

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 524 026**

51 Int. Cl.:

C07D 475/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2008 E 08781435 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2224927**

54 Título: **Análogo de pterina para tratar una afección que responde a BH4**

30 Prioridad:

03.01.2008 US 18735 P
08.01.2008 US 19753 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2014

73 Titular/es:

BIOMARIN PHARMACEUTICAL INC. (100.0%)
105 DIGITAL DRIVE
NOVATO, CA 94949, US

72 Inventor/es:

KAKKIS, EMIL D.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 524 026 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

Análogo de pterina para tratar una afección que responde a BH4

Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

5 Se reivindica el beneficio bajo el 35 USC §119 de la solicitud provisional de patente de EE.UU. nº 61/018.735, registrada el 3 de enero de 2008 y de la solicitud provisional de patente de EE.UU. nº 61/019.753, registrada el 8 de enero de 2008.

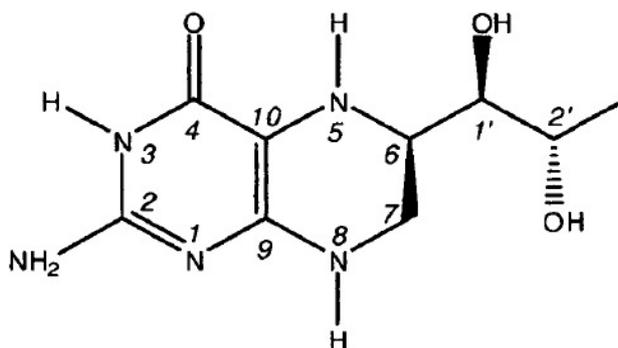
Antecedentes de la invención

Campo de la Invención

10 La invención hace referencia en general a un análogo de tetrahydrobiopterina, a composiciones que contienen el mismo, y a este análogo para su uso en el tratamiento de un individuo que sufre de una afección que responde a la tetrahydrobiopterina mediante la administración de dicho análogo.

Breve descripción de la tecnología relacionada

15 La tetrahydrobiopterina (a la que también se hace referencia en el presente documento como "BH4") es un compuesto químico de origen natural y es una amina biológicamente activa de la familia de pterinas. Un estereoisómero, la sapropterina, se muestra en la Fórmula II, a continuación:



Fórmula II

20 Aunque la tetrahydrobiopterina de origen natural también se puede sintetizar mediante una variedad de métodos, algunos de los cuales se dan a conocer en, por ejemplo, las Patentes Estadounidenses Nos. 2.601.215; 3.505.329; 4.540.783; 4.550.109; 4.587.340; 4.595.752; 4.649.197; 4.665.182; 4.701.455; 4.713.454; 4.937.342; 5.037.981; 5.198.547; 5.350.851; 5.401.844; 5.698.408; y 5.698.408, y la solicitud de patente canadiense N° 2.420.374.

25 Las pterinas son compuestos bicíclicos que incluyen un anillo de pirazina y un anillo de pirimidina que tienen un oxígeno de carbonilo y un grupo amino. Las pterinas funcionan como cofactores en la catálisis enzimática. La tetrahydrobiopterina funciona como un cofactor para una variedad de diferentes enzimas, que incluyen la fenilalanina hidroxilasa (PAH), tirosina 3-hidroxilasa, triptófano 5-hidroxilasa y las tres formas de la óxido nítrico sintasa (NOS). La tetrahydrobiopterina también es un factor de crecimiento para *Crithidia fasciculata*, tiene actividad proliferativa en células hematopoyéticas y actúa como un factor autoprotector para la toxicidad del óxido nítrico. Estas y otras funciones cofactoriales y celulares de la tetrahydrobiopterina, así como también los trastornos que se relacionan con la deficiencia de tetrahydrobiopterina, se dan a conocer en Thony y colaboradores (2000) *Biochem. J.* 347:1-16. Los trastornos que se relacionan con la deficiencia de tetrahydrobiopterina también se describen en general en Blau y colaboradores, *Disorders of Tetrahydrobiopterin and Related Biogenic Amines*, en *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 1275-776 (8a ed, McGraw-Hill Publishing Co, Nueva York, NY, 2001).

35 La tetrahydrobiopterina es un compuesto hidrófilo que tiene dificultad para cruzar las membranas así como también para atravesar la barrera hematoencefálica. La barrera hematoencefálica es generalmente una membrana que controla el paso de sustancias de la sangre al interior del sistema nervioso central (CNS, por sus siglas en inglés). Funciona como una barrera física entre los vasos sanguíneos locales y la mayoría de las partes del CNS, impidiendo que ciertos (y muchos) compuestos alcancen el CNS. Las paredes que definen los vasos capilares en el

cuerpo están hechas de células endoteliales separadas por aberturas pequeñas. Estas aberturas permiten que los productos químicos solubles dentro de los tejidos pasen al interior del torrente sanguíneo, de modo que los productos químicos pueden ser llevados por todo el cuerpo, y subsecuentemente pasar fuera de la sangre al interior de diferentes tejidos. En el cerebro, estas células endoteliales son empaquetadas más ajustadamente y, por lo tanto, las aberturas son aún más pequeñas. Estas aberturas más pequeñas bloquean el paso de todas las moléculas excepto aquellas que cruzan las membranas celulares debido a la solubilidad de lípidos (por ejemplo, oxígeno, dióxido de carbono, etanol) y aquellas que pasan mediante sistemas de transporte específicos (por ejemplo, azúcares, aminoácidos selectos). Muchos fármacos no cruzan la barrera hematoencefálica en cantidades efectivas para proporcionar una terapia. Además de proporcionar una barrera física para el CNS, las células endoteliales en el cerebro también pueden metabolizar ciertas moléculas (fármacos), de modo que nunca alcanzan el CNS.

La presente invención se dirige a maneras más efectivas para administrar la tetrahidrobiopterina al cuerpo, así como también al CNS, para proporcionar una terapia efectiva para trastornos y afecciones que responden a la tetrahidrobiopterina.

15 Resumen de la invención

En el presente documento se da a conocer un análogo de tetrahidrobiopterina, composiciones que contienen el mismo, y este análogo para su uso en el tratamiento de un individuo que sufre de una afección que responde a la terapia con tetrahidrobiopterina mediante la administración de dicho análogo.

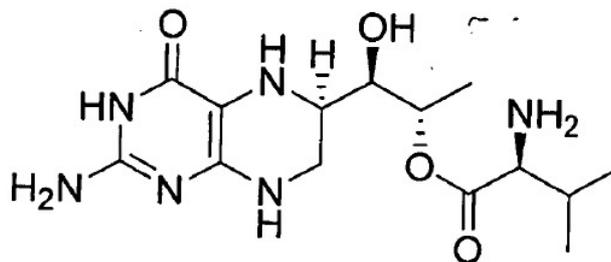
Otros análogos de BH4 se revelaron anteriormente en la patente Suiza CH 651 755, la patente de Estados Unidos US 4.550.109 y la solicitud de patente internacional WO 2008/089008.

El compuesto revelado en el presente documento es un análogo, y un profármaco, de la tetrahidrobiopterina o un derivado de tetrahidrobiopterina que pueden generar la tetrahidrobiopterina o un derivado de la misma, respectivamente, in vivo. La tetrahidrobiopterina es un producto químico de origen natural que también se obtiene mediante la síntesis química conocida por aquellas personas expertas en el arte.

Se ha descubierto que la tetrahidrobiopterina administrada por vía oral tiene baja biodisponibilidad. Se cree generalmente que esta baja biodisponibilidad es atribuible a al menos una de pobre absorción del tracto gastrointestinal (GI), oxidación en el tracto GI y/o el torrente sanguíneo, degradación o metabolismo antes de la absorción y degradación o metabolismo después de la absorción. Adicionalmente, se cree que la tetrahidrobiopterina muestra pobre solubilidad (lípidos), inestabilidad química potencial en el estómago y el torrente sanguíneo, e incapacidad para permear las paredes del tracto GI.

Un aspecto de la revelación se dirige a la mejora de la biodisponibilidad de la tetrahidrobiopterina en un individuo mediante la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del análogo o profármaco de tetrahidrobiopterina a un individuo en necesidad del mismo, en donde, si el análogo es un profármaco de BH4, las enzimas endógenas pueden liberar la tetrahidrobiopterina activa o el derivado de tetrahidrobiopterina, respectivamente, in vivo. La aproximación con el profármaco es adecuada en el caso de la tetrahidrobiopterina debido a que este compuesto interactúa con al menos seis enzimas diferentes (por ejemplo, fenilalanina hidroxilasa, tirosina hidroxilasa, triptófano hidroxilasa, óxido nítrico sintasa endotelial, óxido nítrico sintasa neuronal y óxido nítrico sintasa inducible). Además, la tetrahidrobiopterina experimenta reciclaje después de participar en una reacción de hidroxilación que requiere otras dos enzimas. Por lo tanto, un análogo de la tetrahidrobiopterina que no interactúa apropiadamente con estas seis enzimas y que es reciclado por dos enzimas adicionales, puede no funcionar bien como un cofactor y no se podría utilizar estequiométricamente, en especial si no se recicla apropiadamente. Por estas razones, un análogo que genera el compuesto de tetrahidrobiopterina natural es muy superior a un compuesto que tiene una mejor biodisponibilidad pero no puede interactuar apropiadamente con todas las dianas celulares de la tetrahidrobiopterina.

Por consiguiente, un aspecto de la invención se dirige a un análogo de tetrahidrobiopterina. El análogo de tetrahidrobiopterina es un compuesto de la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



Fórmula I

El análogo de BH4 puede ser, pero no se limita a, un profármaco que puede liberar BH4 bajo condiciones biológicas.

5 La presente invención también se dirige a proporcionar una composición para tratar a un individuo que sufre de una afección que responde a la terapia con tetrahidrobiopterina. Las composiciones pueden incluir, generalmente, cualquiera de los modos de realización del compuesto de la Fórmula I mencionados anteriormente y, opcionalmente, un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente o un soporte para el mismo.

10 Aún otro aspecto de la invención es proporcionar el compuesto de la Fórmula I para su uso en el tratamiento de un individuo que sufre de una afección que responde a BH4 mediante la administración de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente. El método incluye administrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula I. Las afecciones que responden a BH4 incluyen en general aquellas que responden a BH4 o a un derivado de la misma. Las afecciones que responden a BH4 incluyen complicaciones vasculares relacionadas con la diabetes que incluyen, pero no están limitadas a, trastornos de funciones vasculares generales (distensibilidad vascular anormal, disfunción endotelial e hipertensión); hipertensión recalcitrante; trastornos de sensibilidad a la insulina/control de glucosa; perfusión periférica anormal (claudicación intermitente, perfusión periférica reducida, flujo sanguíneo disminuido de la piel y curación defectuosa de heridas); enfermedad cardíaca (insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión pulmonar con o sin insuficiencia cardíaca congestiva, angina asociada con el ejercicio, enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis relacionada); enfermedad oftálmica (atrofia óptica, retinopatía diabética); y enfermedad renal (microalbuminuria en enfermedad renal diabética, insuficiencia renal, velocidad de filtración glomerular disminuida).

25 Las afecciones que responden a BH4 también incluyen enfermedad vascular no relacionada con la diabetes seleccionada del grupo que consiste en enfermedad vascular pulmonar, anemias hemolíticas, apoplejía y enfermedad vascular isquémica relacionada (tal como apoplejía, enfermedad cardíaca o coronaria, arteriosclerosis o enfermedad vascular periférica), trombosis, disfunción endotelial relacionada con trasplantes, y enfermedad cardíaca o coronaria. En una realización, la enfermedad vascular pulmonar incluye, pero no está limitada a, la tensión pulmonar en la anemia depreanocítica y otras hemoglobinopatías, hipertensión pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar persistente del recién nacido (PPHN, por sus siglas en inglés). En una realización adicional, las anemias hemolíticas incluyen anemias hemolíticas hereditarias y anemia hemolítica adquirida. Las anemias hemolíticas hereditarias incluyen, pero no están limitadas a, anemia depreanocítica, talasemia, anemia hemolítica debido a deficiencia de G6PD o asociada con la hemólisis, déficit de piruvato quinasa, eliptocitosis hereditaria, esferocitosis hereditaria, estomatocitosis hereditaria, ovalocitosis hereditaria, hemoglobinuria paroxímica nocturna y enfermedad de hemoglobina SC. Las anemias hemolíticas adquiridas incluyen, pero no están limitadas a, la anemia hemolítica microangiopática, anemia hemolítica autoinmune idiopática, anemia hemolítica no inmune causada por agentes o dispositivos químicos o físicos (dispositivos auxiliares del ventrículo izquierdo), válvulas cardíacas mecánicas y dispositivos de derivación o bypass) y anemia hemolítica inmune secundaria.

35 En otra realización, la apoplejía y enfermedad vascular isquémica relacionada incluyen, pero no están limitadas a, espasmo vascular, tal como espasmo cerebrovascular posterior a la apoplejía. La trombosis incluye, pero no está limitada a, trombogénesis, trombosis, espesamiento y coagulación. En una realización adicional, la disfunción endotelial relacionada con trasplantes incluye, pero no está limitada a, la disfunción vascular después del trasplante de órganos sólidos y disfunción endotelial inducida por ciclosporina A. En aún otra realización, la enfermedad cardíaca o coronaria incluye, pero no está limitada a, insuficiencia cardíaca congestiva, disfunción vascular y angina asociada con hipercolesterolemia, y disfunción vascular y angina asociada con el consumo de tabaco.

Para las composiciones y métodos descritos en el presente documento, las características preferidas tales como componentes, rangos composicionales de los mismos, condiciones y pasos, se pueden seleccionar de varios

ejemplos proporcionados en el presente documento.

Características adicionales de la invención pueden resultar evidentes para aquellas personas que tienen experiencia habitual en el arte, a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada, tomada en conjunción con las reivindicaciones anexas.

5 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo para la medición de la biopterina.

La Figura 2 muestra un resumen de los resultados de la validación del ensayo para medir la biopterina en fluidos corporales y tejidos.

10 La Figura 3 muestra la estabilidad de compuestos de los Ejemplos 2, 3, 4 y 20 en plasma humano durante un periodo de 60 minutos.

La Figura 4 muestra la estabilidad de compuestos de los Ejemplos 2, 3, 4 y 20 en plasma de rata durante un período de 60 minutos.

La Figura 5 muestra la estabilidad de compuestos de los Ejemplos 2, 3, 4 y 20 en un fluido gástrico simulado durante un periodo de 60 minutos.

15 La Figura 6 muestra los niveles en plasma de BH4 durante un periodo de tiempo de 25 horas después de la administración por vía oral de varios análogos de BH4 a monos en ayuno, en comparación con BH4.

La Figura 7 muestra la farmacocinética de BH4, BH2 y biopterina después de una administración por vía intravenosa de BH4 (2 mg/kg) en monos *Cynomolgus*.

20 La Figura 8 muestra la farmacocinética de BH4, BH2 y biopterina después de una administración por vía oral de BH4 (40 mg/kg) en monos *Cynomolgus*.

La Figura 9 muestra la farmacocinética del compuesto del Ejemplo 5, BH4, BH2 y biopterina después de la administración por vía intravenosa del compuesto del Ejemplo 5 (2 mg/kg en equivalentes de BH4) en monos *Cynomolgus*.

25 La Figura 10 muestra la farmacocinética del compuesto del Ejemplo 5, BH4, BH2 y biopterina después de una administración por vía oral del compuesto del Ejemplo 5 (5 mg/kg en equivalentes de BH4) en monos *Cynomolgus*.

La Figura 11 muestra la farmacocinética del compuesto del Ejemplo 5, BH4, BH2 y biopterina después de una administración por vía oral del compuesto del Ejemplo 5 (20 mg/kg en equivalentes de BH4) en monos *Cynomolgus*.

30 La Figura 12 muestra la comparación de la farmacocinética de BH4 después de las administraciones por vía oral de BH4 (40 mg/kg, convertidos a 5 mg/kg para la comparación) o del compuesto del Ejemplo 5 en 5 mg/kg o 20 mg/kg (en equivalentes de BH4).

La Figura 13 muestra la farmacocinética después de la administración por vía intravenosa de BH4 (2 mg/kg) o del compuesto del Ejemplo 5 (2 mg/kg en equivalentes de BH4).

35 La Figura 14 muestra la farmacocinética de BH4 después de la administración intravenosa de BH4 (2 mg/kg) o del compuesto del Ejemplo 5 (2 mg/kg en equivalentes de BH4).

La Figura 15 muestra la farmacocinética de BH4, BH2 y biopterina después de la administración intravenosa de BH4 (2 mg/kg) o del compuesto del Ejemplo 5 (2 mg/kg en equivalentes de BH4).

40 La Figura 16 muestra un cromatograma de BH4 de plasma de monos *cynomolgus*, 2 horas después de la administración del compuesto del Ejemplo 5 (fase móvil de MeOH al 2%).

La Figura 17 muestra el porcentaje de incremento de nitrito + nitrato después de un tratamiento de 5 horas con BH4 y con los compuestos de los Ejemplos 5, 7 y 9 en varias concentraciones.

La Figura 18 muestra el porcentaje de incremento de nitrito + nitrato después de un tratamiento de 17 horas con BH4 y con los compuestos de los Ejemplos 5, 7 y 9 en varias concentraciones.

La Figura 19 muestra el porcentaje de incremento de nitrito + nitrato después de un tratamiento de 22 horas con BH4 y con los compuestos de los Ejemplos 5, 7, y 9 en varias concentraciones.

5 La Figura 20 muestra el porcentaje de incremento de nitrito + nitrato (según se muestra por la concentración en μM) después de un tratamiento durante 5 horas con BH4 y con los compuestos de los Ejemplos 5 y 6 en varias concentraciones.

10 La Figura 21 muestra el porcentaje de incremento de nitrito + nitrato (según se muestra por la concentración en μM) después de un tratamiento durante 20 horas con BH4 y los compuestos de los Ejemplos 5 y 6 en varias concentraciones.

La Figura 22 muestra el porcentaje de incremento de nitrato + nitrito (según se muestra por la concentración en μM) en un ensayo de potenciación de eNOS libre de células *in vitro*, después de un tratamiento con tampón, control, BH4, Ejemplo 5 y 6S-BH4 en varias concentraciones.

15 La Figura 23 muestra el porcentaje de incremento de nitrato + nitrito (según se muestra por la concentración en μM) en un ensayo de producción de eNOS libre de células *in vitro* después de un tratamiento con tampón, control, BH4, Ejemplo 5, Ejemplo 6, Ejemplo 7 y Ejemplo 9 en varias concentraciones.

20 La Figura 24 muestra la evolución de los pesos corporales durante el período de tratamiento de 3 semanas en comparación con el efecto de la hipertensión con la administración de agua (ratas Wistar-Kyoto contra ratas Espontáneamente Hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés)), la administración de un vehículo en SHR, la administración de BH4 y la administración del compuesto del Ejemplo 5 en varias concentraciones.

La Figura 25 muestra la evolución de la presión sanguínea sistólica durante el período de tratamiento de 3 semanas con administración de agua en comparación con las ratas Wistar-Kyoto (MKY) y ratas Espontáneamente Hipertensas (SHR) coincidentes en la edad.

25 La Figura 26 muestra la evolución de la presión sanguínea sistólica durante el período de tratamiento de 3 semanas en SHR tratadas con agua o un vehículo.

La Figura 27 muestra la evolución de la presión sanguínea sistólica durante el período de tratamiento de 3 semanas en SHR tratadas con un vehículo o BH4 a 100 mg/kg/día.

La Figura 28 muestra la evolución de la presión sanguínea sistólica durante el período de tratamiento de 3 semanas en SHR tratadas con un vehículo o con el compuesto del Ejemplo 5 a 2 mg/kg/día.

30 La Figura 29 muestra la evolución de la presión sanguínea sistólica durante el período de tratamiento de 3 semanas en SHR tratadas con un vehículo o con el compuesto del Ejemplo 5 a 10 mg/kg/día.

La Figura 30 muestra la evolución de la presión sanguínea sistólica durante el período de tratamiento de 3 semanas en SHR tratadas con un vehículo o con el compuesto del Ejemplo 5 a 30 mg/kg/día.

35 La Figura 31 muestra la comparación de la evolución de la presión sanguínea sistólica durante el período de tratamiento de 3 semanas en SHR tratadas con un vehículo, BH4 (100 mg/kg/día) o con el compuesto del Ejemplo 5 a 10 mg/kg/día.

Descripción detallada de la Invención

40 La tetrahidrobiopterina administrada por vía oral muestra una pobre biodisponibilidad debido a que la cantidad de fármaco que entra al torrente sanguíneo no conduce frecuentemente a una terapia efectiva o requiere la administración de dosis mayores del compuesto a fin de lograr un beneficio clínico significativo. Adicionalmente, aunque la barrera hematoencefálica es permeable generalmente a moléculas pequeñas, por ejemplo, es una barrera natural para la captación de tetrahidrobiopterina. La presente invención trata la pobre biodisponibilidad de la tetrahidrobiopterina administrada por vía oral y las dificultades a la hora de proporcionar tetrahidrobiopterina tanto al cuerpo como al CNS en cantidades efectivas para proporcionar una terapia para afecciones que responden a la tetrahidrobiopterina.

45 La presente invención hace referencia en general a un análogo de tetrahidrobiopterina, composiciones farmacéuticas que contienen el mismo, y este análogo para su uso en el tratamiento de un individuo que sufre de

una afección que responde a la tetrahidrobiopterina mediante la administración del análogo, todos los cuales se describen con mayor detalle a continuación.

El análogo puede ser particularmente útil debido a que la BH4 es un producto natural con múltiples acciones para las cuales es difícil producir un análogo, que no solamente requeriría que tuviera propiedades de biodisponibilidad mejoradas sino también debe retener la capacidad para funcionar con múltiples dianas celulares. Evitar los efectos tanto inhibidores o tóxicos inesperados de un análogo, se puede lograr con un análogo (por ejemplo, un profármaco) que se convierte al compuesto natural después de lograr entrar en el torrente sanguíneo desde el tracto gastrointestinal.

Terminología

Como se utiliza en el presente documento, el término "biodisponibilidad" hace referencia a la fracción de una dosis administrada de un fármaco que entra a la circulación sistémica. Si el fármaco se administrara por vía intravenosa, entonces su biodisponibilidad sería teóricamente del 100%. Sin embargo, si el fármaco se administrara mediante otras vías (tales como la vía oral), entonces su biodisponibilidad sería habitualmente menor del 100% como resultado de, por ejemplo, la absorción incompleta en el tracto GI, la degradación o metabolismo antes de la absorción y/o el efecto de primer paso hepático.

Métodos para evaluar de análogos de tetrahidrobiopterina

El análogo de tetrahidrobiopterina que se da a conocer en el presente documento se puede evaluar en una variedad de maneras. Por ejemplo, este análogo se puede evaluar para su estabilidad metabólica. El metabolismo de fármacos se logra mediante dos principales reacciones enzimáticas con el hígado. Las enzimas de Fase I incluyen la familia de citocromo 450 (CYP) de enzimas localizadas en el retículo endoplásmico liso. Las reacciones de fase I incluyen la oxidación, reducción y/o hidrólisis, muchas de las cuales son mediadas por las enzimas CYP y requieren NADPH como cofactor. Las reacciones de Fase II se localizan en el citoplasma y retículo endoplásmico e implican una conjugación, tal como con ácido glucorónico, glutatión, sulfato y glutamina. Las reacciones de Fase II pueden inactivar un fármaco y/o causar que la molécula del fármaco sea eliminada mejor por el cuerpo. Los fármacos pueden ser metabolizados por reacciones ya sea de Fase I o de Fase II, o por ambas. La estabilidad metabólica de un compuesto de prueba se determina para evaluar la capacidad del compuesto para generar metabolitos potencialmente tóxicos o farmacológicamente inactivos durante el metabolismo de fase I o para acumularse debido a una degradación metabólica inadecuada. Los microsomas del hígado son fracciones subcelulares (retículo endoplásmico) que contienen muchas enzimas metabolizadoras del fármaco, que incluyen las CYP. Los microsomas del hígado se utilizan comúnmente como un sistema de modelo in vitro para evaluar el destino metabólico de los compuestos de prueba. Otros aspectos de la estabilidad metabólica se podrían relacionar con la oxidación de la tetrahidrobiopterina o sus derivados. La tetrahidrobiopterina es sensible a la oxidación la cual puede ocurrir a través del metabolismo o a través de una acción física bajo las condiciones del cuerpo de los mamíferos en términos de temperatura y potencial de redox. Además, el análogo puede ser sometido a prueba para su metabolismo mediante esterasas y otras enzimas que pueden dividir el análogo y se pueden encontrar en los tejidos así como también en el torrente sanguíneo.

Estos análogos también se pueden evaluar para su solubilidad acuosa así como también su lipofiliidad. La solubilidad acuosa es un importante factor determinante de la biodisponibilidad y la utilidad de un fármaco candidato. La nefelometría (dispersión de luz) es una técnica aceptada para determinar rápidamente las solubilidades aparentes de un gran número de compuestos principales. La lipofiliidad puede ser determinada utilizando el coeficiente de partición de octanol:agua como modelo de membranas. El coeficiente de partición de octanol:agua también se puede calcular utilizando métodos de fragmentos calculados por ordenador. Un logaritmo del coeficiente de partición (log P) de aproximadamente 2 se piensa que representa un log P óptimo para la penetración de la membrana.

Adicionalmente, este análogo puede ser evaluado para la permeabilidad de la membrana. Las células CaCO-2 se utilizan comúnmente para evaluar la permeabilidad de la membrana y, de esta manera, la biodisponibilidad oral potencial. Las células CaCO-2 se derivan de una línea de células de carcinoma de colon en humanos y se desarrollan típicamente en una monocapa confluyente o filtros de membrana porosos, los cuales se montan en cámaras de difusión. La permeabilidad de la membrana se mide en base a la velocidad de aparición del compuesto de prueba en el compartimiento receptor. La superficie apical (donadora) de la monocapa consiste en microvellosidades y por lo tanto retiene las características del borde en cepillo intestinal. Además, las células también pueden expresar proteínas de transporte funcionales y enzimas metabólicas (Inui y colaboradores, J. Pharmacol. Exp. Ther. 261:195-201 (1992); Lu y colaboradores, Pharm. Res. 11:S-258 (1994); Jorge y colaboradores, Pharm. Res. 8:1441-1443 (1991)). Se piensa que las evaluaciones in vitro que utilizan células CaCO-2 son predictivas para la absorción gastrointestinal en humanos (Stewart y colaboradores, Pharm. Res. 12:693-699 (1995)). También se ha determinado que las células Caco-2 derivadas del intestino humano expresan una variedad de esterasas que pueden liberar fármacos precursores a partir de profármacos durante el paso a través de la membrana intestinal. (Imai y colaboradores, Drug Metabolism and Disposition 2005, 33, 1185-1190;

Miyazaki y colaboradores, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004, 48, 2604-2609). Por ejemplo, una proteína similar a la bifenilhidroxilasa que hidroliza los ésteres de valina de ciertos alcoholes ha sido identificada a partir de las células CaCO-2 derivadas del intestino humano. (Amidon y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 2003, 273, 25348-25356).

5 Aún adicionalmente, este análogo se puede evaluar para su permeabilidad intestinal. La evaluación de la permeabilidad intestinal de compuestos destinados para su administración por vía oral juega un papel importante en la selección de candidatos para el desarrollo de fármacos comerciales. La clasificación de una serie de compuestos principales en orden de potencial de absorción facilita la selección y optimización de compuestos. Un método actualmente aceptado para la investigación del potencial de absorción de compuestos dentro de una serie es
10 mediante la comparación de las permeabilidades aparentes a través de cultivos de monocapas de CaCO-2 o MDCK (Artusson y Borchardt, *Pharm. Res.* 1997, 14, 1655-1657). Estos modelos de absorción también son útiles para entender cualquier cuestión de absorción asociada con compuestos adicionalmente avanzados en el desarrollo, incluyendo aquellos implicados con los mecanismos de transporte activos.

15 Se puede evaluar adicionalmente los análogos para su biodisponibilidad y conversión a BH4, utilizando modelos animales tales como ratas o perros. En esta situación, el fármaco administrado por vía oral se compara con aquel proporcionado por vía intravenosa, y la farmacocinética de ambas vías se analiza por la concentración del fármaco. Los tejidos de interés que incluyen el hígado, el corazón, el sistema vascular y el cerebro, se pueden analizar para los niveles de tetrahidrobiopterina en el tejido y se pueden comparar con las concentraciones logradas después de la administración de las formas tanto análogas como nativas.

20 Composiciones que Contienen el Compuesto de la Fórmula I

Un aspecto adicional de la invención se dirige a una composición farmacéutica que incluye un compuesto de la presente invención, junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como un diluyente o soporte para el mismo. Los compuestos y composiciones farmacéuticas que son adecuados para su uso en la presente invención incluyen aquellos en donde el compuesto se puede administrar en una cantidad efectiva para lograr su propósito deseado. La administración del compuesto se describe con mayor detalle más adelante.

Las formulaciones farmacéuticas adecuadas pueden ser determinadas por el experto en el arte, dependiendo de la vía de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1435-712 (18a ed., Mack Publishing Co, Easton, Pensilvania, 1990). Las formulaciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, tasa de liberación in vivo y tasa de eliminación in vivo de los agentes administrados. Dependiendo de la
30 vía de administración, una dosis adecuada se puede calcular de acuerdo con el peso corporal, áreas superficiales del cuerpo o tamaño del órgano. El refinamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosis de tratamiento apropiada se realiza de forma rutinaria por aquellas personas de experiencia habitual en el área sin experimentación indebida, especialmente en vista de la información de dosificación y ensayos revelados en el presente documento, así como también los datos farmacocinéticos que se pueden obtener a través de ensayos
35 clínicos en animales o en humanos.

Las frases "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" hacen referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas u otras reacciones desfavorables cuando se administran a un animal o un humano. Tal como se utiliza en el presente documento, un "soporte farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y la totalidad de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de estos excipientes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en el arte. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con las composiciones terapéuticas, está contemplado su uso en las composiciones terapéuticas. Los ingredientes activos complementarios también se pueden incorporar a las composiciones. En realizaciones a modo de ejemplo, la
45 formulación puede comprender sólidos de jarabe de maíz, aceite de cártamo con alto contenido de ácido oleico, aceite de coco, aceite de soja, L-leucina, fosfato de calcio tribásico, L-tirosina, L-prolina, acetato de L-lisina, DATEM (un emulsionante), L-glutamina, L-valina, fosfato de potasio dibásico, L-iso-leucina, L-arginina, L-alanina, glicina, monohidrato de L-asparagina, L-serina, citrato de potasio, L-treonina, citrato de sodio, cloruro de magnesio, L-histidina, L-metionina, ácido ascórbico, carbonato de calcio, ácido L-glutámico, diclorhidrato de L-cistina, L-triptófano, ácido L-aspártico, cloruro de colina, taurina, m-inositol, sulfato ferroso, palmitato de ascorbilo, sulfato de
50 zinc, L-carnitina, acetato de alfa-tocoferilo, cloruro de sodio, niacinamida, tocoferoles mixtos, pantotenato de calcio, sulfato cúprico, clorhidrato de cloruro de tiamina, palmitato de vitamina A, sulfato de manganeso, riboflavina, clorhidrato de piridoxina, ácido fólico, beta-caroteno, yoduro de potasio, filoquinona, biotina, selenato de sodio, cloruro de cromo, molibdato de sodio, vitamina D3 y cianocobalamina. Los aminoácidos, minerales y vitaminas en el
55 complemento se deben proporcionar en cantidades que proporcionan las dosis diarias recomendadas de cada uno de los componentes.

Tal como se utiliza en el presente documento, las "sales farmacéuticamente aceptables" incluyen, por ejemplo sales de adición básicas y sales de adición ácidas.

- Las sales de adición básicas farmacéuticamente aceptables se pueden formar con metales o aminas, tales como metales alcalinos y alcalinotérreos o aminas orgánicas. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos también se pueden preparar con un catión farmacéuticamente aceptable. Los cationes farmacéuticamente adecuados son bien conocidos para aquellas personas expertas en el arte e incluyen cationes alcalinos, alcalinotérreos, de amonio y amonio cuaternario. Los carbonatos o carbonatos de hidrógeno también son posibles. Los ejemplos de metales utilizados como cationes son sodio, potasio, magnesio, amonio, calcio o férricos y similares. Los ejemplos de aminas adecuadas incluyen isopropilamina, trimetilamina, histidina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, dicitclohexilamina, etilendiamina, N-metilglucamina y procaina.
- Las sales de adición ácidas farmacéuticamente aceptables incluyen sales ácidos orgánicos o inorgánicos. Ejemplos de sales ácidas adecuadas incluyen clorhidratos, acetatos, citratos, salicilatos, nitratos, fosfatos. Otras sales farmacéuticamente aceptables adecuadas son bien conocidas por personas expertas en el arte e incluyen, por ejemplo, ácido acético, cítrico, oxálico, tartárico o mandélico, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico; con ácidos carboxílicos, sulfónicos, sulfo o fosfo orgánicos o ácidos sulfámicos N-sustituídos, por ejemplo ácido acético, ácido trifluoroacético (TFA), ácido propiónico, ácido glicólico, ácido succínico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido metilmaleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido tartárico, ácido láctico, ácido oxálico, ácido glucónico, ácido glucárico, ácido glucurónico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 2-fenoxibenzoico, ácido 2-acetoxibenzoico, ácido embónico, ácido nicotínico o ácido isonicotínico; y con aminoácidos, tales como los 20 alfa-aminoácidos implicados en la síntesis de proteínas en la naturaleza, por ejemplo ácido glutámico o ácido aspártico, y también con ácido fenilacético, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxi-etanosulfónico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido bencensulfónico, ácido 4-metilbencensulfónico, ácido naftalen-2-sulfónico, ácido naftalen-1,5-disulfónico, 2- o 3-fosfoglicerato, 6-fosfato de glucosa, ácido N-ciclohexilsulfámico (con la formación de ciclamatos) o con otros compuestos orgánicos ácidos, tales como ácido ascórbico.
- Se pueden formar sales análogas con ácidos inorgánicos u orgánicos. Ejemplos no limitantes de formas de sales análogas alternativas incluyen sales análogas de ácido acético, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido fumárico y ácido mandélico. En una realización específica, los análogos utilizados en una composición descrita en el presente documento se formulan como una sal de diclorhidrato.
- Las composiciones farmacéuticas que contienen los análogos de la presente invención se pueden fabricar de una manera convencional, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, elaboración de grageas, levigación, emulsión, encapsulamiento, aprisionamiento o liofilización. La formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada. Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de la presente invención se administra por vía oral, la composición típicamente se encuentra en forma de un sólido (por ejemplo, comprimido, cápsula, píldora, polvo o pastilla) o una formulación líquida (por ejemplo, suspensión acuosa, solución, elixir o jarabe).
- Cuando se administra en forma de comprimido, la composición puede contener adicionalmente un sólido funcional y/o un soporte sólido, tal como una gelatina o un adyuvante. El comprimido, cápsula y polvo puede contener de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 95% de un análogo de la invención, por ejemplo, de aproximadamente 25 a aproximadamente 90% de un análogo de la invención.
- Cuando se administra en forma líquida o suspensión, se puede agregar un líquido funcional y/o un soporte líquido tal como agua, petróleo o aceites de origen animal o vegetal. La forma líquida de la composición puede contener además una solución salina fisiológica, soluciones de alcohol de azúcar, dextrosa u otras soluciones de sacáridos o glicoles. Una realización particular se dirige a las soluciones de alcohol de azúcar. Cuando se administra en forma líquida o de suspensión, la composición puede contener de aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 90% en peso de un análogo de la presente invención, por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50% de un análogo de la presente invención. En una realización contemplada, el soporte líquido es no acuoso, o sustancialmente no acuoso. Para la administración en forma líquida, la composición puede suministrarse como una formulación sólida que se disuelve rápidamente, para su disolución o suspensión inmediatamente antes de la administración.
- Cuando una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de la presente invención se administra mediante una inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la composición se encuentra en forma de una solución acuosa, parenteralmente aceptable, libre de pirógenos. La preparación de estas soluciones parenteralmente aceptables, respetando debidamente el pH, la isotonicidad, estabilidad y similares, se encuentra dentro de la experiencia en el arte. En una realización, una composición para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea contiene habitualmente, además de un compuesto de la presente invención, un vehículo isotónico. Tales composiciones análogas se pueden preparar para su administración como soluciones en forma de base libre o de sales farmacológicamente aceptables en agua mezcladas adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos, y en aceites. Bajo condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden

contener opcionalmente un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones análogas inyectables pueden incluir soluciones, suspensiones o dispersiones acuosas, estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones, suspensiones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista una facilidad para su inyección con jeringa. Debe ser estable bajo las condiciones de manufactura y almacenamiento y debe resistir la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos, mediante la inclusión opcional de un conservante. El soporte puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. En una realización contemplada, el soporte es no acuoso, o sustancialmente no acuoso. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido del análogo en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser llevada a cabo por varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. Las composiciones de la invención pueden contener agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser llevada a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los que se han enumerado anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen las técnicas de secado al vacío y secado por liofilización, las cuales producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional a partir de una solución filtrada previamente en condiciones estériles de los mismos.

Para la administración por vía oral, las composiciones adecuadas se pueden formular fácilmente combinando un análogo de la presente invención con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como soportes bien conocidos en el arte. Estos excipientes y soportes hacen posible que los presentes compuestos sean formulados como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y similares, para su ingestión por vía oral por parte de un paciente a ser tratado. Las preparaciones farmacéuticas para su uso por vía oral se pueden obtener añadiendo un compuesto de la Fórmula I con un excipiente sólido, triturando opcionalmente una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de agregar sustancias auxiliares adecuadas, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, materiales de relleno y preparaciones de celulosa. Si se desea, se pueden agregar agentes de desintegración. Los ingredientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos para los diversos tipos de formulación y pueden ser por ejemplo sustancias aglutinantes (por ejemplo, polímeros naturales o sintéticos), lubricantes, tensioactivos, agentes edulcorantes y saborizantes, materiales de recubrimiento, conservantes, colorantes, agentes espesantes, adyuvantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes y soportes para los diversos tipos de formulación.

Los ejemplos no limitantes de sustancias aglutinantes que son útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen goma de tragacanto, goma arábiga, almidón, gelatina y polímeros biodegradables, tales como homo- o co-poliésteres de ácidos dicarboxílicos, alquilenglicoles, polialquilenglicoles y/o ácidos hidroxil-carboxílicos alifáticos; homo- o co-poliámidas de ácidos dicarboxílicos, alquilen-diaminas y/o ácidos amino-carboxílicos alifáticos; co-polímeros correspondientes de poliéster-poliámidas, polianhídridos, polioctoésteres, polifosfazeno y policarbonatos. Los polímeros biodegradables pueden ser lineales, ramificados o reticulados. Los ejemplos específicos son ácido poli-glicólico, ácido poli-láctico y poli-d,l-lactida/glicólico. Otros ejemplos para polímeros son polímeros solubles en agua tales como polioxaalquilenos (polioxaetileno, polioxapropileno y polímeros mezclados de los mismos, poli-acrilamidas y poli-acrilamidas hidroxialquiladas, ácido poli-maleico y ésteres o amidas del mismo, ácido poliacrílico y ésteres o amidas del mismo, alcohol polivinílico y ésteres o éteres del mismo, polivinilimidazol, poli-vinilpirrolidona y polímeros naturales como quitosán.

Los ejemplos no limitantes de excipientes para la fabricación de comprimidos que son útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen fosfatos tales como fosfato dicálcico.

Los tensioactivos para su uso en una composición descrita en el presente documento pueden ser aniónicos, catiónicos, anfotéricos o neutros. Ejemplos no limitantes de tensioactivos que son útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen lecitina, fosfolípidos, sulfato de octilo, sulfato de decilo, sulfato de dodecilo, sulfato de tetradecilo, sulfato de hexadecilo y sulfato de octadecilo, oleato de sodio o caprato de sodio, ácidos 1-acilaminoetano-2-sulfónicos, tales como ácido 1-octanoilaminoetano-2-sulfónico, ácido 1-decanoilaminoetano-2-sulfónico, ácido 1-dodecanoilaminoetano-2-sulfónico, ácido 1-tetradecanoilaminoetano-2-sulfónico, ácido 1-hexadecanoilaminoetano-2-sulfónico y ácido 1-octanodecailaminoetano-2-sulfónico, y ácido taurocólico y ácido taurodesoxicólico, ácidos biliares y sus sales, tales como ácido cólico, ácido desoxicólico y

glicocolatos de sodio, caprato de sodio o laurato de sodio, oleato de sodio, lauril-sulfato de sodio, cetil-sulfato de sodio, aceite de ricino sulfatado y dioctilsulfosuccinato de sodio, cocamidopropilbetaína y laurilbetaína, alcoholes grasos, colesteroles, mono- o diestearato de glicerol, mono- o dioleato de glicerol y mono- o dipalmitato de glicerol, y estearato de polioxietileno.

5 Ejemplos no limitantes de agentes edulcorantes que son útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen alcoholes de azúcar tales como manitol, xilitol, sorbitol, glicerol, eritritol, arabitol, isomalta, maltitol y lactitol, así como también sacarina, sucralosa y aspartamo. En una realización, los agentes edulcorantes se seleccionan de alcoholes de azúcar, aspartamo y sucralosa. En otra realización, los agentes edulcorantes no son azúcares. Ejemplos no limitantes de agentes saborizantes para el uso en una composición descrita en el
10 presente documento incluyen menta, aceite de gaulteria o sabores de frutas tales como sabor de cereza o naranja.

Ejemplos no limitantes de materiales de recubrimiento que son útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen talco, almidón de maíz, dióxido de silicio, lauril-sulfato de sodio, gelatina, cera, goma laca, azúcar, polímeros biodegradables y estearatos metálicos. En una realización, los materiales de recubrimiento se seleccionan de talco, almidón de maíz, dióxido de silicio, lauril-sulfato de sodio, gelatina, cera, polímeros
15 biodegradables y estearatos metálicos. El material de recubrimiento puede estar presente en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,2% en peso a aproximadamente 15% en peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 5% es peso.

Los lubricantes que se pueden emplear en la composición incluyen, pero no están limitados a, aceites naturales o sintéticos, grasas, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de sodio, ácido estéarico, estearil-fumarato
20 de sodio, aceite de semilla de algodón hidrogenado (Sterotex), talco y ceras, que incluyen pero no están limitadas a, cera de abeja, cera de carnauba, alcohol cetílico, estearato de glicerilo, palmitato de glicerilo, behenato de glicerilo, aceites vegetales hidrogenados y alcohol estearílico. El lubricante puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,2% en peso a aproximadamente 20% en peso, por ejemplo, de aproximadamente 0,5% en peso a aproximadamente 5% en peso.

25 Los ejemplos no limitantes de conservantes que son útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen ácido sórbico, clorobutanol, timerosal, alcohol bencílico, cloruro de benzalconio, fenol, m-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, ácido benzoico, fenoxietanol, metil-parabeno y propil-parabeno y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

Los ejemplos no limitantes de adyuvantes que son útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato potásico de aluminio (alumbre), sulfato de berilio, sílice, caolín, carbón, emulsiones de agua en aceite, emulsiones de aceite en agua, dipéptido de muramilo, endotoxina
30 bacteriana, lípido X, *Corynebacterium parvum* (*Propionobacterium acnes*), *Bordetella pertussis*, polirribonucleotidos, alginato de sodio, lanolina, lisolectina, vitamina A, saponina, liposomas, levamisol, DEAE-dextrano, copolímeros en bloque u otros adyuvantes sintéticos. Estos adyuvantes están disponibles comercialmente de varias fuentes, por ejemplo, Adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, N.J.) o adyuvante incompleto y adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, Michigan). Habitualmente, se utilizan adyuvantes tales como Amphigen (aceite en agua), Alhydrogel (hidróxido de aluminio) o una mezcla de Amphigen y Alhydrogel.

Los ejemplos no limitantes de agentes antimicrobianos que son útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen triclosan, fenoxiisopropanol, fenoxietanol, PCMX, aceites esenciales naturales y sus
40 ingredientes clave y mezclas de los mismos.

Los ejemplos no limitantes de antioxidantes que son útiles en una composición descrita en el presente documento incluyen ácido ascórbico (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E), vitamina A, selenio, beta-caroteno, carotenoides, flavonas, flavonoides, folatos, flavanonas, isoflavonas, catequinas, antocianidinas, chalconas y combinaciones de los mismos.

45 Las formulaciones de liberación lenta o liberación sostenida también se pueden preparar a partir de los análogos descritos en el presente documento a fin de lograr una liberación controlada del compuesto activo en contacto con los fluidos corporales en el tracto GI y de proporcionar un nivel sustancialmente constante y efectivo del compuesto activo en el plasma sanguíneo. Por ejemplo, la liberación puede ser controlada por uno o más de disolución, difusión y el intercambio iónico. Además, la aproximación de liberación lenta puede aumentar la absorción a través
50 de vías saturables o limitantes dentro del tracto GI. Por ejemplo, el análogo puede ser integrado para este propósito en una matriz polimérica de un polímero biodegradable, un polímero soluble en agua o una mezcla de ambos, y opcionalmente tensioactivos adecuados. La integración puede significar en este contexto la incorporación de micropartículas en una matriz de polímeros. Las formulaciones de liberación controlada también se obtienen a través del encapsulamiento de micropartículas dispersadas o micro-gotitas emulsionadas mediante tecnologías de recubrimiento por dispersión o emulsión.
55

Para la administración mediante inhalación, el compuesto de la presente invención se administra convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol desde envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un gas propelente adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede ser determinada proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o un insuflador que contienen una mezcla de polvo del compuesto y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

El análogo se puede formular para la administración por vía parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante la inyección de bolos o la infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

Las formulaciones farmacéuticas para su administración por vía parenteral incluyen soluciones acuosas de los análogos en una forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los análogos se pueden preparar como suspensiones de inyección oleosas adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos o ésteres de ácidos grasos sintéticos. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener sustancias que incrementan la viscosidad de la suspensión. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos y permiten la preparación de soluciones sumamente concentradas. Alternativamente, la presente composición puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso.

El análogo de la presente invención también se puede formular en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases para supositorio convencionales. Además de las formulaciones descritas previamente, el análogo también se puede formular como un preparado depot (de acción prolongada). Estas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante el implante (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o mediante una inyección intramuscular. De esta manera, por ejemplo, el compuesto se puede formular con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como una sal moderadamente soluble.

En particular, el análogo de la presente invención se puede administrar por vía oral, bucal o sublingual en forma de comprimidos que contienen excipientes, tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos, ya sea solos o en una mezcla con excipientes, o en forma de elixires o suspensiones que contienen agentes saborizantes o colorantes. Tales preparaciones líquidas se pueden preparar con aditivos farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de suspensión. El análogo también se puede inyectar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intracoronaria. Para la administración parenteral, el análogo se utiliza mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o alcoholes de azúcar, tales como manitol o glucosa, para hacer la solución isotónica con la sangre.

Para el uso veterinario, el análogo de la presente invención o una sal no tóxica del mismo, se administra como una formulación aceptable adecuada, de acuerdo con la práctica veterinaria normal. El veterinario puede determinar fácilmente el régimen de dosificación y la vía de administración que es más apropiada para un animal en particular.

En ciertos aspectos de la presente invención, todos los componentes necesarios para el tratamiento de una enfermedad utilizando análogos de BH4, ya sea solos o en combinación con otro agente, o la intervención utilizada tradicionalmente para el tratamiento de tal enfermedad, se pueden envasar en un kit. Específicamente, la presente invención proporciona un kit para el uso en la intervención terapéutica de la enfermedad que comprende un conjunto envasado de medicamentos que incluyen el análogo de BH4 o un derivado del mismo, así como también soluciones tampón y otros componentes para preparar formas administrables de dichos medicamentos, y/o dispositivos para administrar tales medicamentos y/o cualquier agente que se utilice en una terapia de combinación con medicamentos a base de BH4, y/o instrucciones para el tratamiento de la enfermedad envasadas con los medicamentos. Las instrucciones se pueden fijar en cualquier medio tangible, tal como por ejemplo en papel impreso, o en un medio magnético u óptico legible por ordenador, o instrucciones para la referencia a una fuente de datos de ordenador remoto, tal como una página de la red mundial accesible a través de Internet.

Métodos de tratamiento utilizando el compuesto de la fórmula I

Como se observara anteriormente, un aspecto de la invención incluye composiciones que contienen el análogo de tetrahidrobiopterina. Un aspecto adicional de la invención incluye el compuesto de la Fórmula I para su uso en el tratamiento de un individuo que sufre de una afección que responde a BH4 mediante la administración de cualquiera de las composiciones mencionadas anteriormente. El método incluye administrar al individuo una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la Fórmula I. Las afecciones que responden a BH4 incluyen,

generalmente, aquellas que responden a BH4 o a un derivado del mismo. Las afecciones que responden a BH4 incluyen diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, retinopatía diabética, nefropatía diabética, enfermedad vascular, anemia hemolítica (por ejemplo, asociada con la hemólisis), anemia depreanósitica, trastorno neuropsiquiátrico, trastorno neuropsiquiátrico asociado con la deficiencia de BH4, trastorno neuropsiquiátrico asociado con una función reducida de la tirosina hidroxilasa o una función reducida de triptófano hidroxilasa, un trastorno metabólico tal como síndrome metabólico, hipertensión, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, isquemia límbica crítica, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, disfunción endotelial e hiperfenilalanemia. Estas condiciones se describen en mayor detalle más adelante.

Una "cantidad terapéuticamente efectiva" significa una cantidad efectiva para tratar o prevenir el desarrollo de, o para aliviar los síntomas existentes de, el sujeto que está siendo tratado. La determinación de las cantidades efectivas está dentro de la capacidad de aquellas personas expertas en el arte, especialmente en vista de la descripción detallada proporcionada en el presente documento. Generalmente, una "dosis terapéuticamente efectiva" hace referencia a aquella cantidad del análogo que da como resultado la obtención del efecto deseado. Por ejemplo, en una realización, una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de BH4 tal como se da a conocer en el presente documento, incrementa el grado de vasodilatación en un 50 o un 100% o más en respuesta a señales normales tales como 5 minutos de isquemia en estudios de dilatación mediada por flujo. En otra realización, una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de BH4, tal como se da a conocer en el presente documento, disminuye la presión sanguínea sistólica en 5 mm Hg o 10 mm Hg o, en algunos pacientes, en 15 mm Hg o más. En aún otra realización, una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de BH4, tal como se da a conocer en el presente documento, reduce la disfunción endotelial según se mide por la dilatación mediada por flujo u otros aspectos, tales como la expresión de moléculas de adhesión celular, la generación en exceso de especies de oxidación, o la tendencia a promover la coagulación o trombosis. En aún otra realización, una cantidad terapéuticamente efectiva de un análogo de BH4, tal como se da a conocer en el presente documento, incrementa los niveles de neurotransmisores de L-Dopa o serotonina en al menos un 10% en pacientes que responden a BH4.

La toxicidad y eficacia terapéutica de los análogos se puede determinar por medio de procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar el valor LD50 (la dosis letal para el 50% de la población) y el valor ED50 (la dosis terapéuticamente efectiva en el 50% de la población). La relación de la dosis entre los efectos tóxicos y los terapéuticos es el índice terapéutico, el cual se expresa como la relación entre el valor LD50 y el valor ED50. Se prefieren los compuestos que muestran altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificación para su uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones en circulación que incluyen el valor ED50 con poco o nada de toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

La formulación, vía de administración y dosificación exactas pueden ser seleccionadas por el médico del individuo en vista de la enfermedad en particular que se esté tratando y la condición del paciente. La cantidad de dosificación y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del análogo de BH4, de BH4 o de combinaciones de los mismos, que sean suficientes para mantener los efectos terapéuticos.

La cantidad de análogo administrado puede depender del sujeto que está siendo tratado, de la edad, salud, sexo y peso del sujeto, la clase de tratamiento concurrente (si existe), la gravedad de la afección, la naturaleza del efecto deseado, la manera y frecuencia de tratamiento y el juicio del médico que prescribe el caso. La frecuencia de dosificación también puede depender de los efectos farmacodinámicos sobre las presiones arteriales de oxígeno. Sin embargo, la dosificación más apropiada puede ser adaptada al sujeto individual, según se entienda y pueda ser determinado por una persona de experta en el arte, sin experimentación indebida. Esto implica habitualmente el ajuste de una dosis estándar, por ejemplo, la reducción de la dosis si el paciente tiene un peso corporal bajo.

Aunque las necesidades del individuo varíen, la determinación de los rangos óptimos de cantidades efectivas del análogo está dentro de la experiencia profesional en el arte. Para la administración a un humano en el tratamiento curativo o profiláctico de las afecciones y trastornos identificados en el presente documento, por ejemplo, las dosificaciones típicas de los análogos de la presente invención pueden ser de aproximadamente 0,1 miligramos de fracción activa por kilogramo de peso corporal al día (mg/kg), a aproximadamente 40 mg/kg, por ejemplo al menos 0,2 mg/kg, al menos 0,3 mg/kg, al menos 0,4 mg/kg o al menos 0,5 mg/kg, por ejemplo 30 mg/kg o menos o 20 mg/kg o menos, lo cual puede ser de aproximadamente 2,5 mg/día (0,5 mg/kg x 5 kg) a aproximadamente 2000 mg/día (20 mg/kg x 100 kg), por ejemplo. Tales dosis se pueden administrar en una dosis única, o se puede dividir en múltiples dosis. En las realizaciones a modo de ejemplo, la dosis diaria puede ser 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg, 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 13 mg/kg, 14 mg/kg, 15 mg/kg, 16 mg/kg, 17 mg/kg, 18 mg/kg, 19 mg/kg o 20 mg/kg, o cualquier fracción de las mismas.

Las dosificaciones apropiadas se pueden determinar a través del uso de ensayos establecidos para determinar los niveles de fenilalanina (Phe) en sangre, en conjunto con datos relevantes de la respuesta a la dosis. El régimen de dosificación final será determinado por el médico que atiende el caso, considerando factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la respuesta del

paciente, la edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos. A medida que se realizan los estudios, surgirá información adicional con respecto a los niveles de dosificación apropiados y la duración del tratamiento para enfermedades y condiciones específicas.

5 Se apreciará que las composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento de la invención pueden ser útiles en campos de la medicina en humanos y de la medicina veterinaria. Por tanto, el individuo (o sujeto) a ser tratado puede ser un mamífero, por ejemplo, un humano u otro animal. Para propósitos veterinarios, los sujetos incluyen por ejemplo, animales de granja incluyendo vacas, ovejas, cerdos, caballos y cabras, animales de compañía tales como perros y gatos, animales exóticos y/o de zoológico, animales de laboratorio que incluyen ratones, ratas,
10 conejos, cobayas y hámsteres; y aves de corral tales como pollos, pavos, patos y gansos.

Aunque se contempla la administración diaria y continua, puede ser deseable cesar la terapia cuando mejoran los indicadores clínicos específicos por encima de un determinado nivel umbral. Por supuesto, la terapia puede ser reiniciada en el caso en que se deterioren los indicadores de mejora clínica. En la práctica, el médico determina el régimen de dosificación real más adecuado para un paciente individual y la dosificación varía con la edad, peso y
15 respuesta del paciente en particular. El rango de dosis anterior es un ejemplo de un caso medio, pero puede haber casos individuales en los cuales se necesiten dosificaciones más altas o más bajas, y tales casos se encuentran dentro del alcance de esta invención.

Un análogo de la invención se puede administrar solo o en conjunto con otros agentes terapéuticos dirigidos a la enfermedad o dirigidos a otros síntomas de la misma. El análogo se administra, generalmente, en una mezcla con un soporte farmacéuticamente aceptable seleccionado en relación con la vía de administración deseada y la práctica farmacéutica estándar. Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular, por tanto, de una manera convencional utilizando uno o más soportes fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y sustancias auxiliares que facilitan el procesamiento de los análogos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente.

25 Afecciones que responden a BH4

Tal como se ha revelado anteriormente, las afecciones que responden a BH4 incluyen diabetes de tipo I, diabetes de tipo II, retinopatía diabética, nefropatía diabética, enfermedad vascular, anemia hemolítica, anemia depreanositica, trastorno neuropsiquiátrico, trastorno neuropsiquiátrico asociado con la deficiencia de BH4, trastorno neuropsiquiátrico asociado con una función reducida de la tirosina hidroxilasa o una función reducida de la triptófano hidroxilasa, un trastorno metabólico tal como el Síndrome Metabólico, hipertensión, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, isquemia límbica crítica, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, disfunción endotelial e hiperfenilalanemia.

Entre las afecciones que responden a BH4 se encuentran la diabetes tipo I, diabetes tipo II, retinopatía diabética y nefropatía diabética. La diabetes mellitus y otros estados de enfermedad cardiovasculares se caracterizan por la pérdida de bioactividad del óxido nítrico (NO, por sus siglas en inglés) que da como resultado la alteración del equilibrio entre los vasodilatadores y los vasoconstrictores en el endotelio, y que contribuye a la disfunción endotelial. La disfunción endotelial es la base de la vasoconstricción incrementada que da como resultado la hipertensión, una respuesta de dilatación inadecuada al flujo u otras señales, trombogénesis incrementada y agregación de plaquetas, moléculas de adhesión a la superficie celular incrementadas tales como selectinas, factores de coagulación incrementados y aterosclerosis acelerada debido a la producción en exceso de radicales libres tales como especies de oxígeno reactivo (ROS, por sus siglas en inglés), por ejemplo, moléculas de superóxido. Puesto que el NO juega un papel central en el mantenimiento de la homeostasis vascular, la pérdida de bioactividad de NO contribuye a la patogénesis de enfermedades vasculares y es un marcador del resultado adverso de las enfermedades. Además, la producción de especies oxidantes reactivas en ausencia de una tetrahidrobiopterina adecuada también contribuye a la aterosclerosis acelerada.

La biosíntesis acelerada y el catabolismo de BH4 en las arterias expuestas al estrés oxidativo pueden contribuir a la patogénesis de la disfunción endotelial que se sabe que existe en las arterias de pacientes que sufren de diabetes. Adicionalmente, la glucosa elevada puede evitar un incremento en los niveles celulares de BH4 debido a la supresión de la primera enzima biosintética en la vía para producir la BH4, llamada GTP ciclohidrolasa. La producción de especies oxidantes en exceso mediante la óxido nítrico sintasa endotelial no acoplada conduce a la degradación adicional de tetrahidrobiopterina, y también contribuye a la disponibilidad reducida de niveles de BH4 para la eNOS. La producción de especies oxidantes por parte de la eNOS es aumentada por una deficiencia limitante de BH4 y estas especies oxidantes (por ejemplo, superóxido que conduce a peroxinitrito) destruyen además la BH4, conduciendo a una espiral descendente autónoma. Afortunadamente, en animales y humanos, la complementación experimental de BH4 ha demostrado efectos beneficiosos sobre la función endotelial. Se contempla que los análogos de BH4 revelados en el presente documento pueden demostrar efectos beneficiosos similares, pero en dosis sustancialmente más bajas que con la BH4 nativa. Los estudios de complementación de BH4 en altas concentraciones que utilizan anillos de vasos de animales con diabetes o aterosclerosis y en anillos

de arterias de mamíferos de pacientes con diabetes respaldan la idea de que la BH4 podría mejorar potencialmente la disfunción endotelial, reducir el estrés oxidativo y restaurar la función vascular. Se contempla que los análogos de BH4 revelados en el presente documento pueden mejorar de manera similar la disfunción endotelial y restaurar la función vascular. Algunos ejemplos de los efectos positivos sobre BH4 en sujetos con problemas cardiovasculares y diabéticos incluyen: la administración de BH4 parece aumentar los efectos mediados por NO sobre el flujo sanguíneo de los antebrazos en pacientes con diabetes o hipercolesterolemia, pero no en sujetos normales (Heitzer y colaboradores, *Diabetologia* 43(11):1435-8 (2000)). La BH4 aguda restaura la función vascular en injertos de venas y en arterias en sujetos diabéticos que experimentan la cirugía de injerto de derivación o bypass de la arteria coronaria (Guzik y colaboradores, *Circulation* 105(14):1656-1662 (2002)). La BH4 incrementa la sensibilidad a la insulina en pacientes con diabetes tipo II y enfermedad cardíaca coronaria, en comparación con sujetos de control (Nystrom y colaboradores, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Noviembre de 2004; 287(5):E919-25. Epub (2004)). También se ha mostrado que la complementación de precursores de BH4 en la vía biosintética ayuda en los niveles incrementados de BH4 intracelularmente, y mejora la síntesis de NO in vivo y mejora la función endotelial.

Otra de las afecciones que responden a BH4 es la enfermedad vascular. La enfermedad vascular puede ser una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en la enfermedad vascular periférica, claudicación intermitente, enfermedad arterial coronaria, enfermedad vascular asociada con la hipercolesterolemia, enfermedad vascular asociada con el consumo de tabaco, hipertensión, hipertensión recalcitrante o descontrolada, hipertensión arterial pulmonar, hipertensión pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar en el recién nacido (PPHN), aterosclerosis, apoplejía, espasmo vascular posterior a la apoplejía, infarto de miocardio, lesión por isquemia-reperusión, insuficiencia cardíaca congestiva, lesión por isquemia-reperusión posterior al trasplante, lesión vascular posterior al trasplante, espasmo vascular, trombogénesis, trombosis, espesamiento y coagulación.

Generalmente, el tratamiento de una enfermedad vascular se dirige a mantener la homeostasis, proporcionando una terapia adyuvante y proporcionando una terapia específica para mejorar los criterios de valoración clínicos relevantes. Estos efectos serían mediados a través de la vasodilatación mejorada en respuesta a señales normales, lesión oxidante reducida a los vasos sanguíneos y una reducción general y un potencial cambio repentino de la aterosclerosis u otras condiciones propensas a la obstrucción o trombosis del sistema vascular. Estos criterios clínicos pueden incluir la reducción en la incidencia del infarto de miocardio, de la hospitalización debido a una angina, muerte debida a una enfermedad cardiovascular, una perfusión periférica pobre que causa la pérdida de miembros y úlceras de la piel. La función vascular mejorada puede ser medida utilizando la dilatación mediada por flujo que evalúe la dilatación de la arteria braquial en respuesta a 5 minutos de isquemia, o para la perfusión periférica se puede medir utilizando una prueba en una cinta para caminar graduada para evaluar la capacidad para caminar sin sufrir de dolor en las pantorrillas o la cantidad de tiempo caminando que conduce al dolor. También se puede estudiar a un paciente en una prueba de ejercicio para la aparición de una angina o signos de perfusión o rendimiento cardíaco disminuido. Además, se puede llevar a cabo un ecocardiograma para evaluar la fracción de eyección, volumen minuto cardíaco, función diastólica, tamaño del corazón, velocidad de regurgitación tricúspide y otros signos de enfermedad cardíaca o vascular. Los vasos coronarios pueden ser examinados por medio de una angiografía para evaluar la perfusión del corazón en respuesta a la acetil-colina. La homeostasis habitualmente se mantiene corrigiendo los factores que conducen a una disfunción vascular, incluyendo bajos niveles de BH4 y una producción inadecuada de NO, sin generar radicales libres perjudiciales (por ejemplo, radicales de superóxido que conducen a peroxinitrito). La terapia adyuvante incluye habitualmente la administración de agentes o intervenciones que incrementan la efectividad de la terapia primaria. La terapia específica se dirige a mantener criterios clínicos relevantes normales.

Se contempla que el análogo de BH4 dado a conocer en el presente documento se puede utilizar para tratar a aquella población de pacientes que comprende sujetos con varias formas de enfermedad vascular, que incluyen, pero no están limitadas a, hipertensión recalcitrante o descontrolada, claudicación intermitente, función arterial coronaria, insuficiencia cardíaca, hipertensión arterial pulmonar y anemias hemolíticas que incluyen Enfermedad Depranocítica, en presencia y ausencia de diabetes. El análogo de BH4 dado a conocer en el presente documento se pueden administrar solo o en combinación con cualquier otro agente terapéutico y/o intervención que se utilice comúnmente para el tratamiento de trastornos vasculares. Los agentes utilizados para tratar la diabetes incluyen, pero no están limitados a, agentes que mejoran la sensibilidad a la insulina tales como ligandos de PPAR-gamma (tiazolidindionas, glitazonas, troglitazonas, rosiglitazona (Avandia), pioglitazona), estimuladores de la secreción de la insulina tales como sulfonilureas (gliquidona, tolbutamida, glimeprida, clorpropamida, gliburida, acetohexamida) y meglitinidas (meglitinida, repaglinida, nateglinida) y agentes que reducen la producción de glucosa en el hígado tales como metformina. Los agentes utilizados para tratar una enfermedad vascular incluyen, pero no están limitados a, antagonistas de receptores de endotelina utilizados comúnmente para el tratamiento de la hipertensión y otros trastornos relacionados con la disfunción endotelial, tales como bosentan, darusentan, enrasentán, tezoseptán, atrasentán, ambrisentán, sitaxsentán; relajantes de músculos lisos tales como los inhibidores de PDE5 (de acción indirecta) y minoxidilo (de acción directa); inhibidores de enzimas convertidoras de angiotensina (ACE) tales como captopril, enalapril, lisinopril, fosinopril, perindopril, quinapril, trandolapril, benazepril, ramipril; bloqueantes de receptores de angiotensina II tales como irbesartán, losartán, valsartán, eprosartán, olmesartán, candesartán, telmisartán; beta-bloqueantes tales como atenolol, metoprolol, nadolol, bisoprolol, pindolol, acebutolol, betaxolol, propanolol; diuréticos tales como hidroclorotiazida, furosemida, torasemida,

metolazona; bloqueantes de canales de calcio tales como amlodipina, felodipina, nisoldipina, nifedipina, verapamilo, diltiazem; bloqueantes de alfa-receptores tales como doxazosina, terazosina, alfuzosina, tamsulosina; y alfa-agonistas centrales tales como clonidina. Los agentes utilizados para tratar la hiperlipidemia incluyen, pero no están limitados a, agentes que disminuyen el LDL tales como estatinas (atovastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina de calcio, simvastatina) y ácido nicotínico, agentes que estimulan el PPAR-alfa tales como fibratos, gemfibrozilo, fenofibrato, bezafibrato, ciprofibrato, agentes que se enlazan y previenen la reabsorción de ácidos biliares y reducen los niveles de colesterol tales como los secuestrantes de ácido biliar, colestiramina y colestipol e inhibidores de la absorción de colesterol.

Como se estableciera anteriormente, en el presente documento se dan a conocer métodos para tratar una enfermedad vascular mediante la administración al sujeto de una composición que comprende el análogo de BH4 solo o en combinación con un tratamiento vascular convencional, en donde la administración es eficaz para mejorar los criterios clínicamente relevantes de dicho sujeto en comparación con la concentración en ausencia del análogo de BH4 solo o en combinación con una terapia vascular convencional. Una realización de la invención puede incluir la administración del análogo de BH4 a un individuo con criterios anormales en una cantidad efectiva para normalizar los valores. En una realización, el individuo está diagnosticado con la enfermedad vascular específica. La invención contempla la administración del análogo de BH4 descrito en el presente documento a pacientes diagnosticados con una enfermedad vascular específica caracterizada por síntomas específicos y/o pruebas comunes utilizadas para diagnosticar una enfermedad vascular específica en una cantidad efectiva para mejorar los criterios de valoración hasta niveles normales.

También entre las afecciones que responden a BH4 se encuentran la anemia hemolítica y la anemia depreanocítica. Existen algunos datos que muestran que la disfunción endotelial ocurre en pacientes con anemias hemolíticas y la falta de NO es la base del problema. La deficiencia de BH4 es causada probablemente por la destrucción oxidativa de la acumulación de BH4 o la lesión al endotelio que da como resultado la capacidad disminuida para biosintetizar y mantener los niveles de la acumulación de BH4. Los estudios en animales sugieren que el NO juega un papel compensatorio en la respuesta a la lesión vascular crónica asociada con la enfermedad depreanocítica. Los efectos combinados de la hemoglobina y superóxido del plasma circulante dan como resultado la destrucción de NO (Reiter y colaboradores, *Current Opinions in Hematology* 10:99-107 (2003)). Se han considerado nuevas aproximaciones terapéuticas que incrementan la biodisponibilidad de NO o contrarrestan el estrés oxidativo y la proliferación incontrolada de radicales libres asociados con la enfermedad depreanocítica. La co-administración de arginina con hidroxiurea puede aumentar la producción de NO y mejorar el uso de arginina en pacientes con SCD en estado estable. Véase Morris y colaboradores (2003) *J. Pediatric Hematology* 25:629-34. Además de hidroxiurea y arginina, se han considerado otras terapias tales como NO inhalado para incrementar los niveles de NO, alopurinol para reducir la destrucción de NO, y estatinas y sildenafil para amplificar la respuesta de NO. Véase Mack y colaboradores, (2005, in press) *Intl. J. Biochem. Cell Biol.* La publicación de solicitud de Patente Norteamericana No. 2003/0078231 describe el uso de los derivados de sulfo-adenosilmetionina ortomolecular como un suplemento nutricional o alimenticio con propiedades antioxidantes para tratar diversas enfermedades que son el resultado del estrés oxidativo y la proliferación incontrolada de radicales libres, incluyendo la anemia depreanocítica. La Publicación de Solicitud de Patente Norteamericana No. 2005/0239807 A1 describe el uso de un inhibidor de una enzima generadora de oxígeno reactivo que incluye un grupo que proporciona una bioactividad donadora de NO (por ejemplo alopurinol) para tratar enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, tales como la anemia depreanocítica.

En la enfermedad depreanocítica, el NO reduce la expresión endotelial de moléculas de adhesión y la adhesión subsecuente de glóbulos rojos y leucocitos, previniendo de este modo el desarrollo de una crisis vaso-oclusiva. Véase Space y colaboradores (2000) *Am. J. Hematology* 63:200-04. Se mostró que La NADPH oxidasa asociada con células es una fuente de superóxido. Véase Wood y colaboradores (2005) *FASEB J.* 19:989-91. La generación rápida de radicales de superóxido asociados con la Enfermedad Depreanocítica puede desencadenar la producción de oxígeno reactivo secundario y metabolitos de nitrógeno tales como OH y ONOO, los cuales se sabe que oxidan la BH4, causando de este modo una deficiencia en BH4. En un estudio, la administración de sepiapterina, un precursor de BH4, a ratones transgénicos con enfermedad falciforme (β^s) fue asociada con una atenuación de la adhesión de células sanguíneas. Véase Wood y colaboradores (2006) *J. Free Radical Biology & Medicine* 40:1443-53. Aunque compatible con la presente invención, los autores indican específicamente que la sepiapterina carece de las propiedades anti- y auto-oxidantes de la BH4 exógena, el uso de la cual está contemplado en la presente invención. Además, los modelos de ratones transgénicos con enfermedad falciforme no pueden reflejar de manera precisa los mecanismos homeostáticos complejos que controlan los niveles de NOS, NO y BH4 observados en humanos. Véase Reiter y colaboradores (2003) *Current Opinion in Hematology* 10:99-107. Se contempla que los análogos de BH4 dados a conocer en el presente documento se pueden utilizar de forma similar a la BH4 para tratar afecciones como anemia hemolítica y enfermedad falciforme.

Las afecciones que responden a BH4 también incluyen un trastorno neuropsiquiátrico, trastorno neuropsiquiátrico asociado con deficiencia de BH4 y trastorno neuropsiquiátrico asociado con la función reducida de tirosina hidroxilasa o función reducida de triptófano hidroxilasa. En una realización, el trastorno neuropsiquiátrico es un trastorno seleccionado del grupo que consiste en la Enfermedad de Parkinson, trastorno de hiperactividad con

déficit de atención, enfermedad bipolar, autismo, depresión y distonía.

5 Generalmente, los trastornos de muchos trastornos neuropsiquiátricos están relacionados con los niveles disminuidos o inadecuados de neurotransmisores. En la depresión, los niveles inadecuados de serotonina pueden ser la causa que está debajo de la depresión, y por lo tanto el uso de inhibidores de recaptación de serotonina para incrementar los niveles de serotonina en las terminaciones nerviosas. La BH4 es un cofactor requerido para la biosíntesis de serotonina y en estados deficientes, la adición de BH4 puede estimular la producción de serotonina tal como se observa en algunos trabajos que estudian los niveles de serotonina en las plaquetas de pacientes con PKU. También se ha observado que los pacientes esquizofrénicos pueden tener bajos niveles de catecolamina y bajos niveles de bipterina, y por lo tanto la adición de BH4 puede mejorar la producción de los neurotransmisores de catecolamina debido a la función de BH4 en la biosíntesis en la hidroxilación de tirosina en la vía para las catecolaminas. Además, algunas investigaciones han sugerido que la BH4 puede unirse a receptores en las terminaciones nerviosas que alteran la liberación de neurotransmisores, lo cual puede ser todavía otra función para la BH4 en el control de la neurotransmisión. La BH4 también ha sido propuesta como un tratamiento para ADD/ADHD o para síndromes de hiperactividad en niños. En estos pacientes, el uso de estimulantes ayuda a suprimir los niveles incrementados de actividad y permiten una mejor concentración. La BH4 puede incrementar o mejorar la producción o liberación de neurotransmisores estimulantes y de esta manera incrementar la supresión del comportamiento hiperactivo. Se contempla que los análogos de BH4 dados a conocer en el presente documento se pueden utilizar de forma similar a la BH4 para tratar un trastorno neuropsiquiátrico, un trastorno neuropsiquiátrico asociado con la deficiencia de BH4 y un trastorno neuropsiquiátrico asociado con una función reducida de tirosina hidroxilasa o una función reducida de triptófano hidroxilasa.

Se contempla que una cantidad terapéuticamente efectiva del análogo (por ejemplo, profármacos) de BH4 dado a conocer en el presente documento incrementaría la función de tirosina hidroxilasa o la función de triptófano hidroxilasa.

25 Otra de las afecciones que responden a BH4 es el síndrome metabólico. Generalmente, los pacientes con síndrome metabólico demuestran presión sanguínea incrementada, resistencia a la insulina, hiperlipidemia, índice de masa corporal incrementado y aterosclerosis incrementada. La etiología subyacente exacta del síndrome metabólico es sumamente debatida, pero es claro que las dietas con alto contenido de grasa/alto contenido de carbohidratos y el ejercicio reducido conducen a la obesidad. Los niveles de BH4 pueden ser bajos en esta condición y pueden ser parte de la causa y de la progresión de este síndrome. En el modelo de rata alimentado con fructosa que conduce a la resistencia a la insulina, los niveles de BH4 son bajos y el reemplazo de BH4 mejora los efectos vasculares del estado resistente a la insulina. Se contempla que los análogos de BH4 dados a conocer en el presente documento se pueden utilizar de manera similar a la BH4 para tratar el síndrome metabólico.

35 También entre las afecciones que responden a BH4 se encuentra la hiperfenilalanemia. En una realización, la hiperfenilalanemia se selecciona del grupo que consiste en fenilcetonuria suave, fenilcetonuria clásica y fenilcetonuria grave (PKU), y también la hiperfenilalanemia atípica o maligna asociada con la deficiencia genética en la biosíntesis o el reciclaje de BH4, hiperfenilalanemia asociada con un trastorno hepático e hiperfenilalanemia asociada con la malaria.

40 Generalmente, la PKU es causada por un defecto en el gen o expresión o actividad de la enzima fenilalanina hidroxilasa, que conduce a altos niveles en la sangre de fenilalanina. Estos altos niveles dan como resultado daño cerebral y otras enfermedades neurológicas y físicas que incluyen convulsiones, salpullidos, mala concentración, función ejecutiva disminuida y anomalías de la materia blanca en el cerebro. Los altos niveles de fenilalanina son controlados usualmente a través de una dieta médica severa que restringe la ingesta de fenilalanina. La BH4 ha sido utilizada en numerosos casos publicados y series de informes para reducir los niveles de Phe en la sangre después de la ingestión oral (Blau y colaboradores 2002). Los pacientes con PKU han sido tratados con éxito durante más de 5 años y han logrado reducciones clínicamente significativas en el nivel de Phe que permiten que los pacientes reduzcan su dependencia a la dieta médica restrictiva. En la deficiencia de BH4, la administración de BH4 puede reducir en gran medida los niveles de fenilalanina en la sangre y puede mejorar los niveles de neurotransmisores en el fluido cerebroespinal. Sin embargo, el tratamiento adecuado de la enfermedad cerebral es difícil debido a la pobre penetración del CNS por parte de la BH4. Se contempla que los análogos de BH4 dados a conocer en el presente documento se pueden utilizar de manera similar a la BH4 para tratar la hiperfenilalanemia.

55 La presente invención describe una intervención farmacéutica de trastornos vasculares que se basa en la administración de un análogo de BH4. Se contempla además que un análogo, en una forma estabilizada o en otra forma, se puede utilizar para tratar la población de pacientes que comprende sujetos con varias formas de enfermedad vascular en presencia o ausencia de diabetes, que incluyen, pero no están limitadas a, hipertensión, hipertensión recalcitrante o incontrolada, hipertensión arterial pulmonar, hipertensión pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar en el recién nacido (PPHN), y anemias hemolíticas que incluyen Enfermedad Depranocítica, enfermedad arterial coronaria, aterosclerosis de cualquier arteria, incluyendo arterias coronarias, carótidas, cerebrales o vasculares periféricas, apoplejía, espasmo vascular posterior a la apoplejía, infarto de miocardio, lesión por isquemia-reperusión, insuficiencia cardíaca congestiva, lesión por isquemia-reperusión posterior al

trasplante, lesión vascular posterior al trasplante, espasmo vascular, trombogénesis, trombosis, espesamiento, coagulación, endotelio dañado, flujo insuficiente de oxígeno a órganos y tejidos, resistencia vascular sistémica elevada (alta presión sanguínea), proliferación vascular del músculo liso, progreso de estenosis vascular (estrechamiento) e inflamación, lesión por isquemia-reperfusión, hipertensión, diabetes, vasculopatía diabética, enfermedad cardiovascular, enfermedad vascular periférica, claudicación intermitente, enfermedad vascular asociada con la hipercolesterolemia, enfermedad vascular asociada con el consumo de tabaco o condiciones neurodegenerativas que se originan a partir de la isquemia y/o inflamación vascular.

De esta manera, el tratamiento de cualquiera de estas condiciones está contemplado de acuerdo con los métodos de la invención. Tales composiciones a base de BH4 se pueden administrar solas o en combinación con cualquier otro agente terapéutico y/o intervención que se utilice comúnmente para el tratamiento de síntomas clínicos relevantes o trastornos subyacentes, que incluyen diabetes, enfermedad vascular, hipertensión e hiperlipidemia, incluyendo los agentes terapéuticos conocidos que se describen en el presente documento.

Ciertas realizaciones de la presente invención se dirigen al tratamiento de la disfunción vascular mediante la administración al sujeto de una composición que comprende un análogo de BH4 o un precursor o derivado del mismo solo o en combinaciones con un tratamiento vascular convencional, en donde la administración del análogo solo o en combinación con la terapia vascular convencional es efectiva para mejorar los criterios clínicamente relevantes del sujeto en comparación con dicha concentración en ausencia del análogo solo o en combinación con la terapia vascular convencional

En las realizaciones a modo de ejemplo, el análogo de BH4 o un precursor o derivado se administra en una cantidad que es efectiva para disminuir la presión sanguínea en aproximadamente 5 mm Hg de media en pacientes que responden a BH4, o incrementa los niveles de NO en suero o en orina en aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20% o 30% o hasta aproximadamente un 200% de media en pacientes que responden a BH4.

También se ha sugerido que la mejora de la actividad de óxido nítrico sintasa también da como resultado una reducción de los niveles elevados de superóxido, la sensibilidad incrementada a la insulina y la reducción en la disfunción vascular asociada con la resistencia a la insulina, tal como se describe en la Patente Norteamericana No. 6.410.535. De esta manera, el tratamiento de la diabetes (tipo I o tipo II), hiperinsulinemia o resistencia a la insulina está contemplado de acuerdo con la invención. Las enfermedades que tienen una disfunción vascular asociada con la resistencia a la insulina incluyen aquellas causadas por la resistencia a la insulina o agravadas por la resistencia a la insulina, o aquellas para las cuales la cura se ve retrasada por la resistencia a la insulina, tales como hipertensión, hiperlipidemia, arteriosclerosis, angina vasoconstrictiva coronaria, angina de esfuerzo, lesión constrictiva cerebrovascular, insuficiencia cerebrovascular, espasmo vascular cerebral, trastorno de circulación periférica, arterioestenosis coronaria después de la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA, por sus siglas en inglés) o injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG, por sus siglas en inglés), obesidad, diabetes no dependiente de la insulina, hiperinsulinemia, anormalidad de metabolismo de lípidos, enfermedades cardíacas arterioscleróticas coronarias o similares, en tanto que estén asociadas con la resistencia a la insulina. Se contempla que cuando se administra a pacientes con esas enfermedades, la BH4 puede prevenir o tratar estas enfermedades activando las funciones de NOS, incrementando la producción de NO y suprimiendo la producción de especies de oxígeno activo para mejorar trastornos de células endoteliales vasculares. También se contempla que se pueden reducir las complicaciones posteriores de la diabetes, por ejemplo retinopatía o nefropatía.

La sobreproducción de NO mediante nNOS ha sido implicada en apoplejías, migrañas, cefaleas, enfermedad de Alzheimer y con la tolerancia a y dependencia de la morfina. Los derivados de BH4 se pueden administrar para cualquiera de estas condiciones. Otros trastornos neuropsiquiátricos a modo de ejemplo para los cuales se pueden administrar los derivados de BH4 incluyen la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno psicótico breve, trastorno delirante, trastorno psicótico compartido, trastorno psicótico debido a una afección médica general, trastorno psicótico inducido por sustancias, otros trastornos psicóticos, discinesia tardía, enfermedad de Machado-Joseph, degeneración espinocerebelar, ataxia cerebelar, distonía, síndrome de fatiga crónica, depresión aguda o crónica, síndrome de tensión crónica, fibromialgia, migraña, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, trastorno bipolar y autismo. El trastorno neuropsiquiátrico puede estar asociado con la función reducida de tirosina hidroxilasa o la función reducida de triptófano hidroxilasa. Los trastornos neuropsiquiátricos en el presente documento excluyen opcionalmente la enfermedad de Parkinson, depresión y enfermedad de Alzheimer.

Los derivados de BH4 pueden ser co-administrados de acuerdo con el método de la invención con uno o más agentes activos neuropsiquiátricos diferentes, que incluyen antidepresivos, precursores de neurotransmisores tales como triptófano, tirosina, serotonina, agentes que activan los sistemas noradrenérgicos, tales como lofepramina, desipramina, reboxetina, tirosina, agentes que actúan preferentemente sobre la serotonina, inhibidores combinados de la captación de tanto noradrenalina como de serotonina, tales como venlafaxina, duloxetina o milnacipran, y fármacos que son inhibidores combinados de la recaptación tanto de la dopamina como de la noradrenalina, tal como bupropión.

En realizaciones a modo de ejemplo, la cantidad administrada de BH4 o de un precursor o un derivado incrementa la función de tirosina hidroxilasa o la función de triptófano hidroxilasa en al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40%, 50, 75 o 100%, o incrementa los niveles de neurotransmisores de L-Dopa o serotonina en al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40%, 50, 75 o 100% en pacientes que responden a BH4.

- 5 Los trastornos metabólicos a modo de ejemplo incluyen hiperfenilalanemia, por ejemplo fenilcetonuria suave, fenilcetonuria clásica, fenilcetonuria grave, fenilcetonuria atípica o maligna asociada con la deficiencia de BH4, hiperfenilalanemia asociada con un trastorno del hígado e hiperfenilalanemia asociada con la malaria. Las poblaciones de pacientes a modo de ejemplo incluyen bebés, niños, adolescentes, adultos, mujeres en edad de maternidad y mujeres embarazadas. El individuo puede tener una concentración de fenilalanina en el plasma mayor que 1000 μM en ausencia de un tratamiento con (por ejemplo, pre-tratamiento) el análogo o precursor o derivado y la administración del compuesto es en una cantidad que es efectiva para disminuir la concentración de fenilalanina en el plasma en el individuo hasta menos de aproximadamente 1000 μM , o menos de aproximadamente 800 μM , o menos de aproximadamente 700 μM , o menos de aproximadamente 600 μM , o menos de aproximadamente 500 μM o menos de aproximadamente 450 $\mu\text{M} \pm 15 \mu\text{M}$.

15 Ejemplos

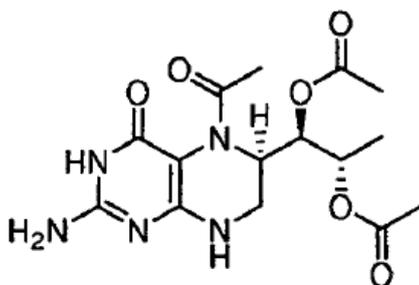
Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención, pero no tienen la intención de limitar el alcance de la misma.

Síntesis de análogos de BH4

Ejemplo de referencia 1 - Didodecanoato de BH4

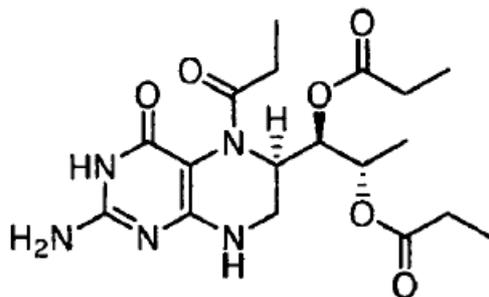
- 20 Este ejemplo describe la síntesis de un análogo de BH4. La BH4 se disuelve en un disolvente adecuado y se hace reaccionar con un exceso molar de cloruro de ácido dodecanoico en presencia de imidazol. La reacción se agita a temperatura ambiente durante toda la noche y el análogo de BH4 de diácido resultante se aísla y se recristaliza.

Ejemplo de referencia 2 - Éster 2-acetoxi-1-(5-acetil-2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-propílico de ácido acético ($\text{Ac}_3\text{-BH}_4$)



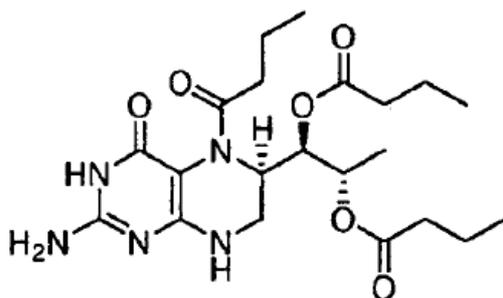
- 25 El diclorhidrato de 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (0,1 g, 0,32 mmol) se mezcló espesamente en ácido acético (3 ml). El anhídrido acético (300 μl , 3,2 mmol) se agregó y la mezcla se calentó a reflujo durante 12 horas. La reacción se concentró y el material crudo se purificó mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el producto final como un sólido de color blanco (0,096 g, 82%). RMN- ^1H (CD_3OD) δ 5.15 (dd, J = 2.4 Hz, J = 10 Hz, 1H), 4.95-4.90 (m, 1H), 3.36 (d, J = 13.6 Hz, 1H), 3.22 (dd, J = 4.4 Hz, J = 13.2 Hz, 1H), 2.16 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.85 (s, 3H), 1.26 (d, J = 6.4 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 368 (M+H).

Ejemplo de referencia 3 - Éster 1-(2-amino-4-oxo-5-propionil-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-propioniloxi-propílico de ácido propiónico ($\text{Pr}_3\text{-BH}_4$)



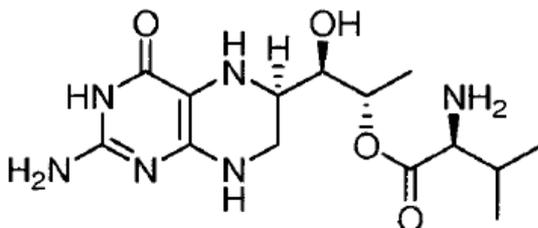
El compuesto del título se preparó mediante el método descrito en el ejemplo 2 utilizando el diclorhidrato de 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (0,2 g, 0,64 mmol), anhídrido propiónico (0,83 ml, 6,4 mmol) y ácido propiónico (6 ml) para proporcionar el producto como un sólido de color blanco (0,20 g, 75%).
 5 RMN-¹H (DMSO-d₆) δ 10.11 (s, 1H), 6.99 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 6.23 (s, 2H), 4.96 (dd, J = 2.5 Hz, J = 10.1 Hz, 1H), 4.84-4.78 (m, 1H), 4.70 (dd, J = 4.1 Hz, J = 10.1 Hz, 1H), 3.15 (dd, J = 5.3 Hz, J = 13 Hz, 1H), 3.03 (dd, J = 4.5 Hz, J = 13 Hz, 1H), 2.67-2.57 (m, 1H), 2.40-2.35 (m, 2H), 2.27-2.20 (m, 1H), 2.15-2.03 (m, 2H), 1.17 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 1.05 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 0.92 (dt, J = 1.8 Hz, J = 7.5 Hz, 6H). MS: ESI (positivo): 410 (M+H).

Ejemplo de referencia 4 - Éster 1-(2-amino-5-butiril-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-butiriloxi-propílico de ácido butírico (Bu₃-BH4)



El compuesto del título se preparó por medio del método descrito en el ejemplo 2 utilizando el diclorhidrato de 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (0,2 g, 0,64 mmol), anhídrido butírico (1,05 ml, 6,4 mmol) y ácido butírico (6 ml) para proporcionar el producto como un sólido de color blanco (0,21 g, 71%).
 15 RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.18 (dd, J = 2.4 Hz, J = 10 Hz, 1H), 4.98-4.93 (m, 1H), 4.89-4.87 (m, 1H), 3.34 (s, 1H), 3.19 (dd, J = 4.4 Hz, J = 13.2 Hz, 1H), 2.62-2.54 (m, 1H), 2.45-2.39 (m, 1H), 2.36 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.10 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.70-1.47 (m, 6H), 1.27 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.98 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.90-0.85 (m, 6H). MS: ESI (positivo): 452 (M+H).

Ejemplo 5 - Diclorhidrato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido 2-amino-4-metil-pentanoico (Val-BH4)



a.) Éster terc-butílico del ácido 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

A una suspensión agitada del diclorhidrato de 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (BH4, 5 g, 15,9 mmol) en piridina (75 ml) bajo un atmósfera de nitrógeno se agregó dicarbonato de di-terc-butilo (5,2

g, 23,8 mmol). La mezcla se agitó antes de la adición de más BH4 (5 g, 15,9 mmol) y bicarbonato de di-terc-butilo (5,2 g, 23,8 mmol). También se agregó 4-(dimetilamino)piridina (catalítica) y la mezcla se agitó bajo una atmósfera de nitrógeno durante 12 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó in vacuo y el residuo se colocó bajo alto vacío durante 24 horas. El residuo se disolvió en metanol (150 ml) y a la solución se agregó 30 g de carbonato-MP (Biotage, 3,14 mmol/g). La mezcla se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla se filtró a través de celite y el producto filtrado se evaporó in vacuo para proporcionar un sólido de color amarillo que se utilizó sin purificación adicional. MS: ESI (positivo): 342 (M+H).

b.) Éster terc-butílico del ácido 6-(1,2-dihidroxi-propil)-2-(dimetilamino-metilenamino)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

El producto del paso a) se disolvió en 75 ml de DMF y se trató con dietil-acetal de N,N-dimetilformamida (13 mL, 76,2 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se evaporó bajo alto vacío (temperatura <50°C). El residuo se purificó mediante la cromatografía con evaporación instantánea de gel de sílice (gradiente de elución de 0 a 20% de metanol en DCM) para proporcionar el producto como un sólido de color amarillo claro (5,7 g, rendimiento del 45% durante dos pasos). RMN-¹H (CD₃OD) δ 8.53 (s, 1H), 4.12 (dd, J = 4.2 Hz, J = 10.5 Hz, 1H), 3.90 (m, 1H), 3.77 (d, J = 12.6 Hz, 1H), 3.42 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 3.26-3.18 (m, 1H), 3.15 (s, 3H), 3.07 (s, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.20 (d, J = 6.3 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 397 (M+H).

c.) Éster terc-butílico del ácido 6-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butiriloxi)-1-hidroxi-propil]-2-(dimetilamino-metilenamino)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

A una solución agitada de N-Boc-L-Valina (19,12 g, 88 mmol) en diclorometano (DCM, 40 ml) a 0°C se agregó una solución de DCC (9,1 g, 44 mmol) en DCM (40 ml). La solución resultante se agitó durante 1 hora después de lo cual se formó un producto precipitado de color blanco. El sólido de color blanco se filtró y el producto filtrado se agregó a una solución agitada del producto del paso b) (4,4 g, 11 mmol) disuelto en piridina (200 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 12 horas. La mezcla de reacción se enfrió rápidamente mediante la adición de metanol (20 ml). El disolvente se evaporó in vacuo y el residuo se purificó mediante la cromatografía de gel de sílice con evaporación instantánea (gradiente de elución de 0 a 6% de metanol en DCM) para proporcionar el producto del subtítulo como un sólido de color amarillo claro (3,1 g, rendimiento del 47%, de una mezcla regioisomérica ~9:1 mediante la HPLC). RMN-¹H (DMSO-d₆) δ 10.61 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.04 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 5.03 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.77 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 4.04-3.92 (m, 1H), 3.82-3.72 (m, 1H), 3.66-3.54 (m, 1H), 3.09 (s, 3H), 2.96 (s, 3H), 2.06-1.80 (m, 1H), 1.37 (s, 18 H), 1.20 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.92-0.82 (m, 1H), 0.77 (d, J = 6.6 Hz, 6H). MS: ESI (positivo): 596 (M+H).

d.) Éster terc-butílico del ácido 2-amino-6-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butiriloxi)-1-hidroxi-propil]-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

El producto del paso c) (3,1 g, 5,15 mmol) se disolvió en acetonitrilo (ACN, 130 ml) y se trató con HCl 1N (13 ml, 13 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que ya no estaba presente ningún material de partida (~18 h). La mezcla de reacción se neutralizó mediante la adición de una solución saturada de bicarbonato de sodio. El disolvente entonces se evaporó in vacuo (temperatura <40°C) para proporcionar un sólido de color amarillo claro. El sólido se mezcló espesamente en DCM (50 ml) y se filtró. El producto filtrado se evaporó y el residuo se purificó mediante la cromatografía de gel de sílice con evaporación instantánea (gradiente de elución de 0 a 10% de metanol en DCM) para proporcionar el producto del subtítulo (1,75 g, 63%, mezcla regioisomérica ~9:1). RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.10-4.98 (m, 1H), 4.20-4.10 (m, 1H), 4.02-3.90 (m, 1H), 3.72 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.59 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.20 (dd, J = 4.5 Hz, J = 12.9 Hz, 1H), 2.16-1.96 (m, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.30 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.84 (d, J = 6.9 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 541 (M+H).

e.) Diclorhidrato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido 2-amino-3-metil-butírico

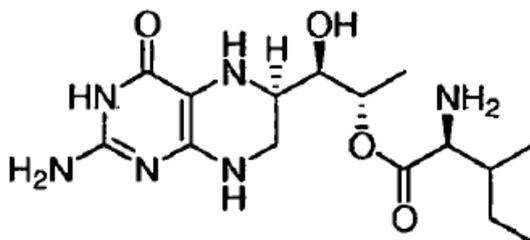
El producto del paso d) (1,75 g, 3,24 mmol) se disolvió en dioxano (10 ml) y se trató con HCl 4N/dioxano (80 ml, 320 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. El producto se aisló mediante filtración y se secó en un horno al vacío purgado con nitrógeno a 45°C para proporcionar 1,34 g (100%) del compuesto del título como un sólido de color blanco. RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.11 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.22 (dd, J = 2.4 Hz, J = 6.9 Hz, 1H), 4.02 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 3.73 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.61-3.57 (m, 2H), 2.4-2.3 (m, 1H), 1.43 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.12-1.05 (dd, J = 7.0 Hz, J = 12 Hz, 6H). MS: ESI (positivo): 341 (M+H).

f.) Diclorhidrato de éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido 2-amino-3-metil-butírico

Como una alternativa para el método e), el producto del paso c) (0,5 g, 0,8 mmol) se disolvió en dioxano (5 mL) y se

trató con HCl 4N/dioxano (20 mL, 80 mmol) bajo una atmósfera de argón. Después de la agitación a temperatura ambiente durante 15 horas, se formó un sólido de color blanco. Este material se aisló y luego se secó para proporcionar 0,24 g (73%) del compuesto del título.

Ejemplo de referencia 6 - Éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido 2-amino-3-metil-pentanoico (Ile-BH4)



a.) Éster terc-butílico del ácido 6-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-pentanoiloxi)-1-hidroxi-propil]-2-(dimetilamino-metilenamino)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

10 El producto del Ejemplo 5, paso b) se trató mediante el mismo método que el descrito en el Ejemplo 5, paso c) excepto que se utilizó N-Boc-L-Isoleucina (3,70 g, 16 mmol) para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color amarillo claro (0,29 g, 48%). El producto obtenido después de la cromatografía aún contenía impurezas y se utilizó para el siguiente paso sin purificación adicional. MS: ESI (positivo): 610 (M+H).

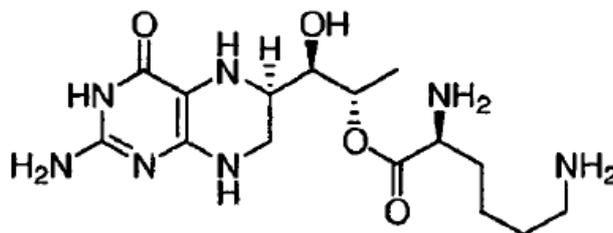
15 b.) Éster terc-butílico del ácido 2-amino-6-[2-(2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-pentanoiloxi)-1-hidroxi-propil]-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

20 El producto del paso a) (0,29 g, 0,48 mmol) se trató mediante el método descrito en el Ejemplo 5, paso d) excepto que el residuo de la reacción se purificó mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color blanquecino (0,10 g, 38%). RMN-¹H (DMSO-d₆) δ 9.83 (s, 1H), 7.04 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 5.05 (s amplio, 1H), 4.74 (d, J=6.0 Hz, 1H), 4.04-3.90 (m, 1H), 3.88-3.78 (m, 1H), 3.56 (dd, J=4.8 Hz y J=12.3 Hz, 1H), 3.48-3.30 (m, 1H), 3.00 (dd, J=4.2 Hz y J=12.3 Hz, 1H), 1.78-1.60 (m, 1H), 1.37 (s, 18H), 1.18 (d, J=6.3 Hz, 3H), 1.16-1.00 (m, 2H) 0.77 (d, J=5.4 Hz, 3H), 0.75 (d, J=5.1 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 555 (M+H).

c.) Ditrifluoroacetato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido 2-amino-3-metil-pentanoico

25 El producto del paso b) (0,1 g, 0,18 mmol) se trató con ácido trifluoroacético (2 ml, 27 mmol) en 2 ml de DCM. La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 1 hora. El producto se precipitó mediante la adición de 20 ml de éter dietílico. El producto se filtró y se secó en un horno al vacío purgado con nitrógeno para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco (0,10 g, 100%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.11 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.09-4.07 (m, 1H), 4.05 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 3.60-3.54 (m, 2H), 3.43-3.38 (m, 1H), 2.07-2.00 (m, 1H), 1.51-1.44 (m, 1H), 1.42 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.37-1.29 (m, 1H), 1.06 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 355 (M+H).

Ejemplo de referencia 7 - Tri-clorhidrato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido 2,6-diamino-hexanoico (Lys-BH4)



a.) Éster terc-butílico del ácido 6-[2-(2,6-bis-terc-butoxicarbonilamino-hexanoiloxi)-1-hidroxi-propil]-2-(dimetilamino-metilenamino)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

5 El producto del Ejemplo 5, paso b) se trató por medio del mismo método que el descrito en el Ejemplo 5, paso d) excepto que se utilizó N-Boc-L-Lisina-N-Boc (8,26 g, 23,8 mmol) y después de la evaporación del disolvente in vacuo, el material crudo se disolvió en acetato de etilo y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 1N (2x), bicarbonato de sodio saturado (2x) y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de sodio y el disolvente se evaporó in vacuo. El producto crudo se purificó mediante la cromatografía de gel de sílice con evaporación instantánea (gradiente de elución de 0 a 8% de metanol en DCM) para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color amarillo claro (2,55 g, 74%). El producto obtenido después de la cromatografía aún contenía impurezas y se utilizó para el siguiente paso sin purificación adicional. RMN-1H (CD₃OD) δ 8.53 (s, 1H), 5.08-4.96 (m, 1H), 4.24-4.12 (m, 1H), 4.10-3.90 (m, 1H), 3.76 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.59 (d, J = 11.4 Hz, 1H), 3.28-3.18 (m, 1H), 3.15 (s, 3H), 3.08 (s, 3H), 3.06-2.94 (m, 2H), 1.56-1.36 (m, 33H), 1.31 (d, J = 6.6 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 725 (M+H).

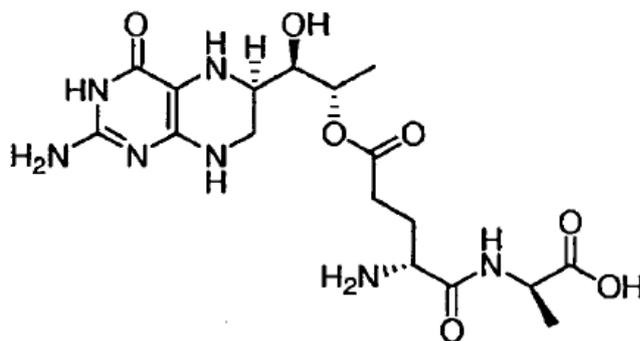
15 b.) Éster terc-butílico del ácido 2-amino-6-[2-(2,6-bis-terc-butoxicarbonilamino-hexanoiloxi)-1-hidroxi-propil]-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

El producto del paso a) (2,55 g, 3,52 mmol) se trató por medio del método descrito en el Ejemplo 5, paso d) excepto que el residuo de la reacción se purificó mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color blanquecino (1,30 g, 55%). La HPLC analítica indica la presencia de dos regioisómeros en una relación de 8:2. RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.08-4.96 (m, 1H), 4.22-4.10 (m, 1H), 4.10-3.96 (m, 1H), 3.72 (d, J = 12.9 Hz, 1H), 3.61 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 3.28-3.16 (m, 1H), 3.08-2.94 (m, 2H), 1.86-1.36 (m, 33H), 1.30 (d, J = 6.6 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 670 (M+H).

c.) Tri-clorhidrato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido 2,6-diamino-hexanoico

25 El producto del paso b) (1,30 g, 1,94 mmol) se trató mediante el método descrito en el Ejemplo 5, paso e) para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco (0,93 g, 100%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.09-5.04 (m, 1H), 4.24 (dd, J = 2.7 Hz, J = 7.2 Hz, 1H), 4.17 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 4.00 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 3.74-3.56 (m, 3H), 2.96 (t, J = 7.7 Hz, 3H), 2.03-1.93 (m, 3H), 1.76-1.68 (m, 3H), 1.61-1.51 (m, 3H), 1.47 (d, J = 6.3 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 370 (M+H).

30 **Ejemplo de referencia 8 – Diclorhidrato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido 4-amino-4-(1-carboxi-etilcarbamoil)-butírico**



a.) Éster terc-butílico del ácido 6-[2-[4-terc-butoxicarbonilamino-4-(1-terc-butoxicarbonil-etilcarbamoil)-butiriloxi]-1-hidroxi-propil]-2-(dimetilamino-metilenamino)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

35 A una solución agitada del producto del Ejemplo 19, paso b) (0,45 g, 1,20 mmol) en piridina (10 ml) se agregó EDC (0,23 g, 1,20 mmol) y DMAP (0,15 g, 1,20 mmol). La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno seguido por la adición del producto del Ejemplo 4, paso c) (0,12 g, 0,30 mmol). La mezcla se agitó durante 48 horas adicionales. El disolvente se evaporó in vacuo y el residuo se purificó mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del subtítulo como un semi-sólido de color amarillo claro (0,12 g, 55%). El producto obtenido después de la cromatografía aún contenía impurezas y se utilizó para el siguiente paso sin purificación adicional. La HPLC analítica indica una relación regioisomérica de 10:1. MS: ESI

(positivo): 753 (M+H).

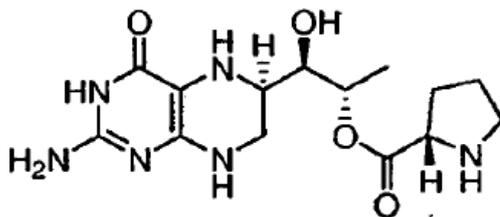
b.) Éster terc-butílico del ácido 2-amino-6-{2-[4-terc-butoxicarbonilamino-4-(1-terc-butoxicarbonil-etilcarbamoil)-butiriloxil]-1-hidroxi-propil}-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

5 El producto del paso a) (0,12 g, 0,16 mmol) se trató mediante el método descrito en el Ejemplo 5, paso d) excepto que el residuo de la reacción se purificó mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color blanquecino (0,048 g, 44%). RMN-¹H (CDCl₃) δ 9.89 (s, 1H), 5.71 (d amplio, J = 6.0 Hz, 2H), 5.08-4.90 (m, 1H), 4.88-4.68 (m, 1H), 4.66-4.54 (m, 1H), 4.32-4.10 (m, 1H), 4.08-3.96 (m, 1H), 3.88-3.70 (m, 2H), 3.36-3.26 (m, 1H), 2.40-1.76 (m, 6H), 1.74-1.58 (m, 1H), 1.56-1.36 (m, 27H), 1.31 (d, J = 6.6 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 698 (M+H).

10 c.) Diclorhidrato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido 4-amino-4-(1-carboxi-etilcarbamoil)-butírico

15 El producto del paso b) (0,048 g, 0,07 mmol) se trató con ácido trifluoroacético (1 ml, 27 mmol) en 1 ml de DCM. La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 2 horas. El producto se precipitó mediante la adición de 20 ml de éter dietílico. El producto se filtró y se secó en un horno al vacío purgado con nitrógeno para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco (0,051 g, 98%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 4.45-4.39 (m, 2H), 4.23-4.20 (m, 2H), 3.94 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 2.60-2.55 (m, 2H), 2.49-2.24 (m, 2H), 2.17-2.12 (m, 3H), 1.45 (dd, J = 7.4 Hz, J = 9.7 Hz, 6H). MS: ESI (positivo): 442 (M+H).

Ejemplo de referencia 9 – Diclorhidrato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido pirrolidin-2-carboxílico (Pro-BH4)



20 a.) Éster 1-terc-butílico del éster 2-{2-[5-terc-butoxicarbonil-2-(dimetilamino-metilenamino)-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il]-2-hidroxi-1-metil-etílico} del ácido pirrolidin-1,2-dicarboxílico

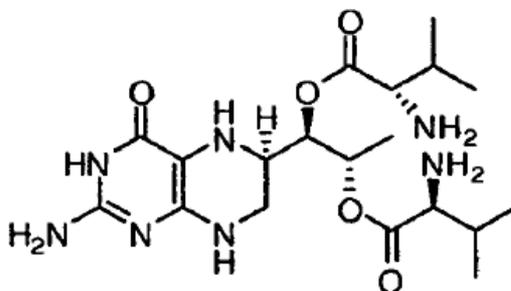
25 El producto del Ejemplo 5, paso b) se trató por medio del mismo método que el descrito en el Ejemplo 5, paso c) excepto que se utilizó N-Boc-L-Prolina (13,6 g, 63,1 mmol) para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color marrón (5,2 g, 69%). MS: ESI (positivo): 594 (M+H).

b.) Éster 1-terc-butílico del éster 2-[2-(2-amino-5-terc-butoxicarbonil-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico] del ácido pirrolidin-1,2-dicarboxílico

30 El producto del paso a) (5,2 g, 8,76 mmol) se trató por medio del mismo método que el descrito en el Ejemplo 5, paso d) excepto que la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas antes de que el residuo de la reacción se purificara mediante la cromatografía de gel de sílice con evaporación instantánea (gradiente de elución de 0 a 14% de metanol en DCM) seguido por la separación de la mezcla regioisomérica mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color amarillo pálido (1,5 g, 32%). MS: ESI (positivo): 539 (M+H). El otro regioisómero se obtuvo como un sólido de color blanco (0.6 g, 13%). MS: ESI (positivo): 539 (M+H).

35 c.) Diclorhidrato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-hidroxi-1-metil-etílico del ácido pirrolidin-2-carboxílico

40 El producto del paso b) se trató por medio del mismo método que el descrito en el Ejemplo 5, paso e) excepto que la reacción se agitó durante 24 horas para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido (1,2 g, 90%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.10 (m, 1H), 4.48 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.17 (dd, J = 2.2 Hz, J = 7.2 Hz, 1H), 3.73-3.66 (m, 1H), 3.57-3.55 (m, 2H), 3.44-3.36 (m, 3H), 2.51-2.43 (m, 1H), 2.18-2.05 (m, 3H), 1.43 (d, J = 6.4 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 339 (M+H).

Ejemplo de referencia 10 – Triclorhidrato del éster 2-(2-amino-3-metil-butiriloxi)-1-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-propílico del ácido 2-amino-3-metil-butírico (Val₂-BH4)5 a.) Éster terc-butílico del ácido 6-[1,2-bis-(2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butiriloxi)-propil]-2-(dimetilamino-metilenamino)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

A una solución agitada de N-Boc-L-Valina (9,08 g, 41,8 mmol) en diclorometano (DCM, 20 ml) a 0°C se agregó una solución de DCC (4,3 g, 20,9 g mmol) en DCM (20 ml). La solución resultante se agitó durante 1 hora después de lo cual se formó un producto precipitado color blanco. El sólido de color blanco se filtró y el producto filtrado se agregó a una solución agitada del producto del Ejemplo 5, paso b) (1,8 g, 4,54 mmol) disuelto en piridina (75 ml). La 4-(dimetilamino)piridina (catalítica) se agregó y la mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón durante 12 horas. La mezcla de reacción se enfrió rápidamente mediante la adición de metanol (20 ml) y el disolvente se evaporó in vacuo. El material crudo se disolvió en acetato de etilo y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 1N (2x), bicarbonato de sodio saturado (2x) y salmuera. La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio y el disolvente se evaporó *in vacuo*. El producto crudo se purificó mediante la cromatografía de gel de sílice con evaporación instantánea (gradiente de elución de 0 a 5% en peso de metanol en DCM) para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color amarillo (1.6 g, 45%). MS: ESI (positivo): 795 (M+H).

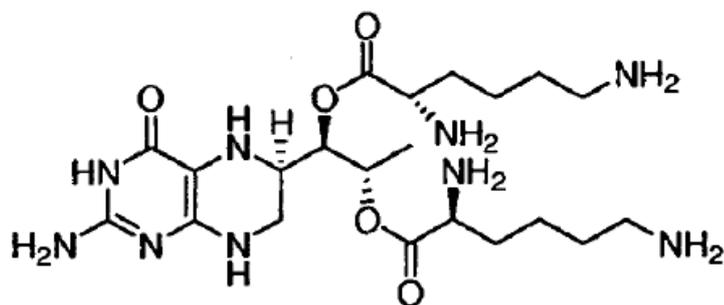
10 b.) Éster terc-butílico del ácido 2-amino-6-[1,2-bis-(2-terc-butoxicarbonilamino-3-metil-butiriloxi)-propil]-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

El producto del paso a) (1,6 g, 2,02 mmol) se disolvió en acetonitrilo (ACN, 50 ml) y se trató con HCl 1N (5 ml, 5 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente hasta que no estuvo presente ningún material de partida (~20 h). La mezcla de reacción se neutralizó mediante la adición de una solución saturada de bicarbonato de sodio. El disolvente se evaporó in vacuo (temperatura <40°C) para proporcionar un sólido de color marrón. El sólido se mezcló espesamente en metanol y se filtró. El producto filtrado se evaporó y el residuo se purificó mediante la cromatografía de gel de sílice con evaporación instantánea (gradiente de elución de 0 a 12% de metanol en DCM) para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color marrón (0,45 g, 30%). RMN-¹H (DMSO-d₆) δ 9.92 (s, 1H), 7.34 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 4.92 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.17 (s amplio, 1H), 3.84-3.72 (m, 2H), 3.25 (s amplio, 1H), 2.97 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 2.07-1.92 (m, 2H), 1.41-1.28 (m, 29H), 0.94 (d, J = 6.6 Hz, 6H), 0.75 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.71 (d, J = 6.9 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 740 (M+H).

25 c.) Diclorhidrato del éster 2-(2-amino-3-metil-butiriloxi)-1-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-propílico del ácido 2-amino-3-metil-butírico

El producto del paso c) (1,0 g, 1,35 mmol) se disolvió en dioxano (10 ml) bajo una atmósfera de argón y se trató con HCl 4 N/dioxano (20 ml, 80 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El producto se aisló mediante la filtración y se secó en un horno al vacío purgado con nitrógeno a 45°C para proporcionar 0,78 g (100%) del compuesto del título como un sólido de color marrón. RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.50-5.41 (m, 2H), 4.10 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 4.00 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 3.66 (s, 2H), 3.61-3.55 (m, 1H), 3.46-3.40 (m, 1H), 2.42-2.32 (m, 2H), 1.47 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.47 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.09 (d, J = 6.9 Hz, 6H), 1.05 (d, J = 6.9 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 440 (M+H).

30 Ejemplo de referencia 11 – Pentaclorhidrato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-(2,6-diamino-hexanoiloxi)-1-metil-etílico del ácido 2,6-diamino-hexanoico (Lys₂-BH4)



a.) Éster terc-butílico del ácido 6-[1,2-bis-(2,6-bis-terc-butoxicarbonilamino-hexanoiloxi)-propil]-2-(dimetilamino-metilenamino)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

- 5 El producto del Ejemplo 5, paso b) se trató por medio del mismo método que el descrito en el Ejemplo 10, paso a) excepto que se utilizó N-Boc-L-Lisina-N-Boc (28,9 g, 83,5 mmol) para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color amarillo pálido (3,2 g, 33%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 8.56 (s, 1H), 7.19 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 5.13-5.05 (m, 2H), 4.40 (m, 1H), 4.08 (m, 1H), 3.94 (m, 2H), 3.43 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 3.17 (s, 3H), 3.09 (s, 3H), 3.05-2.95 (m, 4H), 1.82-1.70 (m, 3H), 1.47-1.39 (m, 48H), 1.26 (m, 2H). MS: ESI (positivo): 1054 (M+H).

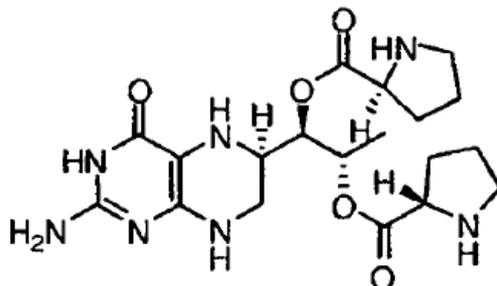
10 b.) Éster terc-butílico del ácido 2-amino-6-[1,2-bis-(2,6-bis-terc-butoxicarbonilamino-hexanoiloxi)-propil]-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carboxílico

- 15 El producto del paso a) (3,2 g, 3,03 mmol) se trató por medio del mismo método descrito en el Ejemplo 10, paso b) para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color marrón (1,46 g, 48%). RMN-¹H (DMSO-d₆) δ 9.92 (s, 1H), 7.36 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.77-6.73 (m, 3H), 6.04 (s, 2H), 4.91 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.14 (s amplio, 1H), 3.87 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 3.72 (s amplio, 1H), 3.19 (s amplio, 1H), 2.97-2.85 (m, 6H), 1.62 (s amplio, 2H), 1.40-1.22 (m, 58H). MS: ESI (positivo): 999 (M+H).

c.) Pentaclorhidrato del éster 2-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-(2,6-diamino-hexanoiloxi)-1-metil-etílico del ácido 2,6-diamino-hexanoico

- 20 El producto del paso b) (1,46 g, 1,46 mmol) se trató por medio del método descrito en el Ejemplo 10, paso c) para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color marrón (0,99 g, 68%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.52-5.48 (m, 1H), 5.42-5.39 (m, 1H), 4.32 (t, J = 6.2 Hz, 1H), 4.14 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 3.65 (s, 1H), 3.57-3.50 (m, 1H), 3.25-3.22 (m, 1H), 2.98 (t, J = 7.8 Hz, 4H), 2.16-1.89 (m, 4H), 1.79-1.71 (m, 4H), 1.61-1.56 (m, 4H), 1.45 (d, J = 6.6 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 498 (M+H).

25 **Ejemplo de referencia 12 – Triclorhidrato de éster 1-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-(pirrolidin-2-carboniloxi)-propílico del ácido pirrolidin-2-carboxílico (Pro₂-BH4)**



- 30 a.) Éster 1-terc-butílico del éster 2-[2-(amino-5-terc-butoxicarbonil-2-(dimetilamino-metilenamino)-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-1-metil-2-(1-terc-butoxicarbonil-pirrolidin-2-carboniloxi)-etílico] del ácido pirrolidin-1,2-dicarboxílico

El producto del Ejemplo 5, paso b) se trató por medio del mismo método que el descrito en el Ejemplo 10, paso a) excepto que se utilizó N-Boc-L-Prolina (12,6 g, 5,87 mmol) para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color amarillo pálido (3,0 g, 60%). MS: ESI (positivo): 791 (M+H).

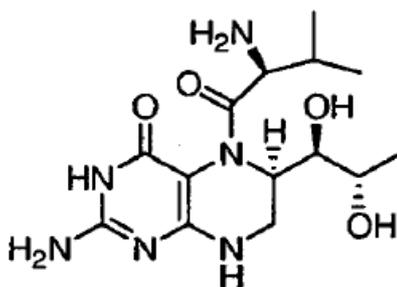
5 b.) Éster 1-terc-butílico del éster 2-[2-(2-amino-5-terc-butoxicarbonil-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-1-metil-2-(1-terc-butoxicarbonil-pirrolidin-2-carboniloxi)-etil] del ácido pirrolidin-1,2-dicarboxílico

El producto del paso a) (3 g, 3,79 mmol) se trató por medio del método descrito en el Ejemplo 10, paso b) para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color marrón (1,4 g, 50%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.19-5.14 (m, 2H), 4.31 (dd, J = 4.4 Hz, J = 8.1 Hz, 2H), 4.09-4.06 (m, 1H), 3.49-3.44 (m, 3H), 3.34 (m, 1H), 3.14 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 2.08-1.96 (m, 4H), 1.89-1.80 (m, 4H), 1.48 (s, 27H), 1.42 (m, 3H). MS: ESI (positivo): 736 (M+H).

10 c.) Triclorhidrato del éster 1-(2-amino-4-oxo-3,4,5,6,7,8-hexahidro-pteridin-6-il)-2-(pirrolidin-2-carboniloxi)-propílico del ácido pirrolidin-2-carboxílico

El producto del paso b) (1,4 g, mmol) se trató por medio del método descrito en el Ejemplo 10, paso c) para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color marrón oscuro (0,85 g, 82%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 5.53-5.46 (m, 2H), 4.62 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 4.47 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 3.82-3.79 (m, 1H), 3.65-3.59 (m, 1H), 3.54-3.32 (m, 5H), 2.53-2.44 (m, 2H), 2.31-2.25 (m, 1H), 2.18-2.07 (m, 5H), 1.47 (d, J = 6.6 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 436 (M+H).

Ejemplo de referencia 13 – Clorhidrato de 2-amino-5-(2-amino-3-metil-butiril)-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (N-Val-BH4)



20

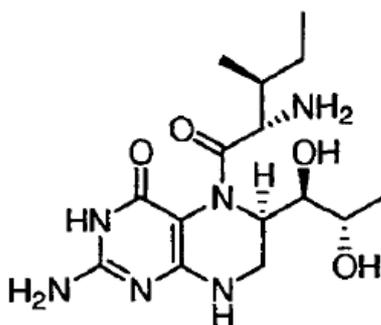
a.) Éster terc-butílico del ácido {1-[2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carbonil]-2-metil-propil}-carbámico

A una solución agitada de N-Boc-L-Valina (4,56 g, 21 mmol) en DCM (15 ml) a 0°C se agregó una solución de DCC (2,17 g, 10,5 mmol) en DCM (10 ml). La solución resultante se agitó durante 1 hora después de lo cual se formó un producto precipitado color blanco. El sólido de color blanco se filtró y el producto filtrado se agregó a una solución agitada de clorhidrato de 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (3,0 g, 9,55 mmol) disuelto en piridina (80 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 1,5 horas. La mezcla de reacción se enfrió rápidamente mediante la adición de metanol (20 ml). El disolvente se evaporó in vacuo y el residuo se purificó mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el producto del subtítulo como un sólido de color marrón (3,2 g, 76%). MS: ESI (positivo): 441 (M+H).

b.) Clorhidrato de 2-amino-5-(2-amino-3-metil-butiril)-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona

El producto del paso a) (3,13 g, 7,04 mmol) se disolvió en dioxano (10 ml) y se trató con HCl 4 N/dioxano (60 ml, 240 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante 4 horas. El producto se aisló mediante la filtración, se recristalizó de isopropanol y se secó en un horno al vacío a 45°C para proporcionar 1,15 g (43%) del compuesto del título como un sólido de color marrón. RMN-¹H (CD₃OD) δ 4.64 (dd, J = 4.2 Hz, J = 10.2 Hz, 1H), 3.99 (d, J = 6.9 Hz, 1H), 3.92 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 3.71 (m, 1H), 3.45 (dd, J = 2.4 Hz, J = 10 Hz, 1H), 3.27 (m, 1H), 2.17-2.10 (m, 1H), 1.20 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.95 (dd, J = 4.8 Hz, J = 6.9 Hz, 6H). MS: ESI (positivo): 341 (M+H).

40 **Ejemplo de referencia 14 – Clorhidrato de 2-amino-5-(2-amino-3-metil-pentanoil)-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (N-Ile-BH4)**



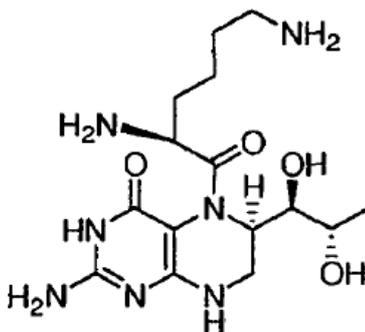
a.) Éster terc-butílico del ácido {1-[2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carbonil]-2-metil-butil}-carbámico

- 5 El compuesto del subtítulo se preparó por medio del método descrito en el Ejemplo 13, paso a) excepto que se utilizó N-Boc-L-Isoleucina (4,86 g, 21 mmol). El material crudo se disolvió en metanol y se purificó mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color marrón (3,48 g, 82%). MS: ESI (positivo): 455 (M+H).

b.) Clorhidrato de 2-amino-5-(2-amino-3-metil-pentanoil)-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona

- 10 El producto del paso a) se trató por medio del método descrito en el Ejemplo 13, paso b) para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color amarillo pálido (1,67 g, 56%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 4.65 (dd, J = 4.2 Hz, J = 10.2 Hz, 1H), 4.04 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 3.94 (d, J = 12.6 Hz, 1H), 3.70 (m, 1H), 3.45 (dd, J = 2.4 Hz, J = 10 Hz, 1H), 3.27 (m, 1H), 1.91-1.85 (m, 1H), 1.47-1.40 (m, 1H), 1.21 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 1.17-1.11 (m, 1H), 0.93-0.87 (m, 6H). MS: ESI (positivo): 355 (M+H).

- 15 **Ejemplo de referencia 15 – Diclorhidrato de 2-amino-5-(2,6-diamino-hexanoil)-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (N-Lys-BH4)**



- 20 a.) Éster terc-butílico del ácido {6-[2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-il]-5-terc-butoxicarbonilamino-6-oxo-hexil}-carbámico

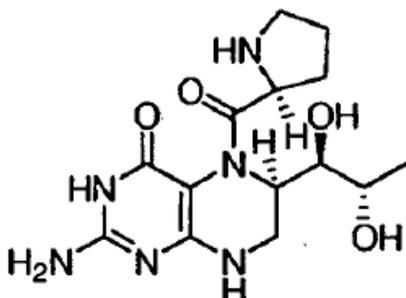
El compuesto del subtítulo se preparó por medio del método descrito en el Ejemplo 13, paso a) excepto que se utilizó N-Boc-L-Lisina-N-Boc (7,28 g, 21 mmol). El material crudo se disolvió en metanol y se purificó mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color marrón (2,16 g, 40%). MS: ESI (positivo): 570 (M₂H)

- 25 b.) Clorhidrato de 2-amino-5-(2,6-diamino-hexanoil)-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona

El producto del paso a) se trató por medio del método descrito en el Ejemplo 13, paso b) excepto que no fue necesaria la recristalización para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco (1,1 g, 48%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 4.64 (dd, J = 4.2 Hz, J = 10.2 Hz, 1H), 4.26 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 3.94 (d, J = 13 Hz, 1H), 3.72-3.66

(m, 1H), 3.46 (dd, J = 2.6 Hz, J = 10.2 Hz, 1H), 2.90 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.86-1.75 (m, 2H), 1.67-1.59 (m, 2H), 1.40-1.33 (m, 2H), 1.20 (d, J = 6.6 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 370 (M+H).

Ejemplo de referencia 16 – Diclorhidrato de 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5-(pirrolidin-2-carbonil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (N-Pro-BH4)



5

a.) Éster terc-butílico del ácido 2-[2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-carbonil]-pirrolidin-1-carboxílico

El compuesto del subtítulo se preparó por medio del método descrito en el Ejemplo 13, paso a) excepto que se utilizó N-Boc-L-Prolina (4,5 g, 21 mmol). El material crudo se disolvió en metanol y se agitó con MP-carbonato (Biotage, 3,14 g/mmol) antes de la purificación mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el producto como un sólido de color blanco (2 g, 48%). RMN-¹H (DMSO-d₆) δ 9.87 (s, 1H), 7.00 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 6.26 (s, 2H), 4.87 (dd, J = 3.3 Hz, J = 8.7 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 4.31 (dd, J = 4.5 Hz, J = 10.2 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 3.62 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.52 (dd, J = 5.7 Hz, J = 12.3 Hz, 1H), 3.26-3.16 (m, 3H), 2.95 (dd, J = 4.8 Hz, J = 10 Hz, 1H), 1.89-1.82 (m, 1H), 1.65-1.54 (m, 2H), 1.35 (s, 10H), 0.97 (d, J = 6.3 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 439 (M+H).

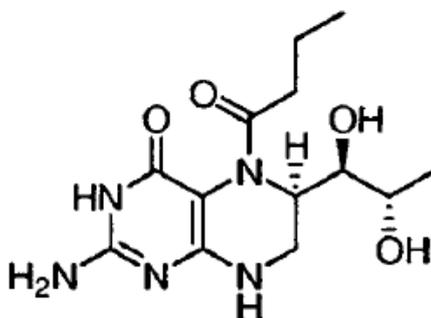
15

b.) Diclorhidrato de 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5-(pirrolidin-2-carbonil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona

El producto del paso a) se trató por medio del método descrito en el Ejemplo 13, paso b) excepto que no fue necesaria la recristalización para proporcionar el compuesto del título como un sólido de color blanco (1,63 g, 69%). RMN-¹H (D₂O) δ 4.73 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 4.58 (dd, J = 4.0 Hz, J = 10.2 Hz, 1H), 3.79 (d, J = 13 Hz, 1H), 3.73 (dd, J = 2.5 Hz, J = 6.4 Hz, 1H), 3.54 (dd, J = 2.5 Hz, J = 10.2 Hz, 1H), 3.43-3.35 (m, 3H), 2.33-2.24 (m, 1H), 2.03-1.96 (m, 2H), 1.83-1.75 (m, 1H), 1.17 (d, J = 6.5 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 339 (M+H).

20

Ejemplo de referencia 17 - 2-Amino-5-butilil-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (N-Bu-BH4)



25

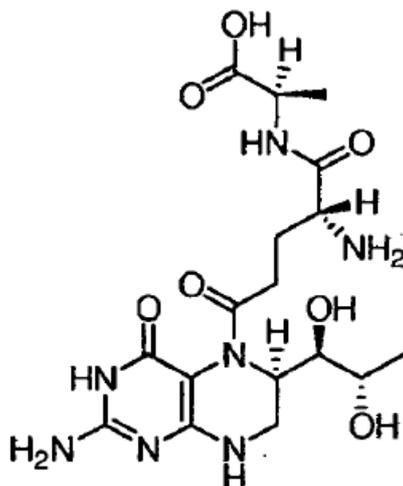
2-Amino-5-butilil-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona

El compuesto del título se preparó por medio del método descrito en el Ejemplo 5 utilizando diclorhidrato de 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (0,5 g, 1,59 mmol), anhídrido butírico (0,31 ml, 1,91 mmol), piridina (7,5 ml) y 4-(dimetilamino)piridina catalítica para proporcionar el producto como un sólido de color amarillo (0,27 g, 55%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 4.62 (dd, J = 4.0 Hz, J = 10.4 Hz, 1H), 3.78 (m, 1H), 3.74 (d, J =

30

12.4 Hz, 1H), 3.44 (dd, J = 2.4 Hz, J = 10.4 Hz, 1H), 3.18 (dd, J = 4.8 Hz, J = 12.8 Hz, 1H), 2.56-2.49 (m, 1H), 1.42-1.34 (m, 1H), 1.63-1.52 (m, 2H), 1.15 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 312 (M+H).

Ejemplo de referencia 18 – Trifluoroacetato del ácido 2-{2-amino-5-[2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-il]-5-oxo-pentanoilamino}-propiónico



5

a.) Ácido 2-{5-[2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-il]-2-terc-butoxicarbonilamino-5-oxo-pentanoilamino}-propiónico

A una suspensión agitada del diclorhidrato de 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-4-ona (0,55 g, 1,76 mmol) y el producto del Ejemplo 19, paso b) (0,66 g, 1,76 mmol) en DMF se agregó el hidrato de HOBt (0,24 g, 1,76 mmol), EDC (0,51 g, 2,64 mmol) y DIPEA (1,1 ml, 6,17 mmol). La mezcla se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. El disolvente se evaporó in vacuo y el residuo crudo se purificó mediante la RP-HPLC preparativa para aislar el compuesto del subtítulo como un sólido de color blanco (0,145 g, 14%). RMN-¹H (DMSO-d₆) δ 9.92 (s, 1H), 7.99 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.77 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.23 (s amplio, 2H), 4.61 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.36 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 4.11-4.06 (m, 2H), 3.81 (m, 1H), 3.50 (m, 2H), 3.21 (m, 1H), 2.98 (m, 1H), 2.65 (m, 2H), 2.22 (m, 1H), 1.82 (m, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.36 (s, 18H), 1.22 (d, J = 6.3 Hz, 3H), 0.95 (d, J = 6.3 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 598 (M+H).

10

15

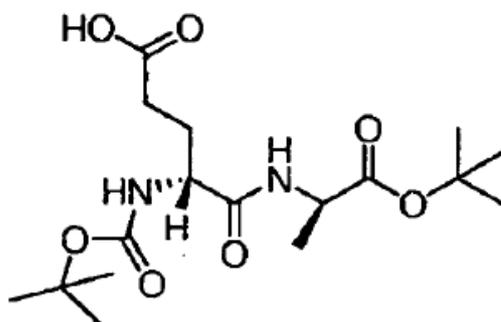
b.) Acido 2-{2-amino-5-[2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridin-5-il]-5-oxo-pentanoilamino}-propiónico

El producto del paso a) se disolvió en TFA:DCM 1:1 y se agitó a temperatura ambiente durante 1,5 horas. El disolvente se retiró in vacuo y el residuo se disolvió en una pequeña cantidad de etanol. El acetato de etilo se agregó a la solución hasta que el sólido comenzó a precipitarse. La solución se almacenó en el congelador durante 14 horas y se filtró para aislar el compuesto del título como un sólido de color blanco (60 mg, 56%). RMN-¹H (CD₃OD) δ 4.61 (dd, J = 4.2 Hz, J = 10.2 Hz, 1H), 4.39 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 3.84 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 3.77-3.71 (m, 2H), 3.45 (dd, J = 2.4 Hz, J = 10.2 Hz, 1H), 3.25 (dd, J = 4.2 Hz, J = 12.6 Hz, 1H), 3.01-2.93 (m, 1H), 2.68-2.59 (m, 1H), 2.18-2.09 (m, 2H), 1.43 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.16 (d, J = 6.3 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 442 (M+H).

20

25

Ejemplo de referencia 19 – Acido 4-terc-butoxicarbonilamino-4-(1-terc-butoxicarbonil-etilcarbamoil)-butírico



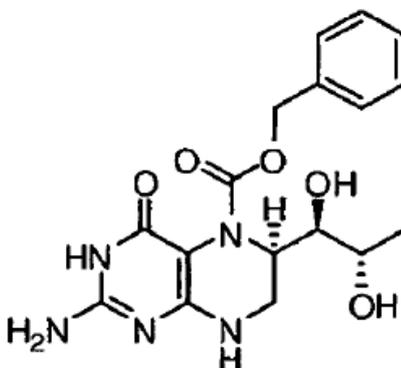
a.) Éster 9H-fluoren-9-ilmetílico del ácido 4-terc-butoxicarbonilamino-4-(1-terc-butoxicarbonil-etilcarbamoil)-butírico

5 A una solución agitada de Boc-D-Glu(OFm) (2,5 g, 5,88 mmol) e hidrato de HOBt (0,79 g, 5,88 mmol) en DMF (50 ml) se agregó DIPEA (1,1 ml, 6,46 mmol), H-Ala-OtBu HCl (1,07 g, 5,88 mmol) y EDC (1,69 g, 8,81 mmol). La mezcla se agitó durante 16 horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera de argón. El disolvente se evaporó *in vacuo* y el residuo crudo se disolvió en acetato de etilo, se lavó sucesivamente con bicarbonato de sodio saturado (3x) y ácido acético acuoso al 5% (3x). La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio y el disolvente se evaporó *in vacuo*. El producto crudo se purificó mediante la cromatografía de gel de sílice con evaporación instantánea (gradiente de elución de 0-40% de acetato de etilo en hexanos) para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color blanco (2,3 g, 71%). RMN-¹H (CDCl₃) δ 7.77 (d, J = 7.5 Hz, 2H), 7.60 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 7.41 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 7.30 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 6.69 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.46-4.37 (m, 3H), 4.22 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.62-2.54 (m, 2H), 2.18-2.14 (m, 1H), 1.96-1.91 (m, 1H), 1.45 (d, J = 7.5 Hz, 18H), 1.38 (d, J = 7.2 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 553 (M+H).

15 b.) Acido 4-terc-butoxicarbonilamino-4-(1-terc-butoxicarbonil-etilcarbamoil)-butírico

El producto del paso a) (2,3 g, 4,16 mmol) se disolvió en DCM (17 ml) y se trató con TEA (2,9 ml, 20,8 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La mezcla se diluyó con DCM y se lavó con HCl 1M (2x). La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio y el disolvente se retiró *in vacuo*. El producto crudo se mezcló espesamente con éter y se filtró para aislar el compuesto del título como un sólido de color blanco (0,72 g, 46%). RMN-¹H (CDCl₃) δ 6.95 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 5.40 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 4.42 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 4.30 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 2.52 (m, 2H), 2.12 (m, 1H), 1.93 (m, 1H), 1.45 (d, J = 9.2 Hz, 18H), 1.38 (d, J = 7.2 Hz, 3H). MS: ESI (positivo): 397 (M+Na).

Ejemplo de referencia 20 – Éster bencílico del ácido 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridín-5-carboxílico



25 El diclorhidrato de 2-amino-6-(1,2-dihidroxi-propil)-5,6,7,8-tetrahidro-1H-pteridín-4-ona (1,63 g, 5,2 mmol) se disolvió en 50 ml de piridina bajo una atmósfera de nitrógeno. A esta solución se agregó cloroformiato de bencilo (1,93 ml, 13,5 mmol). La mezcla de reacción se desgasificó bajo vacío y se colocó bajo una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se agitó durante 12 horas a temperatura ambiente. El disolvente se evaporó *in vacuo* y el residuo se purificó mediante la RP-HPLC preparativa para proporcionar el compuesto del subtítulo como un sólido de color blanco (0,93 g, rendimiento del 48%). RMN-¹H (DMSO-d₆) δ 10.02 (s, 1H), 7.41-7.30 (m, 5H), 6.84 (s, 1H), 6.12 (s, 2H),

5.10-4.99 (m, 2H), 3.93 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 3.66 (dd, J = 2.4 Hz, J = 6.3 Hz, 1H), 3.56 (dd, J = 4.8 Hz, J = 12 Hz, 1H), 3.25 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 3.03 (dd, J = 4.5 Hz, J = 12.4 Hz, 1H), 1.26 (d, J = 6.3 Hz, 1H). MS: ESI (positivo): 376 (M+H).

Estudios de estabilidad en el plasma de humanos, ratas y en el fluido gástrico simulado

5 La estabilidad de diversos compuestos dados a conocer en el presente documento se sometió a prueba en humanos y ratas y en fluido gástrico simulado. Cada compuesto se sometió a prueba durante un período de una hora para la concentración del compuesto que permanecía en cada punto de tiempo. Los resultados se muestran en la Figura 3 (estabilidad en el plasma humano), 4 (estabilidad en el plasma de rata) y 5 (estabilidad en el fluido gástrico simulado) para los compuestos de los Ejemplo 2, 3, 4 y 20. Como se observa en las Figuras 3-5, cada uno de los compuestos sometidos a prueba mostró un alto nivel de estabilidad bajo las diversas condiciones.

Estudio metabólico de análogos de BH4

Este ejemplo describe un ensayo para la estabilidad metabólica y permite la comparación de la estabilidad de un análogo de BH4 contra la de BH4.

15 Los compuestos de prueba (10 μ M) se incuban con microsomas de hígado de ratón, rata y humano (concentración de proteínas de 0,5 mg/mL) y NADPH 1 mM en tampón de fosfato a 37°C. Los experimentos se llevan a cabo por triplicado. Las incubaciones se inician mediante la adición de los microsomas y se enfrían rápidamente mediante la adición de un volumen igual de metanol. Las muestras se toman en dos a tres puntos de tiempo (habitualmente en el tiempo cero, a los 30 minutos, a los 60 minutos) para el análisis. Se realizan las incubaciones de control positivas y negativas, apropiadas. La cuantificación de la desaparición del compuesto de prueba o % de rotación del artículo de prueba se determina utilizando LC-MS/MS.

Solubilidad de análogos de BH4

25 Este ejemplo describe un ensayo para la solubilidad y permite la comparación de la solubilidad de un análogo de BH4 contra la de BH4. Los artículos de prueba se disuelven en DMSO y se diluyen en serie en una solución tampón salina con fosfato a un pH 7,4 (PBS) en una placa de 96 pocillos. Los compuestos diluidos tienen un rango de concentración final de 1 a 1000 mg/mL y contienen \leq 1% de DMSO. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, la precipitación se mide detectando la dispersión de luz en un nefelómetro de Lab Systems. La solubilidad se determina al comparar las NU (unidades de nefelómetro) de cuatro réplicas de una concentración de muestra con las NU de los pocillos testigos de disolvente. La insolubilidad se define como la concentración en la cual las NU corregidas con el testigo son significativamente mayores que un testigo de disolvente. Una diferencia de 30 1% calculada por la Prueba T de Student se considera que es significativa.

Permeabilidad de Análogos de BH4

35 Este ejemplo describe la pantalla de permeabilidad utilizando monocapas de células Caco-2 y permite la comparación de la permeabilidad de un análogo de BH4 contra aquella de BH4. Los cultivos de monocapas de células Caco-2, que son adecuados para la investigación de la permeabilidad de compuestos, se desarrollan en insertos de membrana de policarbonato ya sea de 24 pocillos o de 96 pocillos durante 21 a 30 días. Las monocapas se mantienen a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en una humedad relativa de 95% hasta la confluencia. La madurez y la integridad de la membrana de las monocapas se confirman por medio de la medición de la resistencia eléctrica trans-epitelial (TEER, por sus siglas en inglés) o la permeabilidad aparente del compuesto marcador fluorescente amarillo Lucifer.

40 Las permeabilidades aparentes de una serie de compuestos de prueba y de marcador seleccionables se determinan por duplicado en una concentración individual de 10 mM en la dirección apical a basolateral. Las investigaciones de transporte se inician mediante la adición del compuesto de prueba al compartimiento apical y las placas se mantienen bajo condiciones de cultivo durante el curso del experimento. Los compartimientos basolaterales después de 30 y 60 minutos de exposición y los compartimientos apicales finales se recolectan y se analizan por el contenido de compuesto de prueba mediante LC-MS/MS. La recuperación y permeabilidad aparente de cada compuesto de prueba se calculan a partir de estos datos. Los controles apropiados se incluyen para caracterizar las monocapas. El experimento de transporte del lado basolateral al lado apical también se realizará en presencia y ausencia de un inhibidor de P-gp tal como verapamilo.

Biodisponibilidad de Análogos de BH4

50 Este ejemplo describe un estudio del perfil de biodisponibilidad/farmacocinética realizado con un análogo de BH4 y BH4. El propósito de los estudios farmacocinéticos es proporcionar información sobre la exposición sistémica de un fármaco y cualquier metabolito. Estos datos se pueden utilizar para explicar las cuestiones farmacológicas o

toxicológicas y también pueden ayudar en el diseño de estudios toxicocinéticos. Los parámetros farmacocinéticos, tales como AUC, vida media, eliminación y volumen de distribución, también se determinan.

5 El propósito del estudio es evaluar la disponibilidad oral potencial de los compuestos de análogos, calcular los parámetros farmacocinéticos por medio de la aproximación estadística y comparar estos valores con aquellos obtenidos con la BH4 no alterada. Un método analítico, simple sin extracción de GLP y de LC-MS/MS se desarrolla para el análisis del plasma. La fórmula y la información estructural de los compuestos de prueba se revisan y la estabilidad en el plasma se asume. Si el compuesto de prueba es inestable en el plasma, los métodos se modifican como sea necesario. El estudio implica tres ratas saludables de cualquier sexo por compuesto de prueba. Las formulaciones de dosis se preparan mediante la solución o suspensión de los compuestos de prueba en agua,
10 solución salina, Tween, PEG, o un vehículo similar. Para cada compuesto de prueba, tres ratas se dosifican una vez por vía de alimentación forzada oral y la sangre se recolecta en cuatro puntos de tiempo (1, 2, 4, 8 horas). Las concentraciones de fármaco en el plasma se miden utilizando LC-UV o LC-MS/MS) para definir la curva de concentración en el plasma-tiempo. Los parámetros farmacocinéticos tales como Cmax, Tmax y Area Bajo la Curva (AUC) se calculan utilizando WinNonlin (Pharsight Corp.).

15 Si se utilizan ratones en lugar de ratas, se utilizan 12 ratones para cada compuesto de prueba. Las muestras se toman de tres ratones por punto de tiempo y la farmacocinética se calcula utilizando los datos de la media de concentración en el plasma por punto de tiempo.

Utilizando los datos de metabolismo in vitro, también se pueden calcular las concentraciones de los metabolitos principales. La recolección de los excrementos durante el período de estudio in vivo y el análisis de estas muestras para el precursor y los metabolitos generales proporciona un cálculo de la eliminación.
20

Los cálculos para el % de Biodisponibilidad se realizan utilizando las siguientes ecuaciones:

% de Biodisponibilidad de BH4 = $AUC \text{ de BH4 (oral)} / AUC \text{ de BH4 (IV)} \times Dosis \text{ de BH4 (IV)} / Dosis \text{ de BH4 (oral)}$

% de Biodisponibilidad de análogo de BH4 = $AUC \text{ de análogo de BH4 (oral)} / AUC \text{ de BH4 (IV)} \times Dosis \text{ de BH4 (IV)} / Dosis \text{ de análogo de BH4 (oral)}$

25 Hidrólisis de Análogos de BH4

Este ejemplo describe un ensayo para determinar si la hidrólisis de análogos de BH4 (por ejemplo, Compuesto I) ocurre in vivo, si se forman los productos deseados (incluyendo la BH4) y si es razonable la cinética de la hidrólisis.

Un compuesto de prueba, por ejemplo, un diéster de BH4, (50 uM) se disuelve en un tampón (pH 6,8, NaPhos 20 mM, NaCl 150 mM) y se diluye a un volumen total de 2 ml. La Ésterasa (0,1 unidades, Sigma-Aldrich, Carboxil-Ésterasa E.C.3.1.1.1) se agrega. En puntos de tiempo de 5 minutos, las muestras de 50 ul se retiran de la solución de reacción y se extraen con un volumen igual de cloroformo. Después de que se recolectan 12 muestras de cloroformo, cada muestra se inyecta por separado en una HPLC con una columna C4 estándar utilizando un gradiente estándar de acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético. La producción del ácido utilizado para la Esterificación se calcula mediante la comparación con una curva estándar pura del ácido utilizado para la Esterificación, permitiendo el cálculo del ácido utilizado para la Esterificación como una función de tiempo. La pendiente de esta línea es la velocidad de reacción. Alternativamente, la fase acuosa se somete a ensayo utilizando un método de HPLC de fase inversa en una columna C18 para detectar la BH4 libre. Dadas las propensiones de oxidación de la BH4, ésta puede ser una alternativa apropiada puesto que la detección del ácido utilizado para la esterificación ocurriría independientemente del estado de la BH4.
30
35

40 La hidrólisis de las formas esterificadas de BH4 añadidas dentro de muestras de sangre o tejido obtenidas de humanos o animales depende de las esterases endógenas de los tejidos y no utilizará esterases obtenidas comercialmente. Este método ayuda a determinar la probabilidad de hidrólisis de éster en la ubicación deseada in vivo. Se requiere la extracción con disolvente de productos de reacción seguida por el análisis de HPLC.

Las muestras de suero se toman de humanos o animales y el pH se controla mediante la dilución del suero con fosfato de sodio 0,5 M, pH 6,8, hasta un total de 20 uM. La BH4 diesterificada (50 uM) se disuelve en suero con pH controlado y se agrega esterasa (0,1 unidades). En puntos de tiempo de 5 minutos, las muestras de 50 ul se retiran de la solución de reacción y se extraen con un volumen igual de cloroformo. La fase de cloroformo se recolecta por el ácido utilizado para el análisis de esterificación y/o la fase acuosa para el análisis de BH4. Después de que se recolectan 12 muestras, cada muestra se inyecta en una HPLC con una columna C4 estándar utilizando un gradiente de acetonitrilo/agua/ácido trifluoroacético para el análisis de ácido butanoico o una columna C18 para el análisis de BH4. La producción del ácido utilizado para la esterificación o BH4 se calcula mediante la comparación con un estándar puro, permitiendo el cálculo del ácido utilizado para la esterificación o BH4 como una función de tiempo. La pendiente de esta línea es la tasa de reacción.
45
50

Los cálculos para el % de conversión de análogos de BH4 se realizan utilizando las siguientes ecuaciones:

% de análogo de BH4 de BH4, BH2 y B de biopterinas totales = (Biopterinas totales - (BH4+BH2+B)/biopterinas totales) 100

% de análogo de BH4 de BH4, BH2 y B de dosis = (Biopterinas totales - (BH4+BH2+B)/dosis) 100

5 % de análogo de BH4 de dosis = % de análogo de BH4 / Dosis

Los cálculos se pueden determinar utilizando concentraciones de muestras de analitos o valores de AUC.

Farmacocinética de Análogos de BH4 Administrados a Ratas

Este ejemplo permite la comparación de la farmacocinética del análogo (Compuesto I) contra la de BH4 después de una única administración por vía oral en ratas.

10 Las dosis individuales de BH4 (10 y 100 mg/kg) se administraron por vía oral a un primer grupo de ratas macho Sprague Dawley (6 semanas de edad) bajo condiciones de ayuno. Las dosis individuales del Compuesto I se administraron por vía oral a un primer grupo de ratas macho Sprague Dawley (6 semanas de edad) bajo condiciones de ayuno.

15 Con respecto a la BH4 administrada, las concentraciones totales máximas de biopterina en el plasma 2 horas y 1 hora después de la dosificación fueron 108 ng/ml (es decir, aproximadamente 3 veces el nivel endógeno) y 1227 ng/ml (es decir, aproximadamente 30 veces en nivel endógeno), respectivamente. Después, la biopterina tuvo una vida media de eliminación ($t_{1/2}$) de aproximadamente 1,1 horas, regresando al nivel endógeno 9 horas después de la dosificación para la dosis de 10 mg/kg y 24 horas después de la dosificación para la dosis de 100 mg/kg. Las biobisponibilidades (F) después de una administración por vía oral de 10 y 100 mg/kg fueron 6,8% y 11,8%, respectivamente, con base en el área bajo la curva de concentración en el plasma-tiempo (AUC) obtenida al sustraer el nivel endógeno durante una administración intravenosa de 10 mg/kg. La relación de biopterina reducida con respecto a las biopterinas totales en el plasma (es decir, la relación de la forma reducida) fue relativamente estática (73%-96%).

25 El análogo de BH4 se sometió a prueba y se evaluó de manera similar. La AUC y el valor máximo (C_{max}) son aproximadamente un 50% mejores que los de BH4, debido a su biodisponibilidad incrementada. La biodisponibilidad es al menos un 15, 20 o 30% o superior y hasta un 500% superior a la de la BH4, dependiendo del análogo.

Farmacocinética de Análogos de BH4 Administrados a Monos

30 A los monos Cynomolgus en ayuno se les administró BH4 y análogos de BH4 mediante la alimentación forzada oral (n=3), de tal manera que la cantidad del análogo administrado fuera el equivalente de 80 mg de BH4. Las concentraciones en el plasma de la BH4, cuando se administró directamente, o los análogos se midieron en varios puntos de tiempo durante un período de 25 horas. Los datos de la farmacocinética resultantes se muestran en la Figura 6. Los datos de la farmacocinética también se muestran en la siguiente tabla, en donde el número entre paréntesis es la desviación estándar.

35 Tabla. Farmacocinética y biodisponibilidad de los análogos de BH4 con respecto a 6R-BH4^a

Compuesto	AUC _{0-t} (ng*hr./mL)	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (hr.)	Biodisponibilidad Relativa para 6R-BH4
BH4	288 (15,5)	42,0 (12,6)	3,0 (0)	na ^b
Ej. 5	2669 (552)	1016 (228)	2 (0)	9,3 (2,1)
Ej. 7	572 (148)	82,3 (27.2)	2,7 (0.6)	2,0 (0,5)
Ej. 9	384 (214)	61.9 (34.8)	2.0 (0)	1,3 (0,7)

Ej. 10	625 (294)	138 (123)	1,8 (1,3)	2,1 (0,9)
Ej. 11	617 (336)	115 (65,4)	1,5 (0,09)	2,1 (1,0)
Ej. 12	438 (211)	73,6 (42,9)	3,9 (1,0)	1,5 (0,7)
Ej. 13 ^c	13,7	2,2	6,0	0,045
Ej.14	63,2 (25,6)	5,2 (2,1)	12,1 (11,9)	0,22 (0,10)
Ej. 15	36,8 (37,6)	5,7 (1,7)	12,0 (10,4)	0,13 (0,14)
Ej. 16	88,1 (31,5)	7,6 (2,7)	6,0 (0)	0,31 (0,12)
a - Medido como biopterina total				
b - No aplicable				
c - n = 2				

El estudio previo mostró biodisponibilidad incrementada de BH4 después de la administración de análogos de BH4 en comparación con la administración de 6R-BH4, especialmente con el compuesto del Ejemplo 5 con base en la biopterina total. Este estudio iba a determinar la farmacocinética y la biodisponibilidad relativa de BH4 cuando se administra como BH4 precursora o un análogo de BH4 a monos macho *Cynomolgus* como dosis intravenosas u orales únicas en un diseño cruzado de cuadrado latino parcial.

Seis monos *Cynomolgus* no naturales, macho se mantuvieron en ayuno durante toda la noche antes de la dosificación a través de aproximadamente 4 horas después de la dosis. Las dosis individuales se calcularon con base en los pesos corporales registrados en cada día de la administración de dosis. Cinco grupos experimentales de monos se evaluaron utilizando un diseño cruzado de cuadrado latino parcial: Grupo 1 - 2 mg/kg de BH4 mediante la administración intravenosa; Grupo 2 - 40 mg/kg de BH4 mediante la alimentación forzada oral; Grupo 3 - 2 mg/kg de análogo de BH4 mediante la administración intravenosa; Grupo 4 - 5 mg/kg de análogo de BH4 mediante la alimentación forzada oral; Grupo 5 - 20 mg/kg de análogo de BH4 mediante la alimentación forzada oral. Las dosis de análogo de BH4 se prepararon como equivalentes en mg/kg de BH4 (calculados utilizando pesos moleculares de 2HCl de BH4 y análogos de BH4). El diseño cruzado de cuadrado latino parcial se utilizó para minimizar el efecto de la secuencia de dosis sobre la variabilidad entre animales para propósitos estadísticos. Los monos recibieron sus dosis respectivas de BH4 por vía intravenosa (2 mL/kg, disueltos en ácido ascórbico 100 µM y manitol al 5% en agua estéril para inyección, SWFI), el Ejemplo 5 por vía intravenosa (2 mL/kg, disueltos en ácido ascórbico 100 µM y manitol al 5% en tampón de citrato, pH 3) o BH4 o el Ejemplo 5 mediante la alimentación forzada oral (4 mL/kg, disueltos en ácido ascórbico 100 µM en SWFI). Antes del uso, todas las formulaciones de dosis intravenosas se filtraron dentro del envase de dosificación final utilizando un filtro de jeringa de 0,22 micrómetros (Millex GS o GV; Millipore).

Para la administración intravenosa, la sangre (aproximadamente 1 mL) se recolectó de cada animal previo a la dosis y en 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18 y 24 horas después de la dosis. Para la administración oral, la sangre (aproximadamente 1 mL) se recolectó de cada animal previo a la dosis y en 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18 y 24 horas después de la dosis. La sangre se recolectó en tubos que contenían el anticoagulante K2-EDTA, el cual se mantuvo en una condición fría y se centrifugó para obtener el plasma. La centrifugación comenzó dentro de 30 minutos de la recolección. Tres alícuotas de 100-µL de cada muestra de plasma se transfirieron rápidamente después de la centrifugación al interior de tubos individuales que contenían ditioeritrol al 0,1% (p/v) (DTE) para el almacenamiento. Una vez que se agregó la alícuota de plasma, cada tubo se remolineó brevemente para el mezclado luego se colocaron inmediatamente sobre hielo seco.

Los datos de la farmacocinética resultante se muestran en las siguientes tablas, en donde el número entre paréntesis es la desviación estándar. Los datos de la farmacocinética también se muestran en las Figuras 7-15.

Tabla: Biodisponibilidad Oral de 6R-BH4 y el análogo de BH4 (compuesto del Ejemplo 5) en base a 6R-BH4 IV en Monos Cynomolgus^a

Fármaco	Dosis mg/kg ^b	Biopterina Total		BH4	
		Biodisponibilidad Absoluta (%)	Biodisponibilidad Relativa para 6R-BH4	Biodisponibilidad Absoluta (%)	Biodisponibilidad Relativa para 6R-BH4
6R-BH4	40	8,2 (4,4)	na ^c	9,2 (4,2)	na
VAL-BH4	5	40,7 (8,2)	5,7 (2,0)	19,6 (8,8)	2,3 (0,8)
VAL-BH4	20	25,6 (5,3)	3,6 (1,6)	13,7 (4,4)	1,7 (0,6)

a - n=6
b - Las dosis del análogo de BH4 se prepararon como equivalentes en mg/kg de BH4 (calculado utilizando pesos moleculares de 2HCl de BH4 y análogos de BH4).
c - No aplicable.

5 La biodisponibilidad absoluta de 6R-BH4, Val-BH4 a 5 mg/kg y Val-BH4 a 20 mg/kg con base en las mediciones de biopterina total en el plasma de mono fue 8,2, 40,7 y 25,6%; la biodisponibilidad relativa a 6R-BH4 fue 5,7 y 3,6. En base a las mediciones de BH4, la biodisponibilidad absoluta fue 9,8, 19,7 y 14,0%, respectivamente; la biodisponibilidad relativa fue 2,3 y 1,7. Las mediciones de biopterina total podrían incluir Val-BH4, Val-BH2, Val-B, BH4, BH2 y B.

10 **Tabla: % de Análogo de BH4 (compuesto del Ejemplo 5, Val-BH4) que Permanecía en Circulación Sistémica después de la Administración Oral en Monos Cynomolgus^a**

Dosis ^b (mg/kg)	Val-BH4/BH4 (%)	Val-BH4/(BH4+BH2+B) (%)	Val-BH4/biopterina total ^c (%)
5 mg/kg	56,3 (25,2)	36,4 (16,0)	23,5 (5,6)
20 mg/kg	81,0 (18,1)	51,6 (11,6)	40,7 (11,1)

a - n=6, Determinado de AUC_{0-t}
b - Las dosis del análogo de BH4 (compuesto del Ejemplo 5) se prepararon como equivalentes en mg/kg de BH4 (calculado utilizando pesos moleculares de 2HCl de BH4 y el análogo de BH4).
c - La biopterina total se ajustó al análogo de BH4.

Tabla: Biodisponibilidad Absoluta del Análogo de BH4 (compuesto del Ejemplo 5) en Monos Cynomolgus^a

Dosis, mg/kg ^b	Biodisponibilidad Absoluta (%)
5	36,2 (26,3)

(continuación)

Dosis, mg/kg ^b	Biodisponibilidad Absoluta (%)
20	33,2 (29,2)
a - n=6	
b - Las dosis del análogo de BH4 se prepararon como equivalentes en mg/kg de BH4 (calculado utilizando pesos moleculares de 2HCl de BH4 y el análogo de BH4).	

- 5 El porcentaje de Val-BH4 que permanecía en circulación sistémica después de la administración oral de Val-BH4 a 5 y 20 mg/kg fue mayor que $23,5 \pm 5,6\%$ con base en las mediciones de biopterina total ajustadas para la Val-BH4. La biodisponibilidad absoluta de la Val-BH4 oral a 5 y 20 mg/kg en monos *Cynomolgus* fue 36% y 33%, respectivamente.

Tabla: Farmacocinética para 6R-BH4 y el Análogo de BH4 (5 mg/kg) después de la Administración Intravenosa en Monos *Cynomolgus*^a

Fármaco	AUC _{0-t} (nM*hr.)	AUC _{inf} (nM*hr.)	T _{max} (hr.)	C _{max} (nM)	t _{1/2} (hr.)	Vz (L/kg)	Vdss (L/kg)	CL (L*hr./kg)
6R-BH4	6762 (1224)	6955 (1203)	0,11 (0,07)	7053 (1599)	2,3 (0,8)	3,1 (1,2)	2,0 (0,8)	0,9 (0,1)
Val-BH4	4166 (3484)	5241 (4983)	0.08 (0)	13055 (10414)	1,50 (2,07)	6,35 (8,43)	3,78 (6,35)	2,48 (1,76)
a - n=6								

10

Tabla: Farmacocinética para 6R-BH4 y el Análogo de BH4 (Val-BH4) después de la Administración Oral en Monos *Cynomolgus*^a

Fármaco	Dosis ^b (mg/kg)	AUC _{0-t} (nM*hr.)	AUC _{inf} (nM*hr.)	T _{max} (hr.)	C _{max} (nM)	t _{1/2} (hr.)
6R-BH4	40	11944 (4602)	13361 (5353)	3,7 (1,4)	2328 (1182)	5,9 (4,9)
Val-BH4	5	1671 (534)	1734 (457)	1,0 (0,5)	1140 (580)	5,2 (8,2) ^c

Val-BH4	20	7235 (1956)	7596 (2386)	1,2 (0,4)	2903 (267)	9,1 (20) ^c
<p>a - n=6</p> <p>b - Las dosis del análogo de BH4 se prepararon como equivalentes en mg/kg de BH4 (calculado utilizando pesos moleculares de 2HCl de BH4 y el análogo de BH4).</p> <p>c - La diferencia extrema con $t_{1/2}$ puede ser debido a la medición $t_{1/2,\alpha}$ contra $t_{1/2,\beta}$ para los animales individuales, pero no existen suficientes datos para determinar el $t_{1/2,\beta}$ en la mayoría de los casos.</p>						

5 La farmacocinética para Val-BH4 y 6R-BH4 después de la administración IV a 2 mg/kg muestra que el Cmax promedio era más alto para Val-BH4 y la AUC promedio era mayor para 6R-BH4 con un $t_{1/2}$ ligeramente más prolongado. El Cmax puede ser más alto para Val-BH4 debido al transporte activo a través de la pared intestinal. La AUC puede ser más baja para Val-BH4 debido a la distribución más rápida en los tejidos. La farmacocinética para Val-BH4 y 6R-BH4 después de la administración oral indica un tiempo más prolongado para Cmax y un $t_{1/2}$ más prolongado para 6R-BH4.

10 Los datos de biodisponibilidad anteriores demuestran que la Val-BH4 oral a 5 mg/kg proporcionó 6 veces de exposición sistémica de BH4 en comparación con la 6R-BH4 con base en la biopterina total. Con base en la BH4, la disponibilidad de la Val-BH4 fue mayor que 2 veces de exposición sistémica de BH4 en comparación con la 6R-BH4. Los datos también indican que altas concentraciones de Val-BH4 estuvieron presentes en el plasma sin biodisponibilidad absoluta en aproximadamente 33 a 36%.

15 Las Figuras 7-11 muestran los datos de la farmacocinética en el plasma para las cinco condiciones de dosis: 2 mg/kg de BH4 o análogo de BH4 mediante la administración intravenosa y 40 mg/kg de BH4, 5 mg/kg de análogo de BH4 o 20 mg/kg de análogo de BH4 mediante la alimentación forzada oral. Después de una dosis oral de 40 mg/kg de BH4, se detectó más BH4 que BH2 y biopterina y el Tmax de BH4, BH2 y B fueron aproximadamente los mismos (Figura 8). Después de una dosis oral de 5 mg/kg del análogo de BH4 (compuesto del Ejemplo 5), el análogo fue absorbido rápidamente y se distribuyó rápidamente por 4 horas (Figura 10). El Tmax fue posterior para BH4 que para BH2 y la biopterina, lo cual sugiere que la BH2 puede ser generada a través de Val-BH2.

20 Comparando las dosis orales de BH4 (ajustadas a 5 mg/kg para comparación) y el análogo de BH4 (5 y 20 mg/kg) con respecto a la BH4, se detectó más BH4 en el plasma después de las administraciones de análogos de BH4 que después de la propia BH4 (Figura 12).

25 La Figura 13 muestra la comparación de las dosis intravenosas de BH4 y el análogo de BH4 (2 mg/kg en equivalentes de BH4) en una escala logarítmica. La Figura 14 compara la BH4 después de administraciones intravenosas de BH4 y análogos de BH4, mientras que la Figura 15 incluye también BH2 y biopterina. Interesantemente, las concentraciones de BH4 junto con BH2 y biopterina después de la administración intravenosa del análogo de BH4 fueron muy bajas en comparación con las concentraciones después de la administración de BH4. Esto parece sugerir que la biotransformación por vía del metabolismo del primer paso es el mecanismo primario y las esterasas sanguíneas no son tan activas.

30 Sin pretender ser limitados por ninguna teoría en particular, se asume como hipótesis que la biotransformación por medio del metabolismo de primer paso es probablemente como el mecanismo primario. Los datos de biodisponibilidad demuestran que la Val-BH4 oral a 5 mg/kg proporcionó más de 2 veces de exposición sistémica de BH4 en comparación con la 6R-BH4 y 6 veces más de exposición sistémica con base en la biopterina total. Los datos también indican que altas concentraciones de Val-BH4 estuvieron presentes en el plasma sin biodisponibilidad absoluta en aproximadamente 33 a 36%.

Absorción de análogos de BH4 en el tracto gastrointestinal

La absorción en el tracto gastrointestinal se evalúa en humanos en un estudio cruzado ciego.

40 A menos que se establezca de otra manera, a los sujetos se les administró ya sea tetrahydrobiopterina (BH4) o el análogo de BH4 en una dosis de 1, 5 y 10 mg/kg después de un ayuno de 10 horas. En la parte alimentada del estudio, a los sujetos se les administró ya sea BH4 o el análogo de BH4. Las muestras de sangre se recolectaron en frasquitos con heparina en 0, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas después de la dosis. Para un estudio de dosis individuales y biodisponibilidad relativa, las muestras de plasma también se recolectaron 0,25, 0,75 y 1,5 horas después de la administración y se sometieron a ensayo por la biopterina total para evaluar el sitio de

absorción gastrointestinal de ya sea BH4 o el análogo de BH4.

A los sujetos se les administró una dosis por vía oral o intravenosa de 1, 5 y 10 mg/kg de ya sea BH4 o el análogo de BH4, seguido por mediciones en serie de la concentración de biopterina total en el plasma para determinar la velocidad de absorción de BH4 o el análogo de BH4 desde el tracto gastrointestinal del área bajo la curva de incremento de concentración de biopterina total en el plasma (ΔC_p)-tiempo (ΔAUC). Se anticipa que se requerirá una dosis más baja de BH4 cuando se administra por vía intravenosa en comparación con BH4 administrada por vía oral para lograr el mismo nivel de biodisponibilidad. Por ejemplo, se puede requerir 10 mg/kg de BH4 administrada por vía oral para lograr el mismo nivel de biodisponibilidad que 1 mg/kg de BH4 administrada por vía intravenosa. Debido a que el análogo de BH4 sirve para mejorar la biodisponibilidad, se puede requerir solo 2,5 mg/kg del análogo de BH4 para lograr el mismo nivel de biodisponibilidad que una dosis IV de 1 mg/kg de BH4 para lograr el mismo porcentaje de biodisponibilidad.

La tasa de absorción de BH4 o el análogo de BH4 desde el tracto gastrointestinal se calcula a partir del área bajo la curva de incremento de concentración de biopterina total en el plasma (ΔC_p)-tiempo (ΔAUC) después de la administración de BH4 o el análogo de BH4 utilizando las siguientes fórmulas:

Tasa de Absorción (%) = (ΔAUC después de la dosis p.o./ ΔAUC después de la dosis i.v.)

X

(dosis i.v./dosis p.o. x 100)

Algunos análogos de BH4 pueden requerir una duración más prolongada para liberar la BH4 activa. De esta manera, una medición de BH4 libre o liberada sola en la sangre puede no reflejar de manera exacta la cantidad total de BH4 que podría estar disponible para el tratamiento. Por lo tanto, una medición de la concentración total del análogo y BH4 juntos se requiere para determinar de manera exacta o más precisa el nivel de BH4 en la sangre con el propósito de evaluar la biodisponibilidad y comparar la biodisponibilidad del análogo y la BH4.

Medición de metabolitos de BH4

Ensayo de biopterina: La concentración de la biopterina total y la biopterina oxidada en el plasma, sangre y otros tejidos se determina con base en el método de Fukushima y colaboradores (*Anal. Biochem.* 102:176 (1980)). La biopterina tiene cuatro diferentes formas que incluyen dos formas de biopterina reducida, R-tetrahidrobiopterina (BH4) y R-dihidrobiopterina quinonoide (q-BH2) y dos formas de biopterina oxidada, dihidrobiopterina (BH2) y biopterina (BP). De estas cuatro formas, solo las formas reducidas de biopterina tienen actividad coenzimática. La biopterina reducida se convierte a BP mediante la yodilación bajo condiciones ácidas, mientras que bajo condiciones alcalinas, se convierte en pterina. La biopterina oxidada se convierte a BP mediante la yodilación bajo condiciones ácidas y alcalinas. Al tomar ventaja de esta propiedad, la cantidad de biopterina total se determina con la yodilación bajo condiciones ácidas y aquella de la biopterina oxidada se determina con la yodilación bajo condiciones alcalinas, de modo que la cantidad de biopterina reducida se calcula a partir de la diferencia en la cantidad de las mismas. Cuando se utiliza como una coenzima, la BH4 se convierte a q-BH2. La q-BH2 es convertida inmediatamente a BH4 por la dihidropterina reductasa o si no es reducida, es oxidada a BH2 o DHPT. Debido a que es difícil para la biopterina existir en la forma de q-BH2 in vivo, la biopterina reducida puede ser bien desplazada como BH4.

Las muestras de plasma y sangre entera recolectadas se sujetan inmediatamente a la oxidación con una solución oxidante ácida (solución de HCl 0.6N en agua que contiene yoduro de potasio al 0.6% (KI), yodo al 0.3% (I_2) y ácido tricloroacético 0.6N (TCA)) y una solución oxidante alcalina (hidróxido de sodio 0.7N (NaOH)). La determinación de BP se realiza mediante la HPLC y la radioactividad se mide utilizando un contador de centelleo líquido.

Medición de la BH4 utilizando la HPLC de Fase Inversa (RP) Acoplada con la Espectrometría de Masas en Tándem (LC/MS/MS): El uso combinado de la cromatografía líquida de alto desempeño de fase inversa (RP) y la espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) se mostró que era selectivo para la BH4 en el plasma humano, sensible para BH4 en el intervalo de 5 – 1000 ng/mL. El método está asociado con una conversión de aproximadamente 50% de BH4 debido a la oxidación durante la recolección y el almacenamiento. Las muestras son estables durante más de 3 meses en plasma con sal dipotásica de ácido etilendiaminotetraacético (K_2EDTA). La recuperación de los pasos de pretratamiento es aproximadamente 75%. La exactitud y precisión del método se determinó que tenía un % de coeficiente de variación (CV, por sus siglas en inglés) inferior a 15% (20% en el límite más bajo de cuantificación, LLOQ).

El uso combinado de HPLC y la espectrometría de masas en tándem se mostró que era un mejoramiento sobre la HPLC sola en la determinación del artículo de prueba de BH4 debido a que: (1) su selectividad incrementada por el fármaco-BH4 (mientras que la HPLC mide la biopterina total), (2) el intervalo cualitativo más amplio, (3) la relación

de conversión establecida, (4) la caracterización extensiva y la utilidad probada en sujetos humanos y (5) la medición novedosa y útil en diferentes especies y matrices.

- El método mejorado comprende los siguientes pasos. Las muestras de sangre, plasma, homogenados de tejido u orina se sujetan a la oxidación ácida o alcalina. Con la oxidación ácida, (1) las muestras son tratadas con cloruro de potasio (KCl), ácido clorhídrico (HCl) o TCA durante una hora; (2) las muestras oxidadas ácidas entonces se sujetan a la yodometría; (3) las muestras se conducen a través de una columna de intercambio iónico; (4) la biopterina total que comprende BH4, q-BH2 (la cual es reducida inmediatamente *in vivo* a BH4 de tal manera que la biopterina reducida, medida se basa principalmente en la BH4), BH2 y BP se miden utilizando la HPLC y la espectrometría de masas en tándem. Con la oxidación alcalina, (1) las muestras son tratadas con KI, I₂ o NaOH durante una hora; (2) las muestras oxidadas, alcalinas entonces se sujetan a la acidificación con HCl o TCA; (3) se sujetan a la yodometría; (4) las muestras son conducidas a través de una columna de intercambio iónico; (5) la biopterina oxidada que comprende BH2 y la BP se miden; (6) diferentes especies se miden utilizando la HPLC y la espectrometría de masas en tándem; y (7) la cantidad de biopterina reducida (BH4 + q-BH2) se calcula como la diferencia entre las biopterinas totales menos la forma oxidada.
- El diagrama de flujo de la medición de biopterina y la breve descripción de la validación del ensayo se proporcionan en las Figuras 1 y 2.

Ensayo optimizado

- Un método de HPLC utilizando la Detección Electroquímica (ECD, por sus siglas en inglés) y la Detección de Fluorescencia (FL, por sus siglas en inglés) es ventajoso ya que permite la medición de cada uno de los compuestos de biopterina discretos (BH4, BH2 y B) así como también formas de análogos, tales como profármacos, (por ejemplo, Val-BH4, Val-BH2 y Val-B).

- Las concentraciones de diferentes biopterinas (BH4, BH2 y B) y Val-biopterinas se determinan al utilizar inicialmente la HPLC de fase inversa para la separación, seguida por la detección de ECD y FL. La BH4 y la Val-BH4 se miden utilizando ECD en la cual la BH4 y la Val-BH4 son oxidadas por el electrodo 1 a las formas de dihidrobiopterina quinonoide (qBH2 o Val-qBH2, respectivamente), un producto intermedio de dihidrobiopterina de vida corta, y luego se reducen nuevamente a BH4 o Val-BH4 en el electrodo 2. El detector entonces utiliza la corriente generada por esta reacción de reducción para determinar la concentración de BH4 o Val-BH4 respectivamente. La BH2, Val-BH2, B y Val-B se miden por medio de la detección de fluorescencia. La oxidación pos-columna de BH2 y Val-BH2 utilizando una célula oclusiva de acondicionamiento en el potencial óptimo oxida la BH2 y la Val-BH2 a B y Val-B, respectivamente. La oxidación pos-columna es un paso en donde la BH2 (y otras especies) es oxidada a Biopterina (B). Esto es deseable debido a que la BH2 no es fluorescentemente activa y se mide fácilmente y debe ser convertida a biopterina, la cual se mide fácilmente utilizando la fluorescencia. En total, los métodos se pueden utilizar para medir las seis especies (BH4, BH2, B, Val-BH4, Val-BH2 y Val-B). En una realización, los análogos de biopterina, tales como los derivados de valina-biopterina, se miden utilizando una fase móvil que contiene MeOH al 10% mientras que las biopterinas se miden utilizando una fase móvil que contiene MeOH al 2%.

- De esta manera, un método para detectar las biopterinas en una mezcla de especies de biopterina puede incluir (a) la separación de especies de biopterina en la mezcla mediante la HPLC de fase inversa; y en el caso de la BH4 y análogos de la misma, (b1) la realización de la detección electroquímica mediante la oxidación de la BH4 y análogos de la misma que están presentes por medio de un primer electrodo a las formas de dihidrobiopterina quinonoide, seguido por la reducción de las formas quinonoides nuevamente a la BH4 y análogos de la misma presentes en un segundo electrodo y la medición de la corriente generada por la reacción de reducción para determinar la concentración de especies; y/o (b2) en el caso de la BH2, análogos de la misma, biopterina o análogos de la misma, la medición de estas especies mediante la detección de fluorescencia después de la oxidación pos-columna de las especies de BH2 a biopterina.

- El compuesto del Ejemplo 5 se puede detectar en tampón y mediante la extracción utilizando este ensayo. La medición de BH4, BH2 y B utilizando este ensayo de monos *Cynomolgus* dosificados con el compuesto del Ejemplo 5 indica una biodisponibilidad enormemente incrementada (véase la Figura 16). En la Figura 16, el valor máximo en aproximadamente 5 minutos es característico de BH4 y la altura del valor máximo en 5 minutos es varias veces superior que lo que se observó cuando a los monos se les administró BH4. La altura y el área del valor máximo son representativas de la concentración. El compuesto del Ejemplo 5 de los monos 2 horas después de la dosificación también se observó después de su administración mediante el uso de un método con una fase móvil que contiene MeOH al 10%.

Efecto de análogos de BH4 sobre la producción de óxido nítrico

- Las células endoteliales cultivadas del cordón umbilical humano (HUVEC, por sus siglas en inglés) se trataron

previamente con N-acetilserotonina 3 mM (NAS), un inhibidor de la enzima sepiapterina reductasa. La inhibición de esta ruta da como resultado típicamente la pérdida de BH4 endógena, deprimiendo la actividad endógena de eNOS muy por debajo de lo normal y proporciona un ensayo para someter a prueba la restauración de la actividad de eNOS.

5 De esta manera, las HUVECs subconfluentes se sembraron en una placa de 24 pocillos y se desarrollaron durante toda la noche en medio EGM2 (medio de crecimiento completo). A la siguiente mañana, se agregó medio fresco a los pocillos (300 μ L/pocillo), N-acetilserotonina 3 mM (NAS), un inhibidor de la enzima sepiapterina reductasa (un miembro de la ruta de síntesis para la BH4 endógena) se agregó a las células para disminuir los niveles de BH4 endógena. Después de una incubación de 1.5 horas, la BH4 50, 100 o 200 mM o un compuesto del Ejemplo 5, Ejemplo 6, Ejemplo 7 o Ejemplo 9 se agregaron a las células. Las células se dejaron reaccionar con la BH4 o el compuesto del Ejemplo 5, Ejemplo 7 o Ejemplo 9 durante 5-22 horas. La producción de NO entonces se midió como los cambios en total (nitrito + nitrato) mediante la reacción de Griess subsecuente al tratamiento con nitrato reductasa. 90 μ L de la mezcla de reacción (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, FAD 1 μ M, FMN 1 μ M, L-Arginina 100 μ M, CaCl₂ 2,5 mM, NADPH 1 mM, 0,04 mg/ml de Calmodulina) se mezclaron con 5 μ L de eNOS (15 unidades/ml) y 5 μ L de BH4 o análogos de BH4 (1, 10, 100 μ M), seguido por la incubación en un baño de agua a 37 °C durante 90 minutos. Luego, 100 μ L de agua y 20 μ L de la sonda fluorescente de nitrito DAN (2,3-diaminonaftaleno, 316 μ M) se agregaron a cada reacción y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. El tinte DAN reacciona con nitrito para generar el producto fluorescente naftotriazol. La reacción entonces se detuvo mediante la adición de 10 μ L de NaOH (2,8 M) y la fluorescencia de las muestras se leyó utilizando la frecuencia de excitación 375 nm y frecuencia de emisión 415 nm. El porcentaje de nitrito + nitrato con BH4 o el compuesto del Ejemplo 5, Ejemplo 7 o Ejemplo 9 se muestra en la Figura 17 (después de 5 horas); la Figura 18 (después de 17 horas); y la Figura 19 (después de 22 horas). Los resultados para el Ejemplo 6 se muestran en la Figura 20 (después de 5 horas) y la Figura 21 (después de 20 horas).

25 La adición del compuesto del Ejemplo 5, 6, 7 o 9 a células tratadas con NAS incrementó la producción de NO de una manera dependiente de la dosis. Adicionalmente, el tratamiento de células con el compuesto del Ejemplo 5 produjo aproximadamente 60%-80% del efecto de BH4, lo que sugiere que el análogo es des-esterificado dentro de las células para producir la BH4 activa. Los compuestos de los Ejemplos 6, 7 y 9 tuvieron un efecto similar, aunque ligeramente reducido, sobre las células tratadas con NAS.

30 El compuesto del Ejemplo 5 tuvo la actividad farmacológica in vitro deseada (estimulación de la producción de nitrito o partir de la óxido nítrico sintasa endotelial en células endoteliales cultivadas) y suministra de aproximadamente 60% a 80% de la respuesta proporcionada por la BH4 libre en este sistema de cultivo de células. Las tendencias fueron similares después de una exposición de 5 horas o 22 horas; hubo un poco más de diferencia entre el análogo y la BH4 libre después de 22 horas. Estos resultados sugieren que las células endoteliales contienen esterasas que pueden ayudar en la producción de la BH4 libre activa.

35 También se sometió a prueba el efecto de análogos de BH4 en comparación con la BH4 libre sobre la estimulación de la actividad de eNOS en un sistema de ensayo libre de células reconstituido de componentes purificados. 90 μ L de la mezcla de reacción (Tris-HCl 25 mM, pH 7,4, FAD 1 μ M, FMN 1 μ M, L-Arginina 100 μ M, CaCl₂ 2,5 mM, NADPH 1 mM, 0,04 mg/ml de Calmodulina) se mezclaron con 5 μ L de eNOS (15 unidades/ml) y 5 μ L de BH4 o análogos de BH4 (1, 10, 100 μ M), seguido por la incubación en un baño de agua a 37 °C durante 90 minutos. Luego, 100 μ L de agua y 20 μ L de la sonda fluorescente de nitrito DAN (2,3-diaminonaftaleno, 316 μ M) se agregaron a cada reacción y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. El tinte DAN reacciona con el nitrito para generar el producto fluorescente naftotriazol. La reacción entonces se detuvo mediante la adición de 10 μ L de NaOH (2,8 M) y la fluorescencia de las muestras se leyó utilizando la frecuencia de excitación 375 nm y la frecuencia de emisión 415 nm.

45 Similar a la 6S-BH4 (el isómero menos relevante biológicamente de BH4), la cual sirvió como control negativo, el compuesto del Ejemplo 5 (val-BH4) no aumentó significativamente la actividad de eNOS en un ensayo de componentes purificados libres de células (véase la Figura 22). La BH4 no aumentó la potencia de la actividad de eNOS de una manera dependiente de la dosis. Puesto que el Ejemplo 5 aumentó la potencia de eNOS en células endoteliales cultivadas, este resultado indica que el Ejemplo 5 es un análogo que parece requerir el procesamiento celular (por ejemplo, des-esterificación) para la eficacia, es decir, el Ejemplo 5 puede funcionar como un profármaco.

55 Un segundo ensayo libre de células se realizó para evaluar los ésteres de lisina (ejemplo 7), prolina (ejemplo 9) e isoleucina (ejemplo 6) de BH4. Los resultados se muestran en la Figura 23. El éster de lisina y el éster de prolina tuvieron un ligero efecto sobre la actividad de eNOS, pero estas respuestas no fueron comparables a aquellas de la BH4. Dos explicaciones posibles son que la presencia de impurezas tales como pequeñas cantidades de BH4 libre en las muestras de éster pudo causar una pequeña cantidad de potenciación de eNOS; o que la estructura de relleno de espacio del éster de lisina o el éster de prolina permite un grado menor de interacción entre la porción de BH4 de la molécula y el sitio activo de eNOS.

Propiedades anti-hipertensivas de los análogos de BH4

En estudios previos, se determinó que las dosis de 10, 100 y 500 mg/kg/día de BH4 reducían la presión sanguínea de ratas Espontáneamente Hipertensas (SHR, por sus siglas en inglés) después de dos semanas de administración oral. Este estudio fue para determinar si los análogos de BH4 tenían un efecto hipertensivo similar y para determinar los perfiles farmacocinéticos (PK) en estado estable de las concentraciones de BH4 en el plasma.

Las ratas Wistar-Kyoto (WKY) y las ratas SHR machos (Elevage Janvier, Francia, 7 semanas de edad) se alojaron siete días antes del inicio de los experimentos con acceso libre a alimento estándar y agua y se mantuvieron en un ciclo invertido de 12 horas de oscuridad/luz (10:00/22:00). Después de un período de aclimatación de una semana, los animales se entrenaron para el sistema de manguito en la cola durante una semana (3 sesiones). Después de una semana, se realizaron dos mediciones de línea de referencia de la presión sanguínea.

Las ratas (10 semanas de edad) entonces recibieron tratamientos respectivos de agua, vehículo, 2, 10 o 30 mg/kg/día de análogo de BH4 (Ejemplo 5, Val-BH4) o 100 mg/kg/día de BH4 mediante la alimentación forzada oral (8 mL/kg, disueltos en ácido ascórbico 100 µM) realizado una vez al día durante 21 días de tratamiento. Las dosis del análogo de BH4 se prepararon como equivalentes de mg/kg de BH4 (calculados utilizando pesos moleculares de 2HCl de BH4 y análogos de BH4). El peso corporal se supervisó 3 veces a la semana y el peso corporal más reciente se utilizó para ajustar la captación diaria de fármaco y vehículo. Siete grupos experimentales de ratas se evaluaron: Grupo 1 – ratas WKY de presión sanguínea normal y alimentación forzada con agua; Grupo 2 – ratas SHR hipertensas y alimentación forzada con agua; Grupo 3 – ratas SHR hipertensas y alimentación forzada con vehículo; Grupo 4 – ratas SHR hipertensas y alimentación forzada de 100 mg/kg/día de BH4; Grupo 5 – ratas SHR hipertensas y alimentación forzada de 2 mg/kg/día de análogo de BH4; Grupo 6 - ratas SHR hipertensas y alimentación forzada de 10 mg/kg/día de análogo de BH4; Grupo 7 - ratas SHR hipertensas y alimentación forzada de 30 mg/kg/día de análogo de BH4. Para justificar la pérdida de animales o la descalificación de animales durante el manejo experimental, 10 ratas se utilizaron en cada grupo, con la expectativa de obtener resultados interpretables para por lo menos 8. La presión sanguínea sistólica (SBP, por sus siglas en inglés) y la frecuencia cardíaca (HR, por sus siglas en inglés) se midieron dos veces a la semana durante el período de tratamiento de 3 semanas.

La presión sanguínea sistólica (SBP) y la frecuencia cardíaca (HR) se midieron utilizando el método de manguito en la cola, dos veces antes del inicio del tratamiento y dos veces cada semana durante el período de tratamiento de 3 semanas (6 mediciones durante el período de tratamiento). Las ratas se colocaron en una contención de plástico y se calentaron a 20-30°C. Un sensor de pulsos neumáticos se unió a la cola. Después del inflamiento del manguito, la SBP se midió y la HR se determinó al contar los números de pulsos por minuto. Los datos para cada rata se tomaron un promedio de por lo menos 4 lecturas estables. Por lo menos 10 inflamientos del manguito se realizaron para cada medición de BP.

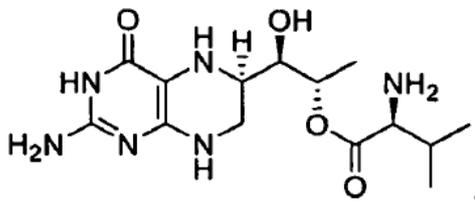
Las mediciones del peso corporal de cada uno de los grupos de ratas se muestran en la Figura 24. Ninguno de los tratamientos dio por resultado alguna modificación en el peso corporal. La Figura 25 muestra la SBP del grupo SHR tratado con agua contra el grupo WKY de control tratado con agua. La SBP de la rata SHR fue significativamente más alta que aquella de la rata WKY de control. La Figura 26 muestra la SBP de la rata SHR tratada con agua contra la rata SHR tratada con vehículo. El vehículo no tuvo un efecto significativo sobre la SBP de la SHR. La Figura 27 muestra la SBP de la rata SHR tratada con vehículo contra el tratamiento con 100 mg/kg/día de 6R-BH4. El tratamiento con 6R-BH4 dio por resultado una disminución de la SBP por aproximadamente 8,4 mm Hg después de 3 semanas de tratamiento. Las Figuras 28-30 muestran el efecto del tratamiento con 2, 10 y 30 mg/kg/día del Ejemplo 5 respectivamente sobre la SBP de la rata SHR. La administración diaria del Ejemplo 5 (Val-BH4) causó una disminución dependiente de la dosis en la SBP de 6,8, 13,9 y 13,7 mm Hg después de 3 semanas de tratamiento con 2, 10 y 30 mg/kg/día del Ejemplo 5, respectivamente. La Figura 31 muestra una comparación del efecto del tratamiento diario de 100 mg/kg/día de 6R-BH4 y 10 mg/kg/día del Ejemplo 5 (Val-BH4) sobre la SBP de la rata SHR. La administración diaria de 10 mg/kg/día del Ejemplo 5 durante 3 semanas disminuyó la SBP al mismo grado que una dosis 10 veces mayor de BH4 (100 mg/kg).

Un subconjunto de 12 animales (n=3 por grupo, con edades de 13,5 a 14,5 semanas) recibió una dosis oral final para la valoración de PK en el estado estable después de 4 a 5 semanas de tratamiento en cuatro grupos experimentales: Grupo 1 – ratas SHR hipertensas y alimentación forzada de 100 mg/kg/día de BH4; Grupo 2 – ratas SHR hipertensas y alimentación forzada de 2 mg/kg/día de análogo de BH4; Grupo 3 – ratas SHR hipertensas y alimentación forzada de 10 mg/kg/día de análogo de BH4; Grupo 4 – ratas SHR hipertensas y alimentación forzada de 30 mg/kg/día de análogo de BH4. Antes del tratamiento (Día -3 a Día -1), en una temporización similar a una hora antes de la alimentación forzada, se extrajo una muestra de sangre para la determinación de BH4 en el plasma en 12 animales en los cuales se evaluó la farmacocinética y en 32 ratas no designadas para la evaluación de la farmacocinética. Aproximadamente 250 µL de sangre entera se extrajeron de la vena de la cola bajo anestesia con isoflurano en cada uno de los siguientes puntos de tiempo: antes del tratamiento y 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 12 horas después de la alimentación forzada oral. La sangre se recolectó en microtubos con EDTA potásico. La sangre entonces se centrifugó durante 5 minutos a 4°C y 8000 RPM. Dos alícuotas de 45 µL de plasma se transfirieron a

dos nuevos microtubos enfiados que contenían 5 μ L de DTE 10 mM en PBS y se mezclaron. Las muestras entonces se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta que se analizaron.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene una fórmula



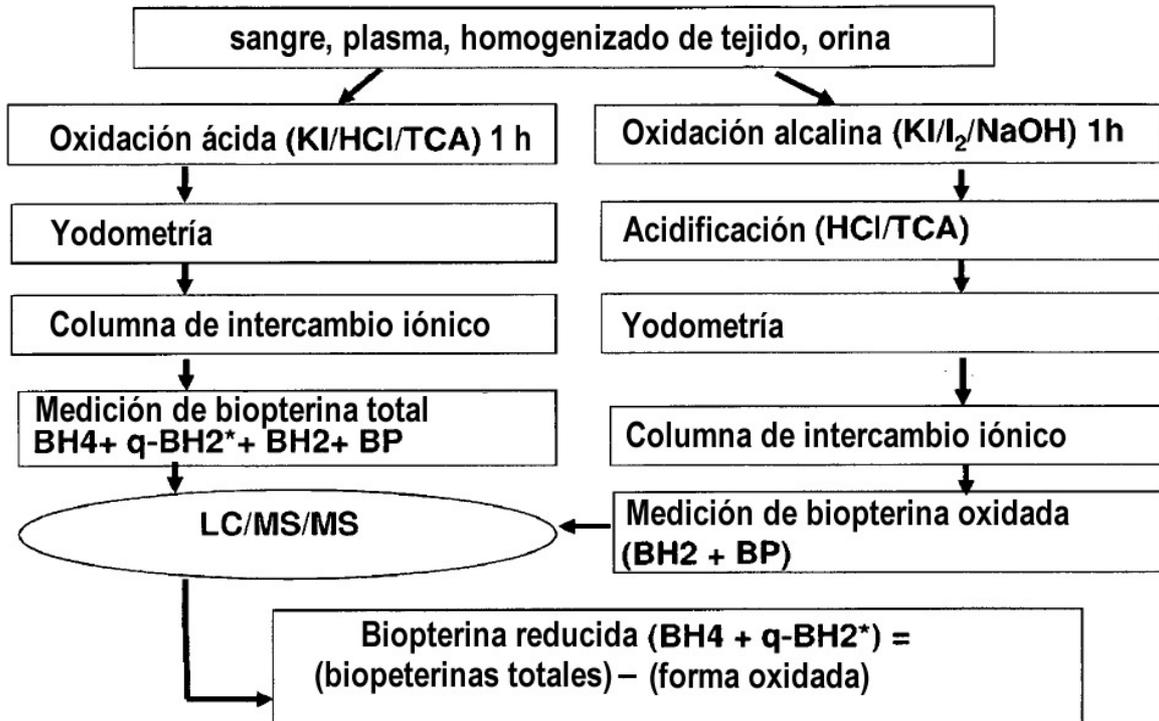
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5 2. Una composición que comprende un compuesto según la reivindicación 1 y un diluyente o soporte farmacéuticamente aceptable.
3. La composición según la reivindicación 2, en donde la composición es adecuada para su administración por vía oral.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en forma de un sólido o un líquido.
- 10 5. El compuesto según la reivindicación 1, o la composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, para su uso en el tratamiento de una afección que responde a BH4.
6. Un compuesto según la reivindicación 1, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, para su uso en el tratamiento de una afección que responde a BH4.
- 15 7. El compuesto para su uso según la reivindicación 6, en donde la afección que responde a BH4 se selecciona del grupo que consiste en hipertensión, enfermedad arterial periférica, claudicación intermitente, isquemia límbica crítica, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, disfunción endotelial, enfermedad vascular, diabetes tipo II, retinopatía diabética, síndrome metabólico, disfunción endotelial asociada con diabetes tipo I y nefropatía diabética.
8. El compuesto según la reivindicación 6, en donde la afección que responde a BH4 es una enfermedad vascular.
- 20 9. El compuesto según la reivindicación 8, en donde la enfermedad vascular es seleccionada del grupo que consiste en enfermedad vascular periférica, claudicación intermitente, enfermedad arterial coronaria, enfermedad vascular asociada con la hipercolesterolemia, enfermedad vascular asociada con el consumo de tabaco, hipertensión, hipertensión recalcitrante o incontrolada, hipertensión arterial pulmonar, hipertensión pulmonar idiopática, hipertensión pulmonar en el recién nacido (PPHN), aterosclerosis, apoplejía, espasmo vascular posterior a la apoplejía, infarto de miocardio, lesión por isquemia-reperfusión, insuficiencia cardíaca congestiva, lesión por isquemia-reperfusión posterior al trasplante, lesión vascular posterior al trasplante, espasmo vascular, trombogénesis, trombosis, espesamiento y coagulación.
- 25 10. El compuesto según la reivindicación 6, en donde la afección que responde a BH4 es anemia hemolítica asociada con la hemólisis o anemia depreanocítica.
- 30 11. El compuesto según la reivindicación 6, en donde la afección que responde a BH4 es un trastorno neuropsiquiátrico.
12. El compuesto para su uso según la reivindicación 11, en donde el trastorno neuropsiquiátrico es seleccionado del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, trastorno de hiperactividad con déficit de atención, enfermedad bipolar, autismo, depresión y distonía, un trastorno neuropsiquiátrico asociado con la deficiencia de BH4, o un trastorno neuropsiquiátrico asociado con la función reducida de tirosina hidroxilasa o la función reducida de triptófano hidroxilasa.
- 35 13. El compuesto para su uso según la reivindicación 6, en donde la afección que responde a BH4 es el síndrome metabólico asociado con hipertensión, hiperlipidemia, índice de masa corporal aumentado, resistencia a la insulina, o una combinación de las mismas.
14. El compuesto para su uso según la reivindicación 6, en donde la afección que responde a BH4 es

hiperfenilalanemia.

15. El compuesto según la reivindicación 14, en donde la hiperfenilalanemia se selecciona del grupo que consiste en fenilcetonuria suave, fenilcetonuria clásica, fenilcetonuria grave, hiperfenilalanemia asociada con deficiencia de BH4, hiperfenilalanemia asociada con un trastorno hepático e hiperfenilalanemia asociada con malaria.

FIGURA 1 - Diagrama de flujo de medición de la biopterina



*qBH2 se reduce inmediatamente *in vivo* a BH4, de manera que la biopterina reducida medida se basa principalmente en BH4.

FIGURA 2 - Resumen del ensayo de validación

Ensayo	LC/MS/MS Determinación de BH4 en plasma humano	HPLC Determinación de biopterina en Plasma humano
Nombre del analito	Tetrahidrobiopterina (BH4)	Biopterina
Nombre del analito (producto de oxidación)	L-biopterina	Biopterina
Estándar interno	Irbesartán	Biopterina
Tipo de método analítico	LC/MS/MS	HPLC (Ex 365 nm/Em 473 nm)
Método de extracción	Precipitación de proteínas	Precipitación de proteínas
Concentraciones QC	5, 15, 150, y 800 ng/mL BH4	1, 10, y 40 ng/mL biopterina
Concentraciones Curva Estándar	5, 15, 50, 100, 300, 500, y 1000 ng/mL	0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, y 50 ng/mL
Límite inferior de cuantificación	5 ng/mL	(5 ng/mL de biopterina)
Límite superior de cuantificación	1000 ng/mL	(50 ng/mL de biopterina)
Recuperación media del fármaco	65,3%	??
Recuperación media del estándar interno	94%	74-94%
Rango de precisión intradía de QC	4,7 a 14,5% de CV	0,8 a 13
Rango de precisión intradía de QC	-7,1 a 7,4% de Dif	-2,8 a 6,1
Rango de precisión entre días de QC	7,4 a 16,4% de CV	0,6 a 4,9
Rango de precisión entre días de QC	8,3 a 3,7% de Dif	??
Disolvente de la solución madre	MeOH:DMSO/50:50 (v:v)	
Ensayo de estabilidad (benchtop) en plasma humano	4,5 horas a Temperatura ambiente	??
Estabilidad de congelación/descongelación en plasma humano	4 ciclos a -70°C	2 ciclos a -20°C
Relación de conversión de BH4 a L-biopterina	47% (en 12 semanas)	??
Estabilidad a largo plazo en plasma K2EDTA	38 días a -70 °C	?? (7 días a -20 °C)
Integridad de dilución	1500 ng/mL diluido 10 veces	??
Selectividad	BH4	Biopterina total

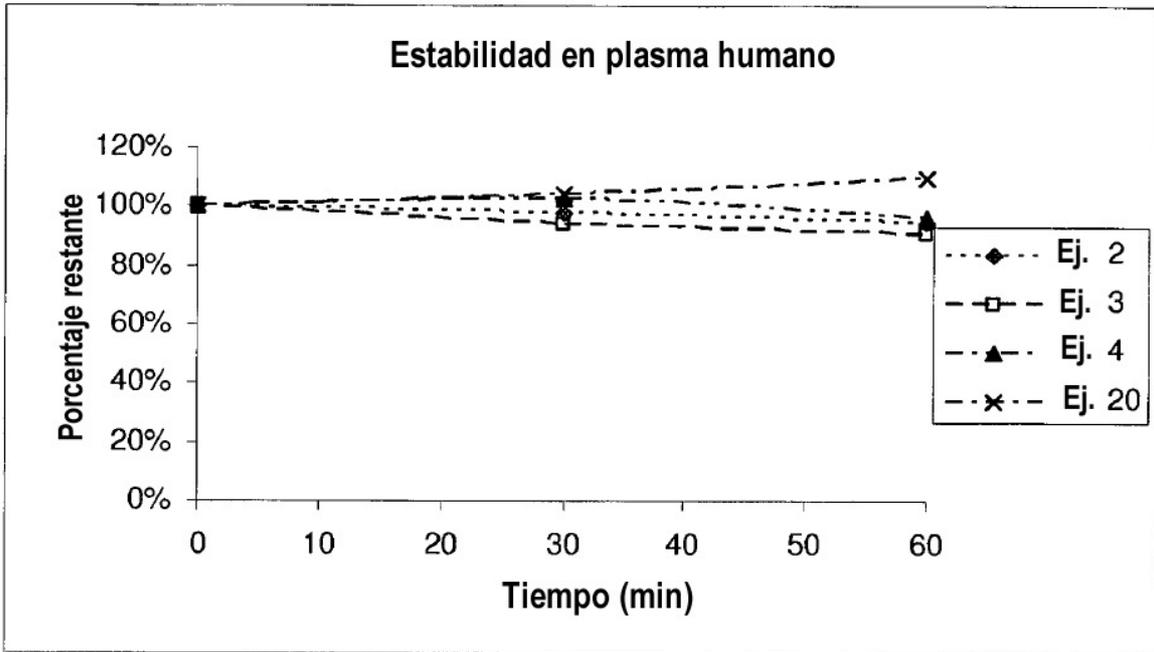


FIGURA 3

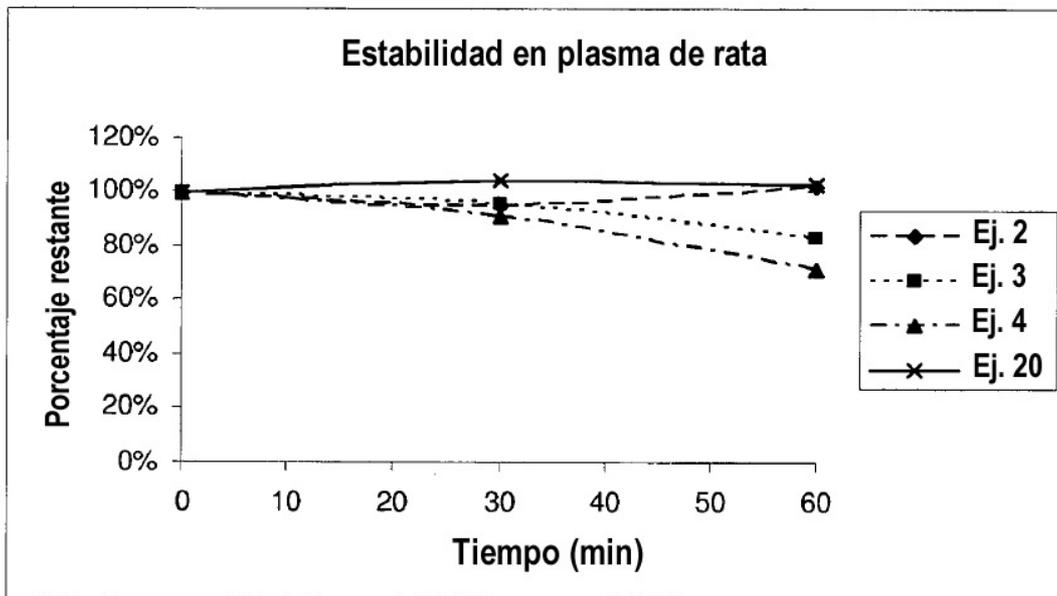


FIGURA 4

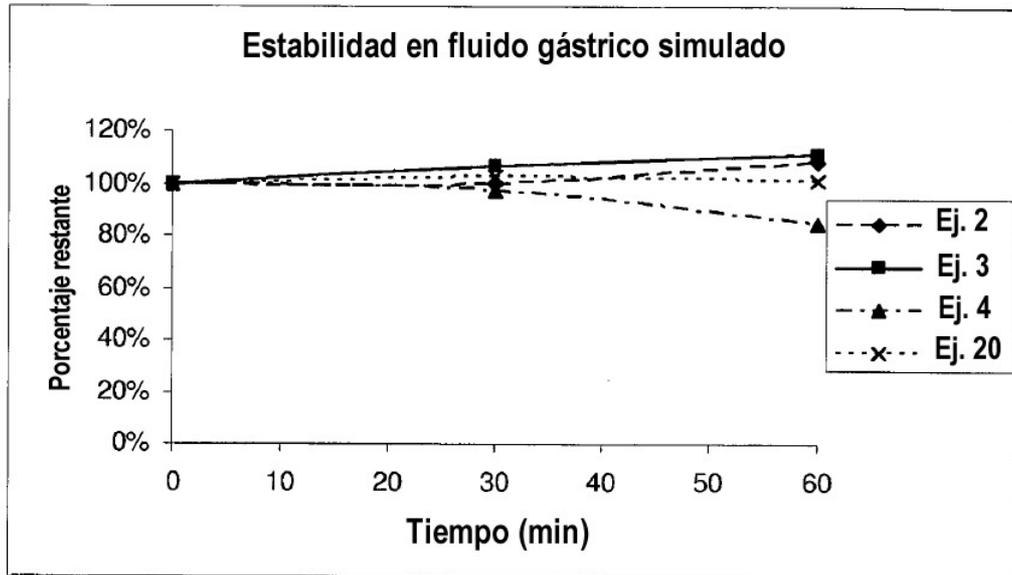


FIGURA 5

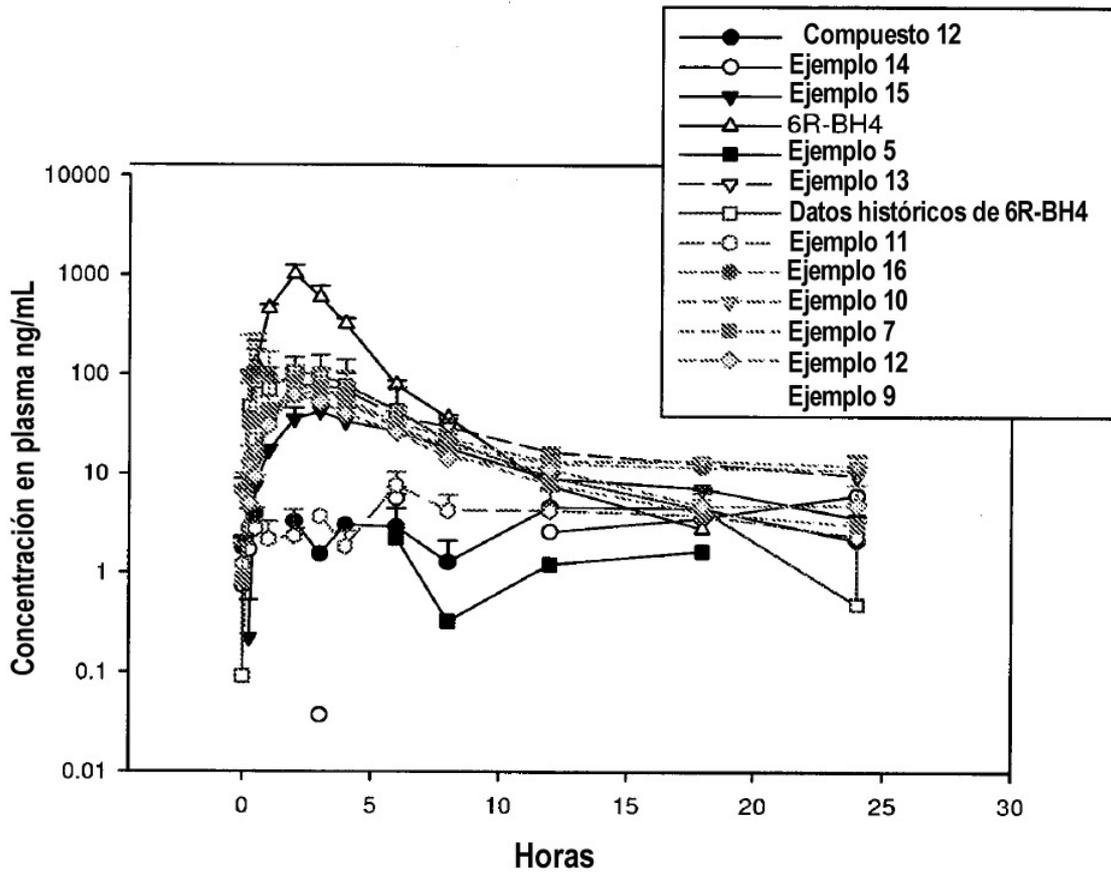


FIGURA 6

PK para mono Cinomolgus
Dosis IV de 6R-BH4, 2mg/kg

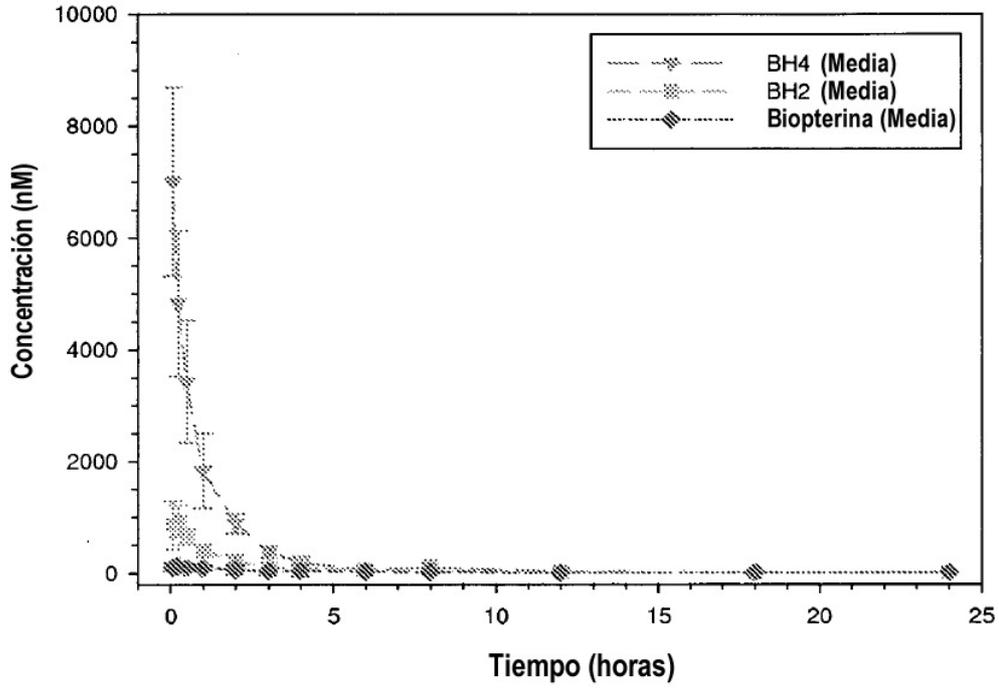


FIGURA 7

PK para Mono Cinomolgus
Dosis oral de 6R-BH4, 40 mg/kg

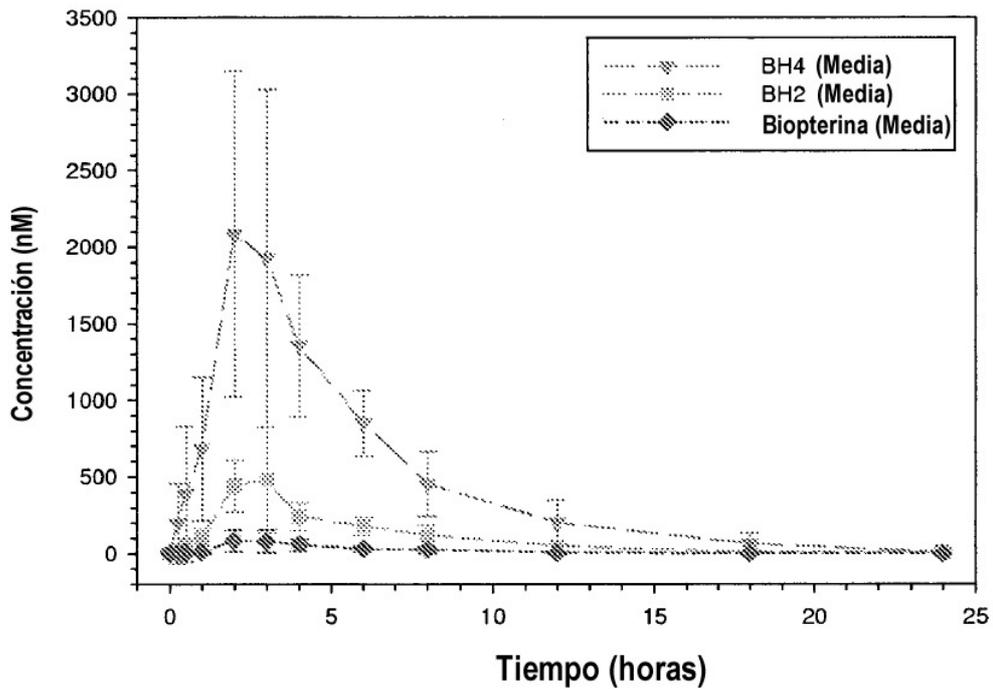


FIGURA 8

PK para Mono Cinomolgus
Dosis IV (equivalentes de BH4) de Val-BH4, 2 mg/kg

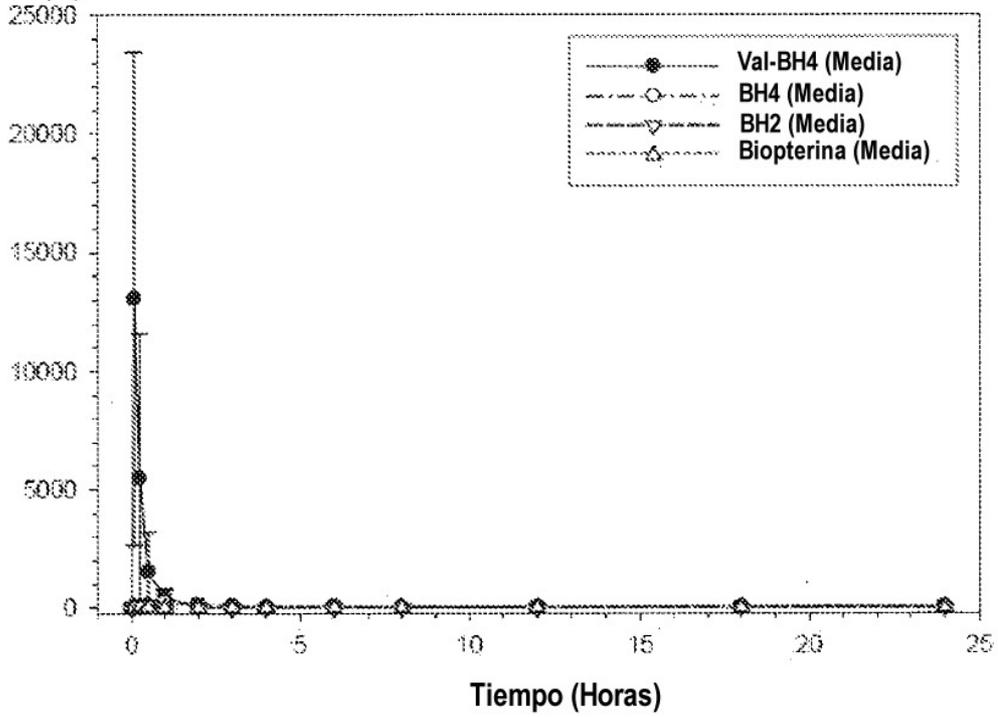


FIGURA 9

PK para Mono Cinomolgus
Dosis oral (equivalentes de BH4) de Val-BH4, 5 mg/kg

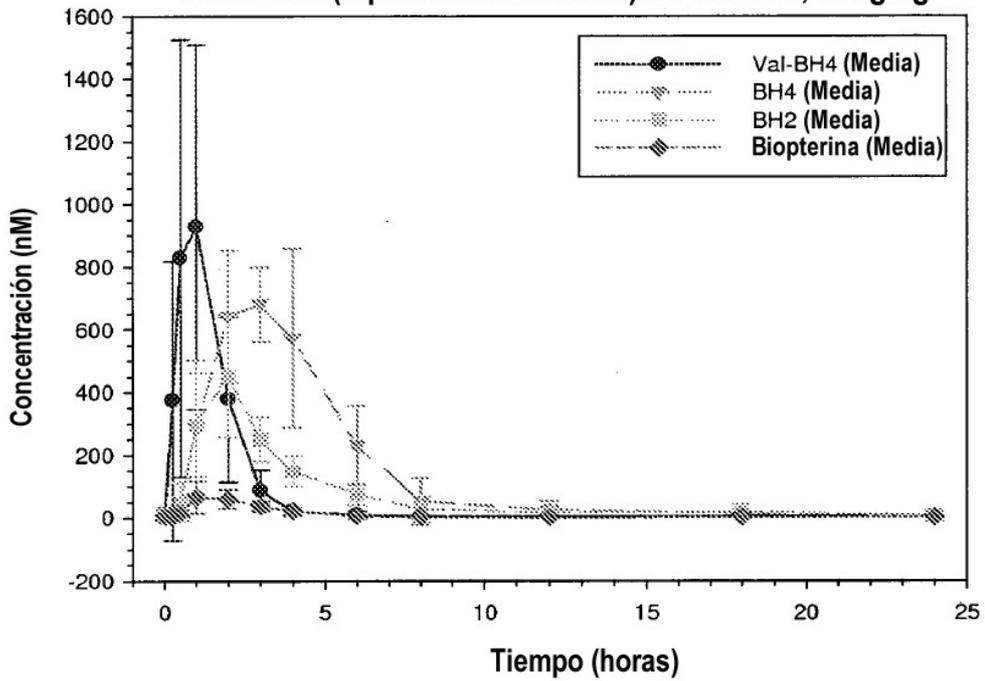


FIGURA 10

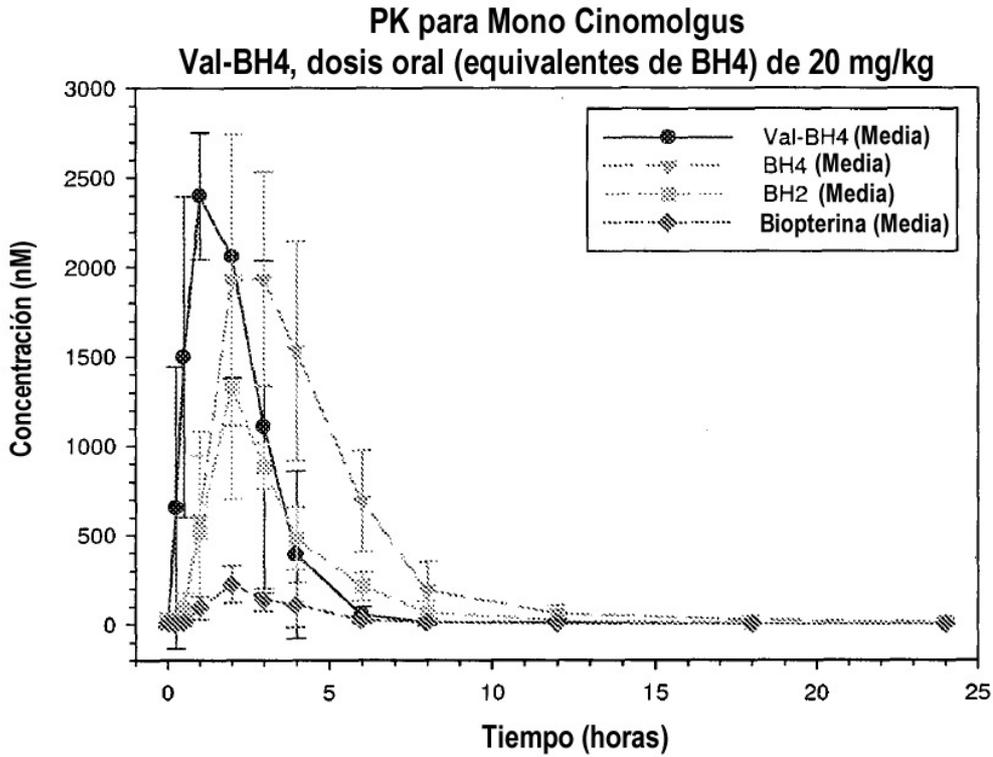


FIGURA 11

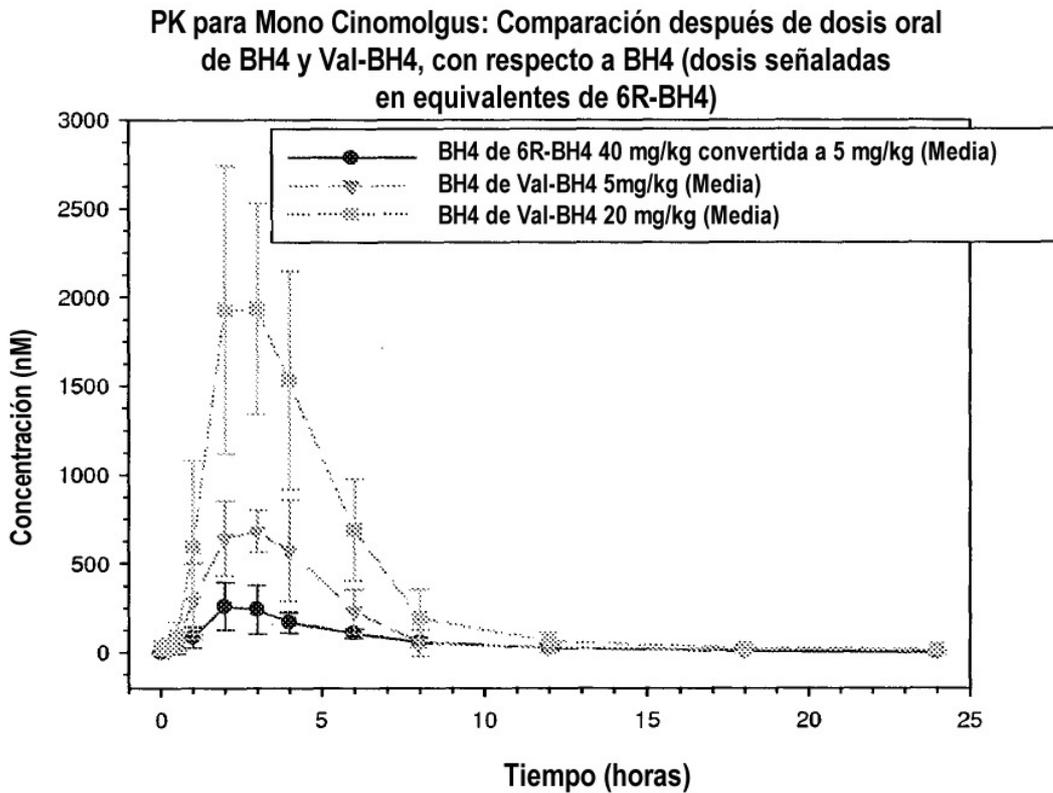


FIGURA 12

PK para Mono Cinomolgus: comparación de dosis IV
de 6R-BH4 (2 mg/kg) y Val-BH4 (2 mg/kg)
(Dosis señaladas en equivalentes de 6R-BH4)

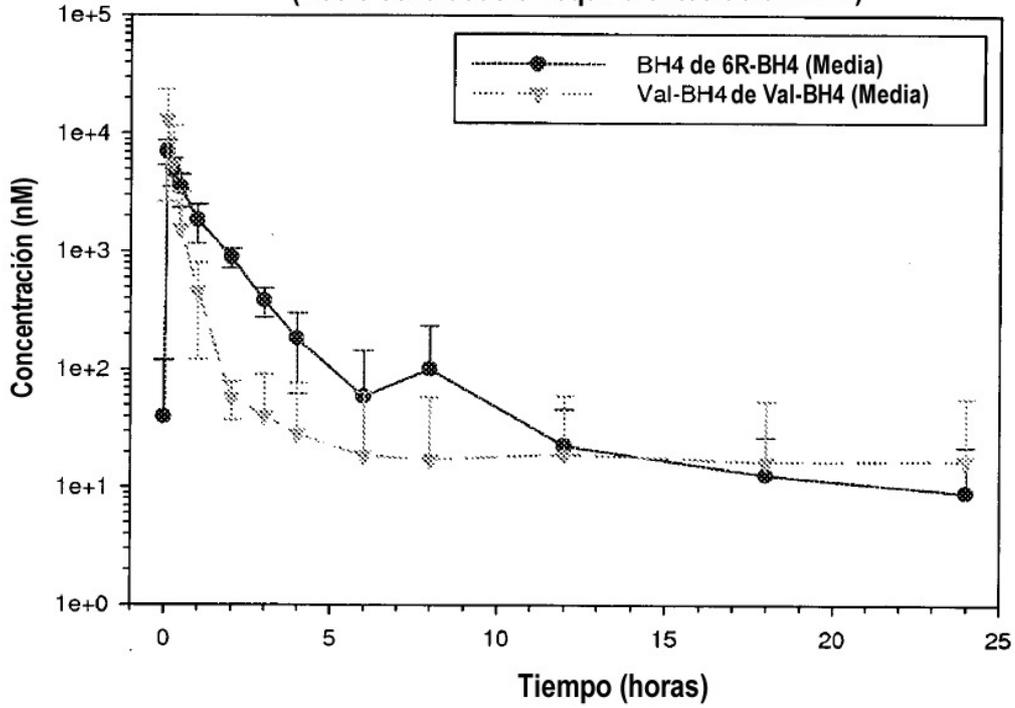


FIGURA 13

PK para Mono Cinomolgus: comparación de dosis IV
de 6R-BH4 (2 mg/kg) y Val-BH4 (2 mg/kg)
(Dosis señaladas en equivalentes de 6R-BH4)

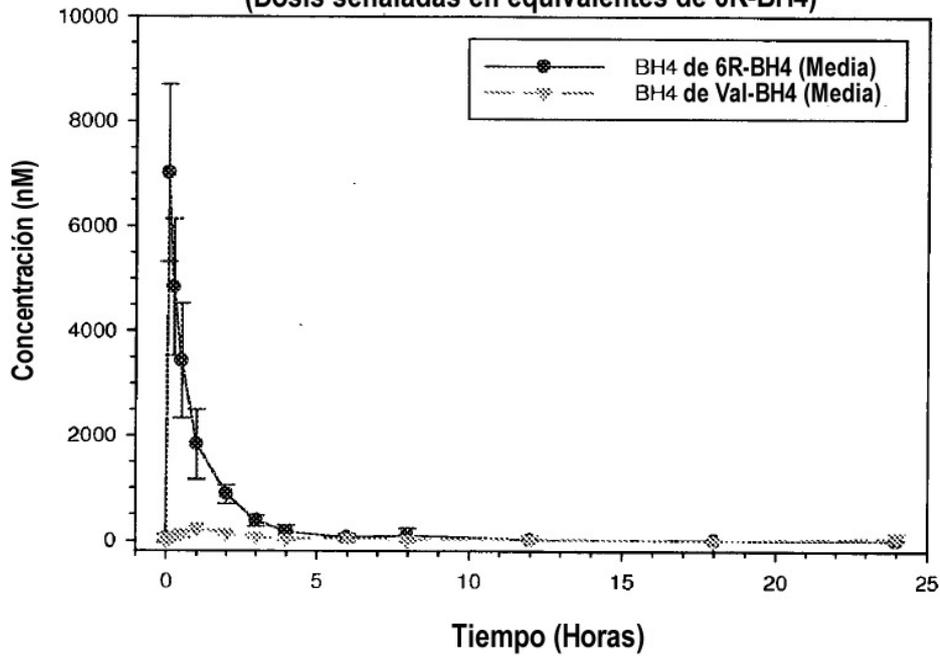


FIGURA 14

PK para Mono Cinomolgus: comparación de dosis IV de 6R-BH4 (2 mg/kg) y Val-BH4 (2 mg/kg) (Dosis señaladas en equivalentes de 6R-BH4)

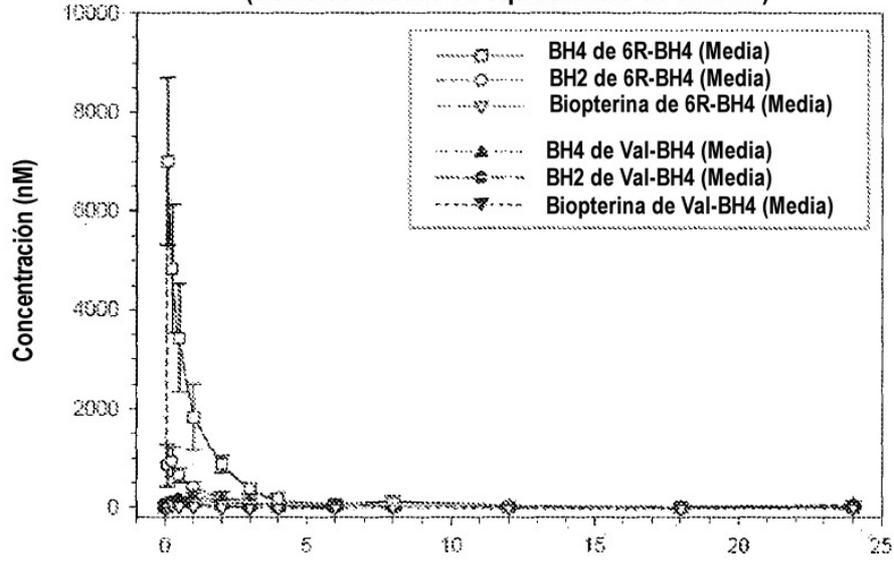


FIGURA 15

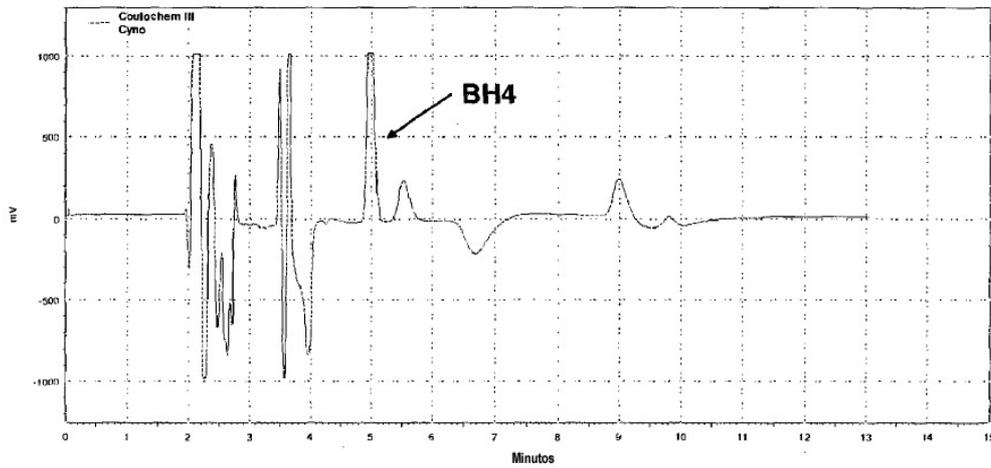


FIGURA 16 - Cromatograma de BH4 en plasma de Monos Cinomolgus, 2 horas después de la administración del compuesto del Ejemplo 5 (MeOH al 2% Fase Móvil)

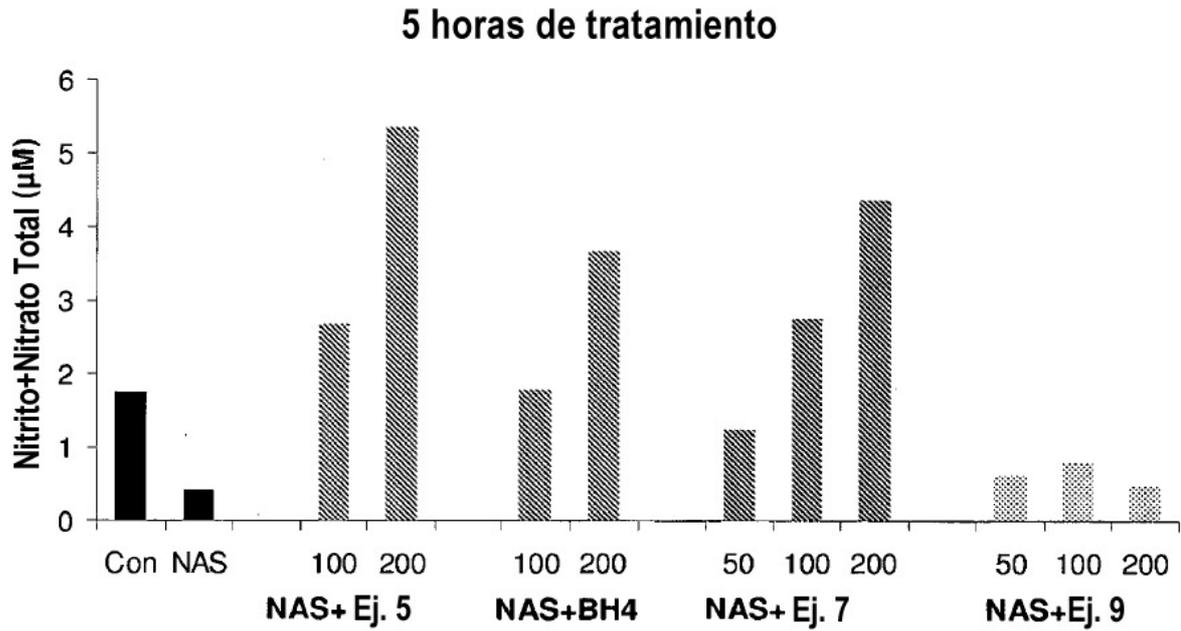


FIGURA 17

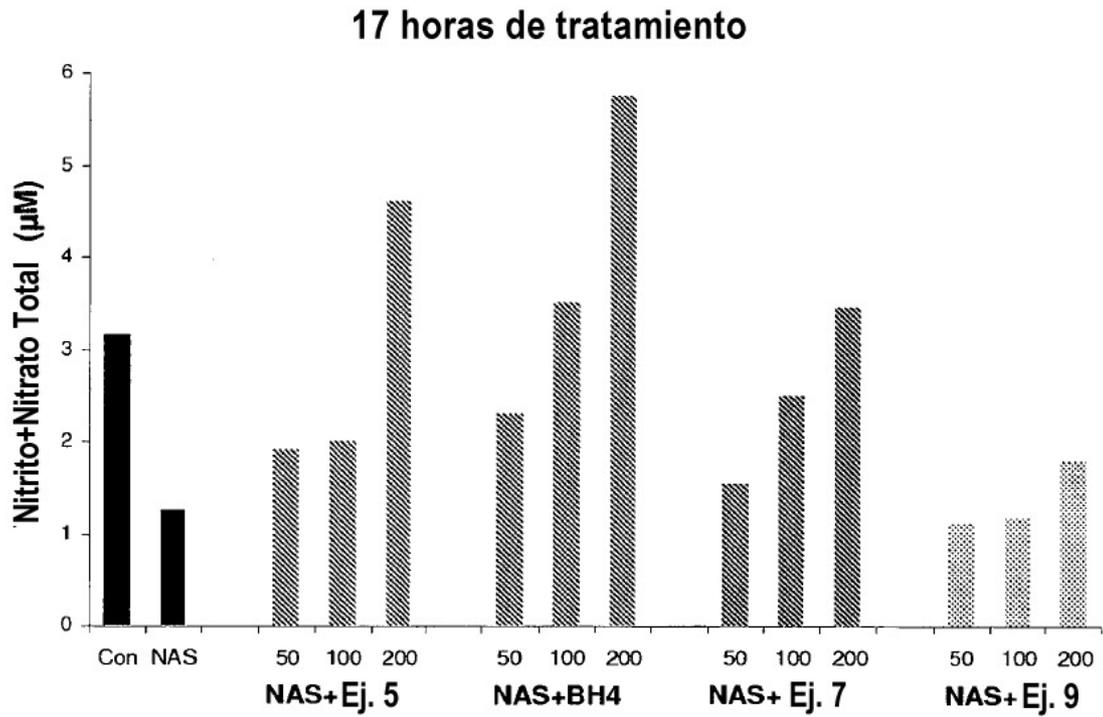


FIGURA 18

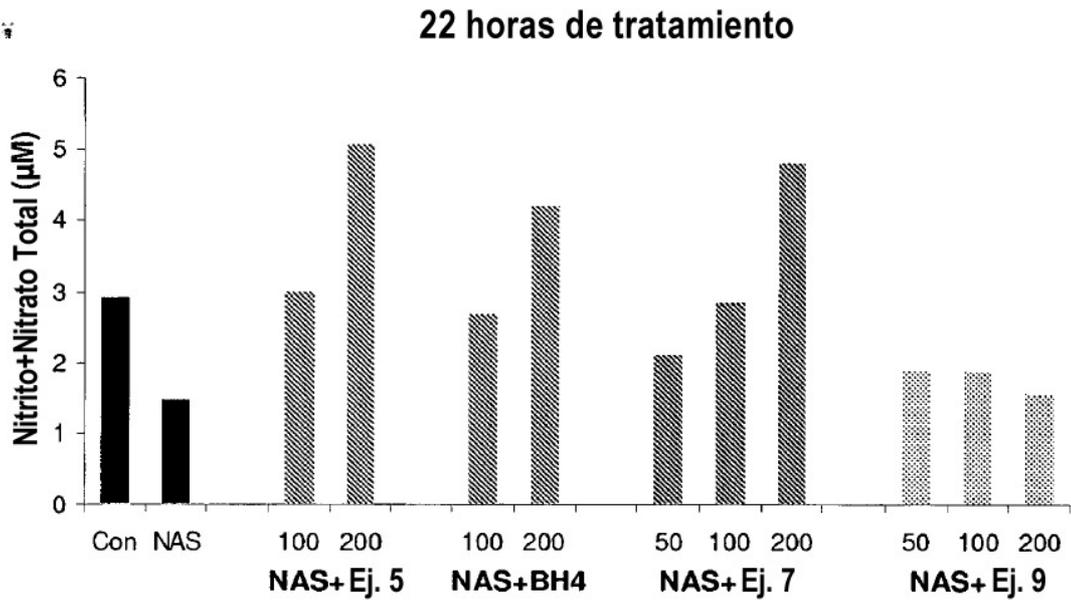


FIGURA 19

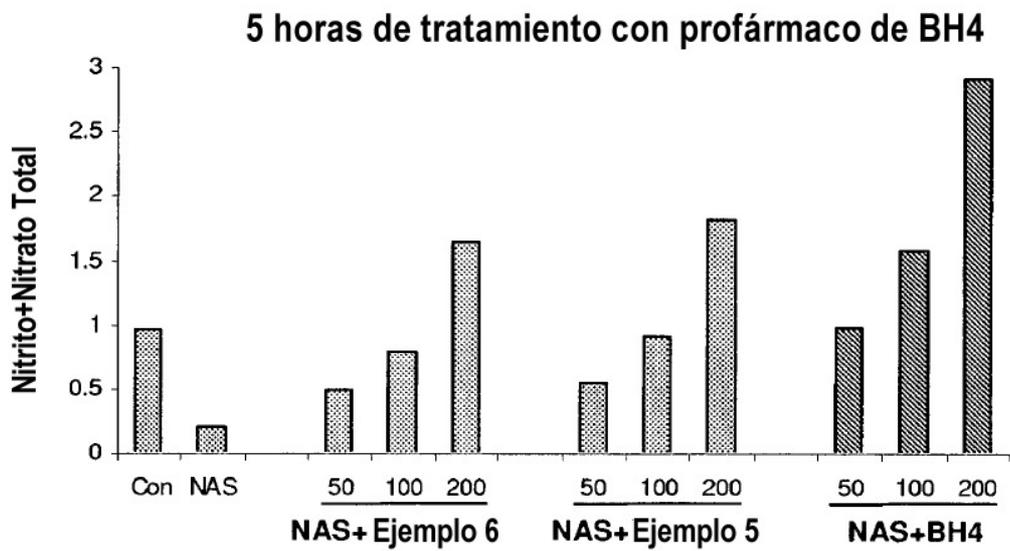


FIGURA 20

20 horas de tratamiento con profármaco de BH4

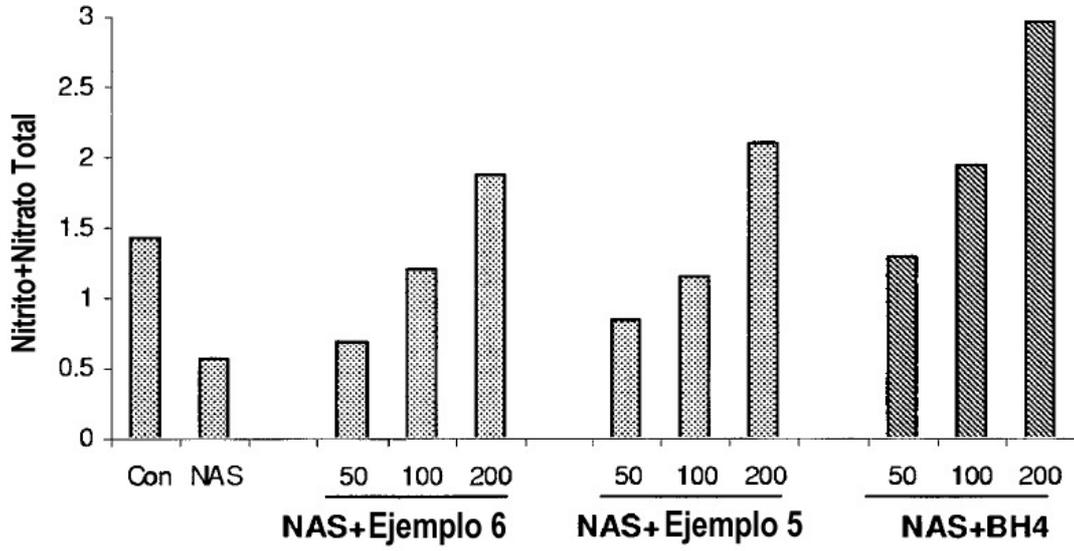


FIGURA 21

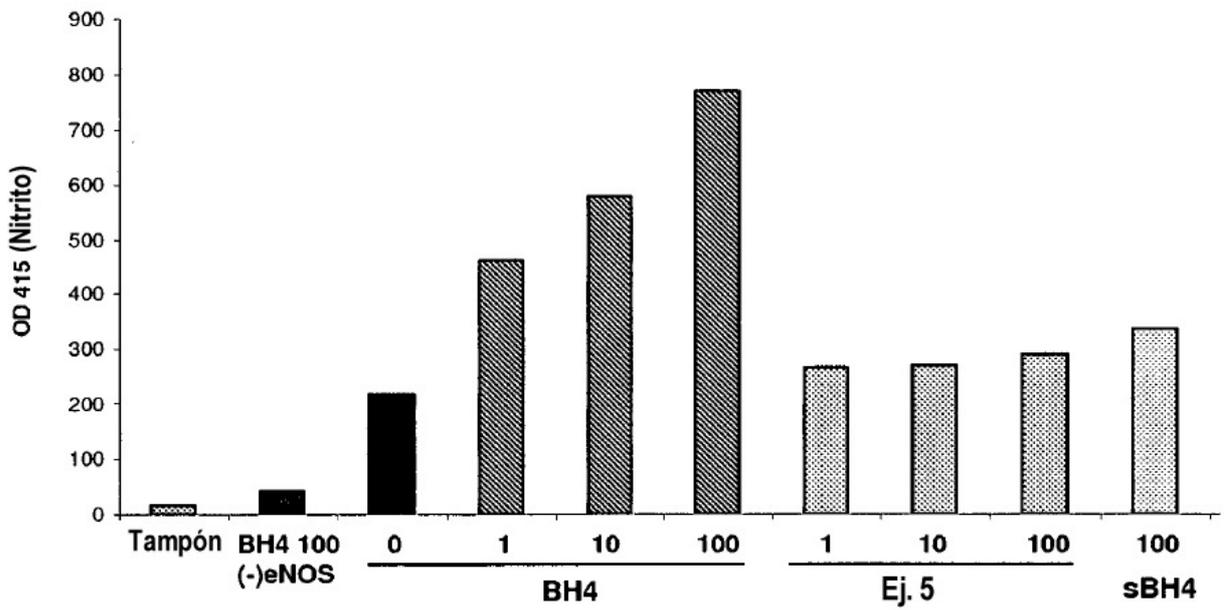


FIGURA 22

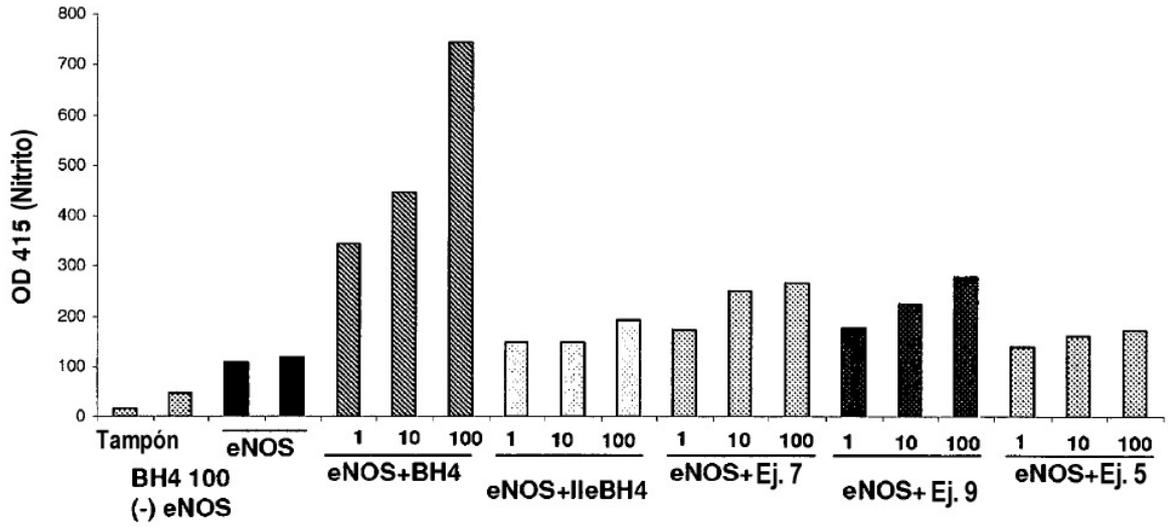


FIGURA 23

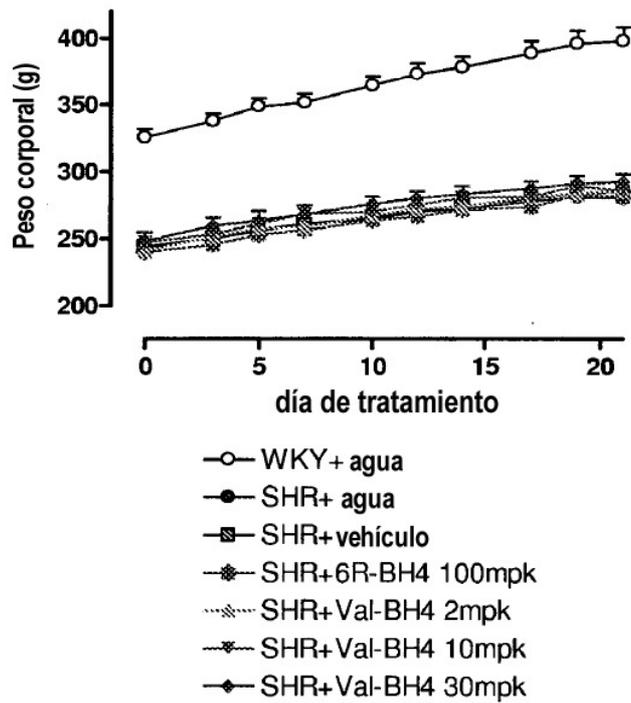


FIGURA 24

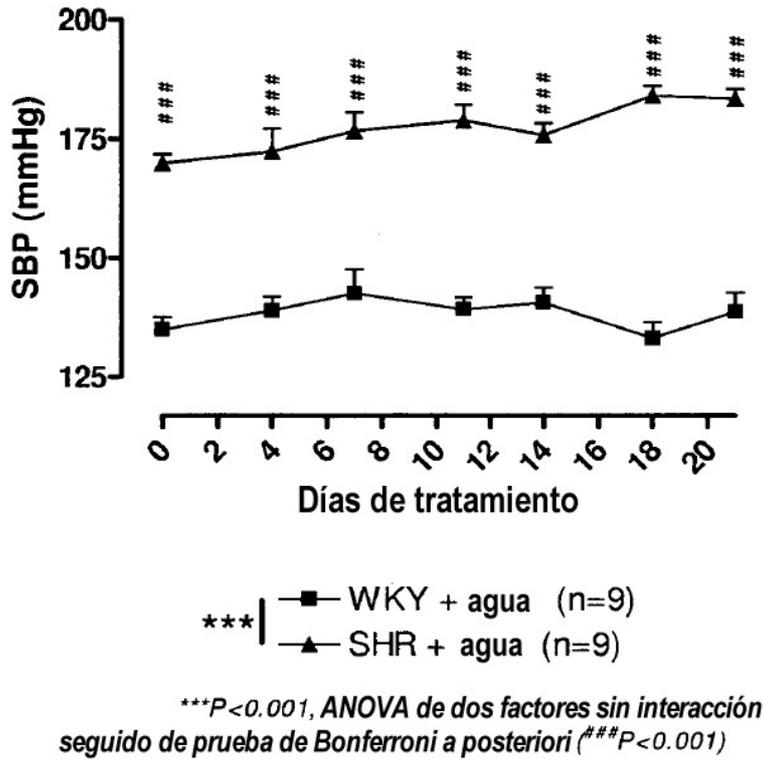


FIGURA 25

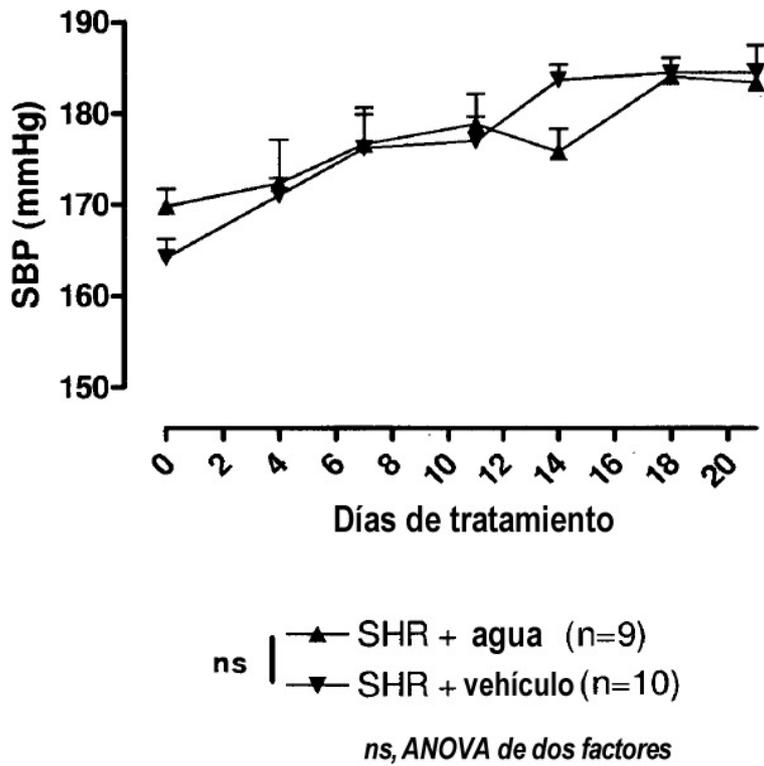
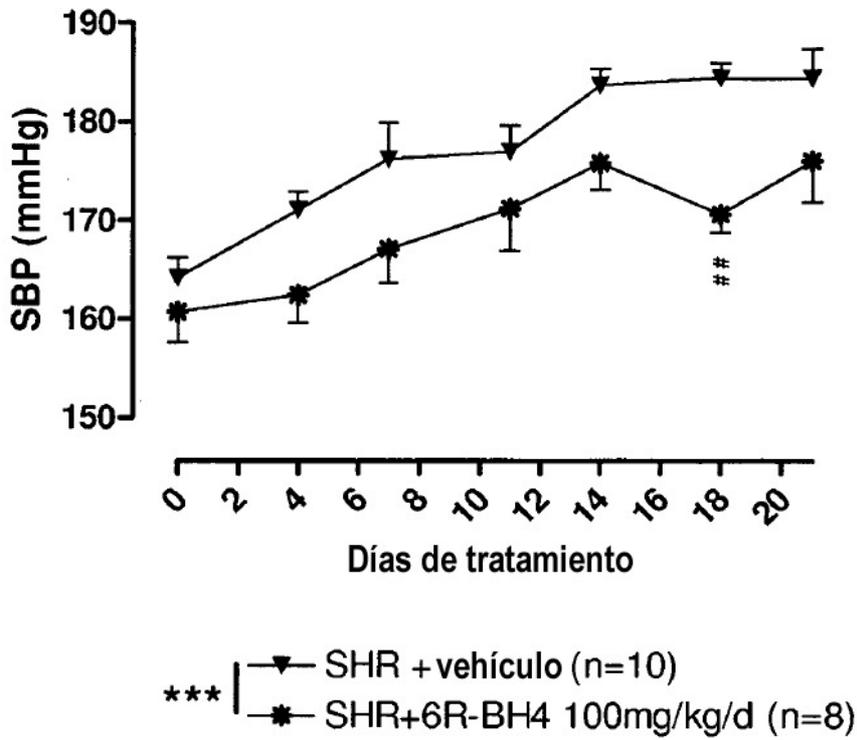
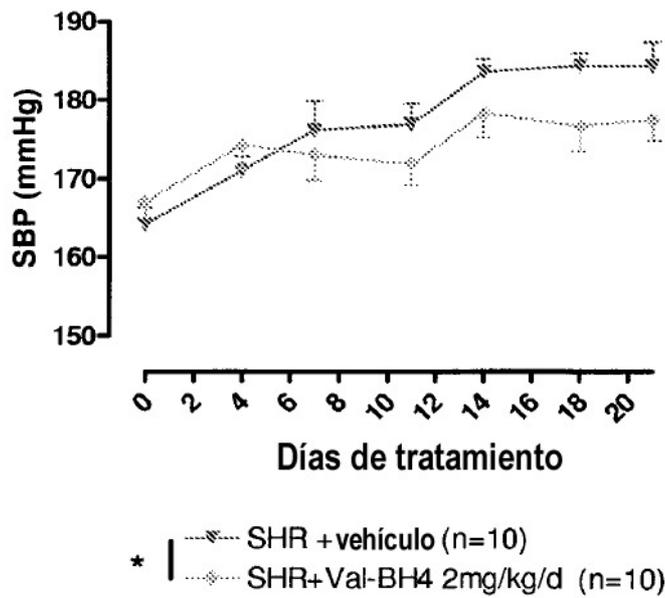


FIGURA 26



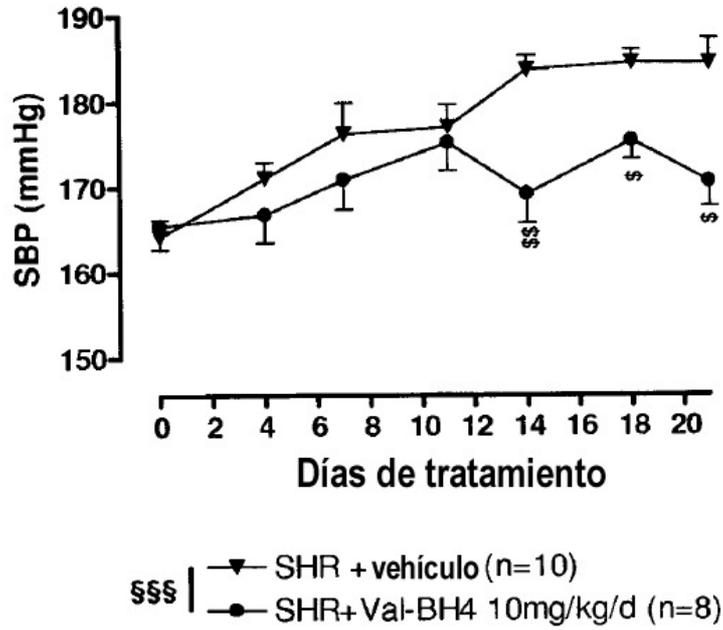
***P<0.001, ANOVA de dos factores sin interacción seguido de prueba de Bonferroni a posteriori (##P<0.01)

FIGURA 27



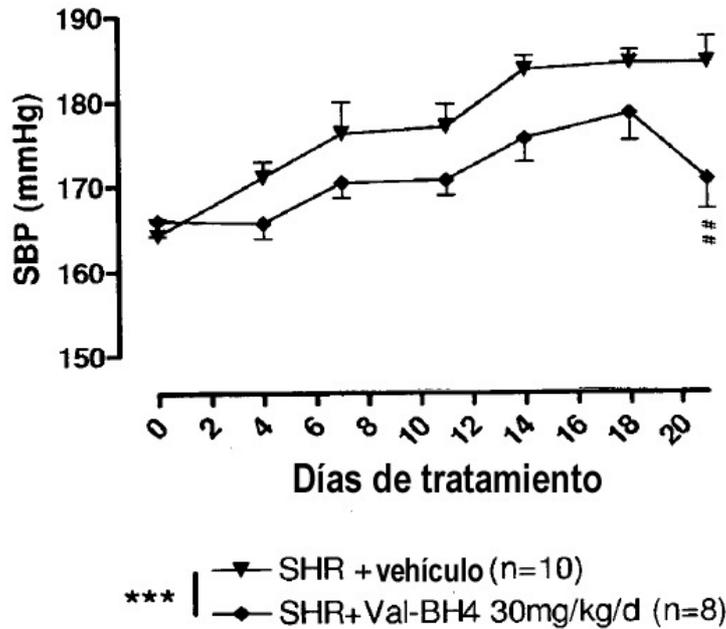
*P<0.05, ANOVA de dos factores sin interacción seguido de prueba de Bonferroni a posteriori (ns)

FIGURA 28



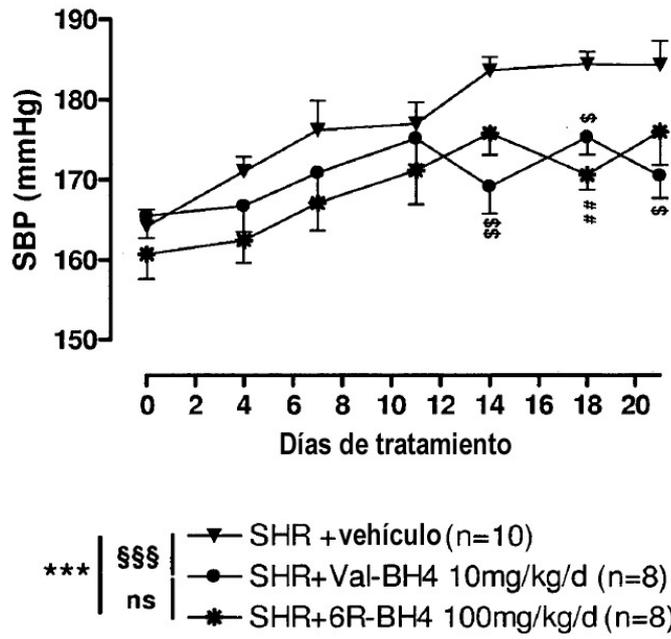
\$\$\$ $P < 0.001$, ANOVA de dos factores seguido de prueba T de Student modificada ($^{\$}P < 0.05$; $^{\$\$}P < 0.01$)

FIGURA 29



*** $P < 0.001$, ANOVA de dos factores sin interacción seguido de prueba de Bonferroni a posteriori ($^{\#\#}P < 0.01$)

FIGURA 30



\$\$\$ $P < 0.001$, ANOVA de dos factores sin interacción seguido de prueba T de Student modificada ([§] $P < 0.05$; ^{§§} $P < 0.01$)

*** $P < 0.001$, ANOVA de dos factores sin interacción seguido de prueba de Bonferroni a posteriori (^{##} $P < 0.01$)

FIGURA 31