede evaluarse el rendimiento cognitivo con una escala cognitiva validada, tal como, por ejemplo, la subescala cognitiva de la Escala de Evaluación de Enfermedad de Alzheimer (ADAS-cog). Una medida de la eficacia de los compuestos de la presente invención en la mejora de la cognición puede incluir medir el grado de cambio de un paciente de acuerdo con dicha escala.

Las condiciones y trastornos anteriores se analizan en más detalle, por ejemplo, en the American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Cuarta Edición, Revisión del Texto, Washington, DC, American Psychiatric Association, 2000. También puede hacerse referencia a este Manual para más detalle sobre los síntomas y características de diagnóstico asociadas con uso, abuso y dependencia de sustancias.

Inflamación

Se sabe que el sistema nervioso, principalmente a través del nervio vago, regula la magnitud de la respuesta inmunitaria innata inhibiendo la liberación del factor de necrosis tumoral de macrófagos (TNF). Este mecanismo fisiológico se conoce como la "ruta antiinflamatoria colinérgica" (véase, por ejemplo, Tracey, "The inflammatory reflex," Nature 420: 853-9 (2002)). La inflamación excesiva y la síntesis del factor de necrosis tumoral provocan morbilidad e incluso mortalidad en diversas enfermedades. Estas enfermedades incluyen, pero sin limitación, endotoxemia, artritis reumatoide, osteoartritis, psoriasis, asma, aterosclerosis, fibrosis pulmonar idiopática y enfermedad inflamatoria del intestino.

Las afecciones inflamatorias que pueden tratarse o prevenirse administrando los compuestos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, inflamación crónica y aguda, psoriasis, endotoxemia, gota, pseudogota aguda, artritis gotosa aguda, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, rechazo de aloinjertos, rechazo de trasplante crónico, asma, aterosclerosis, lesión pulmonar dependiente de fagocitos mononucleares, fibrosis pulmonar idiopática,

dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, síndrome torácico agudo en anemia falciforme, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colangitis aguda, estomatitis aftosa, pouchitis, glomerulonefritis, nefritis lúpica, trombosis y rechazo de injerto contra huésped.

5

Respuesta inflamatoria asociada con infección bacteriana y/o viral

Muchas infecciones bacterianas y/o virales están asociadas con efectos secundarios proporcionados por la formación de toxinas, y la respuesta natural del cuerpo a las bacterias o virus y/o las toxinas. La respuesta del cuerpo a infección con frecuencia implica generar una cantidad significativa de TNF y/u otras citocinas. La sobreexpresión de estas citocinas puede dar como resultado lesión significativa, tal como choque séptico (cuando la bacteria es séptica), choque endotóxico, urosepticemia y síndrome de choque tóxico.

10

La expresión de citocinas está mediada por NNR, y puede inhibirse administrando agonistas o agonistas parciales de estos receptores. Los compuestos descritos en el presente documento que son agonistas o agonistas parciales de estos receptores pueden usarse por lo tanto para minimizar la respuesta inflamatoria asociada con infección bacteriana, así como infecciones virales y fúngicas. Los ejemplos de dichas infecciones bacterianas incluyen carbunco, botulismo y septicemia. Algunos de estos compuestos pueden tener también propiedades antimicrobianas.

15

Estos compuestos también pueden usarse como terapia adyuvante en combinación con terapias existentes para combatir infecciones bacterianas, virales y fúngicas, tales como antibióticos, antivirales y antifúngicos. También pueden usarse antitoxinas para unirse con toxinas producidas por los agentes infecciosos y permitir que las toxinas unidas pasen a través del cuerpo sin generar una respuesta inflamatoria. Se desvelan ejemplos de antitoxinas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 6.310.043 de Bundle *et al.* Otros agentes eficaces contra toxinas bacterianas y otras pueden ser eficaces y su efecto terapéutico puede complementarse por administración conjunta con los compuestos descritos en el presente documento.

20

25

Dolor

Los compuestos pueden administrarse para tratar y/o prevenir el dolor, incluyendo dolor agudo, neurológico, inflamatorio, neuropático y crónico. La actividad analgésica de compuestos descritos en el presente documento pueden demostrarse modelos de dolor inflamatorio persistente y de dolor neuropático, realizados como se ha descrito en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 20010056084 A1 (Allgeier *et al.*) (por ejemplo, hiperalgesia mecánica en el modelo de rata de adyuvante completo de Freund de dolor inflamatorio e hiperalgesia mecánica en el modelo de ligamiento de nervio ciático parcial de ratón del dolor neuropático).

30

35

El efecto analgésico es adecuado para tratar el dolor de diversa génesis o etiología, en particular en el tratamiento del dolor inflamatorio e hiperalgesia asociada, dolor neuropático e hiperalgesia asociada, dolor crónico (por ejemplo, dolor crónico grave, dolor postoperatorio y dolor asociado con diversas afecciones incluyendo cáncer, angina, cólico renal o biliar, menstruación, migraña y gota). El dolor inflamatorio puede ser de diversa génesis, incluyendo artritis y enfermedad reumatoide, tenosinovitis y vasculitis. El dolor neuropático incluye neuralgia del trigémino o herpética, dolor de neuropatía diabética, causalgia, dolor lumbar y síndromes de desaferentización tales como avulsión del plexo braquial.

40

Neovascularización

El NNR $\alpha 7$ se asocia con la neovascularización. La inhibición de neovascularización, por ejemplo, administrando antagonistas (o a ciertas dosificaciones, agonistas parciales) del NNR $\alpha 7$ puede tratar y prevenir afecciones caracterizadas por neovascularización o angiogénesis indeseable. Dichas afecciones pueden incluir las caracterizadas por angiogénesis inflamatoria y/o angiogénesis inducida por isquemia. La neovascularización asociada con el crecimiento tumoral también puede inhibirse administrando los compuestos descritos en el presente documento que actúan como antagonistas o agonistas parciales de NNR $\alpha 7$.

50

El antagonismo específico de la actividad específica de NNR $\alpha 7$ reduce la respuesta angiogénica a inflamación, isquemia y neoplasia. Pueden encontrarse directrices con respecto a sistemas modelo animales apropiados para evaluar los compuestos descritos en el presente documento, por ejemplo, en Heeschen, C. *et al.*, "A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors," J. Clin. Invest. 110(4): 527-36 (2002).

55

Los tipos tumorales representativos que pueden tratarse usando los compuestos descritos en el presente documento incluyen NSCLC, cáncer ovárico, cáncer pancreático, carcinoma de mama, carcinoma de colon, carcinoma de recto, carcinoma de pulmón, carcinoma de orofaringe, carcinoma de hipofaringe, carcinoma de esófago, carcinoma de estómago, carcinoma de páncreas, carcinoma de hígado, carcinoma de la vesícula biliar, carcinoma del conducto biliar, carcinoma del intestino delgado, carcinoma del tracto urinario, carcinoma de riñón, carcinoma de vejiga, carcinoma de urotelio, carcinoma de tracto genital femenino, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de útero, carcinoma ovárico, coriocarcinoma, enfermedad trofoblástica gestacional, carcinoma del tracto genital masculino, carcinoma de próstata, carcinoma de vesículas seminales, carcinoma de testículo, tumores de células germinales,

65

carcinoma de glándulas endocrinas, carcinoma de tiroides, carcinoma adrenal, carcinoma de la glándula hipófisis, carcinoma de piel, hemangiomas, melanomas, sarcomas, carcinoma de hueso y tejido blando, sarcoma de Kaposi, tumores del cerebro, tumores de los nervios, tumores de los ojos, tumores de las meninges, astrocitomas, gliomas, glioblastomas, retinoblastomas, neuromas, neuroblastomas, Schwannomas, meningiomas, tumores sólidos que surgen de tumores malignos hematopoyéticos (tales como leucemias, cloromas, plasmacitomas y las placas y tumores de micosis fungoide y linfoma/leucemia de linfocitos T cutánea) y tumores sólidos que surgen de linfomas.

Los compuestos también pueden administrarse junto con otras formas de tratamiento antineoplásico, incluyendo administración conjunta con agentes antitumorales antineoplásicos tales como cisplatino, adriamicina, daunomicina y similares, y/o agentes anti VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), como se conocen en la técnica.

Los compuestos pueden administrarse de tal manera que se dirijan al sitio del tumor. Por ejemplo, los compuestos pueden administrarse en microesferas, micropartículas o liposomas conjugados con diversos anticuerpos que dirigen las micropartículas al tumor. Adicionalmente, los compuestos pueden estar presentes en microesferas, micropartículas o liposomas que tienen el tamaño apropiado para pasar a través de las arterias y las venas, pero se alojan en lechos capilares que rodean a los tumores y administran los compuestos por vía local al tumor. Dichos dispositivos de suministro farmacológico se conocen en la técnica.

Otros trastornos

Además de tratar trastornos del SNC, inflamación y neovascularización indeseable, y dolor, los compuestos de la presente invención también pueden usarse para prevenir o tratar ciertas otras afecciones, enfermedades y trastornos en los que NNR desempeña un papel. Los ejemplos incluyen trastornos autoinmunitarios tales como lupus, trastornos asociados con liberación de citocinas, caquexia secundaria a infección (por ejemplo, como se produce en el SIDA, complejo relacionado con SIDA y neoplasia), obesidad, penfitis, incontinencia urinaria, enfermedades retinianas, enfermedades infecciosas, miastenia, síndrome de Eaton-Lambert, hipertensión, osteoporosis, vasoconstricción, vasodilatación, arritmias cardíacas, diabetes de tipo I, bulimia, anorexia así como las indicaciones expuestas en la solicitud de PCT publicada WO 98/25619. Los compuestos de la presente invención también pueden administrarse para tratar convulsiones tales como las que son sintomáticas de epilepsia, y para tratar afecciones tales como sífilis y enfermedad de Creutzfeld-Jakob.

Usos de diagnóstico

Los compuestos pueden usarse en composiciones de diagnóstico, tales como sondas, particularmente cuando se modifican para incluir marcadores apropiados. Las sondas pueden usarse, por ejemplo, para determinar el número relativo y/o función de receptores específicos, particularmente el subtipo de receptor $\alpha 7$. Para este fin, los compuestos de la presente invención se marcan más preferentemente con un resto isotópico radioactivo tal como ^{11}C , ^{18}F , ^{76}Br , ^{123}I o ^{125}I .

Los compuestos administrados pueden detectarse usando métodos de detección conocidos apropiados para el marcador usado. Los ejemplos de métodos de detección incluyen tomografía de emisión de positrones (PET) y tomografía computarizada de emisión de un único fotón (SPECT). Los radiomarcadores descritos anteriormente son útiles en captura de imágenes de PET (por ejemplo, ^{11}C , ^{18}F o ^{76}Br) y SPECT (por ejemplo, ^{123}I), con semividas de aproximadamente 20,4 minutos para ^{11}C , aproximadamente 109 minutos para ^{18}F , aproximadamente 13 horas para ^{123}I y aproximadamente 16 horas para ^{76}Br . Se desea una actividad específica alta para visualizar los subtipos de receptores seleccionados a concentraciones no de saturación. Las dosis administradas normalmente están por debajo del intervalo tóxico y proporcionan imágenes de alto contraste. Se espera que los compuestos puedan administrarse a niveles no tóxicos. La determinación de la dosis se lleva a cabo de una manera conocida por los expertos en la materia de captura de imágenes por radiomarcaje. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.969.144 de London *et al.*

Los compuestos pueden administrarse usando técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.969.144 de London *et al.* Los compuestos pueden administrarse en composiciones de formulación que incorporan otros ingredientes, tales como los tipos de ingredientes que son útiles en la formulación de una composición de diagnóstico. Los compuestos útiles de acuerdo con la realización de la presente invención se emplean más preferentemente en forma de alta pureza. Véase, Patente de Estados Unidos N° 5.853.696 de Elmalch *et al.*

Después de administrarse los compuestos a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano), puede capturarse una imagen de la presencia de ese compuesto dentro del sujeto y cuantificarse por técnicas apropiadas para indicar la presencia, cantidad y funcionalidad de subtipos de NNR seleccionados. Además de seres humanos, los compuestos pueden administrarse a animales, tales como ratones, ratas, perros y monos. Puede llevarse a cabo captura de imágenes por SPECT y PET usando cualquier técnica y aparato apropiados. Véase Villemagne *et al.*, En: Arneric *et al.* (Eds.) Neuronal Nicotinic Receptors: Pharmacology and Therapeutic Opportunities, 235-250 (1998; y Patente de Estados Unidos N° 5.853.696 de Elmalch *et al.*

Los compuestos radiomarcados se unen con alta afinidad con subtipos de NNR selectivos (por ejemplo, $\alpha 7$) y

muestran preferentemente unión no específica despreciable con otros subtipos de receptores nicotínicos colinérgicos (por ejemplo, $\alpha 4\beta 2$ y los subtipos de receptores asociados con el músculo y los ganglios). Como tales, los compuestos pueden usarse como agentes para captura de imágenes no invasiva de subtipos de receptores nicotínicos colinérgicos dentro del cuerpo de un sujeto, particularmente dentro del cerebro para diagnóstico asociado con diversas enfermedades y trastornos del SNC.

En un aspecto, las composiciones de diagnóstico pueden usarse para diagnosticar la enfermedad en un sujeto, tal como un paciente humano, administrando a ese paciente un compuesto marcado de forma detectable como se describe en el presente documento, y detectando la unión de ese compuesto con subtipos de NNR seleccionados (por ejemplo, subtipos de receptor $\alpha 7$). Los expertos en la materia del uso de herramientas de diagnóstico, tales como PET y SPECT, pueden usar los compuestos radiomarcados descritos en el presente documento para diagnosticar una amplia diversidad de afecciones y trastornos, incluyendo afecciones y trastornos asociados con la disfunción de los sistemas nerviosos central y autónomo. Dichos trastornos incluyen una amplia diversidad de enfermedades y trastornos del SNC, incluyendo enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y esquizofrenia. Estas y otras enfermedades y trastornos representativos que pueden evaluarse incluyen los que se exponen en la Patente de Estados Unidos N° 5.952.339 de Bencherif *et al.*

En otro aspecto, las composiciones de diagnóstico pueden usarse para controlar los subtipos de receptores nicotínicos selectivos de un sujeto, tal como un paciente humano, administrando un compuesto marcado de forma detectable como se describe en el presente documento a ese paciente y detectando la unión de ese compuesto con subtipos de receptores nicotínicos seleccionados, concretamente el subtipo de receptor $\alpha 7$.

Unión del receptor

Los compuestos de la presente invención pueden usarse como ligandos de referencia en ensayos de unión para compuestos que se unen con subtipos de NNR, particularmente el subtipo de receptor $\alpha 7$. Para este fin, los compuestos de la presente invención se marcan preferentemente con un resto isotópico radiactivo tal como ^3H o ^{14}C . Se describen ejemplos de dichos ensayos de unión en detalle posteriormente.

Composiciones farmacéuticas

Aunque es posible administrar el compuesto de la presente invención en forma de un producto químico activo a granel, se prefiere administrar el compuesto en forma de una composición o formulación farmacéutica. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de la presente invención y uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Otro aspecto de la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica que incluye mezclar el compuesto de la presente invención con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables.

La forma en que el compuesto de la presente invención se administra puede variar. El compuesto de la presente invención se administra preferentemente por vía oral. Las composiciones farmacéuticas preferidas para administración oral incluyen comprimidos, cápsulas, comprimidos encapsulados, jarabes, soluciones y suspensiones. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden proporcionarse en formas de dosificación de liberación modificada tales como comprimido de liberación temporalizada y formulaciones de cápsulas.

Las composiciones farmacéuticas también pueden administrarse mediante inyección, concretamente, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intraarterial, por vía intratecal y por vía intracerebroventricular. La administración intravenosa es un método preferido de inyección. Se conocen bien por los expertos en la materia vehículos adecuados para inyección e incluyen soluciones de dextrosa al 5 %, solución salina y solución tamponada con fosfato.

Las formulaciones pueden administrarse también usando otros medios, por ejemplo, administración rectal. Las formulaciones útiles para administración rectal, tales como supositorios, se conocen bien por los expertos en la materia. Los compuestos también pueden administrarse por inhalación, por ejemplo, en forma de un aerosol; por vía tópica, tal como en forma de loción, por vía transdérmica, tal como usando un parche transdérmico (por ejemplo, usando tecnología que está disponible en el mercado de Novartis y Alza Corporation), por inyección de polvo o por absorción bucal, sublingual o intranasal.

Las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de dosis unitaria, o en dosis múltiples o subunitarias.

La administración de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede ser intermitente o a una velocidad gradual, continua, constante o controlada. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse a un animal de sangre caliente, por ejemplo, un mamífero tal como un ratón, rata, gato, conejo, perro, cerdo, vaca o mono; pero provechosamente se administra a un ser humano. Además, el momento del día y el número de veces por día que se administra la composición farmacéutica puede variar.

El compuesto de la presente invención puede usarse en el tratamiento de diversos trastornos y afecciones y, como tal, puede usarse en combinación con otros diversos agentes terapéuticos adecuados útiles en el tratamiento de profilaxis

de esos trastornos o afecciones. Por lo tanto, una realización de la presente invención incluye la administración del compuesto de la presente invención en combinación con otros compuestos terapéuticos. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención puede usarse en combinación con otros ligandos de NNR (tales como vareniclina), antioxidantes (tales como agentes de eliminación de radicales libres), agentes antibacterianos (tales como antibióticos de penicilina), agentes antivirales (tales como análogos de nucleósidos, como zidovudina y aciclovir), anticoagulantes (tales como warfarina), agentes antiinflamatorios (tales como AINE), antipiréticos, analgésicos, anestésicos (tales como los que se usan en cirugía), inhibidores de acetilcolinesterasa (tales como donepecilo y galantamina), antipsicóticos (tales como haloperidol, clozapina, olanzapina y quetiapina), inmunosupresores (tales como ciclosporina y metotrexato), agentes neuroprotectores, esteroides (tales como hormonas esteroideas), corticosteroides (tales como dexametasona, prednisona e hidrocortisona), vitaminas, minerales, nutracéuticos, antidepresivos (tales como imipramina, fluoxetina, paroxetina, escitalopram, sertralina, venlafaxina y duloxetina), ansiolíticos (tales como alprazolam y buspirona), anticonvulsivos (tales como fenitoína y gabapentina), vasodilatadores (tales como prazosina y sildenafil), estabilizadores anímicos (tales como valproato y aripiprazol), fármacos antineoplásicos (tales como antiproliferativos), agentes antihipertensivos (tales como atenolol, clonidina, amlodipina, verapamilo y olmesartán), laxantes, suavizantes de las heces, diuréticos (tales como furosemida), antiespasmódicos (tales como dicyclomina), agentes anti discinéticos y medicamentos anti úlcera (tales como esomeprazol). Dicha combinación de agentes farmacéuticamente activos puede administrarse junta o por separado y, cuando se administra por separado, la administración puede realizarse simultáneamente o secuencialmente en cualquier orden. Las cantidades de los compuestos o agentes y los momentos relativos de administración se seleccionarán para conseguir el efecto terapéutico deseado. La administración en combinación de un compuesto de la presente invención con otros agentes de tratamiento puede ser en combinación por administración simultánea en: (1) un composición farmacéutica unitaria que incluye ambos compuestos; o (2) composiciones farmacéuticas separadas que incluyen cada una uno de los compuestos. Como alternativa, la combinación puede administrarse por separado de una manera secuencial en la que un agente de tratamiento se administre en primer lugar y el otro en segundo lugar. Dicha administración secuencial puede ser cercana en el tiempo o remota en el tiempo.

Otro aspecto de la presente invención incluye terapia de combinación que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz del compuesto de la presente invención y una o más terapias adicionales incluyendo quimioterapia, radioterapia, terapia génica o inmunoterapia.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes de la misma. En estos ejemplos, todas las partes y porcentajes son en peso, a menos que se indique lo contrario.

Espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Se recogieron espectros de RMN tanto en un instrumento Varian Unity 300 MHz como en un instrumento Bruker 400 MHz equipado con un automuestreador y se controlaron con una consola DRX400. Se obtuvieron experimentos automatizados usando ICONNMR v 4.0.4 (compilación 1) funcionando con Topspin v 1.3 (nivel de parche 8) usando los experimentos cargados de Bruker convencionales. Para espectroscopia no rutinaria, se adquirieron datos a través del uso de solo Topspin.

Punto de fusión

Se usó un aparato de punto de fusión de etapa caliente Fisher-Johns, a una configuración correspondiente a una velocidad de calentamiento de aproximadamente 5 °C por min.

Calorimetría de exploración diferencial (DSC)

Se recogieron datos de DSC en un Mettler DSC 823e equipado con un automuestreador de 50 posiciones. Se calibró la energía y temperatura del instrumento usando indio certificado. Normalmente 0,5-1,5 mg de cada muestra, en una bandeja de aluminio perforada, se calentó a 10 °C/min de 25 °C a 300 °C. Se mantuvo una purga de nitrógeno 50 ml/min sobre la muestra. El control de instrumentos y los análisis de datos se realizaron usando el paquete de software Stare v 9.10.

Difracción de rayos X en polvo (XRPD)

Método 1

Se recogieron patrones de difracción de rayos X en polvo en un difractómetro Siemens D5000 usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), goniómetro θ - θ , divergencia de $\sqrt{20}$ y rendijas receptoras, un monocromador secundario de grafito y un contador de centelleo. Se comprueba el rendimiento del instrumento usando un patrón Corundum certificado (NIST 1976). El software usado para la recogida de datos fue Diffrac Plus XRD Commander v2.3.1 y los datos se analizaron y presentaron usando Diffrac Plus EVA v 11.0.0.2 o v 13.0.0.2.

Las muestras se ensayaron en condiciones ambientales como especímenes de placa plana usando polvo según se recibieron. Aproximadamente 30 mg de la muestra se empaquetaron cuidadosamente en un hueco en una oblea de silicio de fondo cero, pulida (510). La muestra se rotó en su propio plano durante el análisis. Los detalles de la recogida de datos son:

- 5 • Intervalo angular: de 2 a 42 °2 θ
- Tamaño de etapa: 0,05 °2 θ o 0,1 °2 θ
- Tiempo de recogida: 4 s·etapa⁻¹

10 Método 2

Se recogieron patrones de difracción de rayos X en polvo en un difractómetro Bruker AXS C2 GADDS usando radiación Cu K α (40 kV, 40 mA), etapa XYZ automatizada, video microscopio láser para posicionamiento de automuestra y un detector de área bidimensional HiStar. Las ópticas de rayos X consisten en un espejo multicapa Gobel sencillo acoplado con un colimador de poro de 0,3 mm.

15 La divergencia del haz, es decir, el tamaño eficaz del haz de rayos X sobre la muestra, fue aproximadamente 4 mm. Se empleó un modo de barrido continuo θ - θ con una distancia muestra - detector de 20 cm que dio un intervalo 2 θ eficaz de 3,2 ° - 29,7 °. Normalmente, la mezcla se expondría al haz de rayos X durante 120 segundos. El software usado para la recogida de datos fue GADDS para WNT 4.1.16 y los datos se analizaron y presentaron usando *Diffra Plus* EVA v 9.0.0.2 o v 13.0.0.2.

25 Las muestras ensayadas en condiciones ambientales se prepararon como especímenes de placa plana usando polvo según se recibieron sin molienda. Aproximadamente 1-2 mg de la muestra se comprimieron ligeramente sobre un portaobjetos de vidrio para obtener una superficie plana. Las muestras ensayadas en condiciones no ambientales se montaron sobre una oblea de silicio con un compuesto conductor del calor. Después, la muestra se calentó a la temperatura adecuada a aprox. 10 °C·min⁻¹ y a continuación se mantuvo isotérmicamente durante aprox. 1 minuto antes de que se iniciara la recogida de datos.

30 Difracción de rayos X con monocristal (SCXD)

Se recogieron datos en un difractómetro Bruker AXS 1 K SMART CCD equipado con un dispositivo de refrigeración Oxford Cryosystems Cryostream. Las estructuras se resolvieron usando los programas SHELXS o SHELXD y se refinaron con el programa SHELXL como parte de la suite Bruker AXS SHELXTL. A menos que se indique lo contrario, se dispusieron geoméricamente átomos de hidrógeno acoplados a carbono y se dejaron refinar con un parámetro de desplazamiento. Se localizaron átomos de hidrógeno acoplados a un heteroátomo en una síntesis de Fourier diferencial y se dejaron refinar libremente con un parámetro de desplazamiento isotrópico.

40 **Ejemplo 1. Síntesis de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida**

A una suspensión de (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano (20 mg, 0,092 mmol, preparada como se describe en el documento PCT WO 09/018505), hexafluorofoafato de o-(benzotriazol-1-il)-N,N,N,1-tetrametiluronio (HBTU, 41,7 mg, 0,110 mmol) y ácido 3,5-difluorobenzoico (17,4 mg, 0,110 mmol) en N,N-dimetilformamida (DMF, 2 ml) se le añadió trietilamina (28 mg, 0,28 mmol) a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó durante una noche a temperatura ambiente, se diluyó con acetato de etilo (200 ml) y se lavó con carbonato potásico acuoso al 20 %. El residuo se purificó por cromatografía de gel de sílice con el eluyente metanol:trietilamina = 300:1. El disolvente se retiró para dar (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (30 mg, 76 %), pureza según HPLC: 100 % (214 nm), 98,2 % (254 nm); RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,48 (d, J = 2,0 Hz, 1 H), 8,36 (dd, J = 1,7 Hz, J = 4,9 Hz, 1H), 7,56-7,60 (m, 1H), 7,14-7,20 (m, 1H), 7,05-7,14 (m, 2H), 6,87-6,96 (m, 1H), 6,23 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 3,88-3,96 (m, 1H), 3,02-3,13 (m, 1H), 2,82-3,00 (m, 4H), 2,65-2,82 (m, 2H), 1,97-2,05 (m, 1H), 1,58-1,84 (m, 3H), 1,43-1,55 (m, 1H); IEN-EM 358,1 (MH)⁺.

55 **Ejemplo 2. Síntesis de fumarato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida**

A una solución de ácido 3,5-difluorobenzoico (9,36 g, 59,2 mmol), cloroformo (200 ml) y trietilamina (16,34 g, 161,5 mmol) a 25 °C se le añadió HBTU (22,5 g, 59,2 mmol). La mezcla se calentó a 40-42 °C durante 45 min dando como resultado la formación de una suspensión de color blanco. La suspensión se enfrió a 10 °C y se añadió una solución de (2S,3R)-3-amino-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]octano (11,7 g, 53,8 mmoles) en cloroformo (50 ml) durante un periodo de 15-20 min y se agitó durante 1,5 h. La mezcla de reacción se calentó a 40-42 °C y se añadieron más cantidades de ácido 3,5-difluorobenzoico (2,0 g, 13 mmol) y HBTU (4 g, 11 mmol), seguido de agitación a 40-42 °C durante 2 h y después a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla de reacción se inactivó rápidamente con agua (200 ml), y con agitación, el pH de la fase acuosa se ajustó a pH = 10-11 con hidróxido sódico acuoso al 10 % en peso. Las fases se separaron y la fase orgánica se lavó dos veces con agua (100 ml). El disolvente se retiró al vacío para proporcionar 22,9 g de un sólido viscoso de color naranja. La concentración del producto en el aceite en bruto se

determinó a 66,0 % en peso por HPLC cuantitativa frente a un patrón de referencia; esto corresponde a un rendimiento de 15,1 g (78 %). El aceite se disolvió en metil etil cetona (50 ml) que posteriormente se retiró por destilación al vacío; este proceso se repitió un total de tres veces. Un matraz de fondo redondo de tres bocas y 500 ml, equipado con un agitador en su parte superior, una sonda de temperatura, un embudo de goteo y un condensador, se cargó con ácido fumárico (4,9 g, 42 mmol) y metil etil cetona (150 ml). La suspensión se calentó a 78 °C, lo que condujo a la disolución completa del ácido. Una solución de la (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en metil etil cetona (50 ml) se cargó lentamente, manteniendo la temperatura interna por encima de 75 °C. Después de que se completara la adición, la suspensión se agitó durante 30-45 min a 78 °C y la fuente de calor se apagó. La suspensión se agitó durante una noche, se filtró y la torta se secó a 50 °C al vacío durante 16 h para proporcionar fumarato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en forma de un sólido cristalino de color amarillo claro (99,6 % puro según HPLC), pf 208-210 °C. Rendimiento: 65 % para dos etapas. RMN ¹H (D₂O, 400 MHz): δ 8,30 (d, J = 5,6 Hz, 1H); 8,06 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 7,48 (dd, J = 8,7 Hz, J = 5,6 Hz, 1 H); 6,97-7,06 (m, 1 H); 6,75-6,85 (m, 2 H); 6,49 (s, 2H); 4,15 (d, J = 7,5 Hz, 1 H); 3,69-3,81 (m, 1H); 3,40-3,59 (m, 2H); 3,17-3,40 (m, 4 H); 2,03-2,18 (m, 2H); 1,91-2,03 (m, 2 H), 1,78-1,91 (m, 1 H),

Ejemplo 3. Síntesis de mono-clorhidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida

Procedimiento A: A una solución de 250 mg (0,7 mmol) de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en 10 ml de acetato de isopropilo se le añadió ácido clorhídrico acuoso (65 µl de y 37 % (p/p), 0,78 mmol). La solución se calentó a 50 °C y se enfrió a 0 °C durante un periodo de 4 h. La muestra de mono-clorhidrato era una mezcla de goma y polvo de color blanco a 0 °C. Después, la muestra se calentó a 20 °C y se enfrió de nuevo a 0 °C (rampa de enfriamiento 5 °C/min). Los sólidos resultantes se recogieron y se secaron al vacío a 25 °C durante 24 h. pf (DSC) = 274,8 °C.

Procedimiento B: Se añadió gota a gota ácido clorhídrico concentrado (0,54 ml de 37 % (p/p), 6,6 mmol), con refrigeración en un baño de hielo, a tetrahidrofurano (THF, ~4 ml) y se diluyó a un volumen de 5 ml con THF. Esta solución se añadió gota a gota (durante un periodo de 5 min) a una solución caliente (45-50 °C) de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (2,43 g de pureza 96,8 %, 6,58 mmol) en acetona (20 ml). Los sólidos comenzaron a precipitar. La mezcla se calentó próxima a ebullición durante 15 min, se enfrió a temperatura ambiente y se dejó reposar durante 16 h. Los sólidos se recogieron por filtración con succión en una atmósfera de nitrógeno, se lavaron con acetona y se secaron en un horno de vacío (85 °C, 3 h). Esto dejó 2,26 g de material que era 93 % puro según CLEM. Toda la muestra se digirió en 2-propanol (25 ml) caliente (próximo a ebullición) durante 10 min. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se dejó reposar durante 3 h. Los sólidos se recogieron por filtración con succión en una atmósfera de nitrógeno y se secaron en un horno de vacío (85 °C, 2,5 h). Los cristales de color blanco resultantes eran >99 % puros según HPLC, se pesaron 2,03 g (rendimiento del 78,4 %) y se fundieron a 273-276 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,45 (s ancho, 1 H), 8,66 (d, 1 H), 8,54 (s, 1 H), 8,28 (d, 1 H), 7,76 (d, 1 H), 7,41 (m, 1 H), 7,24 (m, 3H), 4,14 (m, 1 H), 4,07 (m, 1H), 3,46 (m, 2H), 3,10-3,35 (m, 4H), 2,06 (m, 3H), 1,90 (m, 1H), 1,69 (m, 1H). Análisis elemental: Calculado para C₂₀H₂₁ON₃F₂ HCl (C, 60,99 %; H, 5,63 %, N, 10,67 %); Encontrado (C, 60,94 %, 60,91 %; H, 5,64%, 5,66 %; N, 10,63%, 10,67%).

Ejemplo 4. Síntesis de mono-fosfato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida

A una solución de 250 mg (0,7 mmol) de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en 5 ml de alcohol isopropílico se le añadieron 780 µl (0,78 mmol, 1,1 equiv.) de una solución 1 M de ácido fosfórico en THF. La solución se calentó a 50 °C y se enfrió a 0 °C durante un periodo de 4 horas. Se formó una suspensión inmóvil de color blanco a 0 °C, que se mantuvo después de calentar la muestra a temperatura ambiente. La evaporación del disolvente produjo material cristalino que se recogió y se secó al vacío 25 °C durante 24 h. pf (DSC) = 219,2 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8,48 (s, 1H), 8,34 (d, 1 H), 8,28 (d, 1H), 7,68 (d, 1 H), 7,43 (m, 1 H), 7,24 (m, 3H), 5,04 (s a), 3,84 (m, 1 H), 2,70-3,35 (m, 7H), 1,60-1,90 (m, 4H), 1,40 (m, 1H).

Ejemplo 5. Síntesis de mono-4-hidroxibenzoato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida

A una solución de 250 mg (0,70 mmol) de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en 5 ml de acetato de isopropilo se le añadieron 780 µl (0,78 mmol, 1,1 equiv.) de una solución 1 M de ácido 4-hidroxibenzoico en THF. La solución se calentó a 50 °C y se enfrió a 0 °C durante un periodo de 4 horas. El mono-4-hidroxibenzoato se obtuvo en forma de una goma. La cristalización se obtuvo después de sembrar con el hemi-4-hidroxibenzoato y 48 horas de maduración entre 50 °C y temperatura ambiente (ciclo de 4 horas) de una mezcla evaporada de goma y disolvente (solo permaneció un cuarto del volumen de partida). Después, el sólido se aisló por evaporación del disolvente en una atmósfera de nitrógeno. Los sólidos resultantes se recogieron y se secaron al vacío a 25 °C durante 24 h. pf (DSC) = 144,0 °C.

Ejemplo 6. Síntesis de hemi-4-hidroxibenzoato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida

A una solución de 71,5 mg (0,20 mmol) de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en 3,5 ml de acetato de isopropilo se le añadieron 100 μ l (0,1 mmol, 0,5 equiv.) de una solución 1 M de ácido 4-hidroxibenzoico en THF. El acetato de isopropilo se evaporó para producir mono-4-hidroxibenzoato (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en forma de un sólido que se recogió y se secó al vacío a 25 °C durante 24 h. pf. (DSC) = 106,0 °C. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10,23 (s a), 8,43 (s, 1H), 8,29 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 7,78 (d, 1H), 7,61 (m, 1H), 7,41 (m, 3H), 7,22 (m, 1H), 6,80 (d, 1H), 3,66 (m, 1H), 2,70-3,20 (m, 7H), 1,50-1,90 (m, 4H), 1,20 (m, 1H).

Ejemplo 7. Síntesis de monohidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida

A una solución de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (993 mg, 2,80 mmol) y agua (5 ml) se le añadió cloroformo (15 ml). El pH de la fase acuosa se ajustó a pH = 10-11 con hidróxido sódico al 10 % en peso. La mezcla bifásica se agitó vigorosamente, y se dejó que se separan las fases. La fase de cloroformo se aisló, y la fase acuosa se extrajo una vez más con cloroformo (9 ml). Las fases de cloroformo combinadas se lavaron una vez más con agua (7 ml), se filtraron sobre un lecho de sulfato de magnesio anhidro y se concentraron al vacío para proporcionar un aceite incoloro y transparente con tendencia a formar espuma. El material se trató con metil *tert*-butil éter (MTBE, 10-15 ml) seguido de destilación del disolvente al vacío; este proceso se repitió una vez más. Este material se disolvió en MTBE (10-15 ml) y se añadió heptano hasta que apareció turbidez de color blanco. En este momento, se inició una destilación lenta de volátiles a 50-55 °C a presión ambiental y se separó más cantidad de material sólido. La destilación de detuvo y el material se recogió por filtración y se lavó con una pequeña cantidad de heptano. El material se secó al vacío a 55 °C en un flujo de vacío/nitrógeno durante 60 h y a 70-85 °C durante 40 h para proporcionar 400 mg de monohidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en forma de un sólido quebradizo de color blanco: $\alpha_D^{26,6^\circ\text{C}} = 40^\circ$; análisis elemental, calc.: C (63,99); H (6,18); N (11,19), H₂O (4,8 % en peso), encontrado: C (64,23); H (6,27); N (11,18); H₂O (4,48). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): δ 8,46 (d, J = 2 Hz, 1H); 8,35 (dd, J = 4,8 Hz, J = 2 Hz, 1H); 7,56-7,61 (m, 1H); 7,08-7,19 (m, 3H); 6,87-6,95 (m, 1H); 6,32 (d, J = 8,1 Hz, 1H); 3,89-3,95 (m, 1H); 3,00-3,12 (m, 1H); 2,84-2,99 (m, 4H); 2,68-2,84 (m, 2H); 1,98-2,04 (m, 1H); 1,83 (s, 2H); 1,58-1,79 (m, 3H); 1,44-1,54 (m, 1H). Se descompone a 240 °C.

Ejemplo 8. Síntesis de hemi-galactarato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,6-difluorobenzamida

A una solución en agitación de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (357 mg, 1,00 mmol) en etanol absoluto (10 ml) a 70-72 °C se le añadió en pequeñas porciones ácido galactárico (puro) (105 mg, 0,50 mmol). Se continuó calentando durante 15 min más después de que se completara la adición de ácidos. La solución se enfrió lentamente a temperatura ambiente. Después de reposar durante 2 h, los sólidos se recogieron por filtración al vacío, se lavaron con etanol, y se secaron en una atmósfera de nitrógeno conc. durante 30 min. El material resultante se secó durante 3 h a 75 °C un horno de vacío para retirar el etanol residual. Los resultados de los análisis XRPD se muestra en la Figura 11.

Ejemplo 9. Detección de sal de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,6-difluorobenzamida

Se prepararon soluciones madre de base libre de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida de la siguiente manera:

- 20 mg/ml en IPA, 25 mg/ml en i-ProAc-Contraiones 1-12
- 25 mg/ml en i-ProAc-Contraiones 13-20

Cada vial se cargó con 2 ml de solución madre de base libre (40-50 mg de base libre/vial). Después, en cada vial se añadieron volúmenes adecuados de solución de ácido madre, (1 M en THF, a menos que se indique lo contrario) tanto a 1,1 como a 2,2 equivalentes en condiciones ambientales. En consecuencia, se añadieron ácidos insolubles en forma de sólidos. Después, todas las muestras se calentaron a 50 °C antes de enfriar a 0 °C durante 10 horas. Todos los sólidos amorfos, incluyendo gomas y aceites, se pusieron en maduración (ambiente - 50 °C en ciclos de 4 horas durante 2 días), seguido de reanálisis de XRPD. A las muestras que permanecieron amorfas después de la maduración se les añadieron 2 ml de metil etil cetona y las muestras se maduraron adicionalmente durante 3 días. A continuación, las soluciones transparentes se evaporaron a aproximadamente la mitad y después a un cuarto del volumen a 50 °C. Las soluciones restantes se enfriaron adicionalmente a 5 °C antes de la retirada completa del disolvente al vacío. Todos los sólidos resultantes se analizaron por XRPD y cualquiera de las muestras cristalinas con patrones de XRPD únicos se analizaron adicionalmente por RMN ¹H/cromatografía de iones, estabilidad en estado sólido a 40 °C/HR 75 % durante 1 semana y solubilidad acuosa (diana 10 mg/ml a 25 °C, no tamponada)

Contraiones ácidos seleccionados para el estudio de selección de sal

Nº	Ácido	Clase	pKa			LogP	PM
			1	2	3		
1	ácido clorhídrico al 37 % en peso (12 M)	1	-6,10			-	36,46
2	Ácido sulfúrico	1	-3,00	1,92		-1,03	98,08
3	Ácido metanosulfónico	2	-1,20			-1,89	96,10
4	Ácido maleico	1	1,92	6,23		-0,01	116,07
5	Ácido fosfórico	1	1,96	7,12	12,32	-2,15	98,00
6	Ácido L-tartárico	1	3,02	4,36		-1,43	150,09
7	Ácido fumárico usado como polvo	1	3,03	4,38		-0,01	116,07
8	Ácido cítrico	1	3,13	4,76	6,40	-1,72	192,12
9	Ácido L-málico	1	3,46	5,10		-1,26	134,09
10	Ácido 1-hidroxi-2-naftoico usado en como polvo	2	2,70	13,50		3,29	188,17
11	Ácido 4-hidroxibenzoico	2					
12	Ácido succínico 1 M en MeOH	1	4,21	5,64		-0,59	118,09
13	Ácido benenosulfónico	2	0,70			0,47	158,18
14	Ácido p-toluenosulfónico 1 M en EtOH	2	-1,34			0,93	190,22
15	Ácido hipúrico usado en forma de polvo	1	3,55			0,31	179,17
16	Ácido D-glucónico al 50 % en agua	1	3,76			-3,18	196,16
17	Ácido acético	1	4,76			-0,29	60,05
18	Ácido bezoico 1 M en IPA	2	4,19				
19	Ácido propiónico	2	4,87			0,25	74,07
20	Ácido L-aspártico usado en forma de polvo	1	1,88	3,65		-0,67	133,11

Tabla -- Resumen de detección de sales

Contraión	Disolvente	Estereoquímica diana	Observación en la adición de ácido a TA	Observación a 0 °C	análisis XRPD después de filtración	XRPD después de 48 horas de maduración	XRPD después de evaporación y maduración en MEK	Observación en la 2ª maduración
clorhidrato	2-propanol	mono sal	Solución transparente	Polvo de color blanco	Cristalino♣	Cristalino♣	n/a	n/a
		bis sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	Cristalino♣	n/a
Sulfato	Acetato de isopropilo	mono sal	Precipitado	Polvo de color blanco	Cristalino♣	Cristalino♣	n/a	n/a
		bis sal	Precipitado	Polvo de color blanco	goma♣	Cristalino♣	n/a	n/a
	mono sal	Precipitado	Polvo de color blanco	goma♣	Cristalino♣	Cristalino♣	n/a	n/a
	bis sal	Precipitado	Polvo de color blanco	goma♣	goma♣	Cristalino♣	goma♣	goma♣
Mesilato	Acetato de isopropilo	mono sal	Precipitado	Polvo de color blanco	Amorfo ▼	Amorfo ▼	Amorfo ▼	Polvo de color blanco
		bis sal	Precipitado	Polvo de color blanco	goma♣	Solución transparente	goma*	goma♣
	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	bis sal	Precipitado	Precipitado	Solución transparente	goma	Amorfo*	Amorfo*	Polvo de color blanco
Maleato	Acetato de isopropilo	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	n/a	goma♣
		bis sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	n/a	goma♣
	mono sal	goma	goma	goma	n/a	goma♣	n/a	goma♣
	bis sal	goma	goma	goma	n/a	goma♣	n/a	goma♣
Fosfato	2-propanol	mono sal	Precipitado	Polvo de color blanco	n/a Sin suficiente material	Cristalino♣	n/a	n/a
		bis sal	Precipitado	Polvo de color blanco	goma♣	Polvo de color blanco	Amorfo ▼	Polvo de color blanco
	Acetato de isopropilo	mono sal	Precipitado	goma	n/a	Cristalino♣	n/a	n/a
		bis sal	Precipitado	goma	n/a	Cristalino♣	n/a	n/a

	2-propanol	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	Cristalino♣	n/a
		bis sal	Solución transparente	Solución transparente	Principalmente amorfo ▼	Experimento detenido ▼	Cristalino♣	n/a
Fumarato	Acetato de isopropilo	mono sal	Solución transparente	Precipitado	Amorfo ▼	Cristalino♣	n/a	n/a
		bis sal	Solución transparente	Precipitado	Amorfo ▼	Cristalino♣	n/a	n/a
Citrato	2-propanol	mono sal	Precipitado	Polvos de color blanco	goma♣	n/a	goma♣	goma♣
		bis sal	Precipitado	Polvos de color blanco	goma♣	n/a	goma♣	goma♣
	mono sal	Precipitado	Polvos de color blanco	Amorfo ▼	Amorfo ▼	Amorfo ▼	Amorfo ▼	Polvo de color blanco
	bis sal	Precipitado	Polvos de color blanco	Amorfo ▼	Amorfo ▼	Amorfo ▼	Amorfo ▼	Polvo de color blanco
Malato	2-propanol	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
		bis sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
	mono sal	Precipitado	Polvos de color blanco	Amorfo ▼	Amorfo ▼	Forma amorfa	Amorfo*	Polvo de color blanco
	bis sal	Precipitado	Polvos de color blanco	goma♣	goma♣	Baja cristalinidad ♣	n/a	n/a
Xinafoato	2-propanol	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
		bis sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	Solución transparente	goma♣	goma♣
	bis sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	Solución transparente	goma♣	goma♣
4-hidroxi-benzoato	2-propanol	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
		bis sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	Cristalino♣	n/a	n/a
	bis sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	Solución transparente	goma♣	goma♣

Succinato	2-propanol	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
		bis sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
bencilato	Acetato de isopropilo	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
		bis sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
Tosilato	Acetato de isopropilo	mono sal	Precipitado	Polvo de color blanco	Amorfo ♥	Baja cristalinidad ♣	n/a	n/a
Hipurato	Acetato de isopropilo	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	Cristalino♣	n/a
		mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
Gluconato	Acetato de isopropilo	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
		mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
Acetato	Acetato de isopropilo	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
		mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
Benzoato	Acetato de isopropilo	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
		mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
Propionato	Acetato de isopropilo	mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	Cristalino ♣
		mono sal	Solución transparente	Solución transparente	n/a	Solución transparente	goma♣	goma♣
Aspartato	Acetato de isopropilo	mono sal	No disuelto	No disuelto	Cristalino igual que el que el ácido ♥	Cristalino igual que el que el ácido ♥	Cristalino igual que el que el ácido ♥	n/a
		mono sal	No disuelto	No disuelto	Cristalino igual que el que el ácido ♥	Cristalino igual que el que el ácido ♥	Cristalino igual que el que el ácido ♥	n/a

Claves: ♣ Cristalino,

♥ Amorfo

♣ Ningún análisis adicional realizado

n/a No aplicable

Tabla -- Caracterización después de detección de sal primaria

Sal	Estereoquímica diana	XRPD después de filtración	Estequiometría (Acido:Base)		XRPD 40 °C/HR 75 % 1 Semana (Véase Figura 12)	Solubilidad acuosa
			RMN ¹ H	Cromatografía iónica		
clorhidrato	mono sales	Patrón 1	Confirmación de la formación de sal	1,0:1	Patrón 1 ♣	> 10 mg/ml
	bis sales	Patrón 2 Patrón 3	Confirmación de la formación de sal	n/a	delicuescente ♣	n/a
Fosfato	mono sales	Patrón 1	Confirmación de la formación de sal	1,0:1	Patrón 1 ♣	> 10 mg/ml
	mono y bis sales	Patrón 2	Confirmación de la formación de sal	n/a	Patrón 1 ♣ Patrón 2 ♣	> 10 mg/ml
Fumarato	mono sal	Patrón 1	Confirmación de la formación de una mono sal 1,0:1	n/a	Patrón 1 ♣	> 10 mg/ml
	bis sal	Patrón 2	Confirmación de la formación de una bis sal 1,9:1	n/a	Patrón 2 ♣	> 10 mg/ml
4-hidroxi benzoato	mono sal	Patrón 1	Confirmación de la formación de una hemi sal 0,5:1	n/a	Patrón 1 ♣	> 10 mg/ml
Benzoato	mono sal	Patrón 1	Confirmación de formación de mono sal	n/a	Patrón 2 ♣	0,8 mg/ml
Sulfato	mono sal	Patrón 1	Confirmación de la formación de sal	n/a	delicuescente ♣	n/a
Mesilato	mono y bis sales	Patrón 1*	Confirmación de la formación de una mono sal	n/a	delicuescente ♣	n/a
Malato	bis sales	Patrón 1 Baja cristalinidad	Confirmación de la formación de sal 1,4:1	n/a	delicuescente ♣	n/a
Tosilato	mono sales	Patrón 1	Confirmación de la formación de sal 1:1	n/a	delicuescente ♣	n/a

Claves: ♣Cristalino

♥ Amorfo

♣ Ningún análisis adicional realizado

n/a No aplicable

Ejemplo 10. Estructura cristalina de la sal clorhidrato

Se obtuvieron cristales de sal clorhidrato por maduración entre temperatura ambiente y 50 °C de una solución en metanol de mono-clorhidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida. Los datos de estructura de un solo cristal se indican en la tabla más adelante. Se comprobó que la muestra era representativa del conjunto

Estructura de un sólo cristal de la sal mono clorhidrato

Fórmula molecular	C ₂₀ H ₂₂ ClF ₂ N ₃ O				
Peso molecular	393,86				
Sistema cristalino	Monodínico				
Grupo espacial	P2 ₁	un	10,049 (1) Å	α	90°
		b	8,872 (1) Å	β	94,088 (3)°
		c	10,491 (1) Å	γ	90°
V	933,07 (15) Å ³				
Z	2				
D _c	1,402 g·cm ⁻¹				
μ	0,239 mm ⁻¹				
Fuente, λ	Mo-K (alfa), 0,71073 Å				
F(000)	412				
T	120(2)K				
Cristal	prima incoloro, 0,3 x 0,15 , 0,11 mm				
Datos truncados a	0,80 Å				
θ _{max}	26,37°				
Grado de compleción	99,4%				
Reflexiones	7986				
Reflexiones únicas	3750				
R _{int}	0,0135				
Parámetro de Flack	-0,04 (3)				
R _{all}	0,0236				
R ₁	0,0231				

10 Las solución de estructura se obtuvo por métodos directos, refinamiento por mínimos cuadrados de matriz completa en F² con ponderación $w^{-1} = \sigma^2(F_o^2) + (0,0435P)^2 + (0,1500P)$, donde $P = (F_o^2 + 2F_c^2)/3$, parámetros de desplazamiento anisotrópico, se aplicaron corrección de absorción empíricas, parámetro de estructura absoluta = -0,04(3). Final $wR^2 = \{\sum[w(F_o^2 - F_c^2)^2] / \sum[w(F_o^2)^2]\}^{1/2} = 0,0636$ para todos los datos, convencional $R_1 = 0,0231$ en valores de F de 3684 reflexiones con $F_o > 4\sigma(F_o)$, S = 1,004 para todos los datos y 252 parámetros. Final Δ/σ (máx) 0,001, Δ/σ (media), 0,000. Representación de diferencia final entre +0,195 y -0,136 e Å⁻³.

El valor del parámetro de estructura absoluta permitió la determinación de la configuración de los centro quirales. Esta configuración se indica en la Figura 10.

20 Ejemplo 11. Ensayos biológicos

Unión con radioligando en el subtipo de NNR α4β2 nAChR del SNC

25 Preparación de membranas de corteza de rata: se mantuvieron ratas (hembras, Sprague-Dawley), que pesaban 150-250 g, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les permitió libre acceso al agua y alimento proporcionados por PMI Nutrition International, Inc. Los animales se anestesiaron con CO₂ al 70 % y después se decapitaron. Se retiraron los cerebros y se colocaron en una plataforma helada. La corteza cerebral se retiró y se colocó en 20 volúmenes (peso:volumen) de tampón preparatorio helado (NaCl 137 mM, KCl 10,7 mM, KH₂PO₄ 5,8 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, HEPES 20 mM (ácido libre), yodoacetamida 5 mM, EDTA 1,6 mM, pH 7,4); se añadió PMSF, disuelto en metanol a una concentración final de 100 μM, y la suspensión se homogeneizó por Polytron. El homogeneizado se centrifugó a 18.000 x g durante 20 minutos a 4 °C y el sedimento resultante se resuspendió en 20 volúmenes de agua helada. Después de 60 minutos de incubación en hielo, se recogió un nuevo sedimento por centrifugación a 18.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sedimento final se resuspendió en 10 volúmenes de tampón y se almacenó a -20 °C.

35 Preparación de membranas de células clonales α4β2 humanas/SH-EP1: se agruparon sedimentos celulares de 40 placas de cultivo de 150 mm, y se homogeneizaron por Polytron (Kinematic GmbH, Suiza) en 20 mililitros de tampón preparatorio helado. El homogeneizado se centrifugó a 48.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sedimento resultante se resuspendió en 20 ml de tampón preparatorio helado y se almacenó a -20 °C.

40 El día del ensayo, las membranas congeladas se descongelaron y se centrifugaron a 48.000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante se decantó y se descartó. El sedimento se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato de

Dulbecco (PBS, Life Technologies) pH 7,4 y se homogeneizó con el Polytron durante 6 segundos. Se determinaron las concentraciones de proteínas usando un Kit de Ensayo de Proteínas Pierce BCA, con albúmina de suero bovino como el patrón (Pierce Chemical Company, Rockford, IL).

5 Se incubaron preparaciones de membrana (aproximadamente 50 µg para ser humano y 200-300 µg de proteína para α4β2 de rata) en PBS (50 µl y 100 µl respectivamente) en presencia de compuesto competidor (de 0,01 nM a 100 µM) y [³H] nicotina 5 nM durante 2-3 horas en hielo. La incubación se terminó por filtración rápida en un recolector tisular multicolector (Brandel, Gaithersburg, MD) usando filtros GF/B previamente empapados en polietilenimina 0,33 % (p/v) para reducir la unión no específica. El tejido se aclaró 3 veces en PBS, pH 7,4. Se añadió líquido de centelleo a filtros
10 que contenían el tejido lavado y se permitió que se equilibraran. Después se contaron los filtros para determinar la radiactividad unidad a las membranas por recuento de centelleo líquido (2200CA Tri-Carb LSC, Packard Instruments, 50 % de eficacia o Wallac Trilux 1450 MicroBeta, 40 % de eficacia, Perkin Elmer).

Los datos se expresaron como desintegraciones por minuto (DMP). Dentro de cada ensayo, cada punto tuvo 2-3
15 repeticiones. Las repeticiones para cada punto se promediaron y se representaron frente al logaritmo de la concentración de fármaco. Se determinó la CI₅₀, que es la concentración del compuesto que produce 50 % de inhibición de la unión, por regresión no lineal de mínimos cuadráticos. Se calcularon los valores de Ki usando la ecuación Cheng-Prusoff (1973):

$$20 \quad K_i = CI_{50} / (1 + N/K_d)$$

en la que N es la concentración de [³H]nicotina y K_d es la afinidad de la nicotina (3 nM, determinada en un experimento separado).

25 **Subtipo de NNR α7**

Se mantuvieron ratas (hembras, Sprague-Dawley), que pesaban 150-250 g, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se les permitió acceso libre a agua y alimentos proporcionados por PMI Nutrition International, Inc. Se anestesió a los animales con CO₂ al 70 %, y después se decapitaron. Se retiraron los cerebros y se colocaron en una plataforma helada. El hipocampo se retiró y se colocó en 10 volúmenes (peso:volumen) de tampón preparatorio helado (NaCl 137 mM, KCl 10,7 mM, KH₂PO₄ 5,8 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, HEPES 20 mM (ácido libre), yodoacetamida 5 mM, EDTA 1,6 mM, pH 7,4); se añadió PMSF, disuelto en metanol hasta una concentración final de 100 µM, y se homogeneizó la suspensión tisular por Polytron. El homogeneizado se centrifugó a 18.000 x g durante 20 minutos a 4 °C y el sedimento resultante se resuspendió en 10 volúmenes de agua helada. Después de 60 minutos de incubación en hielo, se recogió
30 un nuevo sedimento por centrifugación a 18.000 x g durante 20 minutos a 4 °C. El sedimento final se resuspendió en 10 volúmenes de tampón y se almacenó a -20 °C. El día del ensayo, se descongeló el tejido, se centrifugó a 18.000 x g durante 20 minutos, y después se resuspendió en PBS helado (Solución Salina Tamponada con Fosfato de Dulbecco, NaCl 138 mM, KCl 2,67 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, CaCl₂ 0,9 mM, MgCl₂ 0,5 mM, Invitrogen/Gibco, pH 7,4) hasta una concentración final de aproximadamente 2 mg de proteína/ml. La proteína se determinó por el método de Lowry *et al.*, J. Biol. Chem. 193: 265 (1951), usando albúmina de suero bovino como el patrón.
40

La unión de [³H]MLA se midió usando una modificación de los métodos de Davies *et al.*, Neuropharmacol. 38: 679 (1999). Se obtuvo [³H]MLA (Actividad Específica = 25-35 Ci/mmol) de Tocris. Se determinó la unión de [³H]MLA usando una incubación de 2 horas a 21 °C. Las incubaciones se realizaron en placas de microtitulación de 48 pocillos y contenían aproximadamente 200 µg de proteína por pocillo en un volumen de incubación final de 300 µl. El tampón de incubación fue PBS y la concentración final de [³H]MLA fue de 5 nM. La reacción de unión se terminó por filtración del ligando unido que contenía proteína en filtros de fibra de vidrio (GF/B, Brandel) usando un recolector tisular Brandel a temperatura ambiente. Los filtros se empaparon en agua desionizada que contenía polietilenimina 0,33 % para reducir la unión no específica. Cada filtro se lavó con PBS (3 x 1 ml) a temperatura ambiente. Se determinó la unión no
45 específica mediante inclusión de MLA no radiactivo 50 µM en pocillos seleccionados.
50

Se determinó la inhibición de la unión de [³H]MLA por compuestos de ensayo incluyendo siete concentraciones diferentes del compuesto de ensayo en pocillos seleccionados. Cada concentración se replicó por triplicado. Se estimaron los valores de CI₅₀ como la concentración de compuesto que inhibía el 50 % de unión de [³H]MLA específica. Se calcularon las constantes de inhibición (valores K_i), indicadas en nM, a partir de los valores de CI₅₀ usando el método de Cheng *et al.*, Biochem. Pharmacol. 22: 3099-3108 (1973).
55

Selectividad frente a nAChR periféricos

60 **Interacción en el subtipo de nAChR muscular humano**

Se estableció la activación de nAChR de tipo muscular en la línea clonal humana TE671/RD, que deriva de un rabdomiosarcoma embrionario (Stratton *et al.*, Carcinogen 10: 899 (1989)). Estas células expresan receptores que tienen perfiles farmacológicos (Lukas, J. Pharmacol. Exp. Ther. 251: 175 (1989)), electrofisiológicos (Oswald *et al.*, Neurosci. Lett. 96: 207 (1989)) y biológicos moleculares (Luther *et al.*, J. Neurosci. 9: 1082 (1989)) similares al nAChR
65

de tipo muscular.

Se mantuvieron células TE671/RD en fase de crecimiento proliferativa de acuerdo con protocolos rutinarios (Bencherif *et al.*, Mol. Cell. Neurosci. 2: 52 (1991) y Bencherif *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 257: 946 (1991)). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco/BRL) con suero de caballo al 10 % (Gibco/BRL), suero bovino fetal al 5 % (Hy Clone, Logan UT), piruvato sódico 1 mM, L-Glutamina 4 mM y 50.000 unidades de penicilina-estreptomocina (Irvine Scientific). Cuando las células fueron confluyentes al 80 %, se sembraron en placas de poliestireno de 12 pocillos (Costar). Se realizaron experimentos cuando las células alcanzaron 100 % de confluencia.

Se ensayó la función del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) usando salida de $^{86}\text{Rb}^+$ de acuerdo con el método descrito por Lukas *et al.*, Anal. Biochem. 175: 212 (1988). El día del experimento, se retiró suavemente el medio de cultivo del pocillo y se añadió medio de cultivo que contenía cloruro de $^{86}\text{Rubidio}$ ($10^6 \mu\text{Ci/ml}$) a cada pocillo. Las células se incubaron a 37 °C durante un mínimo de 3 horas. Después del periodo de carga, se retiró el exceso de $^{86}\text{Rb}^+$ y las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin marcador (NaCl 138 mM, KCl 2,67 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, CaCl_2 0,9 mM, MgCl_2 0,5 mM, Invitrogen/Gibco, pH 7,4), teniendo cuidado de no alterar las células. A continuación, las células se expusieron a 100 μM del compuesto de ensayo, 100 μM de L-nicotina (Acros Organics) o tampón solamente durante 4 minutos. Después del periodo de exposición, se retiró el sobrenadante que contenía el $^{86}\text{Rb}^+$ liberado y se transfirió a frascos de centelleo. Se añadió líquido de centelleo y se midió la radiactividad liberada por recuento de centelleo líquido.

Dentro de cada ensayo, cada punto tuvo 2 repeticiones, que se promediaron. Se comparó la cantidad de liberación de $^{86}\text{Rb}^+$ tanto con un control positivo (L-nicotina 100 μM) como con un control negativo (tampón solamente) para determinar el porcentaje de liberación en relación con el de L-nicotina.

Cuando fue apropiado, se determinaron las curvas de respuesta a dosis del compuesto de ensayo. La activación máxima para compuestos individuales ($E_{\text{máx}}$) se determinó como un porcentaje de la activación máxima inducida por L-nicotina. También se determinó la concentración del compuesto que dio como resultado activación semi máxima (CE_{50}) del flujo iónico específico.

Interacción en el subtipo de nAChR ganglionar de rata

Se estableció la activación de nAChR ganglionares de rata en la línea clonal de feocromocitoma PC12, que es una línea celular clonal continua de origen en la cresta neural, derivada de un tumor de la médula adrenal de rata. Estas células expresan nAChR de tipo ganglionar (véase Whiting *et al.*, Nature 327: 515 (1987); Lukas, J. Pharmacol. Exp. Ther. 251: 175 (1989); Whiting *et al.*, Mol. Brain Res. 10: 61 (1990)).

Se mantuvieron células de rata PC12 en fase de crecimiento proliferativo de acuerdo con protocolos rutinarios (Bencherif *et al.*, Mol. Cell. Neurosci. 2: 52 (1991) y Bencherif *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 257: 946 (1991)). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (Gibco/BRL) con suero de caballo al 10 % (Gibco/BRL), suero bovino fetal al 5 % (Hy Clone, Logan UT), piruvato sódico 1 mM, L-Glutamina 4 mM y 50.000 unidades de penicilina-estreptomocina (Irvine Scientific). Cuando las células fueron confluyentes al 80 %, se sembraron en placas Nunc de 12 pocillos (Nunc) y se recubrieron con poli-L-lisina 0,03 % (Sigma, disuelto en ácido bórico 100 mM). Se realizaron experimentos cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia.

Se ensayó la función del receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) usando salida de $^{86}\text{Rb}^+$ de acuerdo con un método descrito por Lukas *et al.*, Anal. Biochem. 175: 212 (1988). El día del experimento, se retiró suavemente el medio de cultivo del pocillo y se añadió medio de cultivo que contenía cloruro de $^{86}\text{Rubidio}$ ($10^6 \mu\text{Ci/ml}$) a cada pocillo. Las células se incubaron a 37 °C durante un mínimo de 3 horas. Después del periodo de carga, se retiró el $^{86}\text{Rb}^+$ en exceso y las células se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin marcador (NaCl 138 mM, KCl 2,67 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, CaCl_2 0,9 mM, MgCl_2 0,5 mM, Invitrogen/Gibco, pH 7,4), teniendo cuidado de no alterar las células. A continuación, las células se expusieron a 100 μM del compuesto de ensayo, 100 μM de nicotina o tampón solamente durante 4 minutos. Después del periodo de exposición, el sobrenadante que contenía el $^{86}\text{Rb}^+$ liberado se retiró y se transfirió a frascos de centelleo. Se añadió líquido de centelleo y se midió la radiactividad liberada por recuento de centelleo líquido.

Dentro de cada ensayo, cada punto tuvo 2 repeticiones, que se promediaron. La cantidad de liberación de $^{86}\text{Rb}^+$ se comparó tanto con un control positivo (nicotina 100 μM) como con un control negativo (tampón solamente) para determinar el porcentaje de liberación en relación con el de L-nicotina.

Cuando fue apropiado, se determinaron las curvas de respuesta a dosis del compuesto de ensayo. Se determinó la activación máxima para compuestos individuales ($E_{\text{máx}}$) como un porcentaje de la activación máxima inducida por L-nicotina. También se determinó la concentración del compuesto que da como resultado activación semi máxima (CE_{50}) del flujo iónico específico.

Reconocimiento de nuevo objeto

Se evaluó la memoria usando el ensayo de reconocimiento de nuevo objeto de tres pruebas. El primer día (prueba exploratoria), se permitió que las ratas exploraran una arena abierta (44,5 x 44,5 x 30,5 cm) durante 6 minutos. El segundo día (prueba de adquisición), se permitió que las ratas exploraran la misma arena en presencia de dos objetos idénticos (ambos objeto A) durante 3 minutos. Al tercer día (prueba de retención o recuerdo), se evaluó el rendimiento permitiendo que el mismo animal volviera a explorar la arena durante 3 minutos en presencia de dos objetos diferentes: el objeto familiar A y un objeto nuevo B. Se impuso un intervalo entre pruebas de 24 horas entre las tres pruebas de NOR. Se evaluó la memoria de reconocimiento comparando el tiempo pasado explorando un objeto nuevo (objeto B) frente a uno familiar (objeto A) durante la prueba de recuerdo. Se evaluó el índice de reconocimiento para cada animal y se expresó como una relación ((tiempo B / tiempo A + tiempo B) x 100).

Sumario de datos biológicos**Farmacología *in vitro***

Se presenta un sumario de los datos de farmacología primaria *in vitro* para (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la Tabla 1 y se analiza en detalle posteriormente.

Farmacología primaria y selectividad: (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida inhibió la unión de [³H]metillicaconitina (MLA) con receptores $\alpha 7$ nativos de rata en membranas del hipocampo de ratas con una K_i de 100 nM.

(2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida inhibió la unión de [³H]-nicotina con receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 2$ recombinantes humanos con una K_i de 1470 nM y [³H]epibatidina con receptores $\alpha 4\beta 2$ nativos de rata con una K_i de 4120 nM. (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida también presentó afinidad reducida por receptores nicotínicos de tipo ganglionar nativos humanos (probablemente $\alpha 3\beta 4$), inhibiendo la unión de [³H]epibatidina con receptores en membranas SH-SY5Y con una K_i de 48 μ M, y afinidad reducida por receptores nicotínicos de tipo muscular nativos humanos (probablemente $\alpha 1\beta 1\gamma \delta$), inhibiendo la unión de [³H]epibatidina con receptores en membranas TE-671 con una K_i de 136 μ M. (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida inhibió la unión de [³H]epibatidina con los receptores nicotínicos $\alpha 4\beta 4$ recombinantes humanos en membranas SH-EP1 con una K_i de 19 μ M.

Tabla 1. Sumario de la farmacología *in vitro* de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida

Afinidad y activación de diana	
Hipocampo de rata ($\alpha 7$), K_i	0,1 μ M
K_i de unión de la corteza de rata	4,12 μ M
K_i de unión de $\alpha 4\beta 2$ recombinante humano (SH-EP 1)	1,47 μ M
Ganglionar humano (SH-SY5Y), K_i	48 μ M
Músculo humano (TE671/RD), K_i	136 μ M
$\alpha 4\beta 4$ humano recombinante (SH-EP1), K_i	19 μ M

Farmacología *in vivo*

Se presenta un sumario de los datos de farmacología *in vivo* para (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la Tabla 2 y se analiza en detalle posteriormente.

Tabla 2

Sumario de los resultados de NOR para (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo	
Modelo de Reconocimiento de Nuevo Objeto (NOR)	Resultado
Dosis Eficaz Mínima (MED)	MED= 0,084 μ mol/kg
Duración del Efecto	Duración 6 horas (a 0,1 mg/kg) Duración 18 horas (a 0,3 mg/kg)

(2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida mejoró la memoria declarativa/episódica visual a largo plazo como se evaluó por la tarea de reconocimiento de nuevo objeto (NOR) después de la dosificación oral en ratas normales. Los resultados de estos estudios se presentan en la Figura 1. El índice de reconocimiento del grupo tratado con vehículo 24 horas después del ensayo de adquisición fue de $54 \pm 1\%$ lo que demuestra la incapacidad de este grupo para reconocer el objeto familiar después de este retardo. Por el contrario, los animales tratados con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida

mostraron índices de reconocimiento de 70 ± 4 % al nivel de dosis de $0,84 \mu\text{mol/kg}$ y 74 ± 3 % y el nivel de dosis de $0,25 \mu\text{mol/kg}$.

En un estudio de NOR de seguimiento (Figura 2), se determinó que el nivel de dosis de efecto mínimo (MED) para (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida era $0,084 \mu\text{mol/kg}$ lo que sugiere que las ratas son capaces de reconocer el objeto familiar a todos los niveles de dosis ensayados. En la sesión de "solo recuerdo"; se dosificó por vía oral a un subconjunto de animales agua el día 1 (es decir, sesión exploratoria) y el día 2 (es decir, sesión de adquisición) y después se dosificaron por vía oral con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida $0,28 \mu\text{mol/kg}$ el día 3 (es decir, sesión de recuerdo). Incluso después de una única administración oral, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida demostró efectos procognitivos a este nivel de dosis. (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida mostró índices de reconocimiento significativamente por encima de los controles, lo que indica el reconocimiento del objeto familiar después de la dosificación aguda. La línea discontinua al 65 % indica los criterios de los inventores para actividad potenciadora cognitiva biológica. *P < 0,05.

(2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida se evaluó con respecto a la duración de su efecto en la tarea de NOR en ratas normales. Los resultados de estos estudios se presentan en la Figura 3. El índice de reconocimiento del grupo tratado con vehículo a las 0,5 horas y 24 horas después de la dosificación en el ensayo de recuerdo fue el 51 ± 1 % y 53 ± 4 %, respectivamente, lo que demuestra la incapacidad de este grupo para reconocer el objeto familiar después de este retardo. Por el contrario, los animales tratados con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida ($0,28 \mu\text{mol/kg}$; oral) mostraron índice de reconocimiento de 68 ± 4 % a las 0,5 horas, 71 ± 2 % a las 2 horas y 62 ± 2 % a las 6 horas lo que sugiere que las ratas son capaces de reconocer el objeto familiar durante hasta 6 horas después de la dosificación.

Además, los animales tratados con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida ($0,84 \mu\text{mol/kg}$; oral) mostraron índices de reconocimiento de 59 ± 2 % a las 0,5 horas, 63 ± 2 % a las 2 horas, 68 ± 3 % a las 6 horas y 68 ± 3 % a las 18 horas lo que sugiere que las ratas son capaces de reconocer el objeto familiar durante hasta 18 horas después de la dosificación a este nivel de dosis (Figura 4). La línea discontinua al 65 % indica los criterios de los inventores para actividad potenciadora cognitiva biológica (*P < 0,05).

Electrofisiología

El Compuesto A, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida y el Compuesto B, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-4-fluorobenzamida son ambos agonistas parciales en el NNR $\alpha 7$. Sin embargo existen diferencias drásticas entre los dos compuestos en su capacidad para inducir las llamadas corrientes pico. Las corrientes pico se definen como la corriente de cola observada durante la aplicación conjunta con ACh endógeno después de la retirada del agonista. Como se demuestra en el presente documento, el Compuesto A proporciona un perfil mejorado y un mayor potencial para modular la función de $\alpha 7$ en afecciones, tales como trastornos psicóticos, en las que esta neurotransmisión está comprometida.

Se analizó la respuesta a dosis de los Compuestos A y B con receptores nicotínicos de ACh $\alpha 7$. Tanto el Compuesto B como el Compuesto A son agonistas parciales en receptores nicotínicos $\alpha 7$ ($CE_{50} = 664 \text{ nM}$, $1,6 \mu\text{M}$ y $E_{\text{máx}} = 46,6$ %, $54,4$ %). Como se muestra en la Figura 5, tanto CE_{50} como $E_{\text{máx}}$ son comparables entre estos ligandos.

La aplicación conjunta de compuestos con ACh, sin embargo, reveló diferencias sustanciales entre estos dos ligandos, como se ilustra en la Figura 6. El Compuesto B inhibió la corriente producida por ACh, supuestamente debido a la inhibición competitiva, mientras que el Compuesto A potenció la corriente inducida por ACh. Una hipótesis para esta potenciación es la capacidad del Compuesto A para modulación ortoestérica.

Adicionalmente, se encontraron diferencias sustanciales cuando ACh se aplicó conjuntamente con concentraciones nanomolares del Compuesto B o Compuesto A, como se muestra en las Figuras 7 y 8.

La Figura 7A representa un diseño experimental de microplaca de carga Dynaflo para medir la interacción del ligando (Compuesto A, 200 nM) con acetilcolina ($100 \mu\text{M}$) con respecto a la activación del receptor nicotínico $\alpha 7$. Los canales se prepararon de la siguiente manera: solución de control (canal nº 2), ligando de aplicación en sí mismo (canal nº 3), aplicación de acetilcolina en sí misma (canal nº 1) y aplicación de mezcla de acetilcolina y ligando (canal nº 4).

La Figura 7B muestra cuatro curvas de corriente representativas obtenidas con diferentes secuencias de aplicación:

Curva 1, Figura 7B: la barra sobre la curva indica el tiempo de aplicación de ACh. La curva representa la corriente inducida por una segunda aplicación de ACh $70 \mu\text{M}$. La curva ilustra el resultado de mover la célula del canal nº 2 al canal nº 1 durante una aplicación de 1 segundo de ACh y de vuelta al canal 2 (lavado). La aplicación de ACh produjo activación robusta de la corriente con rápida recuperación después del lavado.

Curva 4, Figura 7B: la curva 4 representa una repetición de la curva 1 al final de las mediciones después de la

aplicación del ligando y la mezcla de ACh/ligando (recuperación).

Curva 2, Figura 7B: las flechas abajo/arriba indican el tiempo de aplicación. La curva 2 representa una aplicación de 5 segundos de 200 nM del Compuesto A. La curva ilustra el resultado de mover la célula del canal nº 2 al canal nº 3 durante 5 segundos. El Compuesto A en la concentración de 200 nM solamente no produce macro corrientes robustas.

Curva 3, Figura 7B: la curva 3 representa la interacción de aplicación de ACh y el Compuesto A. La Curva 3 ilustra los resultados de mover la célula del canal nº 2 al nº 3 (2 segundos), al nº 4 (1 segundo) y de vuelta al nº 3 (2 segundos) y de vuelta al nº 2 (lavado). Se crea una corriente "pico" profunda debido a la aplicación del Compuesto A después de la aplicación de ACh. Esta corriente no fue el resultado de ACh, como se ve cuando se comparan las Curvas 1 y 4, o el Compuesto A, como se ve en la Curva 2, activación de receptores de $\alpha 7$ solamente. Más bien la Curva 3 ilustra un ejemplo de interacción de la aplicación tanto de ACh como del Compuesto A.

La Figura 7C representa una media (n=4) de valores absolutos de corrientes pico obtenidas con diferentes concentraciones de Compuesto A (intervalo de 100 - 500 nM). Los inventores observaron un aumento dependiente de la concentración de la corriente ($CE_{50} = 120$ nM) con $E_{m\acute{a}x}$ a aproximadamente 500 nM.

De forma similar, las Figuras 8A, 8B y 8C representan los resultados obtenidos para el Compuesto B. Tras comparar las Figuras 7A-C y con las Figuras 8A-C, pueden observarse diferencias sustanciales cuando se aplicó conjuntamente ACh con el Compuesto A en comparación con el Compuesto B. El Compuesto A potencia la corriente inducida por ACh.

Ensayo de formalina

Uno de los modelos de exploración más clínicamente predictivos del dolor agudo es el ensayo de formalina en ratones (LeBars *et al.*, 2001). En este paradigma, originalmente descrito por Dubuisson y Dennis (1977), se inyecta una solución diluida de formalina en la superficie plantar de la pata trasera de un sujeto (rata o ratón) y se mide el comportamiento nociceptivo; por ejemplo, lamerse y morderse la pata inyectada. Se observan dos fases de la respuesta. En primer lugar una fase temprana, que comienza inmediatamente después de la inyección y dura 5-10 minutos, seguida de una fase tardía que puede durar de 15 a 60 minutos después de la inyección. La respuesta nociceptiva se atribuye a estimulación química directa en la fase temprana y la inflamación/dolor persistente en la fase tardía (Dubuisson y Dennis, 1977). La respuesta en la fase tardía también depende de cambios en el procesamiento de la información en la médula espinal debido a la barrera aferente durante la fase temprana (Coderre *et al.*, 1990). Una ventaja del ensayo es que se emplean dos tipos diferentes de estímulos en el mismo ensayo para estudiar la posibilidad de variar los efectos analgésicos de un fármaco en las dos fases del ensayo (Tjølsen y Hole, 1997).

Se retiraron sujetos (ratones macho adultos CD-1 (Charles River, Raleigh, NC) que pesaban aproximadamente 20-25 gramos) de la jaula en la que se alojaban y se pesaron, después se colocaron en una caja de observación de Plexiglas™ transparente durante un periodo de aclimatación de 20-30 minutos. Después los ratones se retiraron de las cámaras de observación y se les administró (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (como la sal de clorhidrato en solución salina 0,9 %) (1, 3 o 10 mg/kg s.c. (calculado con respecto a la base libre)), morfina (5 mg/kg; s.c.) o vehículo de solución salina 0,9 % por vía subcutánea en un volumen de 1 ml/kg. Después se devolvieron los ratones a la cámara durante el tiempo de pretratamiento predeterminado de 30 minutos para (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida y morfina.

Después del tiempo de pretratamiento del compuesto de ensayo, se inyectó a los animales solución de formalina (2,5 % derivada como una dilución 1:4 de solución de formalina tamponada con fosfato 10 % (Sigma):agua destilada). La pata asignada del sujeto se agarró suavemente y se inyectó solución de formalina en la pata por vía intradérmica en el medio del lado dorsal. Una vez inyectado, el sujeto se devolvió inmediatamente a su cámara de observación y se inició un temporizador para marcar el comienzo de la Fase 1. Cada sujeto se grabó en vídeo durante la sesión de 40 minutos completa. Cuando se puntuaron las cintas, cada sujeto se observó durante 1 minuto a intervalos de 5 minutos durante una sesión de 40 minutos. Se registró el tiempo pasado lamiendo durante ese intervalo de 1 minuto y se anotó la presencia o ausencia de preferencia de una pata.

Para análisis de datos, se definió la fase I del ensayo como de 0 a 5 minutos después de la inyección de formalina, y la fase II se definió como de 20 a 40 minutos después de la inyección de formalina. El tiempo pasado lamiendo durante los intervalos de 1 minuto durante esos marcos temporales se registró y se representó gráficamente como la media \pm E.T.M. Para comparaciones entre grupos de tratamiento, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía para cada fase de la sesión con tratamiento como la variable dependiente. Se realizaron análisis post-hoc cuando fue apropiado para determinar diferencias de grupos específicos.

Los resultados demuestran que aunque no hubo dosis estadísticamente significativa de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en la reducción del tiempo pasado lamiendo en la fase I, no obstante, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida 10 mg/kg fue significativo en la reducción del tiempo pasado lamiendo la pata en la fase II del ensayo de formalina ($P < 0,05$). La morfina de control positivo (5 mg/kg; s.c.) fue eficaz en ambas fases del ensayo. Estos datos indican que (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida tiene potencial analgésico con

respecto a dolor persistente/inflamatorio inducido químicamente.

El análisis posterior de las cintas de video originales en las que cada animal se puntuó durante el periodo de tiempo completo para la fase I (0-5 minutos después de la formalina) y fase II (20-40 minutos) reveló una tendencia similar para los datos, pero no consiguió alcanzar significación estadística para el efecto de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en la reducción del tiempo pasado lamando la pata afectada ni en la fase I ni en la fase II.

Se hace referencia a: Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R (1990), Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection, *Brain Res.* 535: 155-158; Dubuisson D y Dennis SG (1977), The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats, *Pain* 4: 161-174; MalMBERG AB y BANNON AW (2002), Unidad 8.9: Models of nociception: hot-plate, tail- flick, and formalin tests in rodents, *Current Protocols in Neuroscience*; y TjØlsen A y Hole K (1997), Animal models of analgesia, En: *Handbook of Experimental Pharmacology Volume 130: The Pharmacology of Pain* (Eds. A. Dickenson y J.-M. Besson), Springer Verlag, Nueva York pp. 1-20.

Hiperalgnesia térmica inducida por adyuvante completo de Freund (CFA)

La inyección de adyuvante completo de Freund (CFA) en ratas se usa habitualmente para evaluar compuestos con potencial para su uso como fármacos en el tratamiento de monoartritis (osteoartritis) y otras afecciones inflamatorias. Las señales de hiperalgnesia se desarrollan en un periodo de 24 horas (Schaible y Grubb, 1993).

(2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida se evaluó con respecto a posible efecto analgésico en el ensayo de hiperalgnesia térmica inducida por CFA en ratas usando métodos similares a los descritos por Walker y colaboradores (2003). Brevemente, se asignaron ratas macho adultas Sprague-Dawley (BioLasco, Taiwán) que pesaban 180 ± 20 g al recibirlos aleatoriamente a grupos de tratamiento de n=8 por grupo. Los animales recibieron cada uno una inyección subplantar (0,1 ml) de CFA (DIFCO, 264010; solución 0,1 %) en la pata posterior derecha a las 24 horas antes del ensayo experimental. Se ensayó la hiperalgnesia térmica usando un medidor de analgesia estimulador de Pata / Cola (IITC Modelo-336G, IITC, Estados Unidos) con un suelo de vidrio regulado térmicamente ajustado a 30 °C. Se colocó a un sujeto dentro de una caja de plástico encima de un suelo de vidrio elevado y se dirigió un haz de luz localizado bajo el suelo de vidrio a la superficie plantar de la pata posterior derecha. El tiempo requerido para que el animal retire la pata del estímulo térmico se registró automáticamente. Se ajustó la intensidad de la luz para evocar un tiempo de espera de línea basal del grupo medio de 12-14 segundos (pre-CFA) y se impuso un tiempo de espera de corte de 20 segundos. Se obtuvo el tiempo de espera para la retirada de la pata para cada rata y se definió como el umbral de dolor por calor.

Veinticuatro horas después de la inyección de CFA, se preseleccionaron los sujetos (con respecto a clara presencia de hiperalgnesia térmica) para experimentación solamente si el tiempo de espera hasta la retirada era menor del 75 % de la línea basal. Se administraron sustancia de ensayo, morfina y vehículo por inyección subcutánea (s.c.) en el tiempo 0. El nivel postratamiento de hiperalgnesia térmica se midió después a 60 minutos después de tratamiento. Se aplicó una ANOVA de una vía seguido de un ensayo de Dunnett para comparación entre los grupos tratados con sustancia de ensayo y el grupo de control de vehículo. La actividad se consideró significativa al nivel de $P < 0,05$.

En general, la administración subcutánea (s.c.) de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida a 0,1, 1 o 10 mg/kg no se asoció con ningún efecto analgésico significativo a 1 hora después de la dosis en hiperalgnesia térmica inducida por CFA en ratas comparadas con el grupo de control de vehículo (solución salina 0,9 %). Por el contrario, la morfina convencional de referencia procesada simultáneamente (3 mg/kg s.c.) produjo actividad analgésica significativa a 1 hora después de la dosificación. Véase Figura 13. Se hace referencia a: Schaible H-G y Grubb BD (1993), Afferent and spinal mechanisms of joint pain, *Pain* 55: 5-54; y Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ y Mcintyre P (2003), The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgnesia in models of inflammatory and neuropathic pain, *JPET* 304: 56-62.

Neuropatía diabética inducida por estreptozotocina (STZ) (como se demuestra por alodinia)

La neuropatía periférica, una complicación importante de la diabetes, con frecuencia da como resultado dolor espontáneo o la percepción de dolor de contacto con un estímulo normalmente no nocivo. Dicho dolor neuropático se experimenta por el 20-24 % de los pacientes diabéticos, o aproximadamente 30 millones de personas en todo el mundo (Schmader, 2002). El modelo de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en ratas proporciona un medio para evaluar la eficacia de compuestos de ensayo que ofrecen potencial terapéutico para neuropatía periférica y para entender su mecanismo de acción potencial. En este modelo, una única inyección de STZ, un antibiótico que imita la diabetes clínica provocando daño irreversible a las células δ y α pancreáticas conduce a hiperglucemia crónica, disfunción nerviosa y sensibilidad al dolor. El presente estudio utiliza el modelo de rata de STZ de neuropatía diabética para investigar los efectos (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en alodinia mecánica, una evaluación del dolor.

Se indujo diabetes por una inyección de 0,5 ml de estreptozotocina (60 mg/kg) disuelta en tampón de citrato (pH=6) en

- la vena de la cola de cada rata. Se confirmó el desarrollo de diabetes midiendo los niveles de glucosa en sangre (BGL) de todos los animales el día del estudio 3 (BGL > 300 mg/dl). Se midió de nuevo el BGL el día del estudio 14 y solamente los animales que mostraron alodinia táctil se ensayaron de nuevo con respecto a su BGL el día del estudio 21. Se midió el BGL el día del estudio 16 para animales que no mostraban alodinia táctil el día del estudio 14. Estos animales se ensayaron de nuevo con respecto a su BGL el día del estudio 23.
- (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (0,1, 1 o 10 mg/kg p.o.) se administró como una solución de la sal de clorhidrato en agua una vez al día comenzando el día del estudio 14 o el día del estudio 16 y continuando hasta el día del estudio 21 o 23, respectivamente. El artículo de control gabapentina (en solución salina 0,9 %, 150 mg/kg i.p.) se administró solamente en vías de ensayo de alodinia. La administración de artículo de ensayo, vehículo o artículo de control se basó en la evaluación de la alodinia el día del estudio 14. Si no estaba presente alodinia el día del estudio 14, el animal se evaluó de nuevo el día del estudio 16. Se midió la respuesta al dolor en los días del estudio 14 y 21 o 16 y 23, 30 minutos después de la administración del artículo de Ensayo.
- Para la evaluación de alodinia, se usaron filamentos Von Frey de acuerdo con los métodos de Chaplan y colaboradores (1994). Brevemente, las ratas se colocaron en un recinto y se situaron en una superficie de malla metálica, pero se permitió que se movieran libremente. Las cabinas de las ratas se cubrieron con celofán rojo para disminuir las distribuciones ambientales. El ensayo comenzó después de cesar el comportamiento exploratorio.
- Los roedores muestran un reflejo de retirada de la pata cuando se toca la pata inesperadamente. Cuando se presiona la punta de una fibra de Von Frey de longitud y diámetro dados contra la piel en ángulo recto, la fuerza de la aplicación aumenta siempre que el investigador continúe avanzando la sonda hasta que la fibra se doble. Después de doblarse la fibra, se avanza la sonda, haciendo que la fibra se doble más, pero sin aplicarse fuerza adicional. El animal indicaría sensación retirando su pata. En ausencia de una respuesta de retirada de la pata al filamento seleccionado inicialmente, se presentó un estímulo más fuerte; en el caso de retirada de la pata, se eligió el siguiente estímulo más débil. De esta manera, el patrón resultante de respuestas positivas y negativas se usó para determinar el umbral de retirada de la pata.
- El conjunto de monofilamentos de Von Frey proporciona una escala logarítmica aproximada de la fuerza real y una escala lineal de la intensidad percibida. A continuación hay una tabla que muestra la fuerza (g) y su tamaño correspondiente de los monofilamentos.

Tamaño	1,65	2,36	2,44	2,83	3,22	3,61	3,84	4,08	4,17	4,31	4,56	4,74	4,93	5,07	5,18	5,46	5,88	6,10	6,45	6,65
Fuerza (g)	0,008	0,02	0,04	0,07	0,16	0,40	0,60	1,00	1,40	2,00	4,00	6,00	8,00	10	15	26	60	100	180	300

Todos los datos distribuidos de forma normal se presentan como las medias \pm ETM, así como los valores individuales de los animales seguido de un ensayo de T de student (Software: Microsoft® Excel). Se considera que un p valor $<$ 0,05 representa una diferencia significativa. Debido a la distribución no normal de los datos de alodinia, las descripciones de esos datos se proporcionan como valores tanto medios (\pm ETM) como medianos para representar su naturaleza imprecisa y distribución sesgada.

Los datos de Von Frey se presentan como la fuerza mínima (g) necesaria para retirar cada pata trasera. Se registró una reducción en el umbral del dolor 14/16 días después de la inyección de STZ. Esta reducción se expresó como un aumento en la sensibilidad del animal a los filamentos de Von Frey. La media y la mediana de grupo de fuerza de retirada de los animales tratados con vehículo en la línea basal antes de la inyección de STZ fue de $57,57 \pm 2,43$ (mediana del grupo = 60 g). Los días del estudio 14/16, la mediana de la fuerza de la retirada de la pata fue significativamente menor ($20,5 - 22,14 \pm 2,36$ g; $<0,01$ frente a la línea basal; mediana = 20,5 g) lo que indica alodinia táctil antes del tratamiento con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida. Al terminar el estudio (días de estudio 21/23) aún se observó alodinia táctil después de tratamiento ($20,46 \pm 3,31$ g; $p < 0,01$ frente a la línea basal; mediana=8 g).

En general, el tratamiento con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida 1 mg/kg inhibió la alodinia 30 minutos después de su administración los días del estudio 14/16 en comparación con el pretratamiento ($p < 0,01$) o con el control de Vehículo ($p < 0,05$). El tratamiento con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida a una dosis de 10 mg/kg inhibió la alodinia 30 minutos después de su administración los días del estudio 14/16 en comparación con el pretratamiento ($p = 0,012$). El tratamiento con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida a una dosis de 1 mg/kg inhibió la alodinia 30 minutos después de su administración los días del estudio 21/23 en comparación con el pretratamiento ($p = 0,012$). El tratamiento con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida a una dosis de 10 mg/kg (Grupo 11 M) inhibió la alodinia 30 minutos después de su administración los días del estudio 21/23 en comparación con el control de Vehículo ($p < 0,05$). El tratamiento con el control positivo, gabapentina, invirtió la alodinia táctil significativamente todos los días de tratamiento en comparación con el pretratamiento (días del estudio 14/16 y 21/23; $p < 0,01$) o en comparación con el control de Vehículo (días de estudio 21/23 $p < 0,01$). Al final del estudio (día de estudio 21/23), se analizaron los niveles de insulina en suero. No se observaron diferencias significativas en los niveles de insulina. Se administró (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida a todas las dosis cada día comenzando el día del estudio 14 o 16 hasta el día del estudio 21 o 23, respectivamente. Se realizó el ensayo de dolor antes de la inyección del artículo de ensayo (pre inyección TI) y 30 minutos después de la administración del Artículo de Ensayo (post inyección TI). El control positivo, gabapentina, se administró 2 horas antes del ensayo del dolor los días de estudio 14 o 16 y 21 o 23. El tratamiento con el control positivo, gabapentina, invirtió la alodinia táctil significativamente en todos los días de tratamiento en comparación con el pretratamiento y con el vehículo: $22,77 \pm 3,77$ g (mediana=15 g) frente a $45,62 \pm 4,24$ g (mediana=60 g) en pre y post tratamiento, respectivamente, los días del estudio 14/16, $p < 0,01$; $28,23 \pm 4,91$ g (mediana=20,5 g) frente a $50,88 \pm 4,12$ g (mediana=60 g) en pre y post tratamiento, respectivamente, los días del estudio 21/23, $p < 0,01$; $45,62 \pm 4,24$ g (mediana=60 g) frente a $26,61 \pm 4,41$ g (mediana=15 g) en el grupo de vehículo los días del estudio 14/16, $p < 0,01$; $50,88 \pm 4,12$ g (mediana=60 g) frente a $20,46 \pm 3,31$ g (mediana=10 g) en el grupo de vehículo los días del estudio 21/23, $p < 0,01$.

Inmediatamente después del ensayo de Von Frey los días de terminación, se recogió sangre. Al final del estudio, los animales se sacrificaron con solución de ketamina/xilacina (IP). Se recogieron aproximadamente 0,5-0,7 ml de sangre mediante punción cardiaca en tubos que contenían el anticoagulante (K3 EDTA). Las muestras de sangre se mantuvieron frías en hielo y se centrifugaron a los 30 minutos de la recogida. Para obtener plasma, se centrifugó la sangre durante 10 minutos a 3000 rpm. El plasma se transfirió a tubos marcados y se almacenó en posición vertical y se congeló a aproximadamente -20 °C hasta su envío. Cada muestra se marcó con el número de compuesto y el número de animal.

Todos los animales aumentaron de peso durante el estudio. No hubo diferencias significativas en el aumento de peso corporal entre los grupos.

Los niveles de glucosa en sangre medios aumentaron en todos los animales. La línea basal fue de $108,86 \pm 1,03$ mg/dl y aumentó hasta $390,99 \pm 6,47$ mg/dl el día del estudio 3. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. También se midieron niveles de glucosa altos los días del estudio 14/16 y 21/23 basándose en los resultados para alodinia el día del estudio 14. Al final del estudio (día de estudio 21 y 23) el nivel de glucosa en sangre medio fue de $403,86 \pm 8,45$ mg/dl.

Al final del estudio, se analizaron los niveles de insulina en suero. El nivel de insulina en el control de Vehículo al final del estudio fue de $0,79 \pm 0,41$ μ g/l. No se observaron diferencias significativas en los niveles de insulina entre tratamientos.

Los resultados de la evaluación de Von Frey indican que (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida es eficaz en la reducción del dolor de neuropatía diabética a dosis de 1 mg/kg y

10 mg/kg en comparación con el grupo tratado con vehículo. Véase Figura 14.

Se hace referencia a: Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994), Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw, *J. Neurosci. Methods* 53: 55-63; Schumader KE (2002), Epidemiology and impact on quality of life of postherpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy, *Clinical Journal of Pain* 18: 350-354; y Sommer C (2003). Painful neuropathies, *Curr. Opin. Neurol.* 16: 623-628.

Modelo murino de diabetes mellitus de tipo 2

El ratón *db/db*, un modelo bien establecido de diabetes mellitus de tipo 2, es un mutante deficiente en leptina que expresa un fenotipo obeso y también expresa habitualmente síntomas metabólicos incluyendo hiperglucemia, hiperlipidemia e hiperinsulinemia (Halaas *et al.*, 1995 y Lee *et al.*, 1996). Este modelo animal experimental de diabetes se empleó en un estudio diseñado para determinar los efectos de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en la masa corporal y varios parámetros metabólicos adicionales.

En este estudio, se administró repetidas veces (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida por vía oral (mediante sonda) a 1,0 mg/kg una vez al día comenzando desde la edad aproximada de 3 semanas y continuando hasta el estudio de 7 semanas. Se usaron ratones compañeros de camada heterocigotos no diabéticos (*db/+*; designados "Db") como controles. Se determinó el peso corporal y el consumo de alimentos dos veces a la semana. También se proporcionó metillicaonitina (MLA) antagonista de $\alpha 7$ simultáneamente mediante sonda a 3 mg/kg diariamente a cohortes seleccionadas de ratones *db/db* (designados "db") o *db/+*. Al final del régimen de dosificación de 7 semanas, se calcularon las velocidades de crecimiento totales (aumento de peso corporal general) y el consumo de alimentos diario medio. Además, se evaluaron los niveles de glucosa en ratones en ayunas durante una noche. Además, se recogieron análisis de muestras de sangre de ratones en ayunas durante una noche para mediciones del factor de necrosis tumoral α (TNF- α), triglicéridos y hemoglobina glucosilada (HbA1c). Todos los datos se expresan como la media \pm ETM. Para cada parámetro investigado, se compararon diferencias entre todos los grupos por ANOVA de una vía con ensayo de comparación múltiple de Neuman-Keuls post hoc.

En general, la administración diaria durante el transcurso de 7 semanas de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida a ratones *db/db* obesos dio como resultado una reducción significativa de todos los parámetros medidos en comparación con ratones *db/db* obesos de control tratados con vehículo. Con respecto al aumento de peso corporal total, el consumo de alimentos diario medio, los niveles de HbA1c glucosilado y la concentración en plasma de TNF- α , la coadministración de MLA atenuó el efecto. Aunque la atenuación de la glucosa en plasma y triglicéridos no se atenuó significativamente por coadministración de MLA con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, hubo una tendencia hacia esa inversión.

Como se ilustra en la Figura 15, al final de siete semanas de tratamiento, entre las edades de 3 y 10 semanas, el aumento de peso corporal total en el grupo obeso tratado con control de vehículo ("db") fue significativamente mayor que el de animales de control de vehículo delgados ("Db"). En comparación, el aumento de peso fue significativamente menor en los ratones obesos tratados con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida ("Artículos de Ensayo-db"). Notablemente, los animales a los que se coadministró MLA con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida no consiguieron mostrar el aumento de peso reducido mostrado por las ratas obesas a las que se administró (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida solamente.

Como se muestra en la Figura 16, el consumo de alimentos diario en el grupo obeso de control de vehículo ("db") fue significativamente mayor que el de controles de vehículo delgados ("Db"). El consumo de alimentos medio fue significativamente menor en los ratones obesos tratados con TC-(2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida ("Artículo de Ensayo-db") que en los controles obesos. El consumo de alimentos de los ratones delgados no se vio afectado por (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida ("Artículo de Ensayo-Db"). Los animales a los que se coadministró MLA con (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida no consiguieron mostrar el consumo de alimentos medio diario reducido mostrado por las ratas obesas a las que se administró (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida solamente.

Como se muestra en la Figura 17, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida inhibió significativamente los niveles de glucosa en plasma en ratones obesos ("Artículo de Ensayo-db"). Sin embargo, este efecto no se invirtió por la administración conjunta con MLA.

Como se muestra en la Figura 18, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida inhibió significativamente los niveles de HbA1c glucosilados en ratones obesos ("Artículo de Ensayo-db"). La reducción en HbA1c glucosilado por (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida se atenuó por la administración conjunta de MLA.

Como se muestra en la Figura 19, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida redujo significativamente la citocina proinflamatoria TNF alfa en ratones obesos ("Artículo de Ensayo-db"). Estos efectos se inhibieron por la coadministración del antagonista de alfa 7 MLA.

5 Como se muestra en la Figura 20, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida dio como resultado niveles de triglicéridos significativamente inferiores en ratones obesos ("Artículo de Ensayo-db") en comparación con controles tratados con vehículo ("db"). La reducción de los triglicéridos por (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida no se atenuó por la administración conjunta de MLA.

10

Hipersensibilidad pulmonar, de las vías respiratorias, medición de Penh

Usando el método de Hamelmann *et al*, se evaluó (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida con respecto a posible inhibición de la hipersensibilidad de las vías áreas en ratones. Brevemente, se expuso a animales sensibilizados con ovoalbúmina (OVA), 12 animales por grupo, por inhalación nasal a OVA 5 % en aerosol durante 25 minutos los días 21, 23 y 25. Los ratones se trataron con vehículo o (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida por vía subcutánea (s.c.) dos veces al día desde el día 21 al día 26 o una vez al día por vía intratraqueal (i.t.), precediendo a la exposición a aerosol de ovoalbúmina en 30 minutos los días 21, 23 y 25 así como la exposición a metacolina o recogida de fluidos de lavado broncoalveolar (BALF) el día 26. Se administró dexametasona, el patrón de referencia, a 3 mg/kg por vía oral (p.o.) una vez al día 60 minutos antes de la exposición a OVA el día 21, 23 y 25 y 60 minutos antes de la provocación con metacolina o recogida de BALF el día 26. Se realizaron mediciones no invasivas de la sensibilidad de las vías respiratorias usando pletismografía de cuerpo completo, en la que los aumentos de la pausa potenciada (Penh) actúan como un índice de la obstrucción de las vías respiratorias. Se midieron respuestas a metacolina inhalada y se calcularon como el porcentaje de los valores de líneas basales respectivos. Se usó ensayo de t Student de muestras no relacionadas para comparación entre el control de vehículo y el grupo de simulación; se aplicaron análisis ANOVA de una vía y análisis post hoc de Dunnett para comparación entre el control de vehículo y grupos tratados. Se considera significación estadística a $P < 0,05$.

30 La Figura 21 ilustra el efecto de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en el % de cambios en la respuesta de Penh a la exposición a metacolina en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. La respuesta de Penh a metacolina (10 y 30 mg/ml) se aumentó significativamente en animales sensibilizados con OVA en comparación con control de simulación. La dexametasona a 3 mg/kg PO provocó una inhibición significativa del aumento inducido por metacolina (10 y 30 mg/ml) en valores de Penh, tanto en valores absolutos como en % en comparación con animales con OVA tratados con vehículo, lo que indica eficacia contra la hipersensibilidad de las vías respiratorias. (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida a 0,1, 1 y 10 mg/kg bid s.c. provocó inhibición significativa del aumento inducido por metacolina de los valores de Penh; IT 10 mg/kg también se asoció con inhibición significativa.

40 El efecto de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en los recuentos de glóbulos blancos/recuentos de células diferenciales y % de recuento de glóbulos blancos/recuentos de células diferenciales en ratones sensibilizados con ovoalbúmina se ilustra en las Figuras Y y Z, respectivamente. Se observó un aumento significativo de los WBC totales, neutrófilos, linfocitos, monocitos y eosinófilos en BALF en animales sensibilizados con OVA frente a control de simulación, que se inhibió significativamente por dexametasona. (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida a 0,1 y 1 mg/kg SC, pero no a 10 mg/kg SC, redujo significativamente los WBC totales y eosinófilos en BALF; (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida a 10 mg/kg SC redujo los monocitos; los linfocitos se redujeron a 0,1 y 1 mg/kg SC así como a 10 mg/kg IT.

50 Estos resultados demuestran que múltiples administraciones de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida a 0,1, 1 y 10 mg/kg bid s.c. y a 10 mg/kg i.t. frente a dexametasona proporcionan protección significativa contra hipersensibilidad de las vías respiratorias en modelo de ratón sensibilizado con OVA (como se demuestra por la respuesta de Penh reducida a exposición a metacolina usando pletismografía del cuerpo completo en ratones) y se asocia con reducción significativa en eosinófilos y glóbulos blancos en BALF (que, sin embargo, carece de una relación de respuesta a dosis uniforme).

La Figura 21 ilustra el efecto de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en el % de cambios en respuesta de Penh a exposición a metacolina en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. Se administraron (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida y vehículo por vía subcutánea bid o se proporcionaron por vía intratraqueal qd durante 6 días consecutivos del día 21 al día 25 a 30 minutos antes de la exposición ANOVA y la última dosificación se administró a los 30 minutos antes de la provocación con MCh el día 26. Se determinaron los valores de Penh. Se aplicó ANOVA de una vía seguido de ensayo de Dunnett para comparación entre el vehículo inmunizado con OVA y otros grupos de tratamiento. * $P < 0,05$ frente a control de vehículo de OVA.

65 La Figura 22 ilustra el efecto de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en

recuentos de glóbulos blancos y recuentos de células diferenciales en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. Se administraron (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida y vehículo por vía subcutánea bid o se proporcionaron por vía intratraqueal qd durante 6 días consecutivos del día 21 al día 25 a los 30 minutos antes de la exposición a OVA y la última dosificación se administró a los 30 minutos antes de la recogida de fluido de lavado broncoalveolar el día 26. Se determinaron el recuento de glóbulos blancos totales y los recuentos de células diferenciales. Se aplicó ANOVA de una vía seguido de ensayo de Dunnett para comparación entre el vehículo inmunizado con OVA y otros grupos de tratamiento. *P<0,05 frente a control de vehículo de OVA.

La Figura 23 ilustra el efecto de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida en % de recuento de glóbulos blancos y recuentos de células diferenciales en ratones sensibilizados con ovoalbúmina. Se administraron (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida y vehículo por vía subcutánea bid o se proporcionaron por vía intratraqueal qd durante 6 días consecutivos del día 21 al día 25 a los 30 minutos antes de la exposición a OVA y la última dosificación se administró a los 30 minutos antes de la recogida de fluido de lavado broncoalveolar el día 26. Se determinó el recuento de glóbulos blancos totales y los recuentos de células diferenciales. Se aplicó ANOVA de una vía seguido de ensayo de Dunnett para comparación entre el vehículo inmunizado con OVA y otros grupos de tratamiento. *P<0,05 frente a control de vehículo de OVA.

Se hace referencia a: Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, Oshiba A, Larsen GL, Irvin CG y Gelfand EW, Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography, Am J Respir Crit Care Med, 156: 766-775,1997.

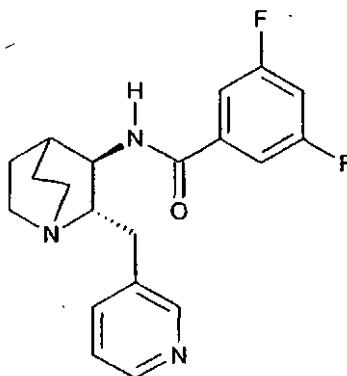
Se emplearon compuestos de ensayo para los experimentos descritos en el presente documento en forma libre o de sal. A no ser que se especifique de otro modo, el compuesto proporcionado para ensayo *in vivo* fue clorhidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, con las cantidades de dosificación proporcionadas asumiendo la forma de base libre.

Las respuestas farmacológicas específicas observadas pueden variar de acuerdo con y dependiendo del compuesto activo particular seleccionado o si hay presentes vehículos farmacéuticos, así como el tipo de formulación y modo de administración empleado, y dichas variaciones o diferencias esperadas en los resultados se contemplan de acuerdo con la práctica de la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida (Fórmula I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5



Fórmula I

2. El compuesto de la reivindicación 1, que está sustancialmente libre de uno o más de (2R,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, (2R,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, y (2S,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida.

3. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2, en forma de una sal de adición de ácidos, donde el ácido se selecciona entre ácido clorhídrico, ácido metanosulfónico, ácido maleico, ácido fosfórico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido malónico, ácido L-tartárico, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido L-málico, ácido R-mandélico, ácido S-mandélico, ácido succínico, ácido 4-acetamidobenzoico, ácido adípico, ácido galactárico, ácido di-p-toluoil-D-tartárico, ácido oxálico, ácido D-glucurónico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 4-metoxibenzoico, ácido (1S)-(+)-10-alcanforsulfónico, ácido (1R,3S)-(+)-alcanforico y ácido p-toluenosulfónico, o un hidrato o un solvato de los mismos.

4. El compuesto de la reivindicación 3, donde la relación molar de ácido con respecto a (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2] oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida es 1:2 o 1:1.

5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 seleccionado entre:

mono-clorhidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o un solvato del mismo;
 mono-fosfato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o un solvato del mismo;
 mono-4-hidroxibenzoato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o un solvato del mismo; y
 hemi-4-hidroxibenzoato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o un hidrato o un solvato del mismo.

6. Un compuesto, (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 que contiene menos del 25 % de (2R,3R)-, (2S,3S)- o (2R,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, tanto individualmente como en cualquier combinación, en peso.

7. El compuesto de la reivindicación 6, que contiene menos del 15 % de (2R,3R)-, (2S,3S)- o (2R,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, tanto individualmente como en cualquier combinación, en peso.

8. El compuesto de la reivindicación 6, que contiene menos del 5 % de (2R,3R)-, (2S,3S)- o (2R,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, tanto individualmente como en cualquier combinación, en peso.

9. El compuesto de la reivindicación 6, que contiene menos del 2 % de (2R,3R)-, (2S,3S)- o (2R,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, tanto individualmente como en cualquier combinación, en peso.

10. El compuesto de la reivindicación 6, que contiene menos del 1 % de (2R,3R)-, (2S,3S)- o (2R,3S)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida, tanto individualmente como en cualquier combinación, en peso.

5 11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 que es sustancialmente cristalino.

12. Una forma polimórfica de un compuesto clorhidrato de (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabicyclo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida de acuerdo con la reivindicación 11, **caracterizado por** un patrón de difracción de rayos X que comprende uno o más picos dentro de $\pm 0,5$ grados 2θ de los siguiente picos:

10

2 θ
8,4
8,8
11,9
13,2
15,2
16,0
17,6
18,4
18,9
19,9
20,1
21,3
23,1
25,4
26,2

13. Uso de un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o una disfunción mediadas por $\alpha 7$.

15

14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o de una disfunción mediadas por $\alpha 7$.

15. El uso de la reivindicación 13 o el compuesto para uso de acuerdo con la reivindicación 14 en el que la enfermedad o la disfunción se seleccionan del grupo que consiste en:

20

i) dolor, incluyendo uno o más de dolor agudo, neurológico, inflamatorio, neuropático, crónico, dolor crónico grave, dolor postoperatorio, dolor asociado con cáncer, angina, cólico renal o biliar, menstruación, migraña, gota, artritis, enfermedad reumatoide, tenosinovitis, vasculitis, neuralgia del trigémino o herpética, dolor de neuropatía diabética, causalgia, dolor lumbar, síndromes de desaferentización y avulsión del plexo braquial;

25

ii) síndrome metabólico, aumento de peso, diabetes mellitus de tipo I, diabetes mellitus de tipo II o neuropatía diabética;

iii) inflamación, incluyendo uno o más de psoriasis, asma, aterosclerosis, fibrosis pulmonar idiopática, inflamación crónica y aguda, psoriasis, endotoxemia, gota, seudogota aguda, artritis gotosa aguda, artritis, artritis reumatoide, osteoartritis, rechazo de aloinjertos, rechazo de trasplante crónico, asma, aterosclerosis, lesión pulmonar dependiente de fagocito mononuclear, dermatitis atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, síndrome torácico agudo en anemia falciforme, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colangitis aguda, estomatitis aftosa, pouchitis, glomerulonefritis, nefritis lúpica, trombosis y reacción de injerto contra hospedador; y

30

iv) cognición, incluyendo uno o más de deterioro de la memoria asociado con la edad, deterioro cognitivo leve, demencia presenil, enfermedad de Alzheimer de aparición temprana, demencia senil, demencia del tipo Alzheimer, demencia de leve a moderada del tipo Alzheimer, demencia de cuerpos de Lewy, demencia vascular, enfermedad de Alzheimer, ictus, complejo de demencia del SIDA, trastorno de déficit de atención, trastorno de hiperactividad del déficit de atención, dislexia, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, déficits cognitivos en la esquizofrenia y disfunción cognitiva en la esquizofrenia.

35

40

16. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

45

17. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para uso en la potenciación de la corriente inducida por acetilcolina.

Figura 1

Compuesto A - Reconocimientos de objetos en ratas

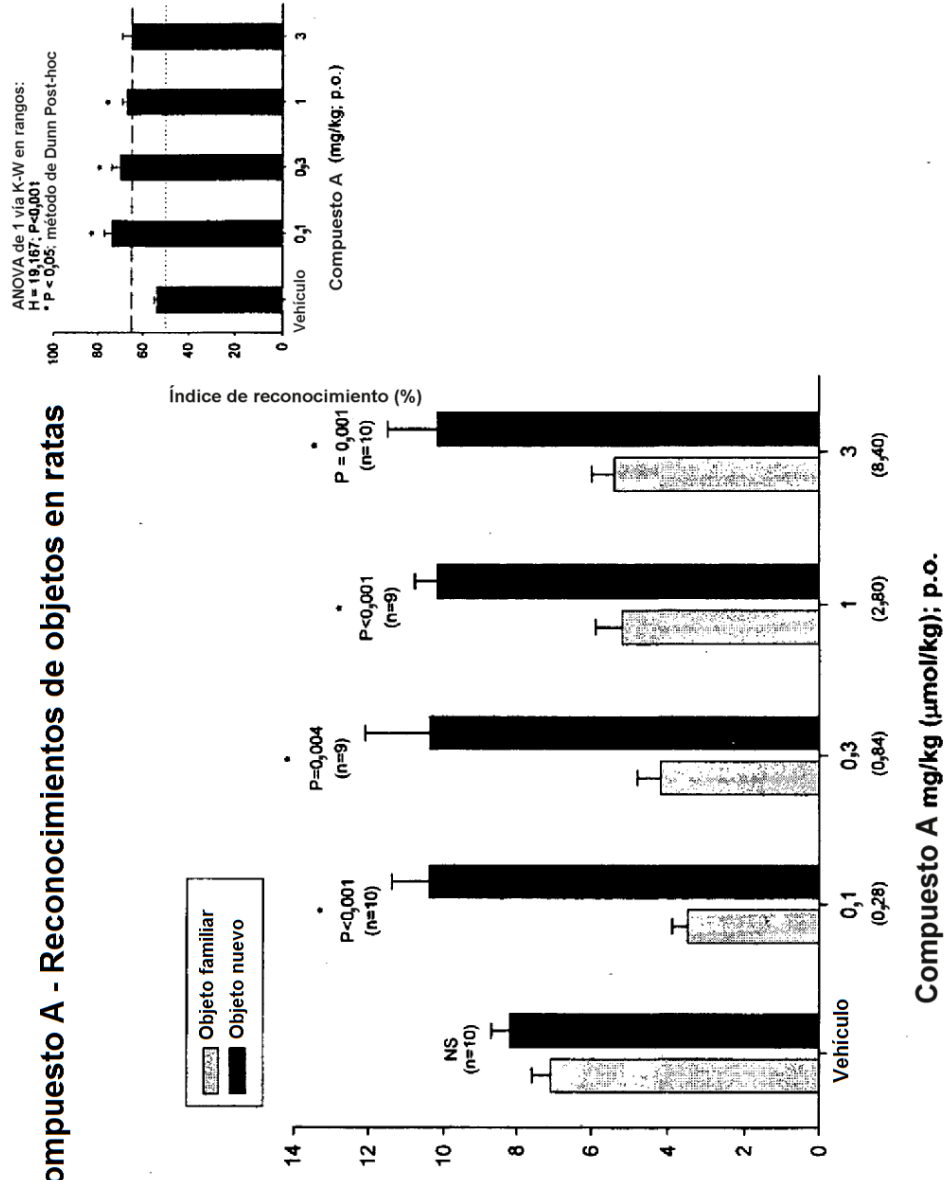


Figura 2

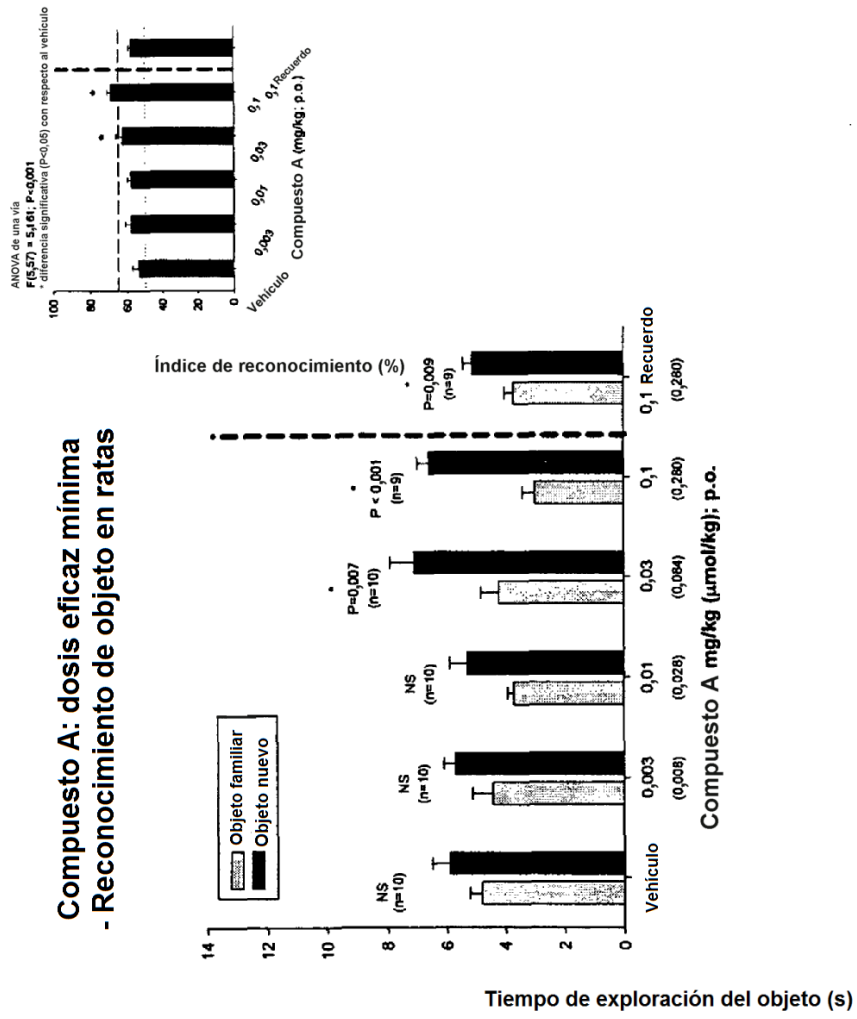


Figura 3

Duración de acción del compuesto A 0,1 mg/kg: efecto en el reconocimiento de nuevo objeto en la rata en tiempos después de la 3ª administración subaguda (diaria)

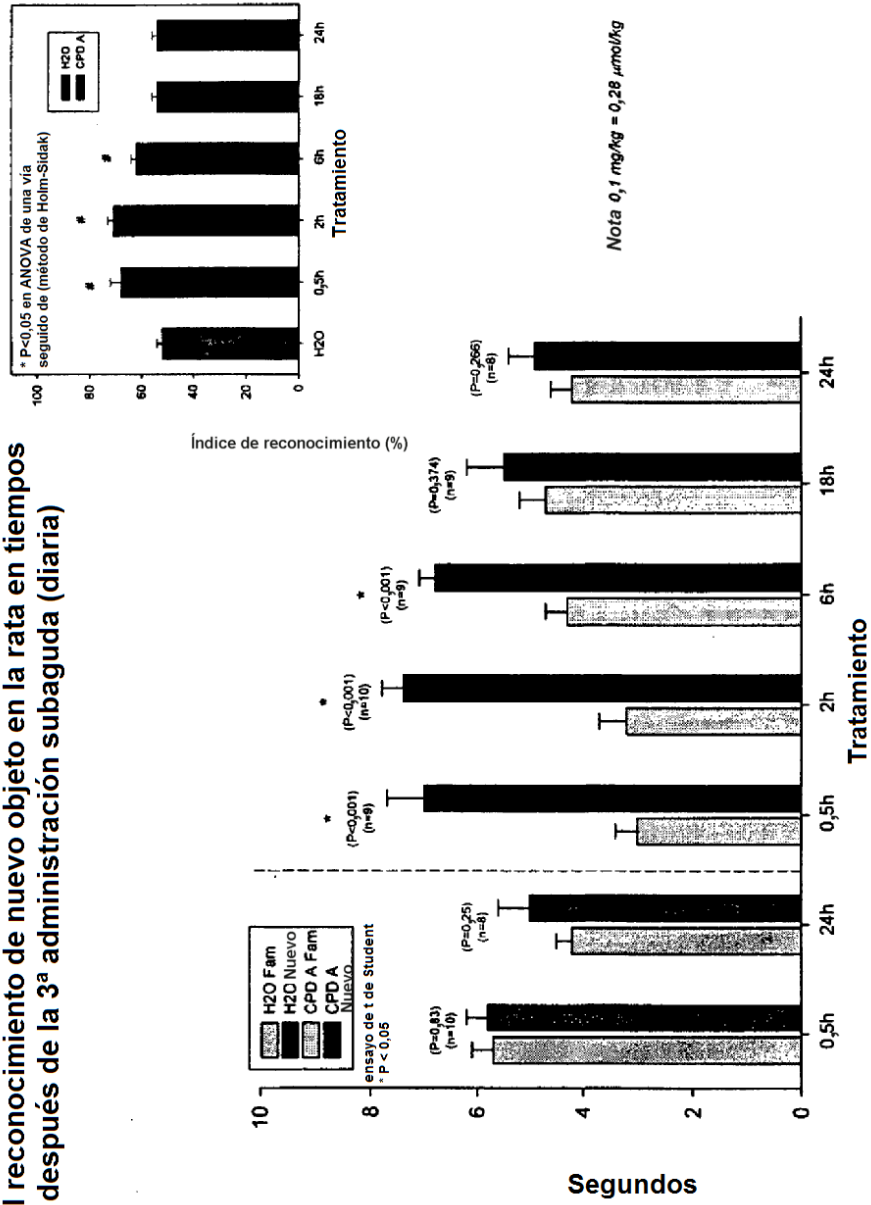


Figura 4

Duración de acción del compuesto A 0,3 mg/kg: efecto en el reconocimiento de nuevo objeto en la rata en tiempos después de la 3ª administración subaguda (diaria)

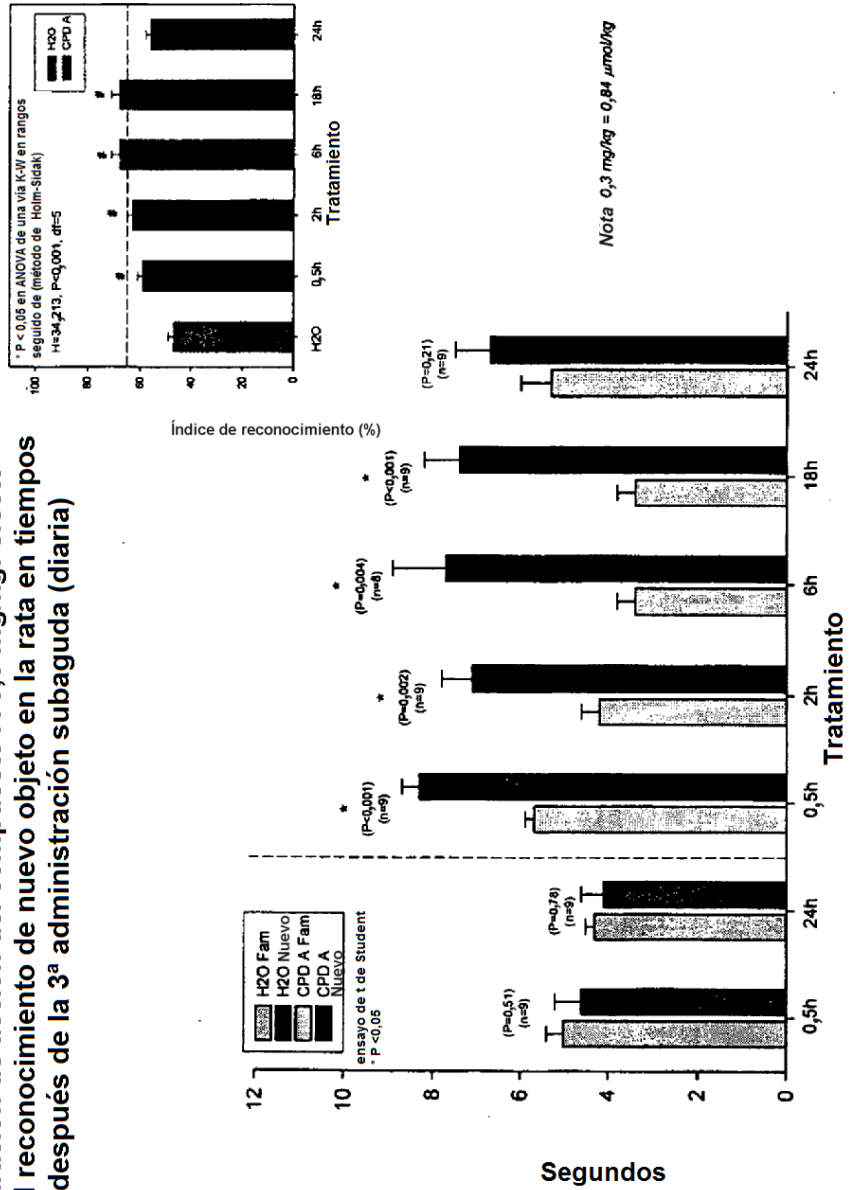
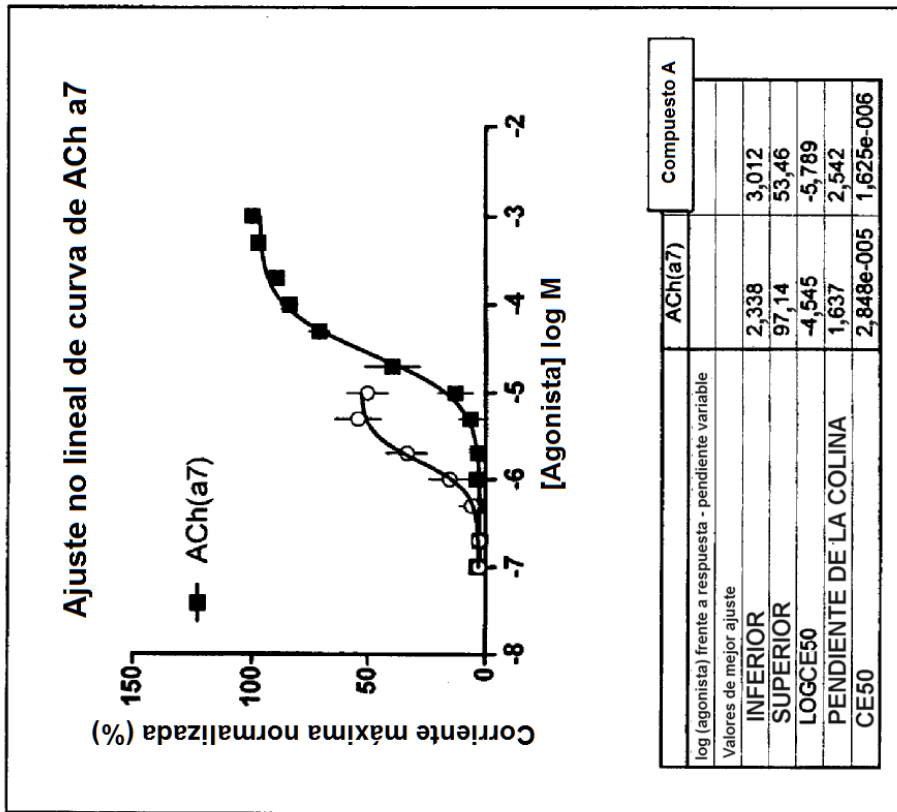


Figura 5

Compuesto A



Compuesto B

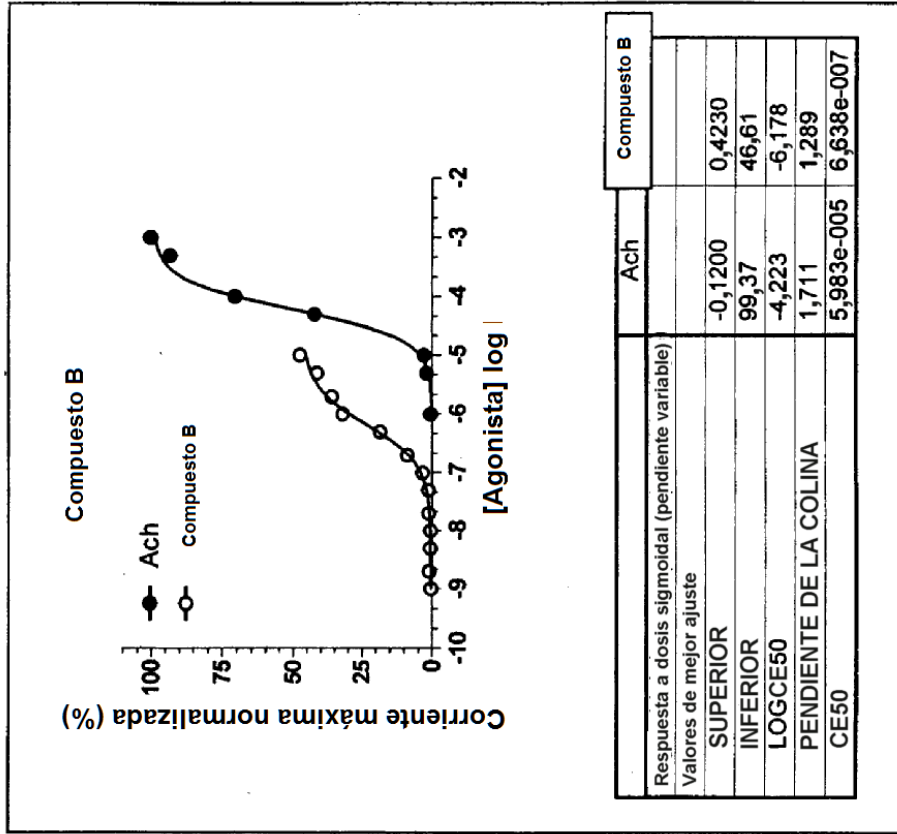


Figura 6
Diferencias de bloqueo de respuestas de ACh
por el compuesto A y el Compuesto B

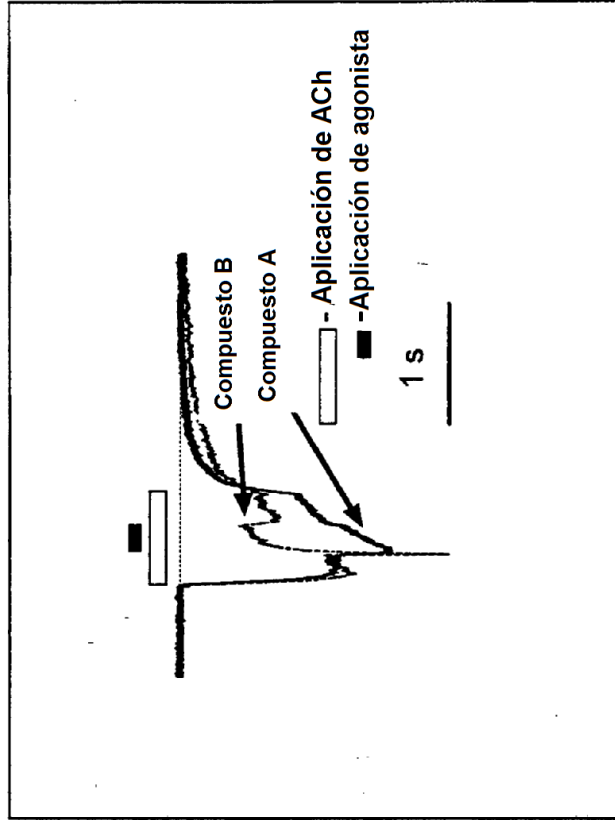


Figura 7
Compuesto A

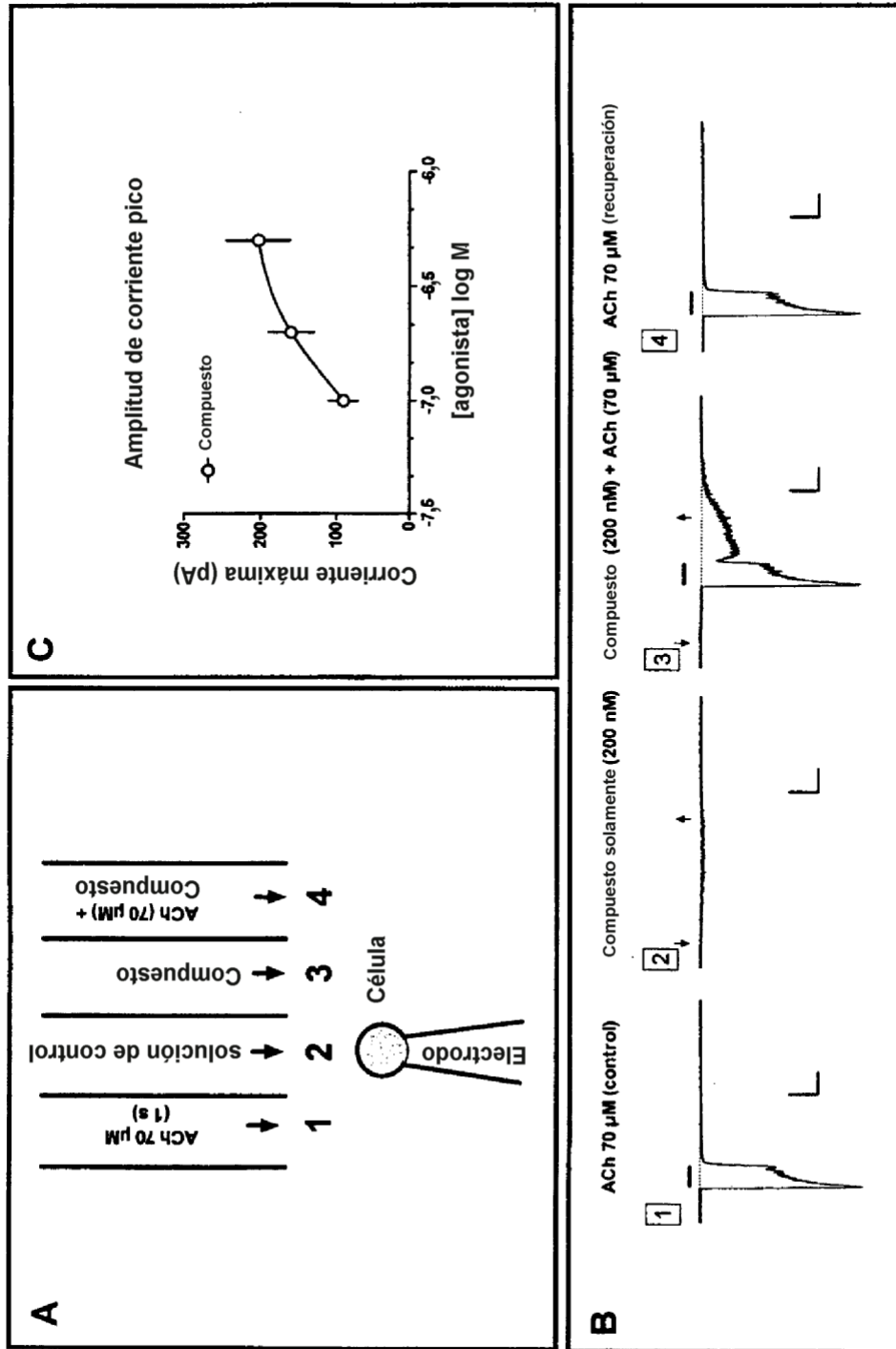


Figura 8
Compuesto B

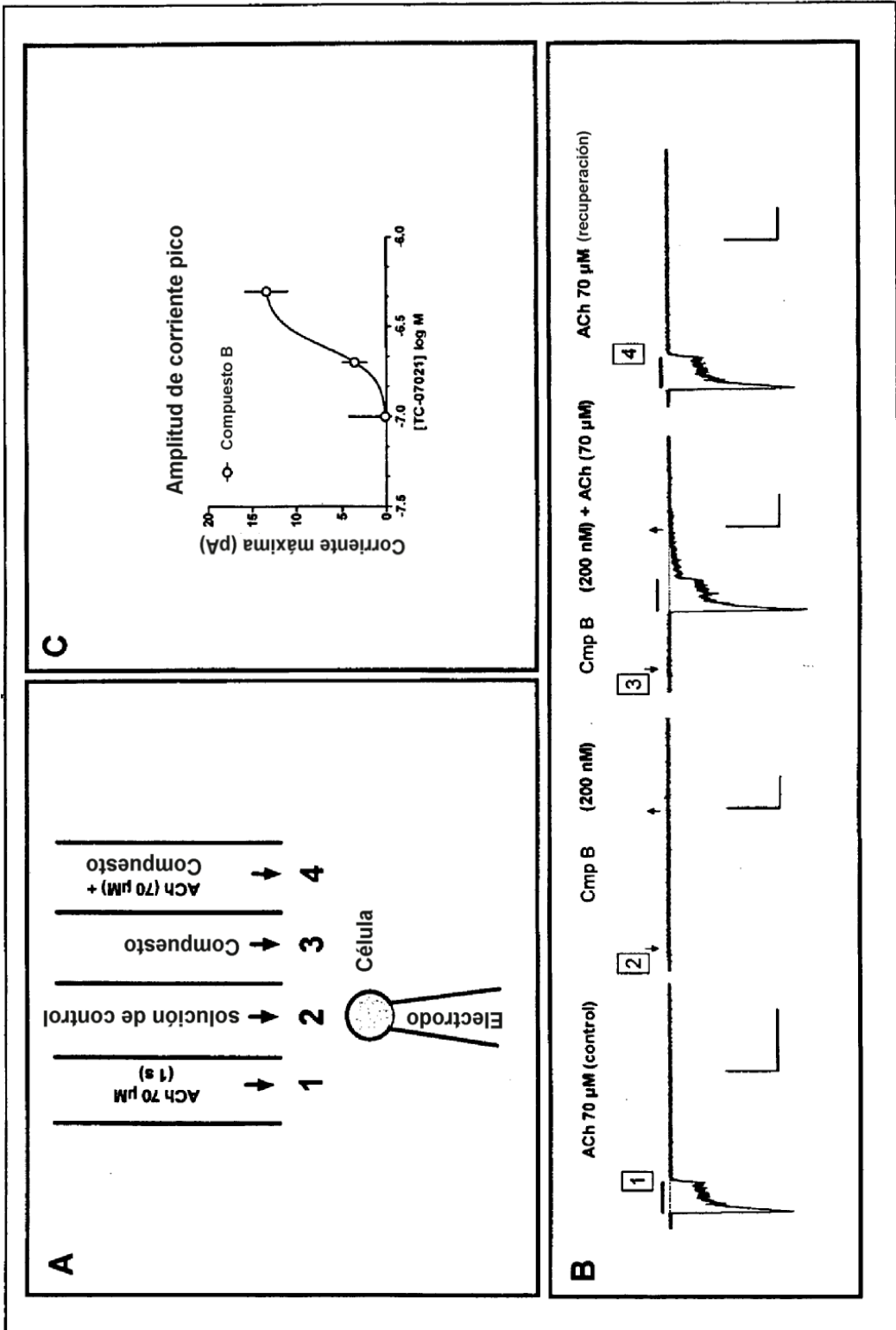


Figura 9
XRPD de sal mono-HCl

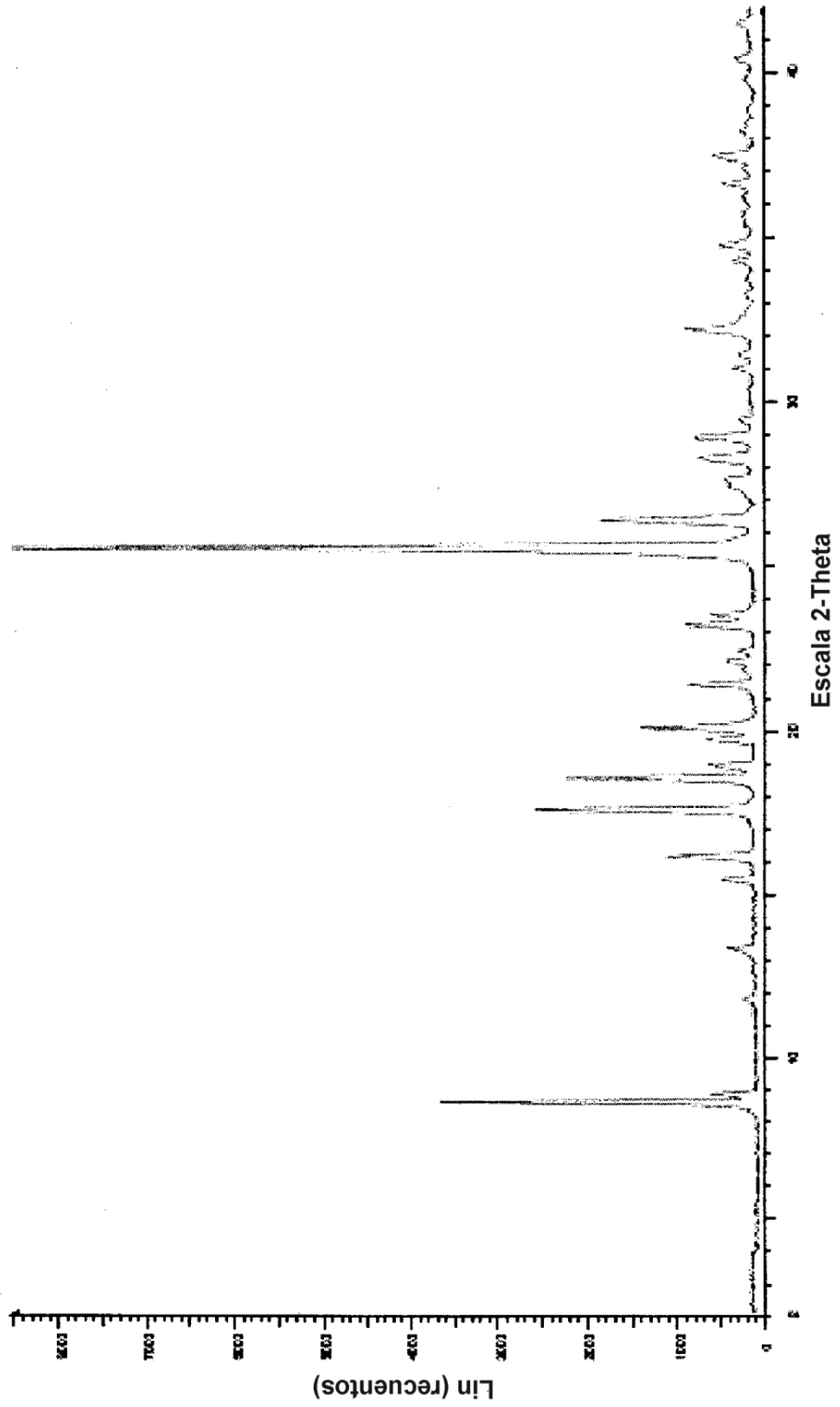


Figura 10
Estructura cristalina de sal mono-HCl

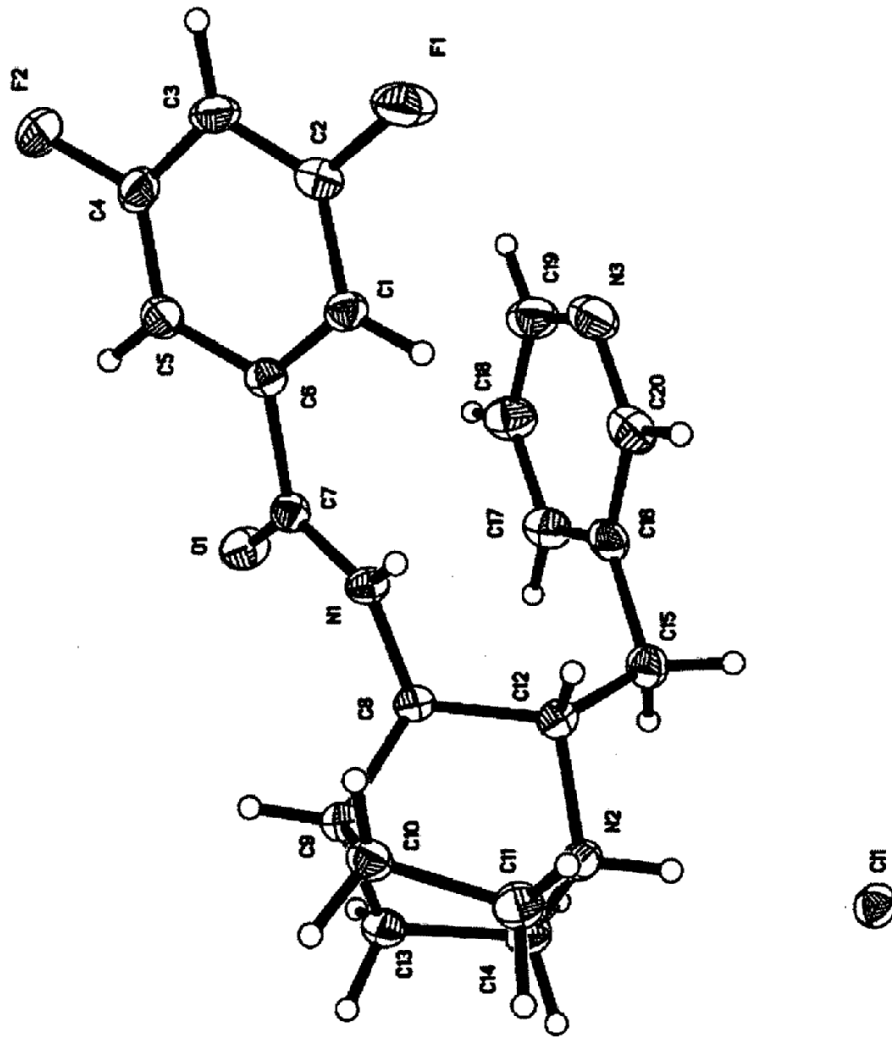


Figura 11
XRPD de sal de hemi-galactarato

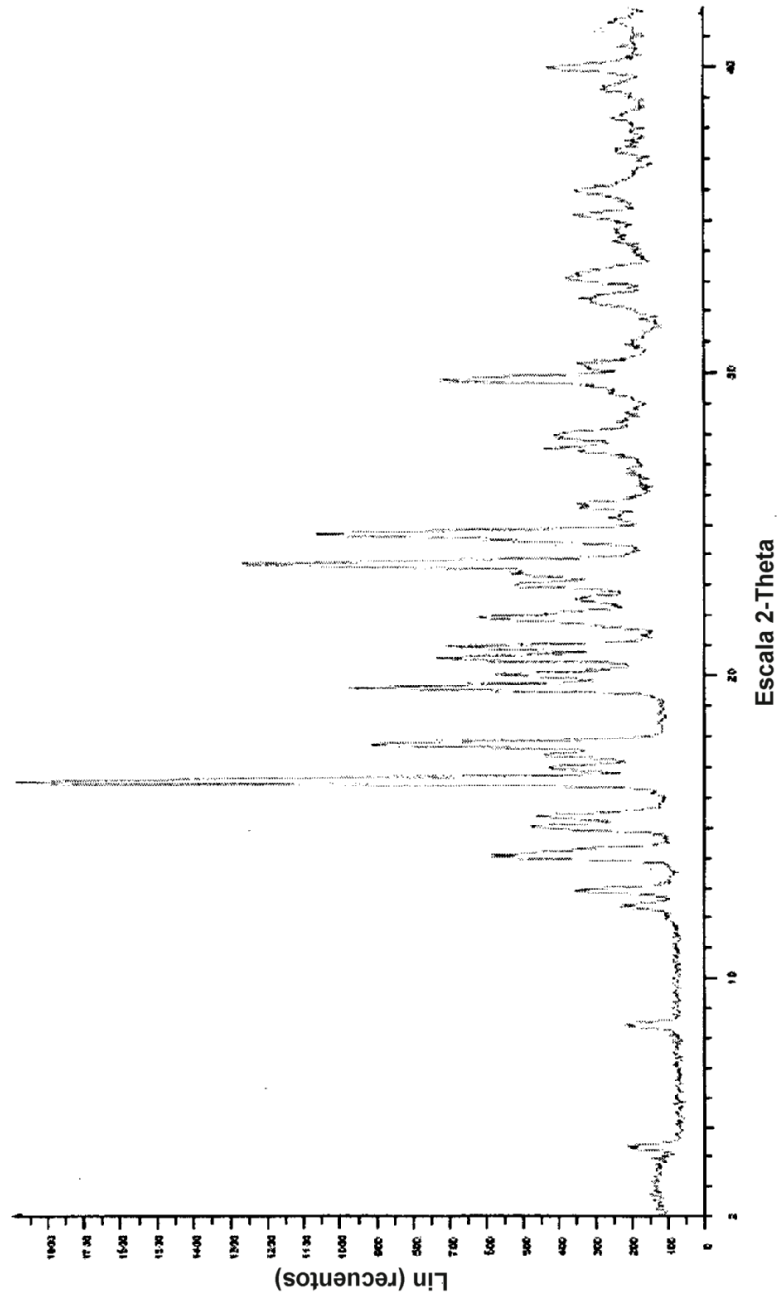


Figura 12
Superposición de patrones de XRPD de exploración de sal primaria
1 semana a 40 °C/75 % de HR

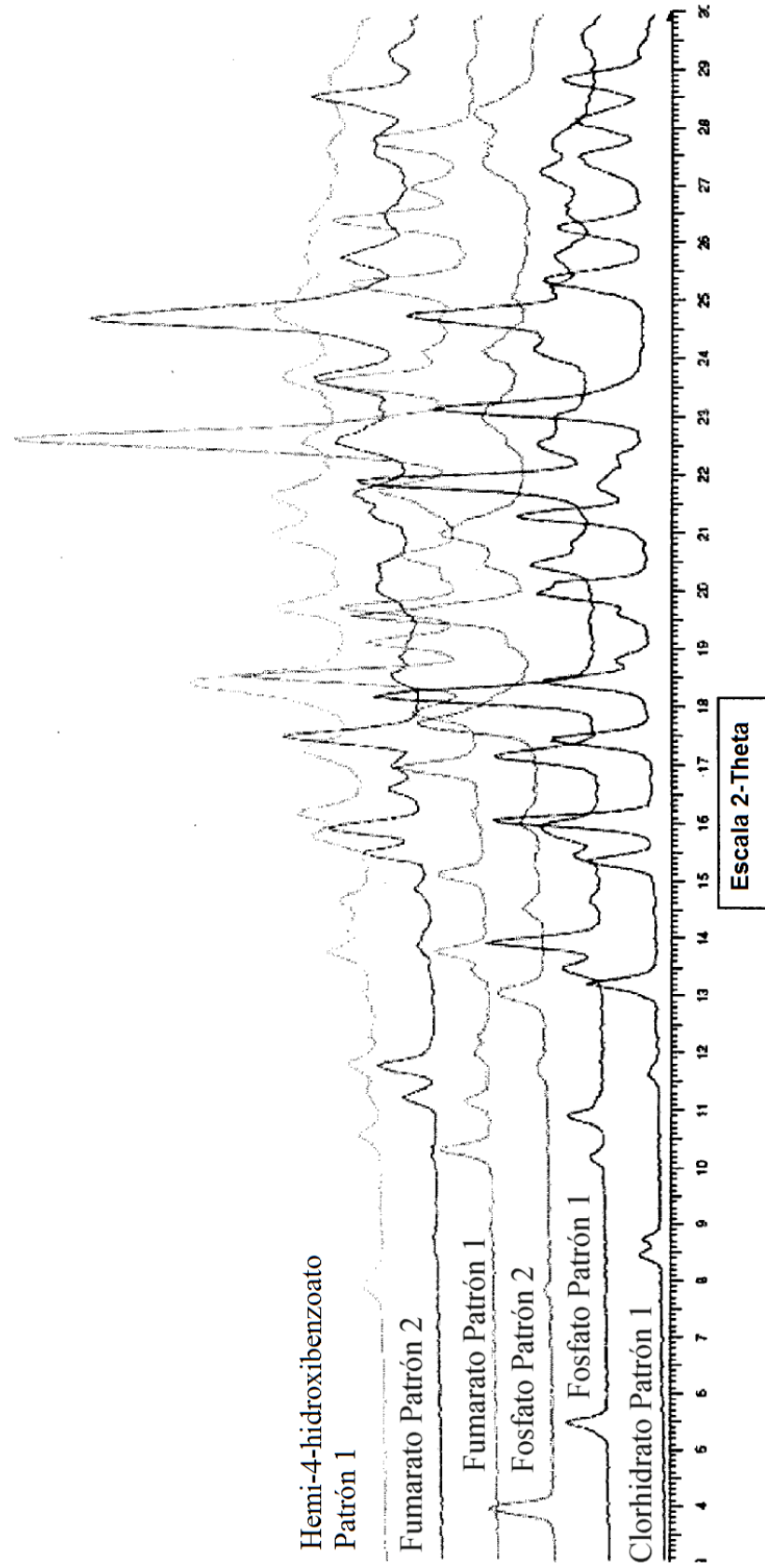


Figura 13
Hiperalgésia térmica inducida por CFA

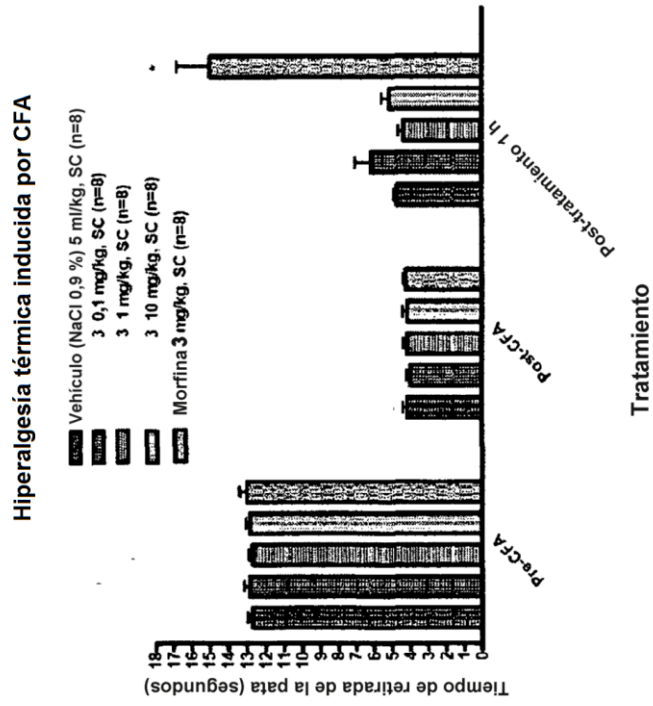
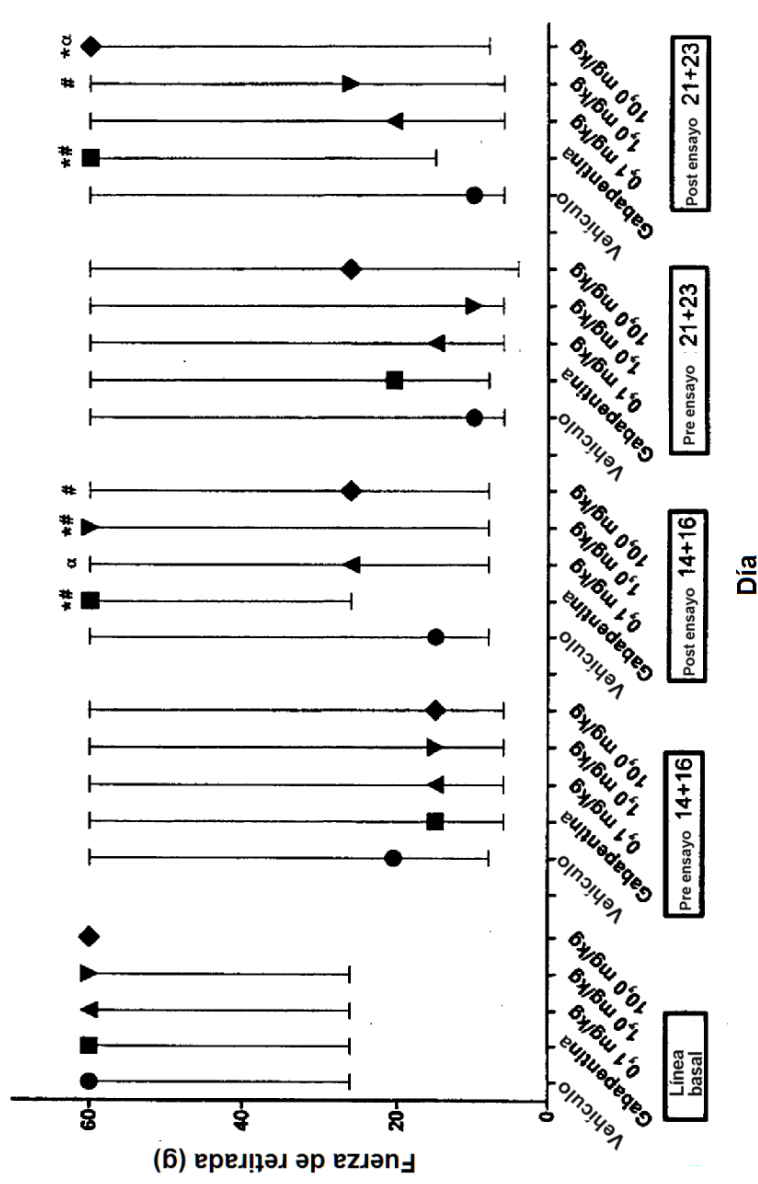
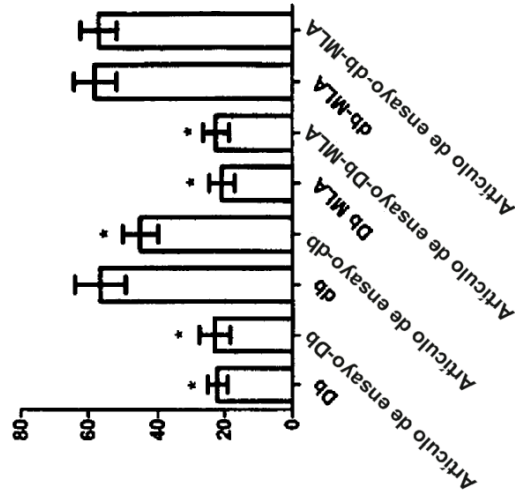


Figura 14



* P < 0,05 en comparación con el grupo de vehículo para ese día de ensayo (ANOVA en rangos)
 # P < 0,05 en comparación con respuesta de pre-ensayo correspondiente en el mismo grupo de tratamiento (ensayo de rangos con signo)
 α P = 0,06 en comparación con pre-ensayo correspondiente en el mismo grupo de tratamiento (ensayo de rangos con signo)
 El símbolo indica mediana del grupo
 Las barras indican el intervalo de grupo

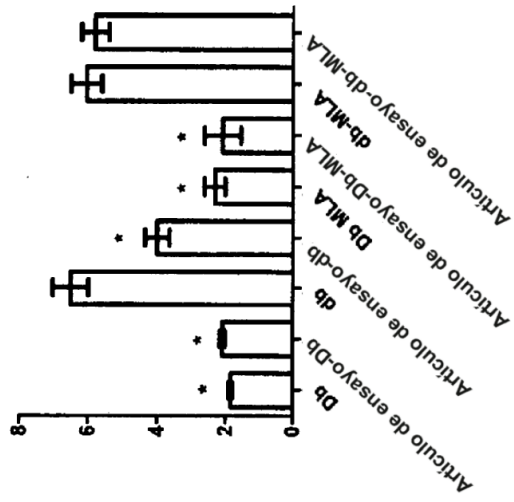
Figura 15
masa corporal +/- MLA (g)



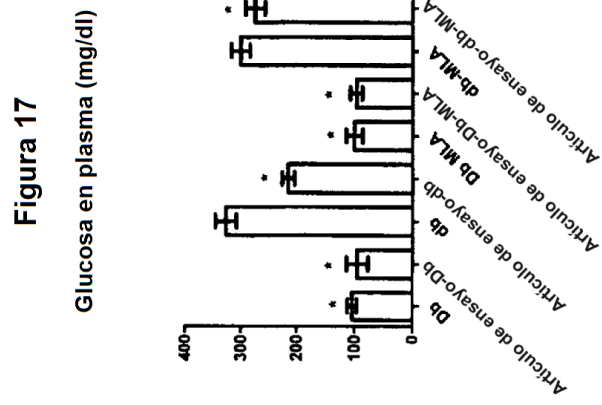
- P < 0,01 en comparación con ratones obesos a los que se ha administrado vehículo ("db").
- Artículo de ensayo = (2S,3R)-N-2-((3-piridinil)metil)-1-azabencilo[2.2.2]oct-3-il)-3,5-difluorobenzamida

Figura 16

Consumo de alimentos +/- MLA (g/día)

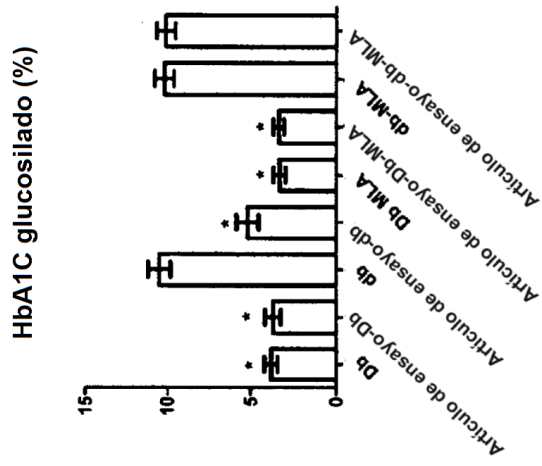


* P < 0,01 en comparación con ratones obesos a los que se administró vehículo ("db").



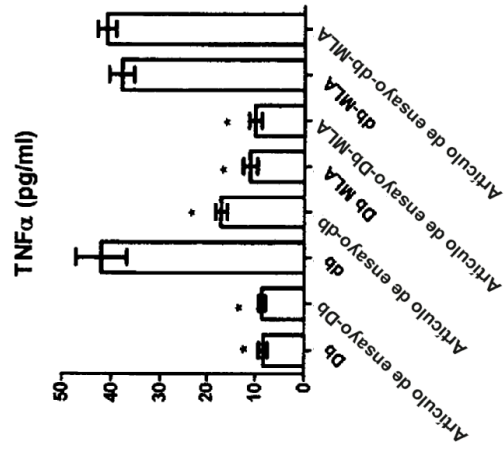
* P < 0,01 en comparación con ratones obesos a los que se administró vehículo ("db").

Figura 18



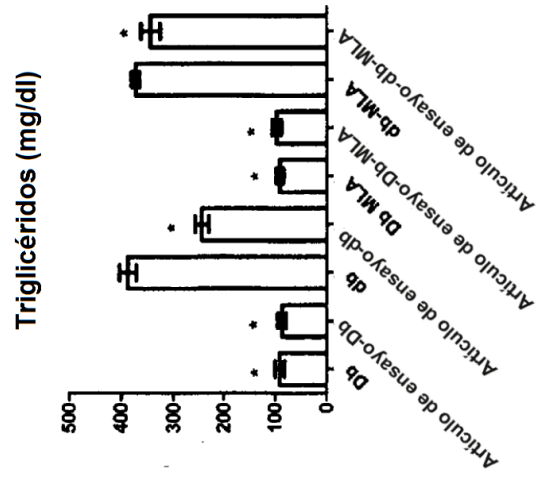
* P < 0,01 en comparación con ratones obesos a los que se administró vehículo ("db").

Figura 19



* P < 0,01 en comparación con ratones obesos a los que se administró vehículo ("db").

Figura 20



* P < 0,01 en comparación con ratones obesos a los que se administró vehículo ("db").

Figura 21

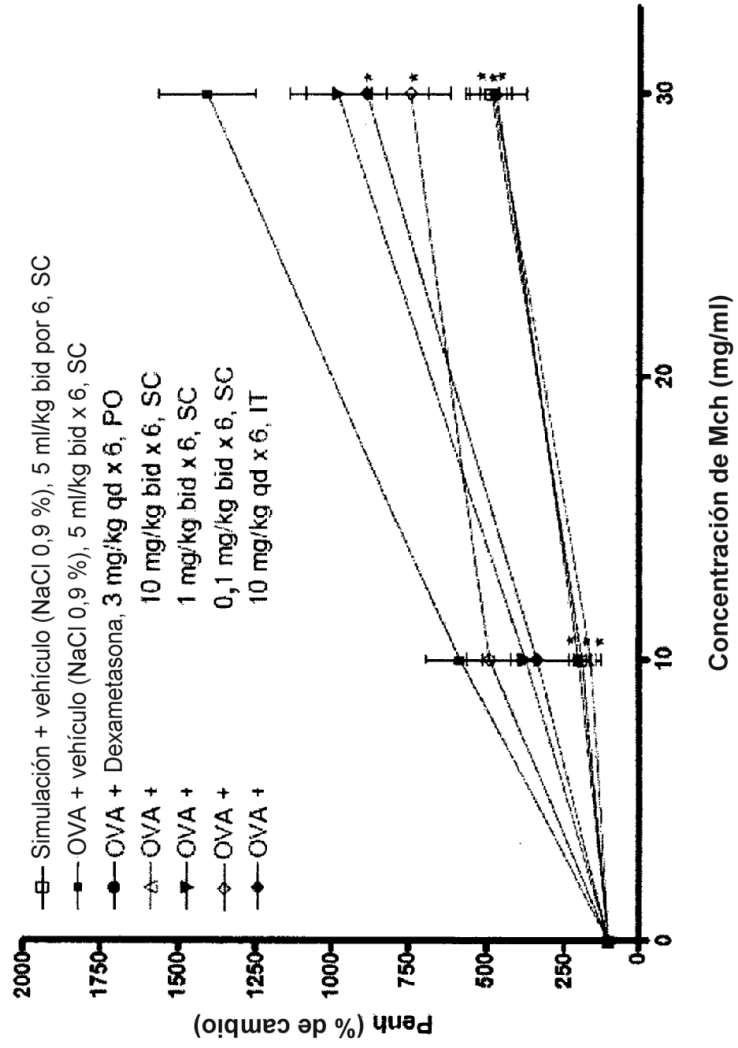


Figura 22

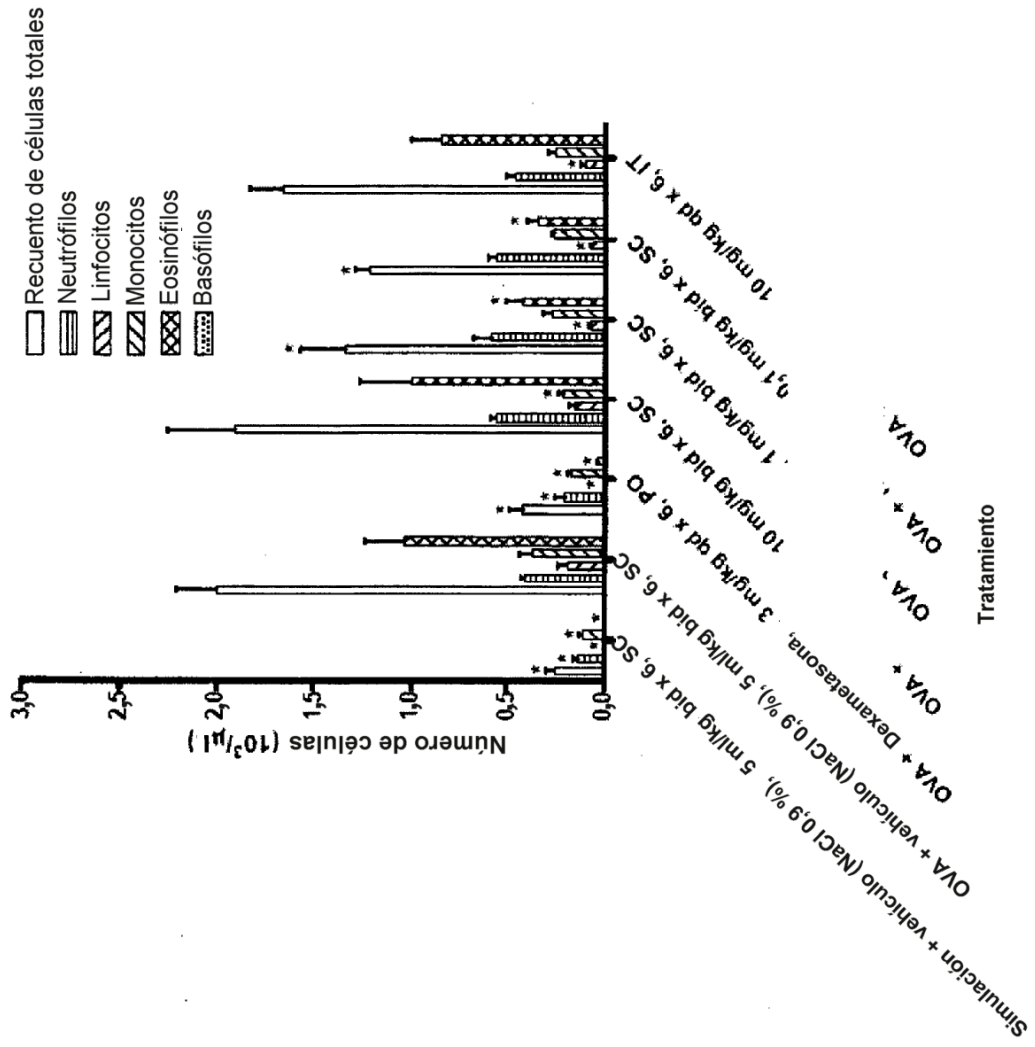


Figura 23

