(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 531 983**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/381 (2006.01)
A61K 31/4162 (2006.01)
A61K 31/502 (2006.01)
A61K 31/5517 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2010** **E 10763011 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014** **EP 2470176**

(54) Título: **Composición y método de tratamiento de deficiencias cognitivas en individuos con síndrome de Down**

(30) Prioridad:

25.08.2009 US 236625 P
25.08.2009 EP 09290643

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2015

(73) Titular/es:

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE - CNRS - (100.0%)
3, rue Michel Ange
75794 Paris Cedex 16, FR

(72) Inventor/es:

POTIER, MARIE-CLAUDE;
DODD, ROBERT;
DELATOUR, BENOÎT;
BRAUDEAU, JÉRÔME y
HERAULT, YANN

(74) Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 531 983 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

Composición y método de tratamiento de deficiencias cognitivas en individuos con síndrome de Down

Campo de la invención

Esta solicitud se refiere a compuestos que tienen selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para su empleo como medicamento en el tratamiento de deficiencias cognitivas en pacientes que padecen síndrome de Down. La presente solicitud además se refiere al empleo de compuestos que tienen selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para la preparación de un medicamento en el tratamiento de deficiencias cognitivas en pacientes que padecen síndrome de Down. La solicitud se refiere además a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de deficiencias cognitivas en pacientes que padecen síndrome de Down que comprenden un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable adecuada, un tensioactivo (agente activo en superficie o agente activo por tensión), tales como aceite de ricino polietoxilado y sulfóxido de dimetilo (DMSO).

La presente solicitud describe además métodos para potenciar la función cognitiva, o tratar o reducir la gravedad de deficiencias cognitivas, en pacientes que padecen síndrome de Down al administrar a un paciente en necesidad de los mismos una cantidad farmacéuticamente eficaz de uno o más compuestos que tienen selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5. Más específicamente, la presente solicitud se refiere al tratamiento de deficiencias cognitivas, tal como deficiencias en la memoria, capacidad de aprendizaje o ambos, en pacientes que padecen síndrome de Down.

Antecedentes de la invención

El síndrome de Down, conocido también como Trisomía 21, es la primera causa genética de retraso mental en el hombre. Es un trastorno genético causado por la presencia de la totalidad o parte de una tercera copia de cromosoma 21, que produce retrasos en el modo en que se desarrolla un niño, tanto mentalmente como físicamente. la mayoría de los libros de texto mencionan que la frecuencia del síndrome de Down es de uno entre 700 a 800 nacimientos.

Además de varias características físicas, el síndrome de Down con frecuencia, aunque no siempre, se caracteriza por grados variables de deficiencia cognitiva en la memoria, capacidad de aprendizaje o ambas. Mientras que los avances en los métodos de aprendizaje y una tendencia hacia la corriente principal educacional ha llevado a una mejora en el desarrollo cognitivo en aquellos que tienen síndrome de Down, quedan deficiencias constitutivas que no pueden abordarse completamente por metodología pedagógica sola.

Además, las personas con síndrome de Down están en situación de riesgo aumentado para determinados problemas médicos. Algunos de los problemas frecuentemente soportados por personas con síndrome de Down comprenden defectos cardíacos, problemas tiroideos, musculares, articulares, de la visión y de audición. Otras afecciones vistas con menos frecuencia en el síndrome de Down comprenden la leucemia y convulsiones. Se utilizan una variedad de diferentes propuestas para tratar estas afecciones médicas. Por ejemplo, si una persona con síndrome de Down presenta un trastorno de convulsiones, se beneficiaría de la toma de medicaciones anticonvulsionantes. Las personas con problemas de tiroides a menudo toman hormonas tiroideas restitutivas. Aunque estas medicaciones ayudan en su enfermedad, no curan el síndrome de Down.

Se han hecho intentos en la elaboración de fármacos para potenciar la función cognitiva en pacientes de síndrome de Down. Por ejemplo, se utiliza ampliamente piracetam como supuesto medio de mejora de la función cognitiva en niños con síndrome de Down. Sin embargo, ha habido informes que debilitan la proposición de que piracetam puede ser eficaz en la mejora de la función cognitiva en niños con síndrome de Down. (Lobaugh N.J. *et al.* Piracetam does not enhance cognitive abilities in moderate to high-functioning 7 to 13 year-old children with Down syndrome. Presentado en el congreso PAS/SPR en San Francisco el 3 de mayo de 1999; publicado en *Archives of Ped. and Adol. Med.*, Abril de 2001, 155(4):442-448 [ref. 4]). En este estudio, ni las medidas cognitivas ni las de comportamiento demostraron mejoras con piracetam, incluso a dosis asociadas a efectos adversos.

Al igual que los pacientes de síndrome de Down, los ratones Ts65Dn, un modelo murino de síndrome de Down que lleva un duplicado segmentario de parte del cromosoma 16 de ratón, ortólogo a la mayor parte del brazo largo del cromosoma 21 humano, demuestran faltas de aprendizaje y memoria, que supuestamente se deben a reducciones selectivas en el número de sinapsis excitadoras en el cerebro en lugar de gruesas anomalías en neuroanatomía. Teóricamente, los genes triplicados hallados en los ratones Ts65Dn desplazan el equilibrio óptimo de excitación e inhibición en el giro dentado (y otras partes del cerebro, quizás) a un estado en el que la excesiva inhibición oscurece por el contrario el aprendizaje y la memoria normales Reeves *et al.*, *Nature Genetics*, 11(2):177-84 (1995) [ref. 1].

Se ha demostrado recientemente que la utilización de antagonistas de $GABA_A$ en ratones Ts65Dn aumenta la memoria, el aprendizaje y la plasticidad neuronal (evaluado por protocolos de potenciación a largo plazo (PLP) (Kleschevnikov *et al.*, *The Journal of Neuroscience*, 24(37):8153-8160 (2004); [ref. 2]). Más recientemente, se ha

demostrado que la utilización de antagonistas de $GABA_A$ en un modelo murino de síndrome de Down (ratones Ts65Dn) normalizó la memoria y las faltas de aprendizaje declarativas en comparación con los ratones euploides. (F. Fernández *et al.*, "Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of Down syndrome,"*Nature Neuroscience*, Advance Online Publication, (25 de febrero de 2007; [ref. 3]).

Estos estudios sugirieron la aplicación potencial de antagonistas de $GABA_A$ para restablecer las actividades de aprendizaje y memoria en pacientes con síndrome de Down.

El documento WO01/38331 describe la utilización de agonistas completos o parciales del receptor α5 $GABA_A$ para potenciar el conocimiento, administrándose el compuesto en una cantidad eficaz por vía oral o en inyección, en forma de solución, en forma de emulsión, en forma de suspensión.

El documento WO 03/006471 describe la utilización de compuestos que actúan como agonistas inversos en el subtipo de receptor α5β3γ2 en el tratamiento de trastornos cognitivos entre otros los que proceden del síndrome de Down.

El documento Ballard *et al. Psychopharmacology*, 2008, 202 (1-3), págs. 207-223, describe el compuesto RO4938581 como un agonista inverso selectivo del receptor α5 $GABA_A$.

El documento Sternfeld *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2004, 47, págs 2176-2179 y Chambers *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2004, 47, págs. 5829-5832, describe el compuesto FG 8094 como un agonista selectivo inverso del receptor α5 $GABA_A$.

Desgraciadamente, muchos antagonistas de $GABA_A$ tienden a producir convulsiones en modelos animales así como en seres humanos, siendo evidente que no pueden utilizarse como agentes potenciadores de conocimiento en pacientes.

Hay una gran necesidad médica insatisfecha para el tratamiento de deficiencias cognitivas asociadas al síndrome de Down. A pesar del trabajo continuado, no cabe esperar tratamientos médicos notables para el retraso mental asociado al síndrome de Down. Actualmente, no se emplean medicinas para tratar el síndrome de Down, más bien se emplean medicinas para tratar otras enfermedades asociadas al síndrome de Down y otras enfermedades que pueden desarrollarse, tales como antibióticos para infecciones del oído y hormonas del tiroides para una glándula tiroides subactiva (hipotiroidismo).

Por lo tanto, hay necesidad de un tratamiento terapéutico de deficiencias cognitivas que no provoque convulsiones, tal como deficiencias en la memoria, capacidad de aprendizaje o ambos, en pacientes que padecen síndrome de Down. La presente invención cumple esta necesidad y proporciona también ventajas relacionadas.

Compendio de la invención

Las realizaciones de la presente invención satisfacen la anterior y nuevas necesidades, dichas realizaciones proporcionan la utilización en un método para el tratamiento o la reducción de la gravedad de deficiencias cognitivas en un individuo que padece síndrome de Down, que comprende la administración a un individuo necesitado del mismo de una cantidad eficaz de un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso por los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5, o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

La anterior y nuevas necesidades las satisfacen realizaciones de la presente invención, que proporcionan la utilización en un método para potenciar funciones cognitivas en un individuo que padece síndrome de Down, que comprende la administración a un individuo necesitado del mismo de una cantidad de un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso por los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5, o una cantidad eficaz potenciadora de funciones cognitivas de una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

La anterior y nuevas necesidades las satisfacen realizaciones de la presente invención, que proporcionan una composición farmacéutica para su empleo en el tratamiento o la reducción de la gravedad de deficiencias cognitivas en individuos que padecen síndrome de Down que comprende una cantidad eficaz de un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso por los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5, o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, en combinación con un tensioactivo (agente activo en superficie o agente activo por tensión), tal como aceite de ricino polietoxilado, como excipiente y sulfóxido de dimetilo como codisolvente.

Se reconocerán características y ventajas adicionales de la invención en consideración de la descripción siguiente y de las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada que expone realizaciones ilustrativas, en las que se utilizan los principios de la invención y los dibujos adjuntos:

La figura 1A representa la estructura de la triazoloftalazina α5-IA preparada por el método de Sternfeld y colaboradores [ref. 8] y utilizada en este estudio como su sal hidrocloruro. En el presente documento, este compuesto puede denominarse indistintamente α5IA, IAα5, α5-IA o IA-α5. En concreto, la denominación IAα5 o IA-α5 se empleó en las solicitudes de patente con prioridad.

La figura 1B representa un espectro de RMN de ^{1}H de 500 MHz de α5-IA tomado en $CDCl_3$.

La figura 1C representa resultados de un estudio de afinidad *in vitro* de α5IA para el sitio de reconocimiento de benzodiazepina del receptor GABAA en comparación con el de diazepam, dado como valores de IC50 y Ki molar, determinados por desplazamiento de [^{3}H]-flunitrazepam procedente tejido cerebral completo de rata [ref. 28]. Los valores son los promedios de tres determinaciones.

La figura 2 demuestra que la expresión génica de Gabra5 está inalterada en ratones Ts65Dn. La expresión del gen Gabra5, que codifica la subunidad de receptor α5-$GABA_A$, se midió en el hipocampo de ratones euploides y Ts65Dn utilizando RCP cuantitativa en tiempo real con transcripción inversa. El nivel de expresión del gen Gabra5 no era diferente en ratones Ts65Dn y en euploides (p >0,69).

La figura 3 representa resultados de un estudio sobre el efecto del tratamiento con α5IA en ratones Ts65Dn en una prueba de reconocimiento objeto (véase el ejemplo 2).

La figura 4 representa resultados de un estudio comparativo sobre el efecto de la administración i.p. en ratones de diferentes formulaciones de α5IA. "GIA" significa GABA Inverse Agonist (agonista inverso de GABA), y representa el compuesto α5IA. (véase el ejemplo 4).

La figura 5 representa resultados de un estudio del efecto respuesta a la dosis de α5IA. La dosis óptima de la sustancia α5IA que favorece la memoria se determinó en ratones adiestrados en la tarea DMTP. Figura 5A: Representación esquemática del protocolo DMTP. Cada día, los ratones se sometieron a 1 prueba de obtención y 3 pruebas de retención (el intervalo entre pruebas fue de 60 s). La posición de la plataforma se cambió cada día, pero permaneció constante en cada sesión.

Figura 5B: Eficacia (distancia a la plataforma; media ± SEM) de los ratones entre las pruebas de obtención y retención. Los datos se han agrupado en los siete días de adiestramiento. Todos los ratones presentaron un aumento significativo en exactitud de comportamiento en cada sesión (p<0,0001). Mientras que los ratones tratados con placebo y los ratones que recibieron 1 mg/kg de α5IA presentaron similar retención, los ratones que fueron tratados con la dosis de 5 mg/kg de α5IA presentaron una eficacia significativamente mayor (*p<0,05).

La figura 6 representa resultados de un estudio de comportamiento relacionado con la ansiedad de α5IA. Se evaluó la ansiedad en el laberinto en cruz elevado, tanto en ratones euploides como Ts65Dn con placebo o α5IA. El tiempo transcurrido en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado se tomó como medida de los niveles de ansiedad.

En estado placebo, los ratones Ts65Dn presentaban una tendencia a la hipoansiedad (aumento de tiempo en los brazos abiertos) en comparación con los ratones euploides. El tratamiento intensivo con α5IA (una sola inyección de 15 mg/kg i.p.; parte izquierda de la figura) no modificó el comportamiento de ratones euploides, pero redujo considerablemente el tiempo transcurrido en los brazos abiertos por los ratones Ts65Dn (p<0,05). Bajo los efectos del fármaco, los ratones Ts65Dn pasaron aún menos tiempo en los brazos abiertos que los ratones tratados con placebo (p<0,025), lo que podría ser la indicación de efectos ansiógenos leves de α5IA en este genotipo. Sin embargo, estos efectos podrían atribuirse también a una normalización de comportamiento en los ratones Ts65Dn que "de modo natural" presentan algunos rasgos de hipoansiedad.

Las inyecciones semiprolongadas de α5IA en ratones euploides (5 mg/kg 5 veces a la semana durante 2 semanas; parte derecha de la figura) no alteran los niveles de ansiedad (p>0,73).

La línea horizontal de puntos indica la eficacia inicial de los ratones tratados intensamente con placebo. *p<0,05 ns: no significativo.

El estudio demostró que α5IA no ocasionó comportamientos relacionados con la ansiedad.

La figura 7 representa resultados de un estudio de actividad locomotriz y ansiedad de α5IA en Ts65Dn y ratones euploides al descubierto. Se evaluaron los efectos de α5IA (5 mg/kg) sobre la locomoción y la ansiedad al descubierto.

Figura 7A: Los análisis de actividad horizontal (distancias recorridas; media ± SEM) no indicaban ningún efecto de tratamiento (F<1), destacando que una sola inyección de α5IA no modificaba toda la actividad locomotriz tanto en ratones euploides como Ts65Dn. Además hubo un efecto significativo del genotipo (* p<0,025) que puede atribuirse a una hiperactividad global de ratones Ts65Dn en comparación con las camadas euploides y observado en todas las condiciones del tratamiento.

Figura 7B: Para evaluar la ansiedad durante la sesión al descubierto, se midió una relación de exploración periferia a centro (relación P/C; media ± SEM). Los análisis en este valor no pusieron de manifiesto ningún efecto de genotipo o factores de tratamiento (Fs<1).

El estudio demostró que α5IA no alteraba la actividad locomotriz ni la ansiedad de ratones Ts65Dn y euploides al descubierto.

La figura 8 representa resultados de un estudio de lesión histológica de α5IA después de tratamiento prolongado. Después del tratamiento prolongado con α5IA (5 mg/kg; 5 inyecciones/semana durante 5 semanas), se extirparon diferentes órganos y se prepararon para examen histopatológico de rutina. Según se ilustra,las tinciones con hematina-eosina no pusieron de manifiesto ninguna alteración macroscópica o microscópica significativa de tejido en el hígado o riñón en ninguno de los 3 grupos experimentales (ratones no inyectados, inyectados con placebo o tratados con α5IA). Los mismos resultados negativos se observaron después de la tinción de Schiff con ácido peryódico de los tejidos (no ilustrada). El examen de tejidos cerebral, hepático y renal a la luz polarizada puso de relieve la falta de cristales anormales en ratones que reciben inyecciones de α5IA. El tamaño y la distribución de cristales de orina (no ilustrados) parecía ser muy similar en los diferentes grupos. La barra de escala representa 100 µm. El estudio demostró que α5IA no produjo lesiones histológicas después del tratamiento prolongado.

La figura 9 representa resultados de un estudio de deficiencia espacial en ratones Ts65Dn. Después de la evaluación de la memoria espacial en el laberinto de agua de Morris, los ratones se adiestraron durante 4 días en una tarea de navegación visualmente guiada (plataforma señalizada visible). La eficacia se evaluó utilizando un índice de aprendizaje no sesgado (como en la Fig. 11). El análisis indicó que la precisión del comportamiento para situar la plataforma visible aumentó ligeramente en cada sesión ($p<0,03$) sin efecto de genotipo ($p>0,55$) o tratamiento ($p>0,16$). La línea de puntos horizontal en el 25% representa el nivel de eficacia debido a la navegación aleatoria en el tanque. Como se ilustra, todos los grupos adiestrados se comportaron en gran medida por encima de este nivel. El estudio demostró que las deficiencias espaciales en ratones Ts65Dn no eran debidas a insuficiencias visuales.

La figura 10 representa resultados de un estudio en el laberinto acuático de Morris. Un fuerte efecto de α5IA se observó sobre la tigmotaxia ("comportamiento de búsqueda de la pared"). Esta estrategia inadecuada para localizar la plataforma en el laberinto acuático disminuyó claramente en ratones después del tratamiento con α5IA, sobre todo en ratones Ts65Dn ($p<0,001$). El análisis de seguimiento indicó que los ratones Ts65Dn eran más tigmotácticos que los ratones de referencia ($p<0,0001$). Este efecto se observó bajo placebo ($p<0,00025$) y, en menor medida, tras el tratamiento con α5IA ($p<0,05$). El estudio demostró que α5IA eximía la utilización de estrategias de navegación de comportamiento irrelevante en el laberinto acuático de Morris.

La figura 11 representa resultados de un estudio de aprendizaje espacial en ratones Ts65Dn. El estudio demuestra que α5IA restableció el estudio de aprendizaje espacial en ratones Ts65Dn.

Figura 11A: Los ratones aprendieron a nadar en un tanque de agua para alcanzar una plataforma invisible (D1-6). Se evaluó la memoria espacial utilizando una prueba de ensayo con sonda (ES).

Figura 11B: Los datos sobre la eficacia de aprendizaje se han agrupado en dos bloques de tres días. Los ratones Ts65Dn demostraron disminución del índice de aprendizaje ($p<0,0025$) que se corrigió por tratamiento con α5IA.

Figura 11C: Un éxito se definió al alcanzar la plataforma antes de 90 s. Los ratones Ts65Dn presentaron una carencia ($p<0,025$) que se invirtió tras el tratamiento con α5-IA.

Figura 11D: Únicamente los ratones euploides presentaban una tendencia espacial para el cuadrante objetivo de la plataforma durante el ensayo con sonda ($p<0,05$). Para comentarios véase la ilustración.

Para las figuras 11B y 11D, las líneas de puntos horizontales en un 25% corresponden a eficacia aleatoria. (* $P < 0,05$, n= 8 para cada grupo)

La figura 12 representa resultados de un estudio de insuficiencia de actividad neuronal y de memoria de reconocimiento en ratones Ts65Dn. El estudio demostró que la α5IA potenció la actividad neuronal y alivió las insuficiencias de memoria de reconocimiento en ratones Ts65Dn.

Figura 12A: Cuando se adiestraron en la tarea de reconocimiento de objetos los ratones Ts65Dn presentaban memoria disminuida. Después de inyección de i.p. de α5IA (5 mg/kg), tanto los ratones euploides como Ts65Dn mejoraron en gran medida su eficacia y se suprimió la insuficiencia de reconocimiento de los ratones Ts65Dn. * Diferencia entre los grupos ($p<0,05$, n= 8 para cada grupo; ns: no significativa;) # Puntuación aleatoria de la eficacia por encima del 50% (#: $p < 0,05$; ###: $p<0,001$)

Figura 12B: Después de la obtención en la tarea de reconocimiento de objetos, los ratones se sacrificaron y sus cerebros se prepararon para la evaluación inmunohistoquímica cuantitativa de la proteína fos. Los histogramas representan el aumento relativo de inmunorreactividad de fos en ratones tratados con α5IA normalizada frente a valores obtenidos para sus camadas tratadas con placebo. En todas las regiones cerebrales muestreadas, excepto

el giro dentado, se observó un aumento significativo de fos después de la inyección de α5IA (*: p < 0,05; ***: p<0,001, n= 3-5 para cada grupo).

La figura 13 representa resultados de un estudio de actividad neuronal de α5IA durante una nueva tarea de reconocimiento de objetos. El estudio mostró un aumento de actividad neuronal por α5IA durante la nueva tarea de reconocimiento de objetos. Fotomicrografías representativas de las regiones cerebrales de interés (representadas en la microfotografía del hemisferio cerebral izquierdo: corteza del cuerpo calloso posterior (CCP), campo CA1 (CA1), giro dentado (GD) y corteza perirrinal (PRh)) inmunoteñida frente a la proteína fos en los diferentes grupos experimentales (barra de escala = 100 μm). Obsérvese el incremento total de inmunorreactividad de fos después del tratamiento con α5IA en todas las regiones de interés, excepto en el giro dentado. Esta figura es complementaria de la Fig. 12B.

La figura 14 resume los resultados obtenidos en el estudio de la figura 13. El análisis estadístico confirma las observaciones cualitativas ilustradas en la figura 13, a saber un aumento de actividad neuronal por α5IA en los ratones de referencia y Ts65Dn, en la corteza perirrinal y la corteza del cuerpo calloso posterior, así como en el hipocampo, en especial el campo CA1. Únicamente la actividad en el giro dentado no está significativamente afectada por el tratamiento.

Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la presente memoria están incorporadas por referencia.

Las definiciones publicadas en esta solicitud están destinadas a aclarar las expresiones utilizadas en toda esta solicitud. La expresión "en la presente memoria" significa en toda la solicitud.

Tal como se utiliza en la presente memoria, una "cantidad eficaz" de un compuesto o composición farmacéuticamente aceptable es una cantidad del principio activo farmacéutico que proporciona alivio temporal de una o más deficiencias de conocimiento in individuos que padecen síndrome de Down. Por lo tanto una cantidad eficaz de un principio activo farmacéutico es de esperar que proporcione alivio de capacidad de deficiente memoria, deficiente aprendizaje o de ambas. Aunque el alivio proporcionado se considera temporal, la persona experta en la técnica reconocerá que incluso una mejora temporal en la capacidad de aprendizaje puede tener un efecto beneficioso prolongado sobre el aprendizaje a largo plazo, a medida que el aprendizaje tiende a acumularse a lo largo del tiempo. Por lo tanto, el empleo del calificador "temporal" no está pensado para excluir potenciales mejoras a largo plazo en aprendizaje acumulativo. Dicha cantidad puede administrarse en una sola dosis o puede administrarse según un régimen, mediante el cual sea eficaz.

Como se emplea en esta memoria, "tratamiento" significa cualquier manera en la que los síntomas o la patología de una dolencia, trastorno o enfermedad mejoran o si no se alteran provechosamente.

Como se emplea en esta memoria, "actividad biológica" se refiera a las actividades *in vivo* de un compuesto o las respuestas fisiológicas que producen *la* administración de un compuesto, composición u otra mezcla. Actividad biológica, por lo tanto, comprende los efectos terapéuticos y la actividad farmacéutica de dichos compuestos, composiciones y mezclas.

Como se emplea en esta memoria, "actividad farmacéutica" se refiera a la actividad de los compuestos en la presente memoria para tratar o disminuir la gravedad de las deficiencias cognitivas en individuos que padecen síndrome de Down.

El término "agonista" está definido como un compuesto que aumenta la actividad de un receptor cuando se pone en contacto con el receptor.

El término "antagonista" está definido como un compuesto que compite con un agonista o agonista inverso por la unión a un receptor, inhibiendo o bloqueando de este modo la acción de un agonista o agonista inverso sobre el receptor. Sin embargo, un antagonista (conocido también como un antagonista neutro") no tiene ningún efecto sobre la actividad constitutiva del receptor.

La expresión agonista inverso" se refiera a un agente que se une al mismo punto de unión del receptor como un agonista para este receptor e invierte la actividad constitutiva de los receptores. Los agonistas inversos ejercen el efecto farmacológico opuesto de un agonista del receptor. Los agonistas inversos son eficaces contra determinados tipos de receptores (p. ej. determinados receptores de GABA) que tienen actividad intrínseca sin la acción de un ligando sobre ellos (denominada también 'actividad constitutiva').Los agonistas, antagonistas y agonistas inversos de receptores se unen a los mismos tipos de receptores. El efecto farmacológico de un agonista inverso se mide como el valor negativo del agonista principalmente debido a los resultados históricos del agonista ya conocido. Por consiguiente, si el agonista tiene un valor positivo y el agonista inverso tiene un valor negativo, el antagonista para el receptor retorna tanto al agonista como al agonista inverso a un estado neutro.

El término "individuo" se refiera a un animal, por ejemplo un mamífero, tal como un ser humano, quien es objeto de tratamiento, observación o experimento.

El término "selectivo" está definido como una propiedad de un compuesto mediante la cual una cantidad del compuesto suficiente para efectuar una respuesta deseada desde un tipo, subtipo, clase o subclase de receptor específico produce un efecto sustancialmente más pequeño o ninguno sobre la actividad de otros tipos de receptor.

Como se emplea en esta memoria, CE_{50} se refiere a una dosis, concentración o cantidad de un compuesto de ensayo específico que provoca una respuesta en función de la dosis al 50% de la expresión máxima de una respuesta específica que está inducida, provocada o potenciada por el compuesto de ensayo específico.

La CE_{50} para un agonista está destinada a designar la concentración de un compuesto necesario para conseguir el 50% de una respuesta máxima observada en un ensayo *in vitro*. Para agonistas inversos, CE_{50} está destinada a designar la concentración de un compuesto necesario para conseguir el 50% de inhibición de una respuesta del receptor procedente de concentraciones basales, sin compuesto.

Como se emplea en esta memoria, el término "coadministración" de compuestos farmacológicamente activos se refiere a la administración de dos o más entidades químicas independientes, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Coadministración se refiere a la administración simultánea de agentes independientes; a la administración simultánea de una mezcla de agentes; así como a la administración de un agente seguida de la administración de un segundo agente o agentes adicionales. En todos los casos, los agentes que se coadministran están pensados para actuar conjuntamente entre si.

Como se emplea en esta memoria, "farmacéuticamente aceptable" se emplea en la presente memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones, y/o formas farmacéuticas que están, dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuados para su utilización en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación utilidad/riesgo razonable.

Como se emplea en esta memoria, "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a derivados de los compuestos descritos en donde el compuesto original se modifica preparando una de sus sales de ácido o base (es decir, también comprende contraiones). Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables comprenden, pero no se limitan a, sales de ácido mineral u orgánico de restos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de restos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables comprenden las sales atóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario del compuesto original formado, por ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos atóxicos. Por ejemplo, dichas sales atóxicas convencionales comprenden las procedentes de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, fosfórico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como láctico, maleico, cítrico, benzoico, metansulfónico y similares.

Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención pueden sintetizarse a partir del compuesto original que contiene un básico o ácido resto por métodos químicos convencionales. Generalmente, dichas sales pueden prepararse haciendo reaccionar las formas ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiados en agua o en un disolvente orgánico, o en una mezcla de los dos; pueden utilizarse medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo.

El término "sal" significa sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables que pueden obtenerse por tratamiento de la forma básica de un grupo funcional, tal como una amina, con ácidos apropiados tales como ácidos inorgánicos, por ejemplo ácidos de haluros; por lo general ácido clorhídrico, bromhídrico, fluorhídrico o yodhídrico; ácido sulfúrico; ácido nítrico; ácido fosfórico y similares; o ácidos orgánicos, por ejemplo acético, propiónico, hidroxiacético, ácido 2-hidroxipropanoico, ácido 2-oxopropanoico, etanodioico, propanodioico, butanodioico, (Z)-2-butenodioico, (E)-butenodioico, 2-hidroxibutanodioico, 2,3-dihidroxibutanodioico, 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico, metansulfónico, etansulfónico, bencensulfónico, ácido 4-metilbencensulfónico, ciclohexansulfámico, 2-hidroxibenzoico, 4-amino-2-hidroxibenzoico y otros ácidos conocidos por el médico de familia cualificado.

Como se emplea en esta memoria, con la frase "principio activo farmacéutico" (o alternativamente "agente activo farmacéutico") se pretende expresar un compuesto o combinación de compuestos, al menos uno de dichos compuestos es un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para receptores de $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 según se describe con más detalle en la presente memoria. Por lo tanto, a menos que se limite de otra manera (p. ej. por los delimitadores "consistentes en o "consistentes esencialmente en") la relación de un principio activo farmacéutico requiere la presencia de al menos un compuesto con selectividad funcional de agonista inverso para receptores de $GABA_A$ que contienen la subunidad α5, pero pueden también comprender uno o más compuestos farmacéuticos adicionales que no restan importancia a, y en algunos casos pueden potenciar, la actividad del agonista inverso funcionalmente selectivo de receptores del subtipo α5 de $GABA_A$.

La frase, "derivado farmacéuticamente aceptable", como se emplea en la presente memoria, indica cualquier sal, éster, o sal de dicho éster farmacéuticamente aceptable, de dicho compuesto, o cualquier otro aducto o derivado que, tras la administración a un paciente, puede proporcionar (directa o indirectamente) un compuesto o un

metabolito o uno de sus residuos, según se describe de otra manera en la presente memoria . Los derivados farmacéuticamente aceptables comprenden por lo tanto, entre otros, profármacos.

Como se emplea en esta memoria, un profármaco es un compuesto que, tras la administración *in vivo*, se metaboliza o dicho de otra manera se convierte en la forma biológica, farmacéutica o terapéuticamente activa del compuesto. En otras palabras, un profármaco es un derivado de un compuesto, normalmente con actividad farmacológica considerablemente reducida, que contiene un grupo adicional que es susceptible de eliminación *in vivo* proporcionando la molécula original en forma de especie farmacológicamente activa. Para producir un profármaco, el compuesto farmacéuticamente activo se modifica de tal manera que el compuesto activo se regenerará por procesos metabólicos. El profármaco puede diseñarse para alterar la estabilidad metabólica o el transporte característicos de un fármaco, para enmascarar efectos secundarios o toxicidad, para mejorar el sabor de un fármaco o para alterar otras características o propiedades de un fármaco. En virtud del conocimiento de los procesos farmacodinámicos y del metabolismo de los fármacos *in vivo*, una vez un compuesto farmacéuticamente activo está identificado, los especialistas en la técnica farmacéutica generalmente pueden diseñar profármacos del compuesto [véase, es., Nogrady (1985) *Medicinal Chemistry* A Biochemical Approach, Oxford University Press, Nueva York, páginas 388-392].

Un ejemplo de un profármaco es un éster que se escinde *in vivo* para dar un compuesto de interés. Dichos ésteres pueden formarse por esterificación, por ejemplo, de cualesquiera de los grupos de ácido carboxílico (-C(=O)OH) en el compuesto original, con protección previa, cuando proceda, de cualesquiera otros grupos reactivos presentes en el compuesto original, seguido de desprotección si se necesita.

Ejemplos de dichos ésteres metabólicamente lábiles comprenden los de la fórmula -C(=O)OR en donde R es: alquilo C_{1-7} (p. ej., Me, Et, -nPr, -iPr, -nBu, -sBu, -iBu, tBu); aminoalquilo C_{1-7} (p. ej., aminoetilo; 2-(N,N-dietilamino)etilo; 2-(4-morfolino)etilo); y aciloxi-alquil C_{1-7} (p. ej., aciloximetilo; aciloxietilo; pivaloiloximetilo; acetoximetilo; 1-acetoxietilo; 1-(1-metoxi-1-metil)etil-carboniloxietilo; 1-(benzoiloxi)etilo; isopropoxi-carboniloximetilo; 1-isopropoxi-carboniloxietilo; ciclohexil-carboniloximetilo; 1-ciclohexil-carboniloxietilo; ciclohexiloxi-carboniloximetilo; 1-ciclohexiloxi-carboniloxietilo; (4-tetrahidropiraniloxi)carboniloximetilo; 1-(4-tetrahidropiraniloxi)carboniloxietilo; (4-tetrahidropiranil)carboniloximetilo y 1-(4-tetrahidropiranil)carboniloxietilo).

Además, algunos profármacos se activan mediante enzimas para dar el compuesto activo, o un compuesto que, tras otra reacción química, da el compuesto activo (por ejemplo, como en ADEPT, GDEPT, LIDEPT, etc.). Por ejemplo, el profármaco puede ser un derivado de azúcar u otro conjugado de glucósido, o puede ser un derivado de éster de aminoácido.

Se conocen profármacos de una variedad de compuestos y materiales y métodos para modificar los compuestos originales para crear los profármacos, y pueden adaptarse a la presente invención.

Otros derivados comprenden parejas de acoplamiento de los compuestos en las que los compuestos están unidos a una pareja de acoplamiento, p. ej. al estar químicamente acoplado al compuesto o físicamente asociado a él. Ejemplos de parejas de acoplamiento comprenden un marcador o molécula indicadora, un sustrato de soporte, un vehículo o molécula transportadora, un efector, un fármaco, un anticuerpo o un inhibidor. Las parejas de acoplamiento pueden estar unidas por enlaces covalentes a compuestos de la invención mediante un grupo funcional apropiado en el compuesto tal como un grupo hidroxilo, un grupo carboxilo o un grupo amino. Otros derivados comprenden la formulación de los compuestos con liposomas.

Algunas composiciones farmacéuticas ilustrativas y derivados farmacéuticamente aceptables se expondrán con más detalle en la presente memoria a continuación.

Descripción detallada de algunas realizaciones preferidas de la invención

Los receptores $GABA_A$ son canales iónicos para la entrada de ligandos que son los principales moduladores del tono inhibidor en todo el sistema nervioso central (SNC). Son el lugar de acción de numerosos fármacos clínicamente importantes, como por ejemplo benzodiazepinas (BZ), barbitúricos y anestésicos. Los receptores $GABA_A$ existen en forma de numerosos subtipos formados por el ensamblaje conjunto de polipéptidos de la subunidad de la familia de genes, la mayoría de los cuales contienen subunidades α, β y γ. Cada subtipo de receptor tiene un modelo distinto de expresión dentro del cerebro del mamífero, lo que sugiere una función fisiológica definida.

La fijación de GABA a su receptor puede modularse por la fijación simultánea de compuestos químicos a zonas alostéricas en el complejo del canal iónico, la más estudiada de las cuales es la zona de fijación a BZ. En base a sus efectos moduladores sobre la activación del receptor $GABA_A$ inducida por GABA, los ligandos de la zona a BZ se clasifican en agonistas (moduladores alostéricos positivos), agonistas inversos (moduladores alostéricos negativos) o antagonistas.

Los agonistas BZ ejercen su efecto al aumentar la frecuencia de abertura del canal en presencia de GABA produciendo un aumento en el flujo de cloruro a través del canal iónico para dar una hiperpolarización neta de las neuronas y una menor excitabilidad. En cambio, los agonistas inversos BZ disminuyen la frecuencia de abertura del

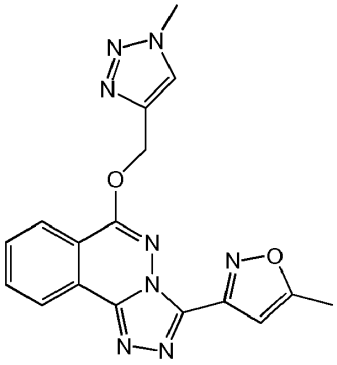
canal de GABA y de este modo aumentan la excitabilidad neuronal. Los antagonistas no tienen un efecto por sí mismos sobre la actividad GABAérgica. Sin embargo, inhiben los efectos de agonistas por competición.

Como se expuso anteriormente, se ha demostrado que los antagonistas del receptor de $GABA_A$ aumentan la memoria y el aprendizaje declarativo en un modelo murino de síndrome de Down (ratones Ts65Dn) [ref. 5]. Sin embargo, muchos antagonistas de $GABA_A$ tienden a producir convulsiones en modelos animales así como humanos, previniendo de este modo su utilización como agentes mejoradores de conocimiento en individuos.

En el campo relacionado de mejora del conocimiento en individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer y otras formas de demencias, los esfuerzos de investigación han vuelto a los agonistas inversos de $GABA_A$. Por ejemplo, se ha publicado que el agonista inverso β-CCM receptor de benzodiazepina aumentó el aprendizaje espacial en el laberinto acuoso de Morris (McNamara y Skelton, *Psychobiology*, 21(2):101-108 (2002) [ref. 5]; Véase también Venault *et al.*, *Nature*, 321(6073):864-866 (1986) [ref. 14]). Sin embargo, β-CCM y muchos agonistas inversos receptores de benzodiazepina convencionales son proconvulsionantes o convulsionantes lo que hace evidente que no pueden utilizarse como agentes potenciadores del conocimiento en seres humanos.

Se ha publicado que una alguna categoría de agonistas inversos de $GABA_A$ tienen propiedades de mejora cognitiva, sin los efectos proconvulsionantes o convulsionantes indeseados. Por lo tanto, los agonistas inversos funcionalmente selectivos en la zona de la benzodiazepina de los receptores α5 $GABA_A$ se ha descubierto que potencian el conocimiento en ratas y/o monos sin efectos secundarios ansiógenos ni proconvulsionantes. (Véase por ejemplo, Ballard *et al.*, *Psychopharmacology*, 202:207-223 (2009) [ref. 6]; Atack *et al.*, *Neuropharmacology*, 51:1023-1029 (2006) [ref. 7]).

Por ejemplo, se ha publicado que la triazoloftalazina α5IA se fija con igual afinidad al punto de fijación en la benzodiazepina de los receptores $GABA_A$ que contienen una subunidad α1, α2, α3 o α5 (Sternfeld *et al.*, *J. Med. Chem.*, 47:2176-2179 (2004) [ref. 8]; Dawson *et al.*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(3):1335-1345 (2006) [ref. 9]).



IAα5

Aunque α5IA no es selectivo por lo que se refiere a la afinidad de fijación, tiene eficacia agonista inverso selectiva para el subtipo α5 por que presenta agonismo inverso en este subtipo pero tiene poca eficacia o antagonista en los subtipos α1, α2 y α3 (Dawson *et al.* [ref. 9]). Por consiguiente, los efectos *in vitro* e *in vivo* de este compuesto se ejercen principalmente por receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 (Dawson *et al.* [ref. 9]). Más específicamente, se ha demostrado que α5IA aumenta la potenciación a largo plazo en un ensayo en cortes de hipocampo de ratón (supuesto modelo para remodelación sináptica asociada al aprendizaje y memoria) y para potenciar la eficacia cognitiva en variantes de la tarea del laberinto acuático de Morris (Dawson *et al.* [ref. 9]).

Recientemente, se ha demostrado que este mismo compuesto disminuye los efectos del etanol en la disminución del conocimiento en voluntarios normales sanos (Nutt *et al.*, *Neuropharmacology*, 53:810-820 (2007) [ref. 10]).

Se han descrito otros agonistas inversos funcionalmente selectivos en la zona de la benzodiazepina de receptores $GABA_A$ α5 (ref. 6 y 7).

Se ha sugerido que este tipo de compuesto encuentra utilización en el tratamiento de deficiencias cognitivas relacionadas con la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, hay una cuestión en cuanto a si este tipo de compuestos podría hallar de hecho utilización en dicho tratamiento.

De hecho por las recientes publicaciones sobre la enfermedad de Alzheimer se demuestra que las neuronas desinhibidas se degenerarán mientras que las neuronas menos excitadas (relativamente sobreinhibidas) sobrevivirán. (Schmitt 2005 «Neuro-modulation, aminergic neuro-disinhibition and neuro-degeneration. Draft of a comprehensive theory for Alzheimer disease» *Med. Hypotheses*. 2005; 65(6):1106-19. Epub 24 de agosto de 2005 [ref. 15]). En modelos de ratón de enfermedad de Alzheimer hay un aumento anormal en excitabilidad del sistema y mecanismos inhibidores compensadores en el hipocampo (Palop *et al.* «Aberrant excitatory neuronal activity and

compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease." *Neuron*. 6 de Sept. de 2007; 55(5):697-711 [ref. 16]). Por lo tanto la utilización de α5I1A podría no ser la mejor cura para la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, la eficacia de agonistas inversos funcionalmente selectivos en la zona de la benzodiazepina de los receptores $GABA_A$ α5 en la mejora del funcionamiento cognitivo, especialmente la memoria, el aprendizaje, o ambos en individuos que padecen síndrome de Down nunca se ha investigado ni publicado.

Los presentes investigadores han centrado, en parte, sus esfuerzos en el desarrollo de moléculas que potencian el funcionamiento cognitivo, especialmente la memoria, el aprendizaje, o ambos en individuos que padecen síndrome de Down, sin producir efectos secundarios significativos parecidos a los ansiógenos y/o convulsionantes o proconvulsionantes.

Se ha descubierto ahora que los compuestos que tienen selectividad funcional de agonista inverso para los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 pueden poseer superior eficacia en las deficiencias del tratamiento cognitivo relacionadas con el síndrome de Down. Por consiguiente, los presentes investigadores han demostrado que los agonistas inversos que son selectivos para el receptor $GABA_A$ α5 pueden utilizarse para proporcionar un medicamento que es útil para el tratamiento de deficiencias cognitivas en individuos con síndrome de Down. Este descubrimiento inesperado no tiene precedentes y puede conducir al desarrollo de tratamientos eficaces de deficiencias cognitivas relacionadas con el síndrome de Down.

Esto se basa en los presentes descubrimientos de los investigadores de que el tratamiento de ratones Ts65Dn con el agonista inverso α5IA de $GABA_A$ α5 funcionalmente selectivo no solamente restablece su insuficiencia mnésica sino además sorprendentemente aumenta su eficacia hasta el nivel del de los ratones salvajes también tratados con α5IA. De una manera totalmente inesperada, los ratones Ts65Dn tratados con α5IA funcionaron mejor en una tarea de reconocimiento de objetos que los ratones salvajes que recibieron placebo. Sin desear estar ligado a ninguna teoría, se cree que el efecto de α5IA en ratones Ts65Dn no es una mera "normalización" de eficacia cognitiva (es decir, retorno a niveles normales), como se observa en ratones Ts65Dn tratados con antagonistas de $GABA_A$ pentilentetrazol (Fernández *et al.* 2007), o un mero efecto promnésico. Por el contrario, se observa un efecto sinérgico que va más allá del mero retorno del estado patológico relacionada con la excesiva transmisión GABAérgica. Estos resultados, publicados en los ejemplos 2 y 3, demuestran que los compuestos que tienen selectividad funcional de agonista inverso por los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 pueden poseer eficacia superior en el tratamiento de deficiencias cognitivas relacionadas con el síndrome de Down, y pueden tener efectos terapéuticos y promnésicos dobles/sinérgicos. De por sí, representan candidatos prometedores para un tratamiento eficaz de deficiencias cognitivas en individuos que padecen síndrome de Down.

El aumento de eficacia observado podría no ser razonablemente esperado porque las sinapsis en los ratones trisómicos tienen más GABA. Por consiguiente podría esperarse que la inhibición de la actividad de GABA sería más difícil en ratones Ts65Dn. El agonista inverso α5IA presenta dos efectos más que podrían no ser razonablemente esperados:

1) Restablece deficiencias mnésicas de ratones Ts65Dn en comparación con ratones no tratados (esto no estaba previsto)

2) Aumenta también la eficacia de la memoria de ratones Ts65Dn, de manera que se vuelven tan eficaces como los ratones salvajes también tratados con α5IA

El trabajo publicado por Fernández *et al.* [ref. 3] con antagonistas de GABA (pentilentetrazol) no presentó ningún efecto de mejora del conocimiento en ratones tratados en comparación con los ratones no tratados de referencia.

Por consiguiente, en un aspecto, la presente invención proporciona métodos y formulaciones farmacéuticas para tratar o aliviar la gravedad de las deficiencias cognitivas relacionadas con el síndrome de Down, que comprenden la administración a un individuo que padece síndrome de Down de una cantidad eficaz de una composición que comprende un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5. Por lo tanto, la presente invención proporciona compuestos que tienen selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para su utilización como medicamento en el tratamiento de deficiencias cognitivas en pacientes que padecen síndrome de Down. La presente invención proporciona además la utilización de compuestos que tienen selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para la preparación de un medicamento en el tratamiento de deficiencias cognitivas en pacientes que padecen el síndrome de Down.

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos y formulaciones farmacéuticas para potenciar la función cognitiva en un paciente que padece síndrome de Down, que comprende administrar al paciente una cantidad que potencia la función cognitiva de un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para receptores de $GABA_A$ que contienen la subunidad α5. Por lo tanto, la presente invención proporciona compuestos que tienen selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para su utilización como medicamento para potenciar la función cognitiva en pacientes que padecen síndrome de Down. La presente invención proporciona además la utilización de un compuesto que tienen selectividad funcional de agonista inverso

para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para la preparación de un medicamento para potenciar la función cognitiva en un paciente que padece el síndrome de Down.

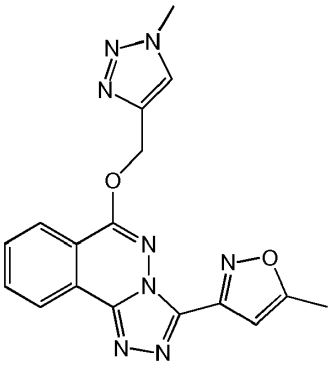
Por lo tanto, la presente invención pretende para mejorar la función cognitiva - p. ej. la memoria y el aprendizaje - en individuos cuya función cognitiva es deficiente como resultado del síndrome de Down.

1. Compuestos

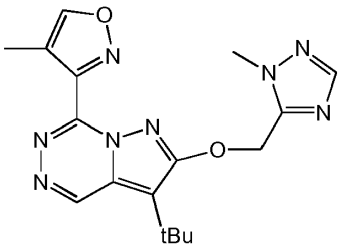
En grado mínimo, los compuestos útiles para llevar a cabo el método de la invención presentan selectividad funcional de agonista inverso para los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5, en los subtipos de receptores $GABA_A$ α1 α2 o α3.

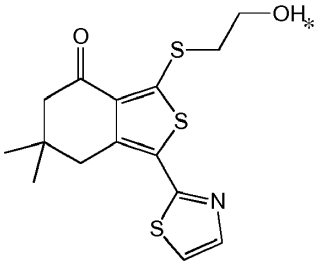
En algunas realizaciones ilustrativas, los compuestos presentan además afinidad de fijación selectiva para el subtipo de receptor $GABA_A$ α5, en los subtipos de receptores $GABA_A$ α1 α2 o α3.

En algunas realizaciones ilustrativas, el compuesto presenta una de las siguientes estructuras:

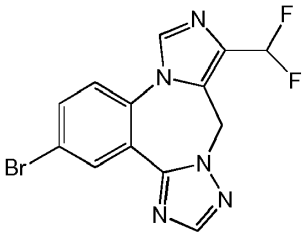


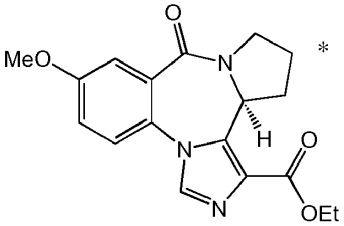
*





*





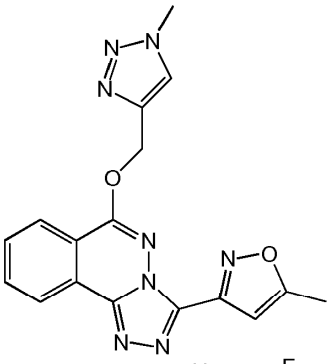
*

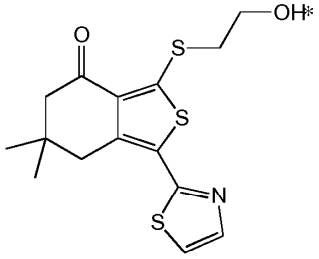
o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

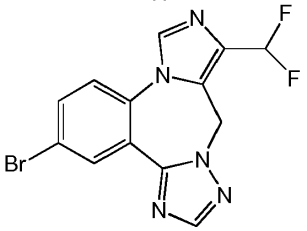
* fuera del alcance de la invención

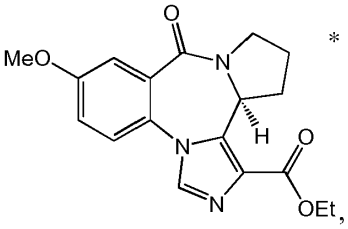
Se ha demostrado que los compuestos anteriores son agonistas inversos funcionalmente selectivos en la zona de la benzodiazepina de los receptores $GABA_A$ α5, aun cuando faltan los efectos secundarios indeseables asociados a la actividad de agonistas inversos en otros subtipos de receptores $GABA_A$ (es decir, ansiogenia o actividad convulsionante o proconvulsionante). (Sternfeld *et al.* 2004 [ref. 8], Chambers *et al.* 2004 [ref. 11] y Ballard *et al.* 2009 [ref. 6], respectivamente). Estos compuestos pueden prepararse por las metodologías descritas en las publicaciones anteriormente mencionadas.

En algunas realizaciones ilustrativas, el compuesto presenta una de las siguientes estructuras:





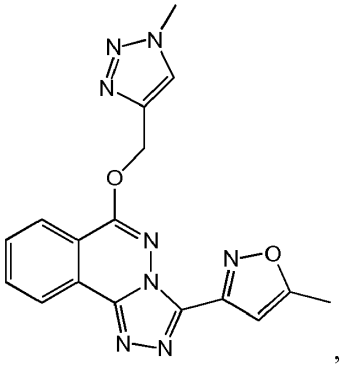




o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

* fuera del alcance de la invención

En algunas realizaciones ilustrativas, el compuesto presenta la siguiente estructura:



o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

2. Identificación de compuestos preferidos utilizando análisis que identifican compuestos que son funcionalmente selectivos para el subtipo de receptor $GABA_A$ α5

Afinidad/selectividad de fijación por el receptor

En algunas realizaciones, los compuestos útiles para llevar a cabo el método de la invención tienen selectividad funcional de agonista inverso por los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5. En algunas realizaciones preferidas, los compuestos son funcionalmente selectivos para la subunidad α5 como agonistas inversos parciales o completos a la vez que son sustancialmente antagonistas en las subunidades α1, α2 y α3. En algunas otras realizaciones, los compuestos de la invención son selectivos para la fijación para la subunidad α5 en comparación con las subunidades α1, α2 y α3.

Pueden seleccionarse empíricamente compuestos para tratar o aliviar la gravedad de defectos cognitivos relacionados con el síndrome de Down utilizando modelos animales *in vitro* o *in vivo* conocidos.

Por ejemplo, puede evaluarse la afinidad de los compuestos ent subtipos de receptores $GABA_A$, en particular el subtipo de receptor α5 $GABA_A$. Los compuestos pueden analizarse mediante competición medida por fijación de [^{3}H]flumazenilo a receptores que se expresan en células de composición α1β3γ2, α2β3γ2, α3β3γ2 y α5β3γ2, tales como los descritos en US 2006/0084642.

En algunas realizaciones, los compuestos presentan un valor Ki para desplazamiento de [^{3}H]flumazenilo procedente de subunidades α5 del receptor $GABA_A$ de rata de 100 nM o menos. En algunas realizaciones, los compuestos

presentan un valor de $Ki^{rata}\alpha_5 \leq 75$ nM, preferiblemente ≤ 50 nM, preferiblemente ≤ 25 nM, preferiblemente ≤ 20 nM, preferiblemente ≤ 10 nM, preferiblemente ≤ 5 nM, más preferiblemente ≤ 1 nM.

En algunas realizaciones, los compuestos son selectivos para el receptor de $GABA_A$ subtipo α5 en comparación con los subtipos α1, α2 y α3. Esta selectividad de fijación puede evaluarse también por competición medida para la fijación de [^{3}H]flumazenilo a células que se expresan en receptores de composición α1β3γ2, α2β3γ2, α3β3γ2 y α5β3γ2, tales como los descritos en el documento US 2006/0084642. En alguna realizaciones, la afinidad de fijación a los compuestos en el subtipo del receptor $GABA_A$ α5 es al menos 2 veces mayor, preferiblemente 5 veces mayor, más preferiblemente 10 veces mayor, más preferiblemente 20 veces mayor, más preferiblemente 30 veces mayor, más preferiblemente 40 veces mayor, más preferiblemente 50 veces mayor, aún más preferiblemente 60 veces mayor que su afinidad de fijación en los subtipos α1 α2 o α3 del receptor $GABA_A$. La afinidad de fijación en el subtipo α5 de receptor $GABA_A$ puede no ser mayor que los subtipos α1, α2 o α3 de receptor por una cantidad similar. Por ejemplo, la afinidad de fijación al subtipo α5 de receptor $GABA_A$ puede ser aproximadamente 10 veces mayor que el subtipo de receptor α3, aproximadamente 20 veces mayor que el subtipo α2 de receptor, y aproximadamente 60 veces mayor que el subtipo α1 de receptor (véase AIα5, Sternfeld *et al.* [ref. 7]),

Selectividad funcional del receptor

En algunas realizaciones, los compuestos útiles para llevar a cabo el método de la invención son funcionalmente selectivos para la subunidad α5. En determinadas realizaciones ilustrativas, los compuestos son funcionalmente selectivos para la subunidad α5 como agonistas inversos parciales o completos a la vez que son sustancialmente antagonistas en las subunidades α1, α2 y α3.

Puede demostrarse selectividad funcional al analizar los compuestos en registros de la técnica de fijación de membranas de células completas procedentes de fibroblastos de ratón que expresan de forma estable los subtipos de receptor $GABA_A$ humano, como han publicado Chambers *et al.* [ref. 11]. La eficacia *in vitro* puede medirse como la modulación máxima en porcentaje de la existente provocada por GABA utilizando una concentración submáxima de GABA (CE_{20}). Los valores positivos representan una potenciación de la existente provocada por GABA (agonista) mientras que los valores negativos representan una atenuación (agonista inverso). La selectividad funcional puede demostrarse también ensayando los compuestos en receptores que contienen α1, α2, α3 y α5 humanos clonados expresados de forma transitoria en *Xenopus oocytes* mediante medición del efecto modulador sobre la CE_{20} iónica de GABA existente utilizando electrofisiología con pinza de voltaje de dos electrodos (véase Sternfeld *et al.* [ref. 8])

La eficacia funcional en los diversos subtipos de receptores pueden calcularse utilizando el método descrito en el documento WO 96/25948.

En algunas realizaciones, la CE_{50} del compuesto en el subtipo α5 de receptor $GABA_A$ es al menos 2 veces menos, preferiblemente al menos 3 veces menos, preferiblemente al menos 5 veces menos, preferiblemente al menos 8 veces menos, más preferiblemente al menos 10 veces menos, más preferiblemente al menos 15 veces menos, más preferiblemente al menos 20 veces menos, que su CE_{50} en los subtipos α1 α2 o α3 de receptor $GABA_A$.

Potenciación del conocimiento

En algunas realizaciones, los compuestos útiles para llevar a cabo el método de la invención potencian la función cognitiva en individuos que padecen el síndrome de Down.

La potenciación del conocimiento puede demostrarse ensayando los compuestos en el laberinto acuático de Morris descrito por McNamara y Skelton, *Psychobiology*, 21:101-108. [ref. 5]. Puede probarse también mediante una prueba de reconocimiento de objetos tal como la descrita por Fernández *at al.* [ref. 3].

En algunas realizaciones, el compuesto produce efectos de potenciación del conocimiento a una dosis eficaz que corresponde a una ocupación del subtipo α5 del receptor $GABA_A$ entre 25% ± 2% y 95% ± 2%, preferiblemente entre 25% ± 2% y 90% ± 2%, entre 25% ± 2% y 80% ± 2%, entre 25% ± 2% y 75% ± 2%, entre 25% ± 2% y 70% ± 2%, entre 25% ± 2% y 65% ± 2%, entre 25% ± 2% y 60% ± 2%.

En algunas realizaciones, el compuesto produce efectos de potenciación del conocimiento a una dosis mínima eficaz que corresponde a una ocupación del subtipo α5 del receptor $GABA_A$ de 25% ± 2%.

Efectos secundarios ansiógenos y/o convulsionantes o proconvulsionantes

En algunas realizaciones, los compuestos útiles para llevar a cabo el método de la invención no presenta efectos mensurables parecidos a ansiógenos y/o convulsionantes o proconvulsionantes a dosis que ocupan > 80%, preferiblemente > 90%, preferiblemente > 95% de zonas de fijación de benzodiazepina.

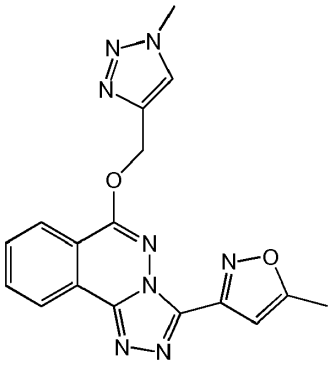
El potencial ansiógeno y/o convulsionante o proconvulsionante puede demostrarse ensayando los compuestos en ensayos que miden la potenciación de las convulsiones provocadas por pentilentetrazol en ratones. Véase, por ejemplo Chambers *et al.* [ref. 11] para protocolos experimentales aplicables.

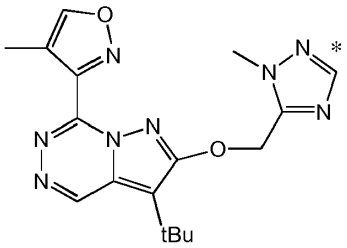
3. Composiciones farmacéuticas

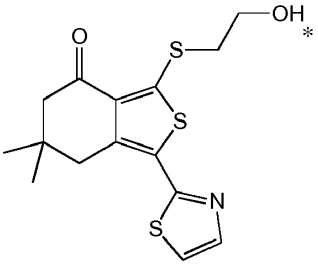
En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticamente aceptables, en donde estas composiciones comprenden cualesquiera de los compuestos descritos en la presente memoria, y opcionalmente comprenden un excipiente, adyuvante o vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, estas composiciones opcionalmente comprenden además uno o más agentes terapéuticos adicionales.

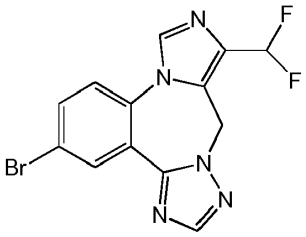
Por lo tanto, se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, uno o más de los compuestos descritos en la presente memoria junto con al menos un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas son útiles para tratar o aliviar la gravedad de deficiencias cognitivas relacionadas con el síndrome de Down, o para potenciar la función cognitiva en individuos que padecen síndrome de Down.

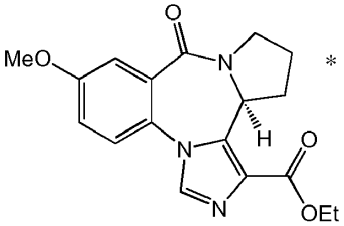
En algunas realizaciones, el principio activo farmacéutico comprende al menos un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso por receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5. En algunas realizaciones ilustrativas, al menos un agonista inverso funcionalmente selectivo por subtipos α5 del receptor $GABA_A$ presenta una de las estructuras siguientes:







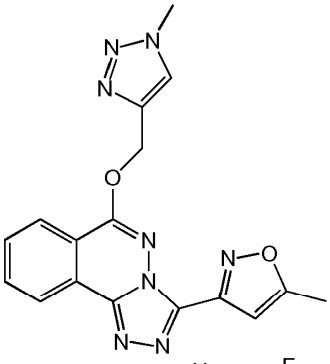


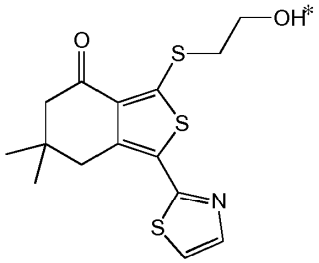


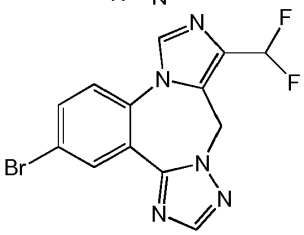
o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

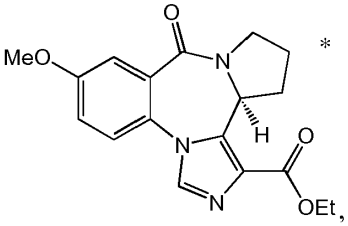
* fuera del alcance de la invención

En algunas realizaciones ilustrativas, al menos un agonista inverso funcionalmente selectivo por subtipos α5 del receptor $GABA_A$ presenta una de las estructuras siguientes:





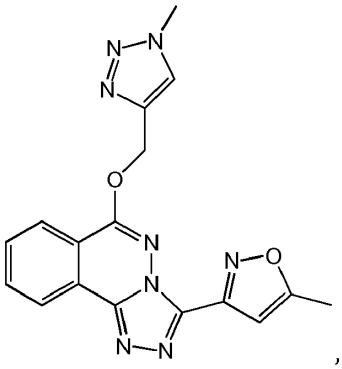




o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

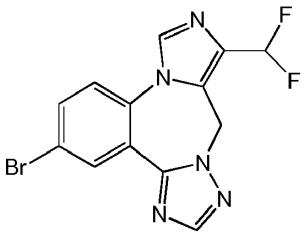
* fuera del alcance de la invención

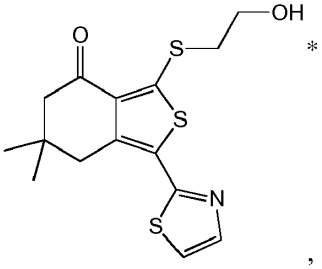
En algunas realizaciones preferidas, al menos un agonista inverso funcionalmente selectivo por subtipos α5 del receptor $GABA_A$ presenta la estructura siguiente:



o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, el principio activo farmacéutico comprende al menos un compuesto que tiene tanto selectividad de fijación como selectividad funcional de agonista inverso por receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5. En algunas realizaciones ilustrativas, al menos uno de dichos compuestos presenta una de las estructuras siguientes:



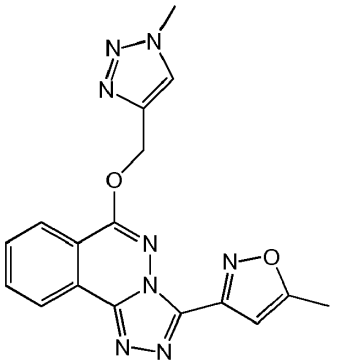


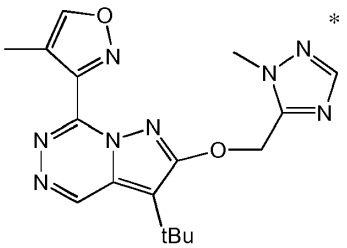
o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

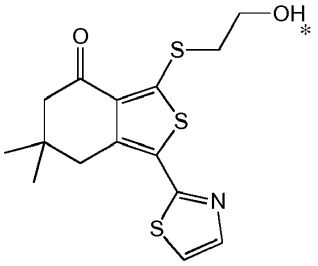
* fuera del alcance de la invención

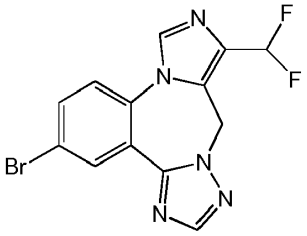
En algunas realizaciones preferidas, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso por receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5, o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables, en combinación con un tensioactivo (agente activo de superficie o agente tensio-activo), por ejemplo aceite de ricino polietoxilado, como excipiente y sulfóxido de dimetilo como disolvente. En algunas realizaciones, la composición es útil para el tratamiento o el alivio de la gravedad de deficiencias cognitivas en individuos que padecen síndrome de Down. En algunas realizaciones, la composición puede estar en forma de una cápsula, solución líquida o suspensión gelatinosa. En algunas realizaciones, la composición puede ser un preparado parenteral. En algunas realizaciones, el preparado parenteral puede ser para inyección intravenosa. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del compuesto puede ser eficaz para producir un efecto potenciador de la memoria, un efecto potenciador del aprendizaje o ambos. En algunas realizaciones, la composición puede comprender además un agente terapéutico adicional utilizado para tratar enfermedades o trastornos relacionadas con el síndrome de Down. La cantidad eficaz puede extrapolarse de las curvas clásicas de respuesta a la dosis, que permiten la determinación de CE_{50} para un determinado compuesto ensayado (la concentración de un fármaco que provoca una respuesta a medio camino entre la inicial y la máxima después de algún tiempo de exposición especificado). La CE_{50} de una curva de respuesta a la dosis escalonada representa por consiguiente la concentración de un compuesto donde se observa el 50% de su efecto máximo. Se utiliza frecuentemente como una medida de la potencia y toxicidad del fármaco. Por ejemplo, una cantidad eficaz para el compuesto α5IA puede estar comprendida entre 3 y 10 mg por vía oral, por ejemplo aproximadamente 4 mg por vía oral en personas.

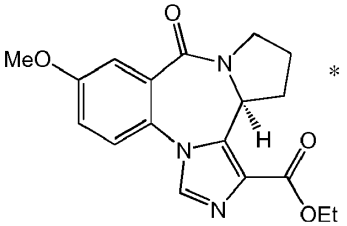
En algunas realizaciones ilustrativas, la composición comprende al menos un compuesto que presenta una de las estructuras siguientes:







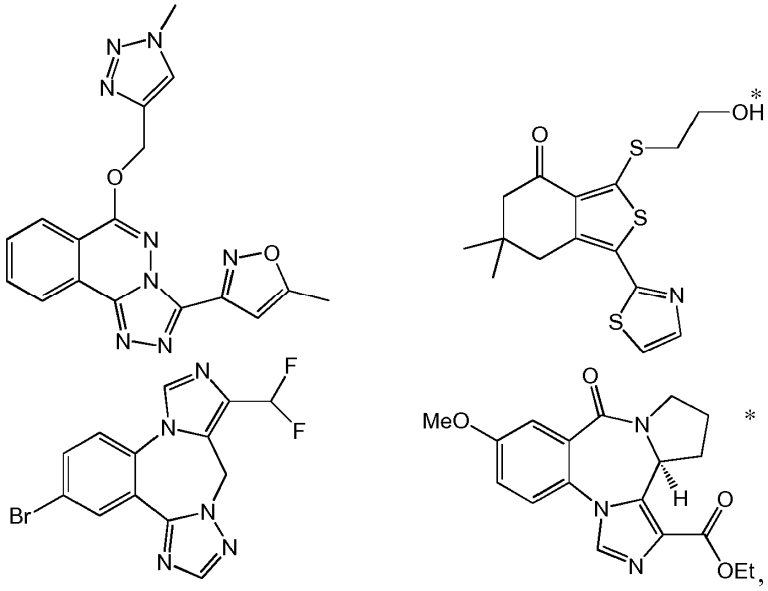




o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

* fuera del alcance de la invención

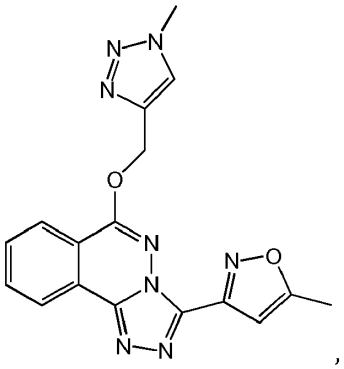
En algunas realizaciones ilustrativas, la composición comprende al menos un compuesto que presenta una de las estructuras siguientes:



o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

* fuera del alcance de la invención

En algunas realizaciones preferidas, la composición comprende al menos un compuesto que la estructura siguiente:



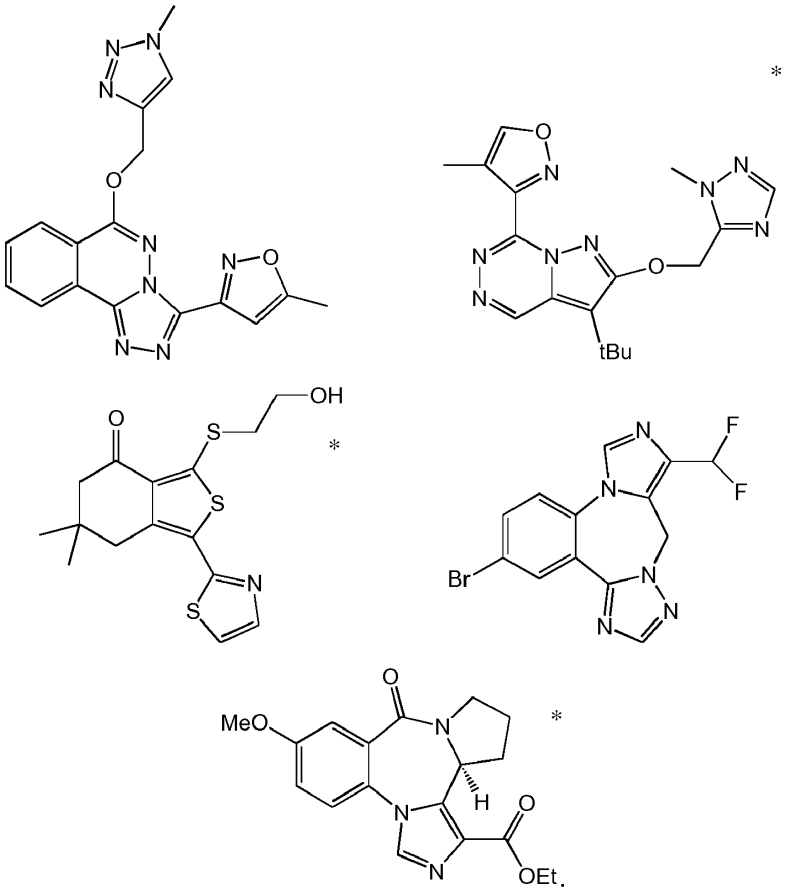
o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones ilustrativas, el tensioactivo es aceite de ricino polietoxilado. En algunas realizaciones ilustrativas, el aceite de ricino polietoxilado es Cremophor EL-H20®. Cremophor EL es la marca comercial registrada de BASF Corporation para su versión de aceite de ricino polietoxilado. Se prepara haciendo reaccionar 35 moles de óxido de etileno con cada mol de aceite de ricino. El producto resultante es una mezcla (CAS número 61791-12-6): el componente principal es el material en el que los grupos hidroxilo del triglicérido del aceite de ricino se han etoxilado con óxido de etileno para formar éteres de polietilenglicol. Los componentes minoritarios son los éteres de polietilenglicol del ácido ricinoleico, polietilenglicoles y éteres polietilenglicólicos de glicerol. En algunas realizaciones, pueden utilizarse otros tensioactivos tal como solutol HS15 en lugar de aceite de ricino polietoxilado o además del mismo.

En algunas realizaciones, se utiliza DMSO como codisolvente con agua.

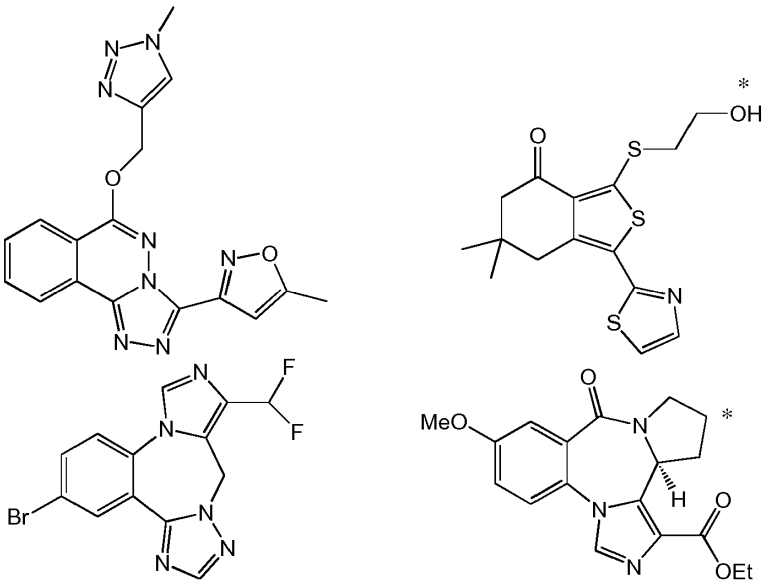
En algunas realizaciones, la composición se formula utilizando una mezcla de DMSO/aceite de ricino polietoxilado/agua donde el aceite de ricino polietoxilado representa entre el 10 y el 20%, preferiblemente entre el 11 y el 19%, preferiblemente entre el 12 y el 18%, preferiblemente entre el 13 y el 17%, preferiblemente entre el 14 y el 15%, preferiblemente alrededor del 15% en volumen de la mezcla DMSO/aceite de ricino polietoxilado/agua. En algunas realizaciones, la composición se formula utilizando una mezcla de DMSO/aceite de ricino polietoxilado/agua donde el DMSO representa entre el 5 y el 15%, preferiblemente entre el 6 y el 14%, preferiblemente entre el 7 y el 13%, preferiblemente entre el 8 y el 12%, preferiblemente entre el 9 y el 11%, preferiblemente alrededor del 10% en volumen de la mezcla DMSO/aceite de ricino polietoxilado/agua. En algunas realizaciones ilustrativas, la

composición se formula utilizando una relación DMSO/aceite de ricino polietoxilado/agua 5-15 /10-20 /65-85, preferiblemente 5-15 /10-20 /68-82, preferiblemente 6-14/11-19/70-80, preferiblemente 7-13/12-18/72-78, preferiblemente 8-12/14-16/73-77, preferiblemente 9-11/14-16/74-76, por ejemplo 10/15/75. En algunas realizaciones, el compuesto es una sal de hidrocloruro de un compuesto que tiene una de las estructuras siguientes:



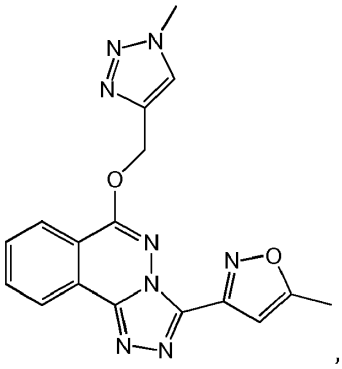
* fuera del alcance de la invención

En algunas realizaciones ilustrativas, el compuesto es una sal de hidrocloruro de un compuesto que tiene una de las estructuras siguientes:



* fuera del alcance de la invención

En algunas realizaciones preferidas, el compuesto es una sal de hidrocloruro de un compuesto que tiene una de las estructuras siguientes:



y la composición farmacéutica contiene además un tensioactivo (agente activo en superficie o agente activo por tensión), por ejemplo aceite de ricino polietoxilado, como excipiente y DMSO como codisolvente. En algunas realizaciones, la composición se formula utilizando una mezcla de DMSO/aceite de ricino polietoxilado/agua donde el aceite de ricino polietoxilado representa entre el 10 y el 20%, preferiblemente entre el 11 y el 19%, preferiblemente entre el 12 y el 18%, preferiblemente entre el 13 y el 17%, preferiblemente entre el 14 y el 15%, preferiblemente alrededor del 15% en volumen de la mezcla DMSO/aceite de ricino polietoxilado/agua. En algunas realizaciones, la composición se formula utilizando una mezcla de DMSO/aceite de ricino polietoxilado/agua donde el DMSO representa entre el 5 y el 15%, preferiblemente entre el 6 y el 14%, preferiblemente entre el 7 y el 13%, preferiblemente entre el 8 y el 12%, preferiblemente entre el 9 y el 11%, preferiblemente alrededor del 10% en volumen de la mezcla DMSO/aceite de ricino polietoxilado/agua. En algunas realizaciones ilustrativas, la composición se formula utilizando una relación DMSO/aceite de ricino polietoxilado/agua 5-15 /10-20 /65-85, preferiblemente 5-15 /10-20 /68-82, preferiblemente 6-14/11-19/70-80, preferiblemente 7-13/12-18/72-78, preferiblemente 8-12/14-16/73-77, preferiblemente 9-11/14-16/74-76, por ejemplo 10/15/75.

La composición farmacéutica de la invención basada en la combinación de DMSO como codisolvente y un tensioactivo (agente activo en superficie o agente activo por tensión), tal como aceite de ricino polietoxilado, como excipiente se propone considerando los descubrimientos de los presentes investigadores que una formulación α5IA.HCl en DMSO/Cremophor-EL ®/agua ha mejorado los efectos en comparación con conocidas formulaciones de α5IA: 1) permite mejor disolución del principio activo α5IA, y 2) no presenta los efectos secundarios indeseables observados con las formulaciones conocidas. En particular, las formulaciones publicadas (administración i.p.) se basan en 70% de PEG 300 y 30% de agua (Collinson *et al*. 2002 y 2006 [ref. 12 y 13]), y provocan una tasa de mortalidad como máximo del 10% en animales tratados después de una inyección de 250 µl de formulación. Véase el ejemplo 4.

Por el contrario, con la formulación de la invención a base de sal hidrocloruro de α5IA, DMSO y un tensioactivo (agente activo en superficie o agente activo por tensión), tal como aceite de ricino polietoxilado, no se observa mortalidad. Además, en la formulación resultante, los cristales de principio activo son más pequeños y más homogéneos, reduciendo el riesgo de embolia después de una inyección i.v..

El experto en la técnica reconocerá que varios principios activos farmacéuticos publicados en la presente memoria pueden estar disponibles en formas de base libre o sal, como estereoisómero enantioméricamente puro y/o como polimorfos. Excepto como se especifica de otra manera en la presente memoria, la relación de un principio activo farmacéutico concreto, sin ninguna cualificación que limite la relación a la base libre o sal, enantiómero o polimorfo del principio activo farmacéutico, está destinada a incorporar todas las formas farmacéuticamente aceptables del principio activo farmacéutico, entre otras la base libre, sales farmacéuticamente aceptables, racematos, formulaciones enantioméricamente puras, formas amorfas y cristalinas del principio activo farmacéutico así como sus hidratos.

Pueden utilizarse también diferentes polimorfos de los compuestos. Los polimorfos son, por definición, cristales de la misma molécula que tienen diferentes propiedades físicas como resultado del orden de las moléculas en la retícula cristalina. El comportamiento polimórfico de los fármacos puede ser de crucial importancia en farmacia y farmacología. Las diferencias en las propiedades físicas presentadas por los polimorfos afectan parámetros farmacéuticos tales como la estabilidad al almacenamiento, la compresibilidad y la densidad (importante en formulación y preparación del producto), y velocidades de disolución (un factor importante en la determinación de la biodisponibilidad). Las diferencias en estabilidad pueden proceder de cambios en la reactividad química (p. ej. la oxidación diferencial, de tal manera que una forma farmacéutica decolora más rápidamente cuando se compone de un polimorfo que cuando se compone de otro polimorfo) o cambios mecánicos (p. ej. los comprimidos desmenuzados en almacenamiento ya que un polimorfo cinéticamente favorecido se convierte en un polimorfo termodinámicamente más estable) o ambos (p. ej. los comprimidos de un polimorfo son más susceptibles a la rotura en condiciones de alta humedad).

En algunas realizaciones, los compuestos descritos en la presente memoria o una de sus sales farmacéuticamente aceptables se formulan según prácticas farmacéuticas convencionales como composiciones farmacéuticas para el tratamiento terapéutico (como por ejemplo el tratamiento profiláctico) de mamíferos como por ejemplo seres humanos.

Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, S. M. Berge *et al.*, describen sales farmacéuticamente aceptables con detalle en *J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66, 1-19, incorporada en la presente memoria por referencia. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de esta invención comprenden las procedentes de ácidos y bases inorgánicos y orgánicos adecuados. Ejemplos de farmacéuticamente aceptables, sales de adición de ácido atóxicas son las sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o utilizando otros métodos utilizados en la técnica tal como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables comprenden sales de adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencensulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etansulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, bisulfato, heptanoato, hexanoato, hidroyoduro, 2-hidroxi-etansulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metansulfonato, 2-naftalensulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluensulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales procedentes de bases apropiadas comprenden sales de metales alcalinos, metales alcalinotérreos, de amonio y de N^+(alquil $C_{1-4})_4$. La presente invención contempla además la cuaternización de algunos grupos básicos que contienen nitrógeno de los compuestos descritos en la presente memoria. Pueden obtenerse productos solubles en agua o aceite o dispersables por dicha cuaternización. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas comprenden las de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Más sales farmacéuticamente aceptables comprenden, cuando proceda, atóxicas de amonio,de amonio cuaternario y de cationes amínicos formados utilizando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo inferior y arilsulfonato.

Los principios activos farmacéuticos, como por ejemplo los derivados farmacéuticamente aceptables, las sales farmacéuticamente aceptables y variaciones polimórficas de los mismos, pueden formularse como composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones pueden administrarse por vía oral, bucal, sublingual, intravenosa, parenteral, mediante nebulizador, por vía rectal, intradérmica, transdérmica, pulmonar, nasal o tópica en formulaciones en dosis unitarias que contienen excipientes, adyuvantes y vehículos atóxicos farmacéuticamente aceptables convencionales según se desee. La administración tópica puede implicar además la utilización de administración transdérmica tal como parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis. El término "parenteral" tal como se emplea en la presente memoria comprende las técnicas subcutánea, intravenosa, intramuscular o inyección intraesternal, o infusión. En algunas realizaciones preferidas la composición se administra por vía oral, bucal o sublingual; en otras realizaciones preferidas, la composición se administra por vía intravenosa.

Los principios activos farmacéuticos pueden administrarse de por sí o en forma de una composición farmacéutica en donde el/los compuesto(s) activo(s) está(n) mezclado(s) con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables, tales como uno o más vehículos, excipientes, disgregadores, fluidificantes, diluyentes, matrices o recubrimientos de liberación retardada o liberación controlada. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de manera convencional utilizando uno o más excipientes fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y adyuvantes, que facilitan el tratamiento de los compuestos activos en preparaciones que pueden utilizarse farmacéuticamente. Una formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

Para la preparación de composiciones farmacéuticas a partir de los compuestos de esta invención, los excipientes inertes, farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Los preparados en forma sólida comprenden polvos, comprimidos, gránulos dispersables, cápsulas, sellos y supositorios.

Para las composiciones sólidas, los excipientes sólidos atóxicos convencionales comprenden y pueden usarse, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, celulosa, derivados de celulosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares. Pueden prepararse, por ejemplo, composiciones líquidas farmacéuticamente administrables disolviendo, dispersando, etc., un compuesto activo como se ha definido anteriormente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un excipiente, tales como, por ejemplo, agua, solución salina acuosa, dextrosa, glicerol, etanol y similares, para formar de esta forma una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que de administrarse puede contener además cantidades menores de sustancias auxiliares atóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponantes de pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio, monolaurato de sorbitán, acetato de sodio y trietanolamina, oleato de trietanolamina, etc. Los métodos existentes de preparación de dichas formas farmacéuticas se conocen, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica; por ejemplo, véase Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 15ª edición, 1975.

Para preparar composiciones, se mezclan uno o más compuestos con un excipiente adecuado farmacéuticamente aceptable. Tras el mezclado o adición del o de los compuesto(s), la mezcla resultante puede ser una solución, suspensión, emulsión o similares. Las suspensiones liposómicas pueden ser también adecuadas como excipientes

farmacéuticamente aceptables. Éstas pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la técnica. La forma de la mezcla resultante depende de numerosos factores, como por ejemplo el modo de administración deseado y la solubilidad del compuesto en el excipiente o vehículo seleccionado. La concentración eficaz es suficiente para mejorar los síntomas de la enfermedad, trastorno o afección tratado y puede determinarse empíricamente.

Los excipientes o vehículos farmacéuticos adecuados para la administración de los compuestos proporcionados en la presente memoria comprenden cualesquiera de dichos excipientes conocidos por los expertos en la técnica por ser adecuados para el modo específico de administración. Además, los materiales activos pueden mezclarse también con otros materiales activos que no afectan la acción deseada, o con materiales que complementan la acción deseada o tienen otra acción. Los compuestos pueden formularse en forma de un solo principio farmacéuticamente activo en la composición o pueden combinarse con otros principios activos.

Un excipiente sólido puede ser una o más sustancias, que pueden actuar también como diluyentes, agentes potenciadores de sabor, disolventes, lubricantes, agentes de suspensión, aglutinantes o agentes disgregadores de comprimidos; puede ser también un material de encapsulación.

En polvo, el excipiente es un sólido finamente dividido, que está en una mezcla con el componente activo finamente dividido. En comprimidos, el componente activo se mezcla con el excipiente que tiene las propiedades de fijación necesarias en proporciones adecuadas y se compacta en la forma y tamaño deseados.

Para preparar composiciones para supositorios, se derrite en primer lugar una cera de bajo punto de fusión tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos y manteca de cacao y el principio activo se dispersa en ésta por agitación, por ejemplo. La mezcla homogénea fundida se vierte a continuación en moldes de tamaño conveniente y se deja enfriar y solidificar.

los excipientes adecuados comprenden carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, lactosa, azúcar, pectina, dextrina, almidón, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares.

La composición farmacéutica puede estar en forma recubierta. Ejemplos de materiales de recubrimiento adecuados comprenden, pero no se limitan a, polímeros de celulosa tales como acetato ftalato de celulosa, hidroxipropil-celulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, ftalato de hidroxipropil-metilcelulosa y acetato succinato de hidroxipropil-metilcelulosa; acetato ftalato de polivinilo, polímeros y copolímeros de ácido acrílico y resinas metacrílicas que están disponibles en el mercado bajo la denominación comercial Eudragit® (Roth Pharma, Westerstadt, Alemania), zeína, goma laca y polisacáridos.

Además, el material de recubrimiento puede contener excipientes convencionales tales como plastificantes, pigmentos, colorantes, fluidificantes, agentes de estabilización, formadores de poros y tensioactivos.

Si se desea administración oral, el compuesto puede suministrarse en una composición que le protege del medio ácido del estómago. Por ejemplo, la composición puede formularse en un recubrimiento entérico que mantiene su integridad en el estómago y libera el compuesto activo en el intestino. La composición puede formularse también en combinación con un antiácido u otro de dichos ingredientes.

Los excipientes opcionales farmacéuticamente aceptables presentes en los comprimidos, bolitas, gránulos o partículas que contienen fármacos comprenden, pero no se limitan a, diluyentes, aglutinantes, lubricantes, disgregadores, colorantes, estabilizantes y tensioactivos.

Los diluyentes, denominados también "cargas" son por lo general necesarios para aumentar la mayor parte de una forma farmacéutica sólida de manera que se proporciona un tamaño práctico se proporciona para la compresión de comprimidos o la formación de bolitas y gránulos. Los diluyentes adecuados comprenden, pero no se limitan a, fosfato dicálcico dihidratado, sulfato cálcico, lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, celulosa, celulosa microcristalina, caolín, cloruro de sodio, almidón anhidro, almidones hidrolizados, almidón pregelatinizado, dióxido de silicio, óxido de titanio, silicato de magnesio y aluminio y azúcar en polvo.

Se utilizan aglutinantes para comunicar cualidades cohesivas a una formulación en dosis sólida, y garantizar de este modo que un comprimido, bolita o gránulo permanece intacto después de la formación de las formas farmacéuticas. Los materiales aglutinantes adecuados comprenden, pero no se limitan a, almidón, almidón pregelatinizado, gelatina, azúcares (como por ejemplo sacarosa, glucosa, dextrosa, lactosa y sorbitol), polietilenglicol, ceras, gomas naturales y sintéticas tales como goma arábiga, tragacanto, alginato sódico, celulosa, como por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, etilcelulosa, y Veegum, y polímeros sintéticos tales como copolímeros de ácido acrílico y ácido metacrílico, copolímeros de ácido metacrílico, copolímeros de metacrilato de metilo, copolímeros de metacrilato de aminoalquilo, ácido poliacrílico/ácido polimetacrílico y polividona.

Se utilizan lubricantes para facilitar la preparación de comprimidos. Ejemplos de lubricantes adecuados comprenden, pero no se limitan a, estearato de magnesio, estearato de calcio, ácido esteárico, behenato de glicerol, polietilenglicol, talco y aceite mineral.

Se utilizan disgregadores para facilitar la disgregración o "rotura" de la forma farmacéutica después de la administración, y generalmente comprenden, pero no se limitan a, almidón, almidón glicolato sódico, carboximetil-almidón sódico, carboximetilcelulosa sódica, hidroxipropilcelulosa, almidón pregelatinizado, arcillas, celulosa, alginina, gomas o polímeros reticulados, tal como PVP reticulado (Polyplasdone XL de GAF Chemical Corp).

Se utilizan estabilizantes para inhibir o retardar las reacciones de descomposición de fármacos que comprenden, a modo de ejemplo, reacciones oxidativas.

Los tensioactivos pueden ser aniónicos, catiónicos, anfóteros o agentes activos de superficie no iónicos. Los tensioactivos aniónicos adecuados comprenden, pero no se limitan a, los que contienen carboxilato, sulfonato e iones sulfato. Ejemplos de tensioactivos aniónicos comprenden sulfonatos de alquilo de cadena larga y sulfonatos de alquilo y arilo de sodio, potasio y amonio tal como dodecilbenceno sulfonato de sodio; dialquil-sulfosuccinatos de sodio, tal como dodecilbenceno sulfonato de sodio; dialquil-sulfosuccinatos de sodio, tal como bis-(2-etiltioxil)-su!fosuccinato de sodio; y sulfatos de alquilo tal como laurilsulfato sódico. Los tensioactivos catiónicos comprenden, pero no se limitan a, compuestos de amonio cuaternario tales como cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, bromuro de cetrimonio, cloruro de estearll-dimetilbencil-amonio, polioxietileno y amina de coco. Ejemplos de tensioactivos no iónicos comprenden monoestearato de etilenglicol, miristato de propilenglicol, monostearato de glicerilo, estearato de glicerilo, poligliceril-4-oleato, acilato de sorbitán, acilato de sacarosa, laurato de PEG-150, monolaurato de PEG-400, monolaurato de polioxietileno, polisorbatos, octilfeniléter de polioxietileno, éter cetílico de PEG-1000, éter tridecílico de polioxietileno, éter glicolbutílico de polipropileno, Poloxamer* 401, estearoil-monoisopropanolamida y amida de polioxietileno y sebo hidrogenado. Ejemplos de tensioactivos anfóteros comprenden N-dodecil-[beta]-alanina sódica, N-lauril-beta-iminodipropionato sódico, miristoanfoacetato, lauril-betaína y lauril-sulfobetaína.

Si se desea, los comprimidos, bolitas, gránulos o partículas pueden contener además una cantidad menor de sustancias auxiliares atóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, colorantes, agentes tamponantes del pH o conservantes.

Los principios activos farmacéuticos pueden formar complejos con otros agentes como parte de que se formulan farmacéuticamente. Las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agentes aglutinantes (p. ej., goma arábiga, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, polividona (Povidona), hidroxipropil-carboximetilcelulosa, sacarosa, almidón y etilcelulosa); cargas (p. ej., almidón de maíz, gelatina, lactosa, goma arábiga, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, carbonato cálcico, cloruro sódico o ácido algínico); lubricantes (p. ej. estearatos de magnesio, ácido esteárico, silicona líquida, talco, ceras, aceites y sílice coloidal); y disgregadores (p. ej. celulosa microcristalina, almidón de maíz, almidón glicolato sódico y ácido algínico. Si dicho complejo formulado es soluble en agua, entonces puede formularse en un tampón apropiado, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato u otras soluciones fisiológicamente compatibles. Alternativamente, si el complejo resultante tiene poca solubilidad en disolventes acuosos, entonces puede formularse con un tensioactivo no iónico tal como TWEEN(TM) o polietilenglicol. Por lo tanto, los principios activos farmacéuticos y sus solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para su administración.

Las presentaciones líquidas en las que las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden incorporarse para administración por vía oral o por inyección comprenden soluciones acuosas, jarabes con sabor apropiado, suspensiones acuosas o aceitosas y emulsiones aderezadas con aceites comestibles tales como aceite de semillas de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares. Las formulaciones líquidas para administración oral preparadas en agua u otros vehículos acuosos pueden contener varios agente de suspensión como por ejemplo gomas sintéticas y naturales tales como tragacanto, pectina, kelgin, carragenina, goma arábiga, alginatos, dextrano, carboximetilcelulosa sódica, carboximetilcelulosa, polividona, alcohol polivinílico y/o gelatina. Las formulaciones líquidas pueden comprender además soluciones, emulsiones, jarabes y elixires que contienen, junto con el o los compuesto(s) activo(s), agentes humectantes, edulcorantes y agentes colorantes y saborizantes. Pueden prepararse varias formulaciones líquidas y en polvo por métodos convencionales para inhalación por el paciente.

Pueden prepararse composiciones de liberación retardada y liberación prolongada. Las composiciones farmacéuticas de liberación retardada/liberación prolongada pueden obtenerse complejando fármacos con una resina de intercambio iónico farmacéuticamente aceptable y recubriendo dichos complejos. Las formulaciones se recubren con una sustancia que actúe como barrera para controlar la difusión del fármaco desde su núcleo complejo en los líquidos gastrointestinales. Opcionalmente, la formulación se recubre con una película de un polímero que es insoluble en el medio ácido del estómago, y soluble en el medio básico de los intestinos a fin de obtener una forma farmacéutica final que libera menos del 10% de la dosis de fármaco dentro del estómago.

Además, las combinaciones de composiciones de liberación inmediata y las composiciones de liberación retardada/liberación prolongada pueden formularse conjuntamente.

Los compuestos pueden prepararse con excipientes que protegen el compuesto frente a la rápida eliminación del cuerpo, tales como formulaciones o recubrimientos de liberación a lo largo del tiempo Dichos excipientes

comprenden formulaciones de liberación controlada, tales como, pero sin limitarse a, implantes y sistemas de administración microencapsulados, y polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como colágeno, acetato de viniletileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, poliortoésteres, ácido poliláctico y otros. Los métodos para la preparación de dichas formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica.

Cabe esperar que en algunos casos puede ser ventajoso administrar un principio activo farmacéutico de la invención como formulación pulsátil. Dicha formulación puede administrarse en forma de cápsulas, comprimidos o suspensión acuosa. Por ejemplo, puede formularse una cápsula, comprimido o suspensión acuosa que contiene dos o más poblaciones de partículas de principio activo farmacéutico - una que contiene principio activo farmacéutico en una forma de liberación inmediata (p. ej. sin recubrir o recubierta con un recubrimiento de liberación inmediata) y otra población en la que el principio activo farmacéutico está recubierto con un recubrimiento de liberación retardada y/o un recubrimiento entérico. En algunas realizaciones, una liberación pulsátil de principio activo farmacéutico da como resultado una formulación más prolongada, que puede administrarse dos veces al día o una vez al día. En el caso de una cápsula, las dos poblaciones de partículas pueden estar contenidas dentro de una cápsula de liberación inmediata o de liberación retardada. En el caso de un comprimido (como por ejemplo un comprimido oblongo) las dos poblaciones de partículas pueden comprimirse, opcionalmente en mezcla con un aglutinante y/o disgregadores apropiados, para formar un núcleo de comprimido, que se recubre a continuación con un recubriendo de liberación inmediata, un recubrimiento entérico o ambos. El comprimido a continuación puede recubrirse con un recubriendo que aumenta la facilidad de tragar la dosis.

En el caso de una suspensión líquida, la primera población de partículas puede estar sin recubrir (y de hecho total o parcialmente disuelta en el medio acuoso) o puede estar recubierto con un recubriendo de liberación inmediata, un recubriendo entérico o ambos. La segunda población de partículas está recubierta con un recubrimiento de liberación retardada y opcionalmente un recubriendo de liberación inmediata y/o un recubrimiento entérico. (Los recubrimientos entéricos se aplican generalmente cuando el principio activo farmacéutico es sensible a condiciones de bajo pH y por lo tanto habría que esperar que fueran inestables en el estómago. Pueden también aplicarse a la población de partículas de liberación retardada a fin de añadir un retardo adicional a la liberación del principio activo farmacéutico dentro de las partículas de liberación retardada.

En los casos en que los compuestos presentan insuficiente solubilidad, pueden utilizarse métodos para disolver los compuestos. dichos métodos son conocidos por los expertos en esta técnica, y comprenden, pero no se limitan a, la utilización de codisolventes, tal como sulfóxido de dimetilo (DMSO), la utilización de tensioactivos, tal como Tween, o la disolución en bicarbonato sódico acuoso. Los derivados de los compuestos, tales como sales de los compuestos o profármacos de los compuestos pueden utilizarse también en la formulación de composiciones farmacéuticas eficaces.

El compuesto activo está incluido en el vehículo farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para ejercer potenciación de conocimiento in un individuo que padece síndrome de Down en ausencia de efectos secundarios indeseables en el individuo tratado (es decir, efectos secundarios como ansiógenos y/o convulsionantes o proconvulsionantes). La concentración terapéuticamente eficaz puede determinarse empíricamente ensayando los compuestos en sistemas de modelos *in vitro* e *in vivo* conocidos descritos en la presente memoria.

Las composiciones pueden estar contenidas en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples o individuales de vidrio, plástico u otros materiales adecuados. Dichas composiciones contenidas pueden proporcionarse en kits.

Los principios activos pueden mezclarse también con otros principios activos que no alteran la acción deseada, o con materiales que complementan la acción deseada.

3. Kits de tratamiento

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo conveniente y eficazmente los métodos según la presente invención. En general, el envase o kit farmacéutico comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Dichos kits son especialmente adecuados para la administración de formas sólidas orales tales como comprimidos o cápsulas. Dicho kit comprende preferiblemente numerosas dosis unitarias, y puede comprender además una tarjeta con las dosis orientadas en el orden de su uso deseado. Si se desea, puede proporcionarse como recordatorio, por ejemplo en forma de números, letras u otras marcas o con un prospecto con calendario, designando los días en el programa de tratamiento en que pueden administrarse las dosis. Alternativamente, dosis de placebo, o complementos alimentarios de calcio, en forma similar o distinta de las dosis de las composiciones farmacéuticas, pueden incluirse para proporcionar un kit en el que se toma una dosis cada día. Opcionalmente puede asociarse a dicho(s) recipiente(s) una nota en la forma ordenada por un organismo gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuya nota refleja la aprobación por el organismo de fabricación, del uso o venta para administración humana.

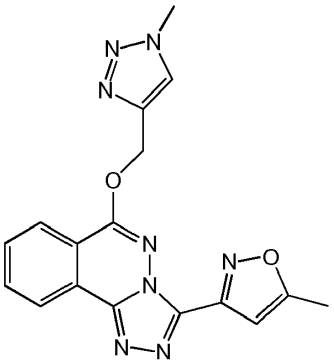
4. Métodos de uso

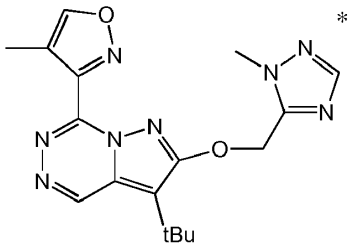
En otro aspecto todavía, la presente invención proporciona un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para su utilización como medicamento para

tratar o aliviar la gravedad de las deficiencias cognitivas en individuos que padecen síndrome de Down. La invención proporciona además la utilización de un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o alivio de la gravedad de deficiencias cognitivas en individuos que padecen síndrome de Down. Por lo tanto, se proporciona un método para el tratamiento o alivio de la gravedad de deficiencias cognitivas en un individuo que padece síndrome de Down, que comprende administrar a un individuo en necesidad de éste, una cantidad eficaz de un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5, o una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

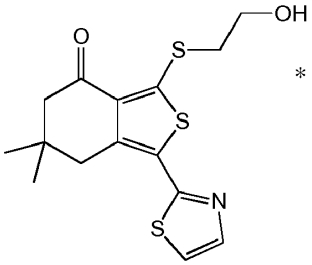
En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para su utilización como medicamento para potenciar la función cognitiva en individuos que padecen síndrome de Down. La invención proporciona además la utilización de un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para la preparación de un medicamento para potenciar la función cognitiva en individuos que padecen el síndrome de Down. Por lo tanto, se proporciona un método para potenciar la función cognitiva en un individuo que padece síndrome de Down, que comprende administrar a un individuo en necesidad de éste, una cantidad que potencia la función cognitiva de un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5, o una cantidad eficaz que potencia la función cognitiva de una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones ilustrativas, el compuesto presenta una de las estructuras siguientes:

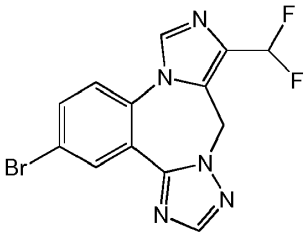


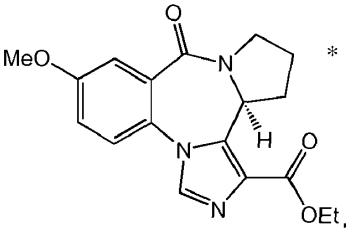


*



*



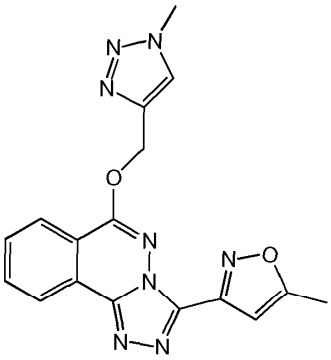


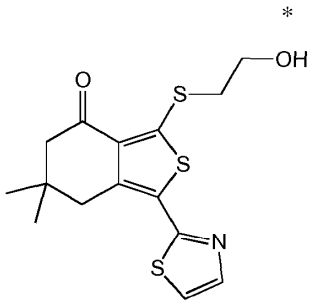
*

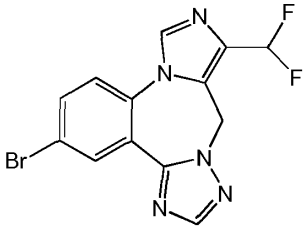
o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

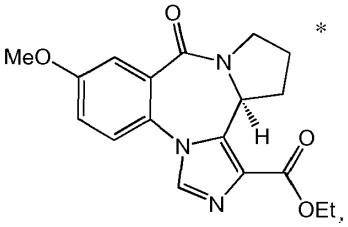
* fuera del alcance de la invención

En algunas realizaciones ilustrativas, el compuesto presenta una de las estructuras siguientes:





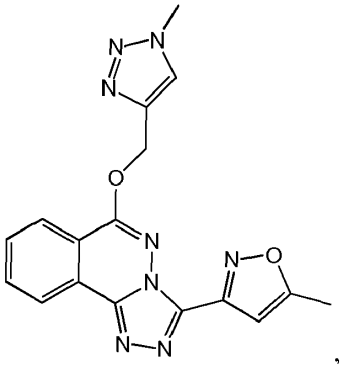




o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

* fuera del alcance de la invención

En algunas realizaciones ilustrativas, el compuesto presenta la estructura:



o una de sus sales o profármacos farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, el compuesto se administra en forma de composición farmacéutica oral, bucal o sublingual. En algunas realizaciones, el compuesto se administra en forma de comprimido, cápsula, cápsula gelatinosa, comprimido oblongo o solución o suspensión líquidas. En algunas realizaciones, el compuesto se administra en forma de preparado parenteral. En algunas realizaciones, el preparado parenteral es para inyección intravenosa. En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del compuesto es una cantidad que provoca subconvulsiones. Las cantidades que provocan subconvulsiones pueden determinarse, por ejemplo, determinando si un efecto convulsionante se observa a varias cantidades (dosis) de compuesto. En algunas realizaciones, el compuesto puede no tener efecto convulsionante a alto % de ocupación del receptor (80-90%).

En algunas realizaciones, la cantidad eficaz del compuesto es eficaz para producir un efecto potenciador de la memoria, un efecto potenciador del aprendizaje o ambos. Ésta puede determinarse trazando curvas de respuesta a la dosis mediante cuantificación del efecto del compuesto en una batería de pruebas neuropsicológicas tanto en ratones como en personas.

En algunas realizaciones, el compuesto se utiliza en combinación con un agente terapéutico adicional utilizado para tratar enfermedades o trastornos relacionados con el síndrome de Down.

Los compuestos y composiciones, según el método de la presente invención, puede administrarse utilizando cualquier cantidad y cualquier vía de administración eficaz para tratar o aliviar la gravedad de deficiencias del conocimiento en individuos que padecen síndrome de Down. La cantidad exacta requerida variará de individuo a individuo, dependiendo de la especie, edad y el estado general del individuo, la gravedad de la disfunción cognitiva,

el agente específico, su modo de administración y similares. Los compuestos de la invención se formulan preferiblemente en formas galénicas unitarias para facilidad de administración y uniformidad de dosis. La expresión "forma galénica unitaria" como se emplea en la presente memoria se refiera a una unidad físicamente discreta de agente apropiado para el paciente que va a tratarse. Debe entenderse, sin embargo, que el médico adjunto decidirá el uso diario total de los compuestos y composiciones de la presente invención dentro del alcance del criterio médico acertado. La concentración de la dosis específica eficaz para cualquier paciente u organismo concreto dependerá de una variedad de factores como por ejemplo del grado de deficiencia cognitiva; de la actividad del compuesto específico empleado; de la composición específica empleada; de la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; del tiempo de administración, la vía de administración, y la velocidad de excreción del compuesto específico empleado; de la duración del tratamiento; de los fármacos utilizados en combinación o coincidentes con el compuesto específico empleado, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. El término "paciente", como se emplea en la presente memoria, significa un animal, preferiblemente un mamífero, y aún más preferiblemente una persona.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables de esta invención pueden administrarse a seres humanos y otros animales por cualquier vía apropiada, por ejemplo, por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como en polvos, pomadas o gotas), por vía bucal, en forma de nebulizador oral o nasal, o similares, dependiendo de la gravedad de la infección que se está tratando. Los modos de administración preferidos comprenden los modos oral y parenteral de administración.

La composición puede administrarse en formas galénicas unitarias del tipo descrito anteriormente que contiene de 0,1 a aproximadamente 500 mg del compuesto activo descrito en la presente memoria. Las formas galénicas unitarias típicas contienen de 1 a 100 mg, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50 o 100 mg, de principio activo. En algunas realizaciones, las formas galénicas pueden contienen 3 a 10 mg de principio activo, por ejemplo aproximadamente 4 mg.

Para la potenciación del conocimiento, un nivel de dosis adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a 250 mg/kg al día, preferiblemente alrededor de 0,01 a 100 mg/kg al día, preferiblemente alrededor de 0,01 a 10 mg/kg al día, y especialmente alrededor de 0,01 a 5 mg/kg de peso corporal al día. Los compuestos pueden administrarse en un régimen de 1 a 4 veces al día, por ejemplo 1 a 2 veces al día. En algunos casos, sin embargo, pueden utilizarse dosis fuera de estos límites. El tratamiento terapéutico puede llevarse a cabo durante un periodo de 2 a 12 semanas, por ejemplo durante 4 semanas. En algunos casos, sin embargo, puede utilizarse un régimen de dosis fuera de estos límites.

El principio activo puede administrarse de una vez, o puede dividirse en numerosas dosis más pequeñas para ser administradas a intervalos de tiempo. Alternativamente, los compuestos de la invención pueden administrarse continuamente durante un periodo de tiempo, por ejemplo mediante una infusión intravenosa o por medio de un parche transdérmico colocado adecuadamente que incorpora y libera compuestos de la invención.

Es preferible que los compuestos de la presente invención estén molidos, por ejemplo utilizando una mano de mortero y mortero o el equivalente industrial a éste, hasta un tamaño de partícula de entre 1 y 10 μM, y preferiblemente menos de 5 μM, antes de la formulación. Los compuestos pueden micronizarse o someterse a ultrasonidos por métodos conocidos en la técnica o nanonizarse, por ejemplo por métodos descritos en el documento US-A-5145684.

Además de los compuestos de la presente invención, la composición farmacéutica de esta invención también puede contener, o administrarse (simultánea o sucesivamente) con, uno o más agentes farmacológicos de valor en el tratamiento de una o más enfermedades mencionadas en la presente memoria.

Se apreciará además que los compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables de la presente invención puedan emplearse en politerapias, es decir, los compuestos y composiciones farmacéuticamente aceptables pueden administrarse simultáneamente con, antes de, o después de, uno u otros agentes terapéuticos o procedimientos médicos deseados más. Por consiguiente, los métodos definidos en la presente memoria pueden aplicarse como una sola terapia o pueden involucrar, además del compuesto de la invención, quimioterapia convencional. Dicho tratamiento conjunto puede conseguirse mediante la administración simultánea, sucesiva o independiente de cada uno de los componentes del tratamiento. Dichos productos de combinación pueden emplear los compuestos descritos en la presente memoria.

La politerapia específica (agentes terapéuticos o procedimientos) a emplear en un régimen de combinación deberá tener en cuenta la compatibilidad de los agentes terapéuticos y/o procedimientos deseados y el efecto terapéutico deseado que debe conseguirse. Debe apreciarse además que los tratamientos empleados pueden conseguir un efecto deseado para el mismo trastorno (por ejemplo, un compuesto de la invención puede administrarse simultáneamente con otro agente utilizado para potenciar la función cognitiva en individuos con síndrome de Down), o pueden conseguir diferentes efectos (p. ej., control de algunos efectos adversos). Tal como se utiliza en la presente memoria, los agentes terapéuticos adicionales que se administran normalmente para tratar o prevenir una enfermedad, o afección, específica se conocen como "apropiados para la enfermedad, o afección, que se está tratando".

La cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones de esta invención no debe ser superior a la cantidad que normalmente se administraría en una composición que comprende este agente terapéutico como el único agente activo. Preferiblemente la cantidad de agente terapéutico adicional presente en las composiciones descritas actualmente oscilarán desde aproximadamente 50% a 100% de la cantidad normalmente presente en una composición que comprende este agente como el único agente terapéuticamente activo.

Los problemas médicos asociados por lo general al síndrome de Down comprenden los defectos congénitos de corazón (p. ej., defectos del tabique auriculoventricular, el defecto del tabique ventricular (VSD), el defecto del tabique auricular, o el conducto arterioso persistente, otra cardiopatía compleja tal como la Tetralogía de Fallot y el síndrome del corazón izquierdo hipoplásico), la hipertensión pulmonar, problemas del oído (p. ej., acumulación de líquido en el oído interno, infección del oído o problemas estructurales del propio oído) y de la visión (p. ej., cataratas congénitas (pérdida de transparencia del cristalino del ojo), glaucoma (aumento de la presión dentro del ojo), estrabismo (bizco) y errores refractarios principales (hipermétrope o miope), ambliopía (ojo perezoso)), anomalías intestinales, trastornos convulsivos, problemas respiratorios, obesidad, un aumento de sensibilidad a las infecciones, leucemia (la leucemia se produce en uno de cada 150 niños con síndrome de Down. Esto es 20 veces más elevada que en la población general), anomalías gastrointestinales (2 por ciento a 5 por ciento de los niños tienen obstrucción completa del intestino delgado conocida como atresia duodenal. Otro 2 por ciento tiene escasas de capacidades de movimiento del colon y/o recto conocida como enfermedad de Hirschsprung) y trastornos del tiroides.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, el método de la invención puede incluir la administración conjunta (simultánea o sucesivamente) de un compuesto o composición farmacéutica de la invención junto con un agente terapéutico adicional apropiado para tratar enfermedades o afecciones asociadas al síndrome de Down, tales como las mencionadas anteriormente.

Los ejemplos representativos siguientes están pensados para ayudar a ilustrar la invención, y no están pensados para, ni debería considerarse que, limitan el alcance de la invención. De hecho, varias modificaciones de la invención y muchas más de sus realizaciones, además de las mostradas y descritas en la presente memoria, se harán patentes para los expertos en la materia a partir de los contenidos completos de este documento, entre otros los ejemplos que siguen y las referencias a la bibliografía científica y de patentes citada en la presente memoria.

Los siguientes ejemplos contienen importante información, ejemplificación y orientaciones adicionales que pueden adaptarse a la puesta en práctica de esta invención en sus varias realizaciones y sus equivalentes.

Ejemplos

Compendio

El tratamiento con antagonistas de $GABA_A$ puede restablecer funciones cognitivas de ratones Ts65Dn, un modelo genético para el síndrome de Down. Ya que estos fármacos son también convulsionantes, los inventores evaluaron las estrategias terapéuticas más seguras utilizando un agonista inverso (α5IA) selectivo para los receptores $GABA_A$-benzodiazepina que contienen el subtipo α5 que inhibe la transmisión GABAérgica sin presentar actividades convulsionantes. Los inventores demuestran que α5IA alivia las deficiencias del aprendizaje y la memoria en ratones Ts65Dn al potenciar productos génicos iniciales inmediatos producidos por el comportamiento en el cerebro.

El síndrome de Down es la causa genética más frecuente de retraso mental (1/800 nacimientos), y está caracterizado por grados variables de deficiencias cognitivas [ref. 17]. Datos recientes sugieren que los cambios asociados al aprendizaje y la disfunción de la memoria en el SD podrían proceder, en parte, del aumento de inhibición GABAérgica en el cerebro, abriendo nuevas vías para la intervención terapéutica [ref. 2, 18]. La utilización de antagonistas de $GABA_A$ no competitivos puede restablecer de hecho fenotipos alterados en ratones con SD [ref. 3, 19]. Sin embargo, estos fármacos son convulsionantes a altas dosis, evitando su empleo, sobre todo en pacientes con SD que pueden ser más propensos a las convulsiones [ref. 9].

El objetivo del presente trabajo era evaluar el potencial terapéutico de un agonista inverso selectivo para α5, la 3-(5-metilisoxazol-3-il)-6-[(1-metil-1,2,3-triazol-4-il)metiloxi]-1,2,4-triazolo[3,4-a]ftalazina [ref. 8] activa por vía oral, denominada en la presente memoria compuesto α5IA, en ratones Ts65Dn con deficiencia cognitiva que modelan el SD [ref. 1].

Los inventores en primer lugar comprobaron que el nivel de expresión del gen Gabra5 codifica la subunidad α5 $GABA_A$ era comparable en ratones Ts65Dn y euploides (Fig. 2). Los inventores sintetizaron α5IA según Sternfeld [ref. 8] (Fig. 1) y seleccionaron la dosis de 5 mg/kg i.p. para estimular efectos promnésicos claros en ratones (Fig. 5) con actividad convulsionante/proconvulsionante no asociada (véase el ejemplo 3 y la tabla 1) ni ansiógena y efectos locomotores (Figs. 6 y 7). El examen histopatológico no puso de manifiesto alteraciones tisulares tras el tratamiento prolongado con α5IA (Fig. 8 y comentarios en la figura 8). Dada la ausencia de efectos secundarios de α5IA, los inventores evaluaron su potencial terapéutico para recuperar el conocimiento alterado en ratones Ts65Dn.

La memoria espacial se evaluó en la tarea del laberinto acuático de Morris (LAM), en el que los ratones nadan en su medio para encontrar una plataforma oculta (Fig. 11A). Se administró i.p. α5IA o placebo 30 min antes de cada

sesión de adiestramiento. Aunque muestran capacidades visuales normales (Fig. 9), los ratones Ts65Dn bajo placebo se alteraron profundamente en comparación con los ratones euploides (p<0,0025), y presentaron un retardo para mejorar su eficacia de aciertos a través de las sesiones (p<0,025) (Figs. 11B y C). El tratamiento con α5IA disminuyó la utilización de estrategias de búsqueda ineficientes por ratones Ts65Dn (véanse Comentarios en las figuras 9 y 10, y Fig. 10) y sobre todo permitiéndoles recuperar la eficacia de aprendizaje normal (Fig. 11B y C). Se evaluó la retención durante una prueba con una sola sonda (sin plataforma disponible). La memoria para el objetivo se demostró en ratones euploides (p<0,05) pero no en ratones Ts65Dn, incluso después del tratamiento con α5IA (p>0,38) (Fig. 11D).

La memoria no espacial se evaluó en la tares de reconocimiento de nuevos objetos (RNO) (Fig. 12A). Se proporcionaron tratamientos 30 min antes de la obtención. Los ratones Ts65Dn bajo placebo presentaron una deficiencia de la memoria cuando se comparaban con ratones euploides (p<0,05). Después del tratamiento con α5-IA, la memoria de reconocimiento se potenció en gran medida tanto en grupos Ts65Dn como euploides (p<0,001) que presentaron eficacia de alta retención similar (falta de efecto de genotipo: p>0,99).

En paralelo los inventores realizaron un análisis de la cartografía cerebral del producto génico inicial inmediato fos noventa minutos tras la obtención de la tarea de RNO (Figs. 12B y 13). Se observó aumento de inmunorreactividad de fos en ratones euploides y Ts65Dn tratados con α5IA en comparación con los ratones bajo placebo. Especialmente, se observó el aumento de inmunorreactividad de fos provocado por α5IA en diferentes áreas cerebrales involucradas en la memoria de reconocimiento (p. ej. corteza perirrinal) pero no en el giro dentado, que contiene solamente bajos niveles de expresión de los receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 [ref. 21].

En este estudio los inventores demostraron que los ratones Ts65Dn que reciben una sola administración de α5IA aumentaron su eficacia cognitiva en la tarea del RNO. Además, el tratamiento repetido con α5IA en todas las sesiones de adiestramiento en la tarea del LAM permitió a los ratones Ts65Dn disminuir sus comportamientos anómalos en la búsqueda, y aprender un lugar objetivo fijado con la misma eficiencia que los ratones euploides. α5IA, debido a su falta de efectos convulsionantes o ansiógenos, tiene unas características terapéuticas más favorables que otros fármacos GABAérgicos (antagonistas de $GABA_A$) y de hecho ya ha sido aprobado para estudios en personas [ref. 10].

Materiales y Métodos

a. Animales

Se produjeron ratones en el centro de recursos Intragene (TAAM, CNRS UPS44 Orleans, Francia) y se reprodujeron en un fondo genético mixto (B6C3<B>(I)) que lleva un alelo funcional de Pd6b similar al que se describe en Costa *et al*. [ref. 24], evitando de este modo la degeneración retiniana y el fenotipo de la ceguera en los ratones modificados genéticamente. Para cada experimento, se utilizaron diferentes cohortes de ratones sin experimentación previa para evitar confundir los efectos de pruebas repetidas. Cuando se transfirieron de un centro de animales al otro, los ratones se aclimataron a su nuevo medio durante al menos 2 semanas antes de iniciar experimentos de comportamiento. La salud general de los ratones se comprobó regularmente y los pesos corporales se evaluaron semanalmente en todos los periodos experimentales.

Todos los experimentos se realizaron según las normas éticas de los reglamentos francés y europeo (Directiva del Consejo para las Comunidades Europeas de 24 de noviembre de 1986). El supervisor de los estudios *in vivo* (B. Delatour) recibió autorización oficial del ministro francés de Agricultura para llevar a cabo investigación y experimentos en animales (autorización nº 91-282).

b. RCP cuantitativa en tiempo real de Gabra-5

La expresión del gen Gabra-5 se estudió utilizando RCP cuantitativa en tiempo real (qRCP) en 9 ratones euploides y 7 Ts65Dn. Se extrajeron ARN completos de los hipocampos disecados y se trataron con DNasa utilizando el kit Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Francia). De cada hipocampo, se transcribieron a la inversa individualmente 500 ng de ARN completo en ADNc durante la noche a 37°C utilizando el kit Verso cDNA (ThermoFisher Scientific, Waltham, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. Los ADNc se diluyeron 1:20 a continuación para la ampliación por qRCP en tiempo real de los genes Gabra-5 y pPib (ciclofilina B) como gen de referencia (los cebadores y sondas se diseñaron mediante el programa informático ProbeFinder, http://www.universalprobelibrary.com)

Los ensayos por qRCP se realizaron en un Lightcycler® 480 System (Roche), en presencia de 200 nM de cada cebador, 100 nM de sonda específica para hidrólisis y 1X Lightcycler® 480

Sondas Master mix (Roche, Francia). Cada reacción se llevó a cabo por triplicado según las instrucciones del fabricante. Se calcularon valores de la expresión normalizada de Gabra-5 utilizando el programa informático Lightcycler® 480 SW 1.5 .

c. Análisis Estadístico

Los datos de comportamiento y morfológicos se analizaron utilizando estadísticas paramétricas, dependiendo de las variables estudiadas. En la mayoría de los casos, los datos se analizaron utilizando un análisis de la variancia (ANOVA) con dos factores: genotipo (euploide frente a Ts65Dn) y tratamiento (placebo frente a α5IA). La significación estadística se fijó para un valor p <0,05. Todos los análisis se realizaron utilizando los paquetes informáticos Statistica v6 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EE.UU.) o GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE.UU.) .

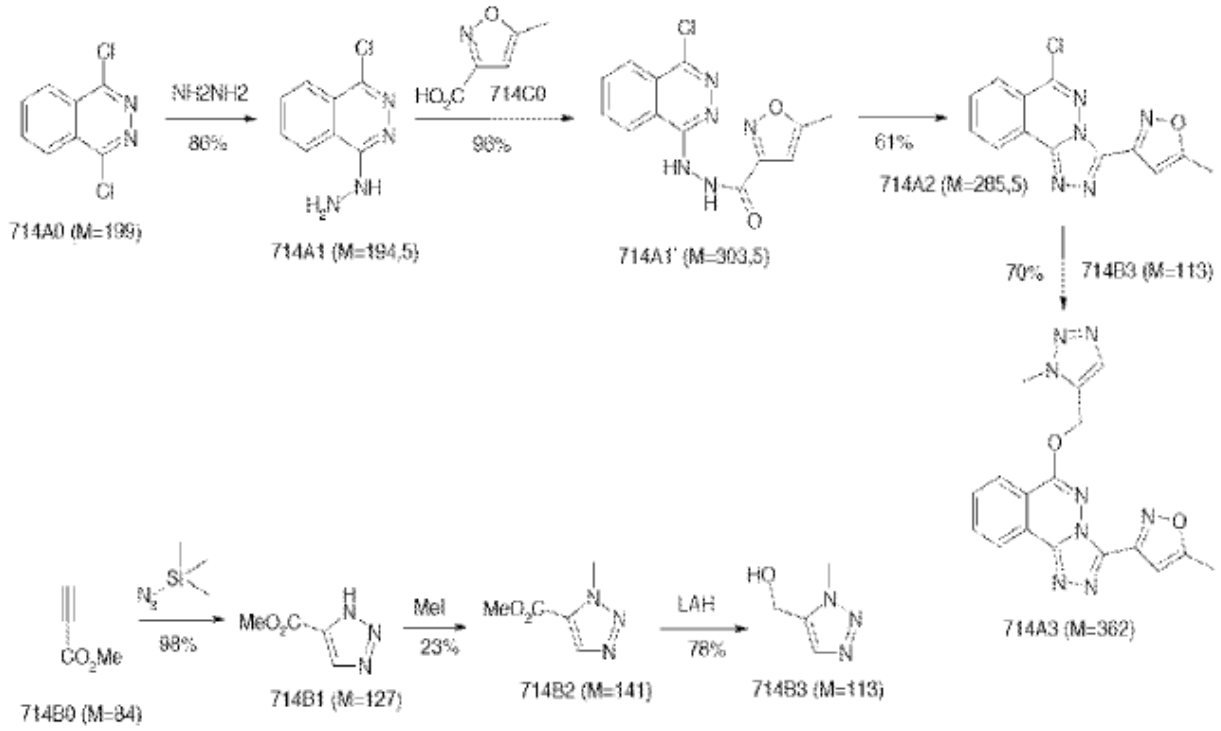
Obsérvese que para facilitar la presentación de los resultados, las estadísticas de ANOVA se han presentado utilizando solamente los valores p.

Cuando no están explícitamente expresadas en las legendas de las figuras, las variables dependientes se han representado en cada grupo como media ± error típico para la media (SEM).

Ejemplo 1: Síntesis del compuesto α5IA (714A3)

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "temperatura ambiente" se refiera a una temperatura comprendida entre 20°C y 25°C.

El compuesto α5IA (714A3) se obtuvo en 4 etapas partiendo del 714A0 con un rendimiento global del 35,3%. Estas 4 etapas se detallan a continuación.



Etapa 1: Síntesis del compuesto 714A1

El compuesto 714A0 (1 eq., 9,96 g, 50,1 mmol) se introdujo en un matraz de fondo redondo de 250 ml. Se añadieron con agitación magnética 106,4 ml de alcohol etílico (36 eq., 1,80 mol), a continuación 4,8 ml de hidróxido amónico al 20% (0,5 eq., 0,03 mol). La mezcla se calentó a 60°C. Se añadió gota a gota a continuación durante 5 minutos hidrazina monohidratada (3,6 eq., 0,18 mol, 9,0 g). La mezcla resultante se calentó a reflujo durante 10 minutos (mezcla espesa, la agitación fue difícil). La mezcla se dejó enfriar a continuación por debajo de la temperatura ambiente. La mezcla se filtró, el matraz se enjuagó con una cantidad mínima de alcohol etílico. El filtro se lavó con agua, alcohol etílico y éter. Después del secado, se obtuvieron 8,32 g de compuesto 714A1 en forma de un sólido blanquecino. El rendimiento fue del 86%.

Etapa 2: Síntesis del compuesto 714A1'

Se introdujeron bajo argon en un reactor de 2 l con agitación mecánica CH_2Cl_2 (1051,6 ml, 383 eq., 16,34 mol), el compuesto 714C0 (5,4 g, 1 eq., 0,04 mol), a continuación trietilamina (11,8 ml, 2 eq., 0,09 mol). La mezcla resultante

se enfrió por debajo de 0°C con agitación, a continuación se añadió cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico (BOP-C1, 10,9 g, 1 eq., 0,04 mol). Después de agitar a esta temperatura durante 45 minutos, se introdujo el compuesto 714A1 (8,3 g, 1 eq., 42,7 mmol). La mezcla se dejó en agitación a 0°C durante 2 horas, a continuación a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se evaporó, se puso en suspensión en agua y se filtró. El sólido resultante se lavó dos veces con agua, a continuación se secó en evaporador rotativo con alcohol etílico. El sólido se puso en suspensión y se lavó con pentano para proporcionar el compuesto 714A1' en forma de un sólido amarillo (m=12,4 g). Rendimiento: 96%.

Etapa 3:Síntesis del compuesto 714A2

Se introdujeron en un matraz de 1 l de fondo redondo de tres bocas con agitación magnética clorhidrato de trietilamina (2,5 g, 0,4 eq., 0,02 mol), xileno (601,2 ml, 119 eq., 4,87 mol), a continuación el compuesto 714A1' (12,4 g, 1 eq., 40,9 mmol). La mezcla resultante se dejó a reflujo durante 3 horas, a continuación se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche. Se añadió DCM (CH_2Cl_2) a la suspensión resultante para obtener una mezcla homogénea. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y el disolvente se evaporó. El residuo se puso en suspensión en pentano para proporcionar 8,39 g de un sólido amarillo. El sólido se puso en suspensión para una extracción con DCM/H_2O. Después del tratamiento habitual, se obtuvo el compuesto 714A2 en forma de un sólido amarillo (7,1 g). Rendimiento: 61%.

Etapa 4: Síntesis del compuesto α5IA (714A3)

a) Síntesis del reactivo 714B3

El compuesto 714A3 se obtuvo en 3 etapas partiendo del 714B0 con un rendimiento global del 17,6%. Estas 3 etapas se detallan a continuación.

- Síntesis del compuesto 714B1:

El compuesto 714B0 (24,9 ml, 1 eq., 0,298 mol) y $(CH_3)_3SiN_3$ se introdujeron en un autoclave de 1 l con agitación magnética. La mezcla resultante se calentó a 105°C durante 90 horas. La mezcla se enfrió por debajo de 0°C, a continuación se añadieron gota a gota 36 ml de metanol. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 45 minutos, a continuación se añadieron 20 ml de éter. El sólido se filtró, se lavó con éter, con pentano, a continuación se secó a proporcionar un sólido blanquecino (37,36 g). El sólido se puso en suspensión en 80 ml de metanol. La mezcla resultante se calentó a reflujo (disolución), a continuación se añadió éter hasta enturbiar la solución. La mezcla se dejó sin agitar y sin calentar durante 2 horas. La suspensión resultante se filtró, se lavó con éter para proporcionar el compuesto 714B1 en forma de un sólido blanco (28 g + 9 g para el 2º lote). Rendimiento: 98%.

- Síntesis del compuesto 714B2:

El compuesto 714B1 (27 g, 1 eq., 0,213 mol) y a continuación DMF (434,8 ml, 26,3 eq., 5,59 mol) se introdujeron en un reactor de 500 ml en agitación mecánica. La mezcla resultante se enfrió por debajo de 0°C. Se añadió en porciones K_2CO_3 (35,21 g, 1,2 eq., 0,255 mol), a continuación se añadió gota a gota CH_3I (31,7 g, 1,05 eq., 0,223 mol). La mezcla se agitó a 0°C durante 1 hora, a continuación a temperatura ambiente durante la noche. Se evaporó el disolvente; el residuo se puso en suspensión en agua y se extrajo con CH_2Cl_2. Después de secar y evaporar, el sólido se puso en suspensión en CH_2Cl_2. La fase orgánica se lavó con agua y las fases acuosas se volvieron a extraer con CH_2Cl_2. Las fases orgánicas se recogieron, se secaron sobre $MgSO_4$, se filtraron, a continuación se evaporó el disolvente. El aceite resultante se puso en suspensión en éter y el sólido resultante se filtró y se lavó con éter para proporcionar 6,98 g de compuesto 714B2 en forma de un sólido blanco. Rendimiento: 23%.

- Síntesis del compuesto 714B3:

El compuesto 714B2 (6,98 g, 1 eq., 49,5 mmol) y THF (tetrahidrofurano,81,1 ml, 20 eq., 0,99 mol) se introdujeron en un reactor de 250 ml en agitación mecánica. La mezcla resultante se enfrió por debajo de 0°C. Se añadió en porciones LAH (hidruro de litio y aluminio o $LiAlH_4$, 1,9 g, 1 eq., 0,05 mol) . La mezcla se agitó a 0°C durante 30 minutos, a continuación a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se enfrió por debajo de 0°C, a continuación se hidrolizó con 2 ml de agua, 2 ml de NaOH al 15%, a continuación 6 ml de agua. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, se filtró la mezcla, se lavaron las sales con THF, a continuación se evaporó el disolvente. Se puso en suspensión el residuo en CH_2Cl_2, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró, a continuación se evaporó el disolvente para proporcionar 4,34 g de compuesto 714B3 en forma de un aceite que cristaliza. Rendimiento: 78%.

b) Reacción entre el compuesto 714A2 y el reactivo 714B3

El reactivo 714B3 (2,8 g, 1 eq., 0,02 mol) y a continuación DMF (dimetilformamida,665,2 ml, 344 eq., 8,55 mol) se introdujeron en un reactor de 2 ml en agitación mecánica. La mezcla resultante se enfrió por debajo de -10°C. Se añadió gota a gota LiHMDS (hexametildisilazida de litio en tetrahidrofurano 1,06 M, 26,9 ml, 1,1 eq., 0,03 mol) durante 10 minutos . La mezcla se agitó a -10°C durante 50 minutos. El compuesto 714A2 (7,1 g, 1 eq., 24,9 mmol) en solución en 90,9 ml de DMF (47 eq., 1,17 mol) se añadió rápidamente gota a gota a la mezcla. La mezcla se dejó en agitación a temperatura ambiente durante la noche, a continuación se hidrolizó con agua (450 ml, reacción

exotérmica). La suspensión resultante se filtró y se lavó con agua. La torta filtrante resultante se secó en evaporador rotativo (polvo blanco: 7.4 g). Los intentos para recristalizar el sólido en $CHCl_3$ fallaron. El residuo se purificó por cromatografía en gel de sílice (eluyente: DCM/AcOEt: 5/5 a continuación DCM/CH_3OH: 85/15) para proporcionar el compuesto α5IA (714A3) en forma de un sólido blanco (6,3 g). Rendimiento: 70%.

Ejemplo 2: Efecto de α5IA sobre ratones Ts65Dn - Tarea de reconocimiento de objetos

El protocolo del ensayo es una variante del método de ensayo según Fernández *et al*. 2007. El protocolo de reconocimiento de objetos utilizado para estudiar el aprendizaje y la memoria se llevó a cabo en un periodo de 10 minutos entre la primera presentación de los objetos y el cambio de un objeto. Los ratones euploides y Ts65Dn se probaron con o sin tratamiento con α5IA. El aparato constaba de un plano cuadrado negro (50 x 50 cm) situado en una sala bajo luminosidad suave controlada (4-6 Lux) y ruido blanco constante de 60dB. El primer día, el experimentador manipuló todos los ratones (16 ratones euploides y 16 Ts65Dn) en las instalaciones de los animales 2 x 3 min para familiarizarles con el contacto humano. El 2º día, los ratones se colocaron durante 20 min en el plano vacío para acostumbrarles al aparato y a la sala de ensayo. El 3er día, se colocaron cuatro objetos idénticos simétricamente en las esquinas del plano, 14 cm de las paredes laterales. Se dejó explorar los objetos a los ratones durante 20 min. El día de la prueba (4º día), los ratones se inyectaron i.p. con el placebo o la formulación α5IA antes de la sesión de comportamiento (8 ratones euploides y 8 Ts65Dn en cada grupo). Treinta min después de las inyecciones, los ratones se colocaron en el aparato experimental que contenía dos objetos idénticos y se les dejó explorar durante 10 min. Después de esta fase de obtención, los ratones volvieron a su propia jaula durante un intervalo de retención de 10 min. Para probar la memoria de reconocimiento a corto plazo, se colocaron en el aparato un objeto familiar (tal como uno de la etapa de obtención) y un objeto nuevo, y los ratones se colocaron por una segunda vez en la cámara durante 10 min para explorar los dos objetos. Entre cada prueba, los objetos se limpiaron con etanol de 70° a fin de reducir señales olfativas.

Durante todas las sesiones al descubierto, los ratones fueron controlados utilizando un sistema de seguimiento por vídeo (Any-Maze TM). La exploración de objetos se puntuó manualmente con un teclado etológico y se definió como la orientación del ruido al objeto a una distancia < 6 cm. Sentarse en el objeto no se consideró una exploración del objeto.

Para la fase de retención, se calculó el tanto por ciento de tiempo de exploración conocida frente a nuevos objetos para evaluar la eficacia de la memoria (una puntuación de 50% correspondiente a tiempos de exploración iguales de los dos objetos indicados sin memoria del objeto). Obsérvese que un ratón euploide y dos ratones Ts65Dn se eliminaron del análisis estadístico porque presentaban niveles anormalmente bajos de exploración de objetos durante la prueba de retención (t<7 sec), excluyendo análisis de su eficacia de memoria. Los restantes ratones pasaron una gran cantidad de tiempo explorando objetos (media ± SEM= 77± 12,9 s).

La relación de discriminación se calculó empleando la fórmula:

$$I = \left(\frac{\text{Tiempo (nuevo objeto)}}{\text{Tiempo (nuevo objeto) + Tiempo (objeto conocido)}}\right) \times 100$$

Se investigó el efecto del agonista inverso receptor de benzodiazepina funcionalmente selectivo para el subtipo α5 de receptor $GABA_A$, α5IA, en un modelo murino de síndrome de Down empleando ratones Ts65Dn. Durante la evaluación se ensayaron ratones Ts65Dn y naturales para reconocimiento de nuevos objetos. Los ratones Ts65Dn tratados con α5IA tenían eficacia para el reconocimiento de objetos normal anterior en comparación con los ratones naturales que reciben un placebo. Los ratones Ts65Dn tratados con α5IA eran eficaces para el reconocimiento de objetos al igual que los ratones naturales tratados con α5IA.

Ejemplo 3: Estudio de efectos convulsionantes o proconvulsionantes de α5IA en ratones Ts65Dn

Comparación de β-CCM y αSIA

Se evaluó la acción convulsionante del α5IA o beta CCM después de una sola inyección intraperitoneal de 50 o 3 mg/Kg de α5IA o beta CCM, respectivamente. La dosis de 50 mg/Kg de α5IA correspondía a 10 veces la dosis con efectos promnésicos y 10 veces la dosis activa en la prueba de reconocimiento de objetos (5 mg/Kg)

Para probar los efectos proconvulsionantes de α5IA, se inyectó i.p. una dosis subconvulsionante of pentilentetrazol (45 mg/kg i.p.) que provoca convulsiones mioclónicas en aproximadamente 50% de los ratones 20 min tras la inyección de α5IA (50 mg/kg) o placebo.

Se midió la acción proconvulsionante del α5IA tras la inyección de una dosis subconvulsionante de pentilentetrazol. Se inyectó a los ratones vehículo o el α5IA (50 mg/kg i.p) y 20 min después recibieron una inyección intraperitoneal de 45 mg/kg de pentilentetrazol. Se observaron los animales durante 20 min (efectos convulsionantes) o 50 min

(efectos proconvulsionantes): Se registraron la aparición y la latencia del primer episodio de contracción mioclónica. Se utilizaron seis a 7 ratones para cada estado. Se registraron la latencia del primer episodio de contracción mioclónica y el grado de convulsión durante un periodo de observación de 1.200 s. Se determinaron empíricamente cuatro grados: Grado 0 : sin efecto; grado 1: cola arriba y curvada; grado 2: cola invertida y escalofríos convulsivos; grado 3: convulsiones mioclónicas.

Ni los ratones euploides ni los Ts65Dn presentaban convulsiones tras la inyección (véase la Tabla 1). Los inventores probaron a continuación el efecto proconvulsionante de α5IA inyectandoles (50 mg/kg) 20 min antes de una dosis subconvulsionante de pentilentetrazol (45 mg/kg) que provoca convulsiones mioclónicas en aproximadamente el 50% de los ratones. La inyección de α5IA potenció actividad convulsionante de pentilentetrazol en ratones euploides o Ts65Dn.

Tabla 1

Efectos convulsionantes			
Genotipo	Tratamiento	Latencia a contracciones mioclónicas	Proporción de ratones convulsionantes
Euploides	Placebo	/	0/6
	α5IA (50 mg/kg)	/	0/6
Ts65Dn	Placebo	/	0/6
	α5IA (50 mg/kg)	/	0/7
Efectos proconvulsionantes tras el pentilentetrazol (45 mg/kg)			
Euploides	Placebo	448,8±145,5	4/6
	α5IA (50 mg/kg)	330,7±90,21	3/6
Ts65Dn	Placebo	507,3±39,77	3/6
	α5IA (50 mg/kg)	796,3±354,0	4/7

α 5IA (50 mg/kg) no estimuló efectos convulsionantes, en ratones euploides o Ts65Dn. El fármaco tampoco modificó la acción convulsionante del pentilentetrazol (45 mg/kg) en los dos genotipos.

Ejemplo 4: Formulación farmacéutica mejorada que comprende α5IA como principio activo

Se comparó el efecto de la administración i.p. en ratones de diferentes formulaciones de α5IA.

Se evaluaron las propiedades físicas de las formulaciones α5IA - PEG300/NaCl 9‰ (7:3), α5IA - DMSO/Cremophor EL/agua (10:15:75) y sal de HCl de α5IA DMSO/Cremophor EL/agua (10 :15 :75) para viscosidad (fluido (0) a muy viscoso (+++)), aspecto macroscópico (solución o suspensión), número de cristales (alta densidad (+) o muy alta densidad (++)) y tamaño de los cristales.

Los impactos biológicos de las formulaciones se cuantificaron con respecto a la insuficiencia motriz (sin efecto motriz (0) - reducción importante de capacidades motrices (++)) y tasa de mortalidad después de una sola inyección de 250 µl.

-	0,6 µg/µl de α5IA (base libre) PEG-300/NaCl 9‰ (7:3)	0,6 µg/µl de α5IA (base libre) DMSO/Cremophor EL/agua (10:15:75)	0,6 µg/µl de sal de α5IA HCl DMSO/Cremophor EL/agua (10:15:75)
Viscosidad	+++	0	0
Aspecto	Suspensión opaca	Suspensión opaca	Suspensión opaca
Presencia de cristales	+	++	++
Tamaño de cristales	356,9±40,69 µm	260,1±36,91 µm	112,6±15,52 µm
Homogeneidad de cristales	-	-	++
Impacto sobre aptitudes motrices 250 µl	++	0	0
Mortalidad del placebo 250 µl	10%	0%	0%

Ejemplo 4: Efecto de respuesta a la dosis de α5IA

Para determinar la dosis óptima de α5IA, se llevó a cabo un estudio de respuesta a la dosis en ratones euploides adiestrados en la tarea de emparejamiento demorado con la muestra (DMTP), un paradigma clásico de aprendizaje y memoria utilizado para evaluar los efectos promnesiantes de fármacos, y en particular de agonistas inversos de $GABA_A$ α5 [ref. 8, 9, 11].

Se llevaron a cabo experimentos en un laberinto acuático de Morris (LAM). El laberinto era un depósito de 150 cm de diámetro lleno con agua opacificada mantenida a 19°C y equipada con una plataforma de 9 cm de diámetro sumergida 1 cm bajo la superficie del agua. Se utilizaron un total de 27 ratones. Los animales se distribuyeron al azar y equitativamente en 3 grupos (placebo, 1mg/kg de α5IA, 5mg/kg de α5IA). El adiestramiento se llevó a cabo durante 7 días. Se proporcionó a los animales cuatro pruebas por sesión, y la posición de la plataforma oculta se alteró cada día como se describe en la Fig. 5-a, pero permanecía constante en cada sesión. Se inyectó a los ratones placebo o α5IA 30 min antes del comienzo de la prueba de comportamiento. Cada uno de los ratones de la prueba se liberaron en el depósito desde un punto de partida aleatorio, y se les dejó nadar hasta que alcanzaban la plataforma. La duración máxima de la prueba fue de 90 s, tras lo cual los ratones fueron guiados manualmente a la plataforma. Una vez en la plataforma, a los animales se les dio un descanso de 30 s antes de volver a colocarlos en su propia jaula. Al final de un intervalo de 30 s entre las pruebas,los ratones se introdujeron de nuevo en el depósito para la siguiente prueba utilizando una nuevo punto de partida. Este procedimiento se repitió hasta que se habían completado cuatro pruebas. La evaluación de la memoria se determinó comparando a distancia para alcanzar la plataforma en la primer prueba (prueba de obtención) y la distancia media recorrida en pruebas posteriores (pruebas de retención).

Ejemplo 5: Actividad locomotriz

Se evaluó la actividad locomotriz en un total de 33 ratones 30 min. después de las inyecciones i.p. (placebo: 8 ratones euploides y 7 Ts65Dn; α5IA (5 mg/kg): 10 ratones euploides y 8 Ts65Dn; Se midió la locomoción en un área cuadrada (50 cm×50 cm al descubierto; luminosidad: 30 lux) con paredes negras de 30 cm de altura. En resumen, cada animal se colocó en el centro del plano y dejó explorar libremente durante 10 min. La actividad horizontal se controló utilizando el programa informático Any-Maze. Se registró el tiempo transcurrido en la zona periférica de 10 cm de ancho y en la zona central complementaria de 30 cm×30 cm para evaluar la ansiedad.

Ejemplo 6: Pruebas de comportamiento relacionadas con la ansiedad

La modulación de comportamientos por α5IA relacionados con la ansiedad se evaluó con más precisión utilizando el laberinto en cruz elevado, en un total de 42 ratones, 30 min después de las inyecciones i.p. (placebo: 11 ratones euploides y 7 Ts65Dn; α5IA (15 mg/kg): 14 ratones euploides y 10 Ts65Dn; El laberinto se construyó de perspex negro (longitud, 28 cm; anchura, 5 cm; altura desde el suelo, 40 cm; luminosidad total en los brazos abiertos: 70 lx) con dos brazos abiertos opuestos, y dos brazos cerrados equipados con tres paredes de 16 cm de altura. Los ratones se colocaron en la zona central del laberinto y se registró el comportamiento durante un periodo de 5 min utilizando el programa informático Any-Maze que calcula automáticamente el tiempo transcurrido en las diferentes partes del laberinto (p. ej., brazos abiertos y cerrados).

Para explorar la potencial adversidad de las inyecciones prolongadas de α5IA (5 mg/kg), se trató otro grupo de ratones euploides durante dos semanas (5 inyecciones/semana; 5 ratones tratados con α5IA; 5 ratones tratados con placebo). Después del tratamiento repetido, estos ratones se evaluaron en el laberinto en cruz elevado como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 7: Anatomopatología después de tratamiento prolongado con α5IA

ratones tratados durante 2 semanas con α5IA y probados en el laberinto en cruz elevado se trataron más durante otras 3 semanas. El último día de tratamiento, se recogieron muestras de orina 2 horas después de la administración de α5IA o placebo i.p.. La orina se guardó a -20°C antes de su análisis. Al día siguiente, se inyectó i.p. a los ratones una sobredosis de pentobarbital sódico. Los ratones fuertemente anestesiados recibieron un enjuague con PBS mediante una perfusión intracardíaca. Para el examen anatomopatológico, se sacrificaron además 3 ratones euploides adicionales no inyectados. El hígado, el riñón, el cerebro y el bazo se disecaron y se fijaron en una solución de formalina al 10%. Los tejidos se empaparon en parafina a continuación y se cortaron utilizando un microtomo (secciones de 5 μm de espesor) antes de que se procesen para su evaluación histopatológica de rutina (hematina-eosina y ácido peryódico-tinciones de Schiff).

Ejemplo 8: Laberinto acuático de Morris (LAM)

Se evaluó la memoria de referencia espacial utilizando la tarea típica del laberinto acuático de Morris. El laberinto era similar al descrito anteriormente (efectos de respuesta a la dosis de α5IA). La plataforma se sumergió 1 cm por debajo de la superficie del agua en el centro de uno de los cuadrantes del depósito. Durante el adiestramiento espacial alocéntrico la plataforma oculta permaneció en una posición constante de principio a fin de las pruebas con numerosos índices visuales externos disponibles para facilitar la formación de cartografías espaciales cognitivas.

Se utilizaron un total de 32 ratones (16 ratones euploides y 16 Ts65Dn). Los animales se distribuyeron al azar y equitativamente en 4 grupos. Cada día se inyectó a los ratones placebo o α5IA (5 mg/kg) 30 min antes del comienzo de la prueba de comportamiento.

El primer día, se sometió a los ratones a una sola prueba de habituación con la plataforma oculta disponible. En los seis días siguientes, el adiestramiento espacial alocéntrico consistía en sesiones diarias (2 pruebas por sesión). Las posiciones iniciales variaron de manera seudoaleatoria entre los cuatro puntos cardinales. El intervalo medio entre pruebas fue de 2 horas. Durante las fases de habituación y adiestramiento espacial cada prueba acababa cuando el animal alcanzaba la plataforma. Se utilizó un límite de 90 s, tras el cual los ratones fueron guiados manualmente a la plataforma. Una vez en la plataforma, a los animales se les dio un descanso de 20 s antes de volver a colocarlos en su jaula. Veinticuatro horas después de la última sesión de adiestramiento, se llevó a cabo una prueba con sonda (8º día) durante el cual se retiró la plataforma y se dejó a los ratones nadar libremente durante 60 s.

Después de la evaluación de las aptitudes de aprendizaje espacial y memoria, se controló la capacidad visual de los ratones empleando un procedimiento de adiestramiento no espacial. La posición de la plataforma se señaló directamente mediante una bola blanca de estireno colocada 12 cm por encima de la superficie del agua y el acceso a los índices externos se evitó mediante una cortina negra que rodeaba el depósito. Las pruebas en esta tarea de navegación visualmente guiada consistieron en 4 sesiones diarias durante 4 días consecutivos como se ha descrito anteriormente.

Todos los datos se recogieron, analizaron y guardaron utilizando a sistema de seguimiento por vídeo (Ethovision, Noldus, Wageningen, Holanda).

Obsérvese que un ratón Ts65Dn se descartó a partir del análisis estadístico porque presentaba un comportamiento anormal en flotación y disminuía la velocidad de nado en el laberinto. Durante la prueba con sonda se retiró del análisis un ratón suplementario (euploide) por la misma razón.

Ejemplo 9: Medición de la inmunorreactividad cerebral a fos

Se investigó el mecanismo de acción de α5IA cuantificando la actividad neuronal midiendo la producción de la proteína fos en ratones sometidos a una tarea de reconocimiento de objetos (exploración de un nuevo medio).

Es sabido que esta proteína, un factor de transcripción, se sintetiza local y rápidamente en el cerebro en poblaciones neuronales activadas por estímulos endógenos o exógenos. En particular, numerosos datos de la bibliografía demuestran que el gen c-fos que codifica la proteína fos se expresa específicamente en la región en animales durante el aprendizaje. La expresión topografía de c-fos varía dependiendo del tipo de aprendizaje, lo que acentúa la especificidad del marcador.

En el punto de partida, la expresión de c-fos es baja en todo el SNC. Esto aumenta considerablemente después de un estímulo, y lo hace de modo específico en determinadas regiones del cerebro, de acuerdo con el agente inductor. La proteica fos puede detectarse por inmunohistoquímica convencional y el marcaje resultante es nuclear. Su máxima concentración es aproximadamente 2 h después de la estimulación y después disminuye (Hoffman *et al.*, 1993).

El protocolo que se utilizó implicaba el tratamiento de ratones (placebo o fármacos). 30 minutos después, los ratones se sometieron a exploración de un nuevo medio, una situación en la que el animal obtiene y almacena información espontáneamente. Esta estimulación del comportamiento activa el gen c-fos, y el producto de expresión de este gen (la proteína Fos) se detecta a continuación por inmunohistoquímica y se cuantifica utilizando programas informáticos de análisis de imagen especializados.

En este estudio se examinaron cuatro regiones del cerebro:

- El campo CA1 del hipocampo (CA1),

- El giro dentado del hipocampo (GD)

- La corteza del cuerpo calloso posterior, denominada también granular retrofasciolada cortical (RSG),

- La corteza perirrinal (PRH).

Estas cuatro regiones del cerebro están implicadas en mecanismos de tratamiento de información sensitiva y su memoria.

Ratones euploides (n=13) y Ts65Dn (n=6) se seudoadiestraron en la tarea de reconocimiento de objetos utilizando el mismo protocolo descrito en la tarea RNO, pero sin fase de retención. Treinta minutos antes de la obtención, a 6 ratones euploides y 3 Ts65Dn se les inyectó i.p. α5IA (5 mg/kg). A los animales restantes (7 ratones euploides y 3 Ts65Dn) se les inyectó placebo. Después de la sesión en campo abierto, se devolvieron los ratones a su propia jaula. Noventa minutos después de la estimulación del comportamiento, los ratones se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron a través del corazón con PBS. Se extrajeron los cerebros y se

fijaron en formalina al 10% durante una semana. Tras la crioprotección, se seccionaron los cerebros en un microtomo por congelación (secciones frontales en serie de 40 µm).

Una serie de secciones se procesó para inmunodetección de fos. Las secciones flotantes libres se incubaron con un anticuerpo anti-fos primario (policlonal AB-5, Calbiochem-VWR, Francia; dilución 1:10.000) durante 48 horas a 8°C. Las etapas posteriores fueron 1) incubación con anticuerpo secundario anti-conejo en cabra biotinilado (Sigma, Francia, 1:200), 2) reacción con avidina-biotina-peroxidasa (ABC Vectastain standard kit, Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU., 1:400), 3) reacción con diaminobenzidina potenciada con níquel (Ni-DAB) que forma precipitados gris oscuro. El tiempo de incubación en Ni-DAB fue el mismo para todos los ratones.

El análisis por la imagen se llevó a cabo de la manera siguiente: se fotografiaron regiones de interés (RDI) utilizando un microscopio Olympus BX61 (objectivo x10) e inmunotiñendo fos se cuantificó utilizando un programa informático especializado de tratamiento de imagen que calculaba automáticamente la proporción de tejido teñido con fos (p= área teñida/área total), que proporciona una medición estereológica objetiva de la inmunorreactividad a fos. Se analizaron cuatro RDI: corteza del cuerpo calloso posterior, corteza perirrinal, giro dentado y campo CA1 del hipocampo. Se tomaron muestras de cada RDI en varias secciones en serie y los resultados se promediaron a continuación para dar una evaluación cuantitativa fiable de inmunotinción local de fos.

Ejemplo 10: Preparación de membranas y ensayo de fijación

La afinidad de compuestos a subtipos del receptor $GABA_A$ puede medirse por competición para [^{3}H]flumazenil (85 Ci/mmol; Roche) fijación a células HEK293 que expresan receptores de rata (transfectados de manera estable) o humanos (transfectados temporalmente) de composición . α1β3γ2, α2β3γ2, α3β3γ2 y α5βγ2.

Los sedimentos celulares se pusieron en suspensión en tampón Krebs-tris (KCl 4,8 mM, $CaCl_2$ 1,2 mM, $MgCl_2$ 1,2 mM, NaCl 120 mM, Tris 15 mM; pH 7,5; tampón de ensayo de fijación), se homogeneizaron mediante Polytron durante aprox. 20 s en hielo y se centrifugaron durante 60 min a 4°C (50.000 g; Sorvall, rotor: SM24=20.000 rpm). Los sedimentos celulares se volvieron a poner en suspensión en tampón Krebs-tris y se homogeneizaron mediante Polytron durante aprox. 15 s en hielo. Se mide la proteína (método Bradford, Bio-Rad) y se preparan alícuotas de 1 ml y se almacenan a -80°C.

Se llevan a cabo ensayos de fijación de radioligandos en un volumen de 200 µl (placas de 96 pocillos) que contienen 100 µl de membranas celulares, [^{3}H]flumazenil a una concentración de 1 nM para las subunidades α1, α2, α3 y 0,5 nM para las subunidades α5 y el compuesto de ensayo en el intervalo de 10^{-10}-$3x10^{-6}$ M. La fijación inespecífica puede definirse por diazepam 10^{-5} M y puede representar por lo general menos del 5% de la fijación total. Los análisis se incuban hasta el equilibrio durante 1 hora a 4°C y se recogen sobre uni-filtros GF/C (Packard) por filtración utilizando un recogedor Packard y lavando con tampón de lavado enfriado con hielo (Tris 50 mM; pH 7,5). Después del secado, la radioactividad retenida en el filtro puede detectarse por recuento de centelleo líquido. Los valores Ki pueden calcularse utilizando Excel-Fit (Microsoft) y son los promedios de dos determinaciones.

Comentarios a la figura 8: Solubilidad y toxicidad renal de α5IA

Los estudios previos determinaron que α5IA se metaboliza exclusivamente en el metabolito hidroximetil-isoxazol M1 principalmente en la orina y en las heces [ref. 25]. M1 es poco soluble en agua y orina a temperatura ambiente, pero su solubilidad aumenta en la orina a 37°C. La dosis promnesiante eficaz de α5IA en ratas en la prueba LAM es de 3 mg/kg (3-5). Esta dosis corresponde al 80% de ocupación del receptor después de 2 h y 60% después de 8 h [ref. 25]. El estudio que publicó poca solubilidad del compuesto M1 se llevó a cabo después de tratar las ratas con una dosis casi 100 veces superior (240 mg/kg) durante 5 semanas [ref. 26]. La inducción de pielitis y papilitis renales relacionadas con la formación de cristales en las ratas tratadas se publicó en este estudio. Sin embargo después del tratamiento prolongado con α5IA a una dosis farmacológica (5 mg/kg), los inventores no observaron ninguna anomalía histológica en diferentes órganos de los ratones tratados ni formación de anormales cristales en la orina (véase la Fig. 8). Además, se llevó a cabo la determinación de la zona de concentración a saturación de M1 en la orina añadiendo M1 sólido (3 mg) en la orina [ref. 25, 26]. Este método no permite sin embargo estudiar la solubilidad de α5IA y de su metabolito M1 en la orina tras la administración periférica (p. ej. absorción oral). Dada la poca solubilidad de M1, la probabilidad de disolución en la orina es despreciable.

Aunque presenta poca solubilidad a muy altas dosis, α5IA parece ser bien tolerado en pacientes jóvenes y ancianos [ref. 25]. Se ha proporcionado anteriormente la información sobre la dosis que podría administrarse en estudios clínicos y sobre la duración del tratamiento con α5IA [ref. 26]. El estudio clínico sobre el síndrome alcohólico llevado a cabo por Nutt *et al.* [ref. 10] utilizó una sola administración de 4 mg por vía oral.

Para investigaciones clínicas del síndrome de Down que utilizan α5IA, podría ser aplicable el mismo tipo de protocolo. Alternativamente, moléculas recién desarrolladas que presentan características de agonista inverso en los receptores α5-$GABA_A$ serían también adecuadas en el contexto de la presente invención, especialmente tan pronto como han demostrado su inocuidad en seres humanos.

Comentarios a las figuras 9 y 10: Espectro de acción de α5IA sobre aprendizaje y memoria en ratones euploides y Ts65Dn.

La recuperación de insuficiencias de aprendizaje en ratones Ts65Dn por α5IA parecía ser específica. Por lo tanto, los defectos cognitivos α5IA contrarresta cuando no es debido a funciones sensitivas alteradas en la prueba LAM (Fig. 9) o a una motivación disminuida para explorar objetos en la tarea RNO ya que los niveles globales de exploración de objetos eran comparables en los dos genotipos durante la obtención de RNO y las fases de la prueba (ps>0,36). Esto acentúa que α5IA actúa principalmente como un potenciador cognitivo en los ratones tratados. En la versión señalada de la LAM que exige poco conocimiento, los inventores no hallaron ningún efecto de α5IA (Fig. 8; p>0,16), reforzando de este modo la hipótesis de que α5IA se dirige únicamente a funciones cognitivas complejas.

En la prueba LAM, los inventores observaron un fuerte efecto de α5IA sobre el tiempo transcurrido en el anillo más periférico de 10 cm de ancho del depósito. Este comportamiento tigmotáctico irrelevante disminuyó fuertemente después del tratamiento con α5IA (Fig. 10). El efecto fue significativo en ratones Ts65Dn (p<0,001) pero solo no pudo alcanzar significación estadística en ratones euploides (p=0,06), debido probablemente al hecho de que los ratones Ts65Dn presentaban un nivel basal global aumentado de tigmotaxia en comparación con los ratones euploides (p<0,0001). α5IA puede potenciar directamente aptitudes de aprendizaje y por consiguiente disminuyen la utilización de estrategias inadecuadas de resolución de problemas (p. ej., tigmotaxia). Alternativamente, su acción puede basarse en primer lugar en el alivio de comportamientos extraños irrelevantes con un efecto positivo indirecto en eficacias de obtención.

Además sus efectos terapéuticos en ratones Ts65Dn, α5IA también presentó una acción promnesiante en ratones euploides. La eficacia de ratones euploides fue considerablemente potenciada en la prueba RNO tras el tratamiento con α5IA.

Al contrario que la prueba DMTP, la tarea LAM requiere el animal para memorizar gradualmente, a lo largo de las pruebas y días, un lugar objetivo invariante. En este paradigma específico de memoria de referencia espacial, los inventores observaron que α5IA facilitaba claramente la eficacia de ratones Ts65Dn, pero los inventores no observaron un efecto promnesiante significativo de α5IA sobre la eficacia de aprendizaje ratones euploides de de referencia. Esto podría sugerir que las propiedades promnesiantes de α5-IA dependen tanto de la tarea como del genotipo. Sin embargo, esto no está conforme con los datos de otros estudios, que indicaban que la liberación de la inhibición GABAérgica utilizando otro inverso agonista α5 $GABA_A$ menos selectivo (L-655,708) o un antagonista $GABA_A$ no selectivo (pentilentetrazol) puede facilitar la obtención en la prueba del laberinto acuático de memoria de referencia, incluso en roedores salvajes con conocimiento normal.

Por último, los inventores evaluaron los efectos de α5IA sobre la recuperación de memorias espaciales a largo plazo (24 horas) durante la prueba con sonda de la tarea de navegación. Los resultados de los inventores indican que α5IA no aumentaron significativamente la eficacia de retención en ratones euploides o Ts65Dn, permaneciendo los últimos animales igualmente deficientes después de placebo o tratamiento con fármacos. Los ratones Ts65Dn tratados con α5IA, aunque aumentando gradualmente su aprovechamiento del aprendizaje a través de las sesiones hasta alcanzar la eficacia normal, no demostraron una representación adecuada del lugar objetivo según se evalúa por su poca eficacia de retención durante la prueba con sonda. Los datos de los inventores podrían indicar que α5IA principalmente ejerce su acción noótropa durante la obtención de información pero es menos potente en estimular la recuperación exacta de las memorias previamente formadas. Alternativamente, los agonistas inversos α5 $GABA_A$ pudieron, en algunas circunstancias, mejorar tanto la obtención como la recuperación de memorias espaciales. Sin embargo, estas conclusiones se obtuvieron en paradigmas de memoria basados en intervalos breves de retención (15-180 min) que no permitían completamente evaluar los recuerdos a largo plazo (al menos 24 horas) como normalmente se llevó a cabo durante las pruebas con sonda. A partir de los datos de los inventores, puede concluirse que los agonistas inversos α5 $GABA_A$ estimulan las eficacias de aprendizaje y pueden incluso aliviar deficiencias de aprendizaje en ratones Ts65Dn, pero esta acción suya en la recuperación de memorias a largo plazo es más disputable y/o podría ser dependiente de la tarea.

Listado de referencias

[Ref. 1] Reeves *et al.*, *Nature Genetics*, 11(2):177-84 (1995).

[Ref. 2] Kleschevnikov *et al.*, *The Journal of Neuroscience*, 24(37):8153-8160 (2004)

[Ref. 3] F. Fernández *et al.*, "Pharmacotherapy for cognitive impairment in a mouse model of síndrome de Down," *Nature Neuroscience*, 10:411-413 (2007).

[Ref. 4] Lobaugh N. J. *et al.* Piracetam does not enhance cognitive abilities in moderate to high-functioning 7 to 13 year-old children with síndrome de Down. Presentado en el congreso PAS/SPR en San Francisco 3 de mayo de 1999; publicado en *Archives of Ped. and Adol. Med.*, Abril de 2001, 155(4):442-448.

[Ref. 5] McNamara y Skelton, *Psychobiology*, 21(2):101-108 (2002).

[Ref. 6] Ballard *et al.*, *Psychopharmacology*, 202:207-223 (2009).

[Ref. 7] Atack *et al.*, *Neuropharmacology*, 51:1023-1029 (2006).

[Ref. 8] Sternfeld *et al.*, *J. Med. Chem.*, 47:2176-2179 (2004).

[Ref. 9] Dawson *et al.*, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(3):1335-1345 (2006).

[Ref. 10] Nutt *et al.*, *Neuropharmacology*, 53:810-820 (2007).

[Ref. 11] Chambers *et al.*, *J. Med. Chem.*, 47:5829-5832 (2004).

[Ref. 12] Collinson *et al.*, *J. Neurosci.*, 22:5572-5580 (2002).

[Ref. 13] Collinson *et al.*, *Psychopharmacology*, 188:619-628 (2006).

[Ref. 14] Venault *et al.*, *Nature*, 321(6073):864-866 (1986).

[Ref. 15] Schmitt *et al.* «Neuro-modulation, aminergic neuro-disinhibition and neuro-degeneration. Draft of a comprehensive theory for Alzheimer disease » *Med. Hypothesis*. 2005; 65(6):1106-19. Epub. 24 de agosto de 2005.

[Ref. 16] Palop *et al.* «Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease." *Neuron*. 6 de septiembre de 2007; 55(5):697-711.

[Ref. 17] Sherman, S. L., Allen, E. G., Bean, L. H. y Freeman, S. B. *Ment. Retard Dev. Disabil. Res. Rev*. 13, 221-227 (2007).

[Ref. 18] Best, T. K., Siarey, R. J. y Galdzicki, Z. *J. Neurophysiol*. 97, 892-900 (2007).

[Ref. 19] Rueda, N., Flórez, J. y Martínez-Cue, C. *Neurosci. Lett*. 433, 22-27 (2008).

[Ref. 20] Sur, C., Quirk, K., Dewar, D., Atack, J. y McKernan, R. *Mol. Pharmacol*. 54, 928-933 (1998).

[Ref. 21] Sperk, G., Schwarzer, C., Tsunashima, K., Fuchs, K. y Sieghart, W. *Neuroscience* 80, 987-1000 (1997).

[Ref. 22] Siarey, R. J., Stoll, J., Rapoport, S. I. y Galdzicki, Z. *Neuropharmacology* 36, 1549-1554 (1997).

[Ref. 23] S. M. Hoelter *et al.*, *Front Biosci*. 13, 5810 (2008).

[Ref. 24] A. C. Costa, M. R. Stasko, C. Schmidt, M. T. Davisson, *Behav. Brain Res.* 206, 52 (2010).

[Ref. 25] J. R. Atack, Pharmacol. Ther. 125, 11 (2010)

[Ref. 26] S. A. Merschman *et al.*, *Pharmazie* 60, 359 (2005).

[Ref. 27] D. J. Moura *et al.*, *Life Sci*. 79, 2099 (2006).

[Ref. 28] A. E1 Hadri, *J. Med. Chem*. 45, 2824-2831 (2002).

[Ref. 29] Atack, J. R., Preclinical and clinical pharmacology of the GABA(A) receptor alpha5 subtipo-selective inverse agonist alpha5IA. *Pharmacol. Ther*. enero de 2010;125 (1):11-26.

[Ref. 30] D'Hulst, C., Atack, J. R. y Kooy, R. F. (2009) The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discov. Today*, 14, 866-875.

[Ref. 31] Demas, G. E., Nelson, R. J., Krueger, B. K. y Yarowsky, P.J. (1996) Spatial memory deficits in segmental trisomic Ts65Dn mice. *Behav. Brain Res.*, 82, 85-92.

[Ref. 32] Escorihuela, R.M., Fernández-Teruel, A., Vallina, I.F., Baamonde, C., Lumbreras, M. A., Dierssen, M., Tobena, A. y Flórez, J. (1995) A behavioral assessment of Ts65Dn mice: a putative Down syndrome model. *Neurosci. Lett.,* 199, 143-146.

[Ref. 33] Hoffman, G. E., Lee, W. S., Smith, M. S., Abbud, R., Roberts, M. M., Robinson, A. G. y Verbalis, J. G. (1993) c-Fos and Fos-related antigens as markers for neuronal activity: perspectives from neuroendocrine systems. *NIDA Res. Monogr.*, 125, 117-133.

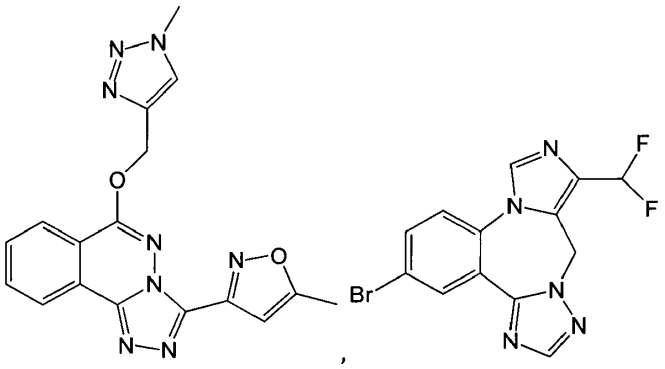
[Ref. 34] Siarey, R. J., Carlson, E. J., Epstein, C. J., Balbo, A., Rapoport, S.I. y Galdzicki, Z. (1999) Increased synaptic depression in the Ts65Dn mouse, a model for mental retardation in Down syndrome. *Neuropharmacology*, 38, 1917-1920.

[Ref. 35] Documento US 2006/0084642

[Ref. 36] Documento WO 96/25948

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para utilización como medicamento para el tratamiento o alivio de la gravedad de deficiencias cognitivas en individuos que padecen síndrome de Down, en donde el compuesto tiene una de las estructuras siguientes:



o una sal farmacéuticamente aceptable o un éster escindible *in vivo* o un conjugado de glucósido enzimáticamente lábil o uno de sus ésteres de aminoácido.

2. El compuesto para su uso según la reivindicación 1, en donde el compuesto se administra en forma de composición farmacéutica oral, bucal o sublingual.

3. El compuesto para su uso según la reivindicación 2, en donde el compuesto se administra en forma de comprimido, cápsula, cápsula gelatinosa, comprimido oblongo o solución o suspensión líquida.

4. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el compuesto se administra en forma de preparación parenteral.

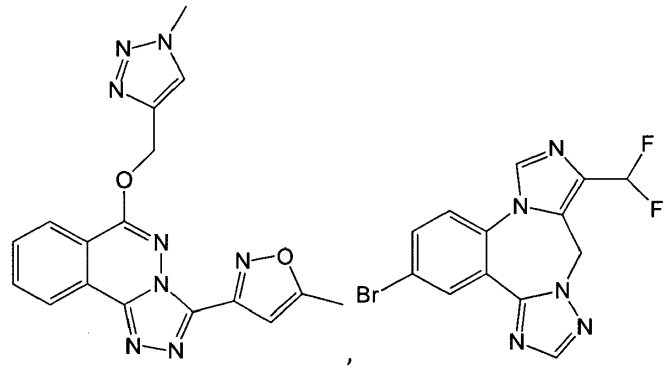
5. El compuesto para su uso según la reivindicación 4, en donde la preparación parenteral es para una inyección intravenosa.

6. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el compuesto está en una cantidad que provoca subconvulsiones que es una cantidad que no provoca un efecto convulsionante.

7. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el compuesto está en una cantidad eficaz para producir un efecto potenciador de la memoria, un efecto potenciador del aprendizaje, o ambos.

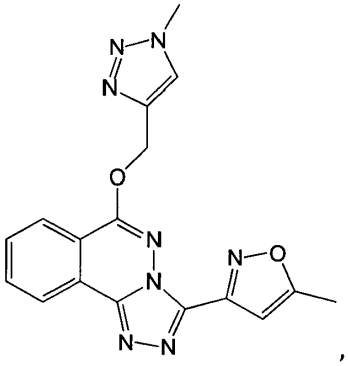
8. El compuesto para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde el compuesto se utiliza en combinación con un agente terapéutico adicional utilizado como medicamento para tratar enfermedades o trastornos asociados al síndrome de Down.

9. Utilización de un compuesto que tiene selectividad funcional para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o alivio de la gravedad de deficiencias cognitivas en individuos que padecen síndrome de Down, en donde el compuesto tiene una de las estructuras siguientes:

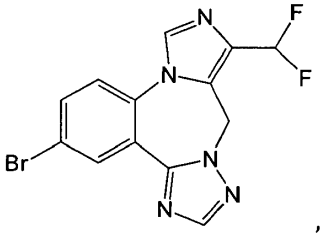


o una sal farmacéuticamente aceptable o un éster escindible *in vivo* o un conjugado de glucósido enzimáticamente lábil o uno de sus ésteres de aminoácido.

10. Una composición farmacéutica para el tratamiento o el alivio de la gravedad de las deficiencias cognitivas en individuos que padecen síndrome de Down que comprende una cantidad eficaz de un compuesto que tiene selectividad funcional de agonista inverso para receptores $GABA_A$ que contienen la subunidad α5, en combinación con un tensioactivo como excipiente y sulfóxido de dimetilo como disolvente, en donde el compuesto tiene una de las estructuras siguientes:



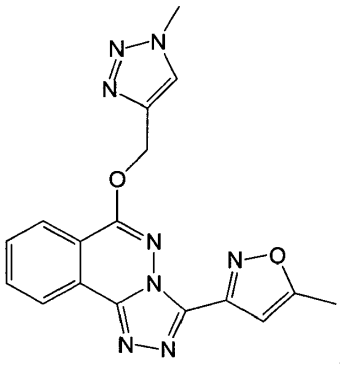
,



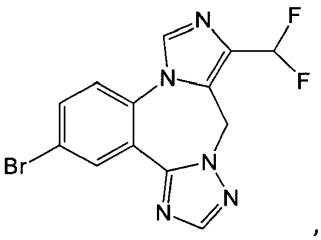
,

o una sal farmacéuticamente aceptable o un éster escindible *in vivo* o un conjugado de glucósido enzimáticamente lábil o uno de sus ésteres de aminoácido.

11. La composición de la reivindicación 10, en donde el compuesto es una sal de hidrocloruro de un compuesto que tiene una de las estructuras siguientes:



,



,

12. La composición de la reivindicación 10 u 11, en donde la composición está en forma de una cápsula de gelatina, solución o suspensión líquida.

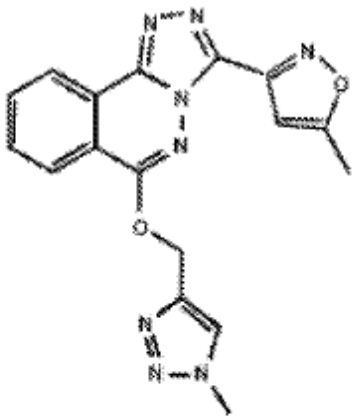
13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en donde la composición es una preparación parenteral.

14. La composición de la reivindicación 13, en donde la preparación parenteral es para una inyección intravenosa.

15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10-14, en donde la cantidad del compuesto es eficaz para producir un efecto potenciador de la memoria, un efecto potenciador del aprendizaje o ambos.

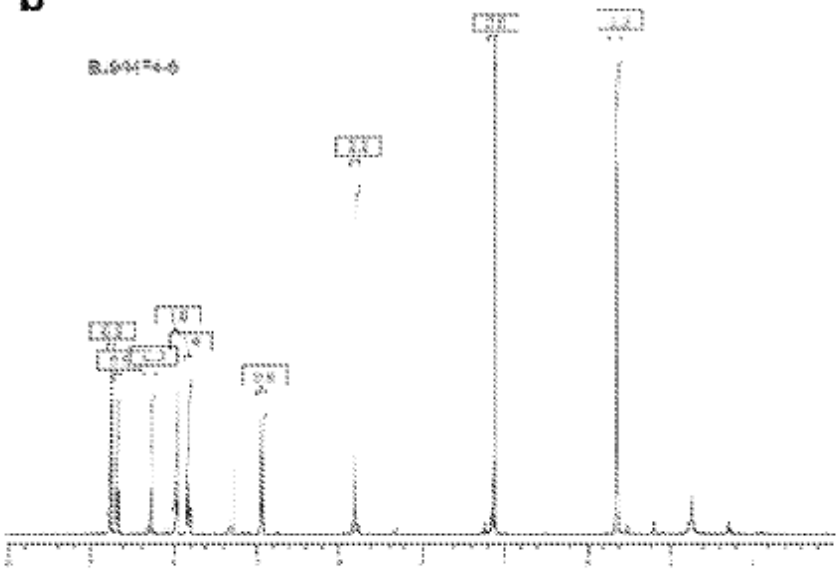
16. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, que comprende además un agente terapéutico adicional utilizado para tratar enfermedades o trastornos relacionados con el síndrome de Down.

a



Agonista inverso
Triazoloftalazina α5-GABA
(α5-IA)

b



c

Determinación de IC50

	IC_{50} (M)	K_i (M)	n_H
α5IA	6.5E-10	5.4E-10	0.6
diazepam	1.6E-08	1.4E-08	1

FIGURA 1

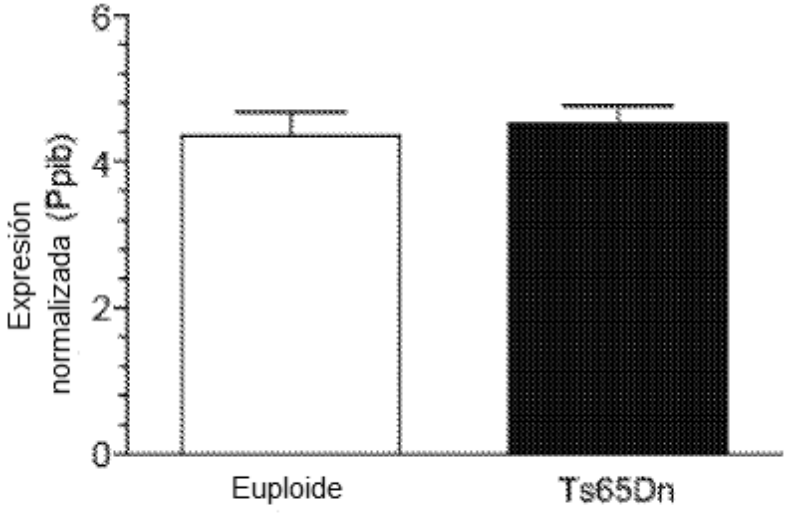


FIGURA 2

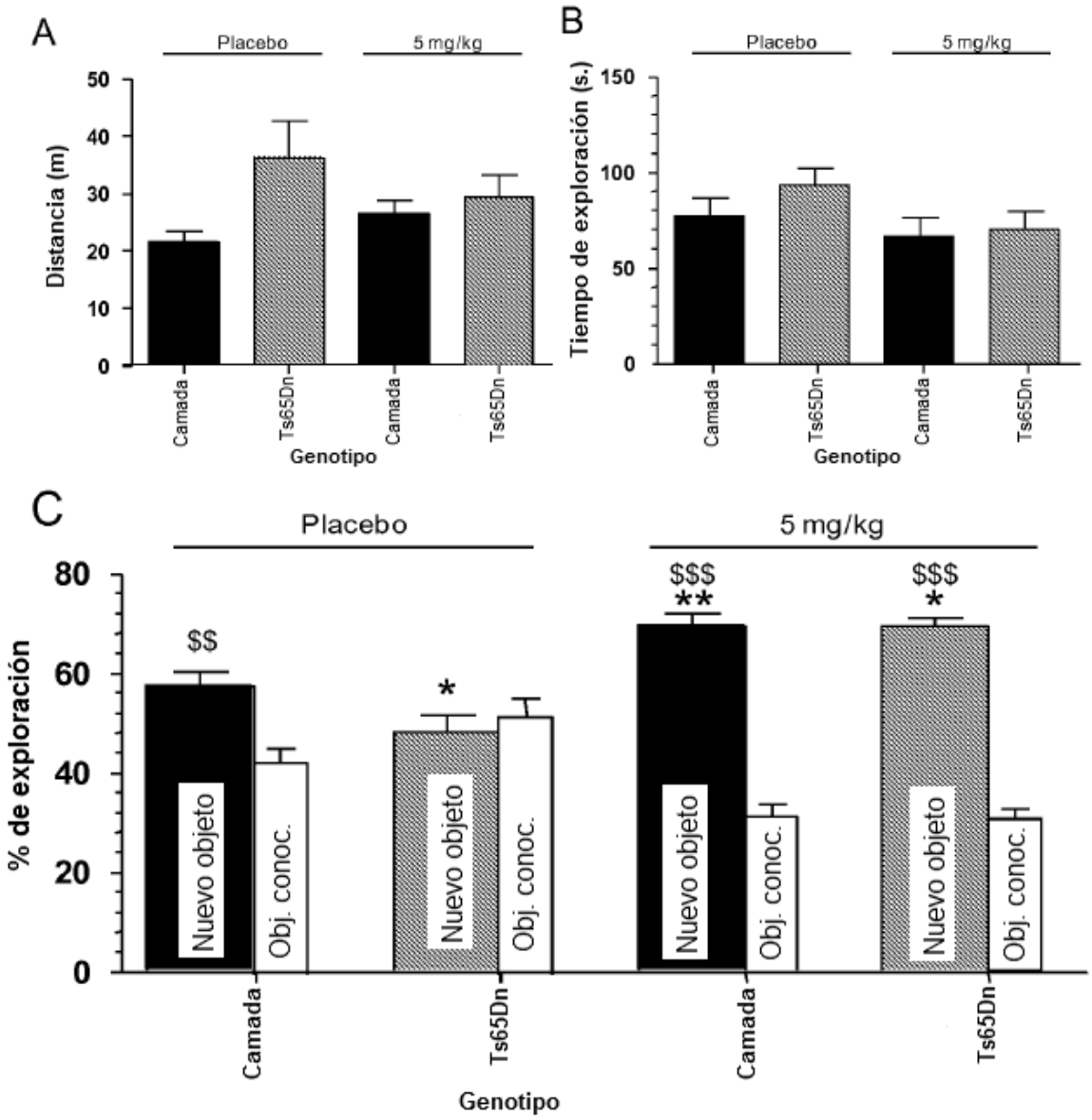
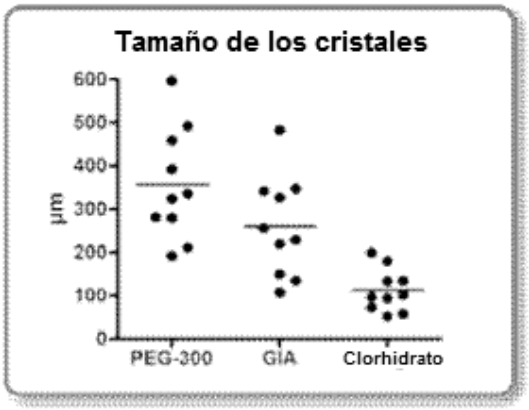
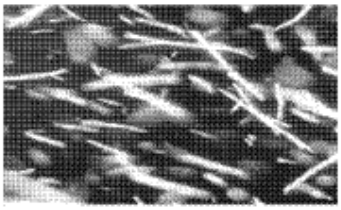
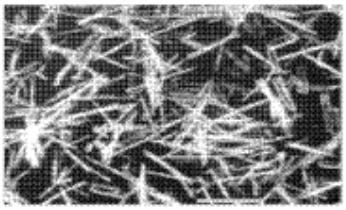
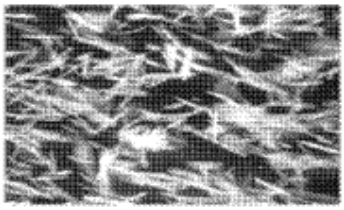

A
Placebo
5 mg/kg
Distancia (m)
50
40
30
20
10
0
Camada
Ts65Dn
Camada
Ts65Dn
Genotipo
B
Placebo
5 mg/kg
Tiempo de exploración (s.)
150
100
50
0
Camada
Ts65Dn
Camada
Ts65Dn
Genotipo
C
Placebo
5 mg/kg
% de exploración
80
60
40
20
0
$$
*
$$$
**
$$$
*
Nuevo objeto
Obj. conoc.
Nuevo objeto
Obj. conoc.
Nuevo objeto
Obj. conoc.
Nuevo objeto
Obj. conoc.
Camada
Ts65Dn
Camada
Ts65Dn
Genotipo

FIGURA 3







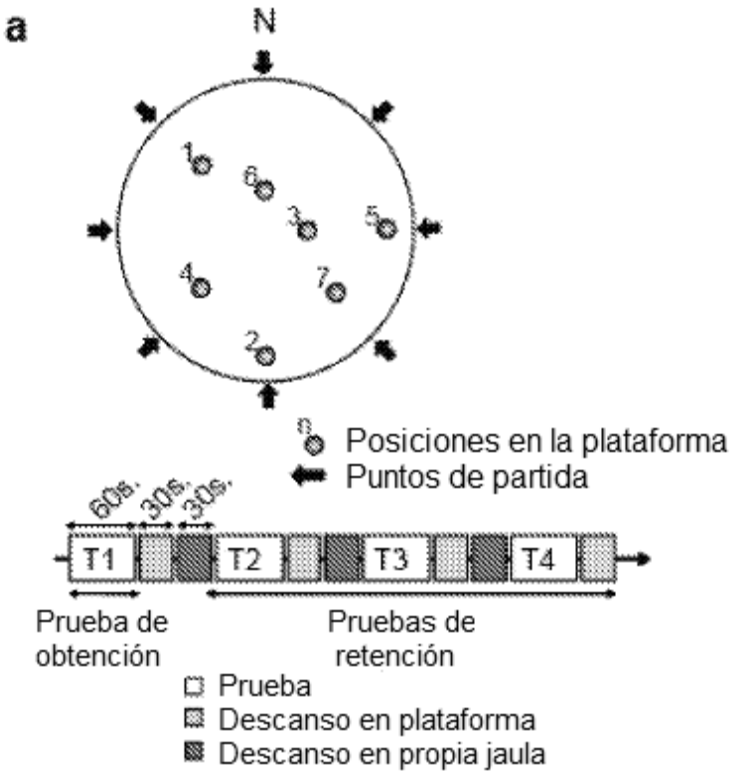


0,6µg/µl GIA
PEG-300/NaCl 9‰ (7:3)

0,6µg/µl GIA
DMSO/Crem. EL/agua
(10:15:75)

0,6µg/µl Clorhidrato
DMSO/Crem. EL/agua
(10:15:75)

FIGURA 4


a
N
1
6
3
5
4
7
2
Posiciones en la plataforma
Puntos de partida
60s
30s
30s
T1
T2
T3
T4
Prueba de obtención
Pruebas de retención
Prueba
Descanso en plataforma
Descanso en propia jaula

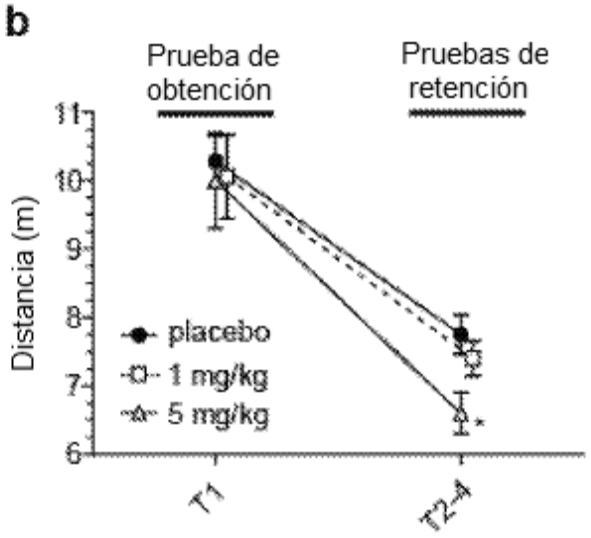

b
Prueba de obtención
Pruebas de retención
Distancia (m)
11
10
9
8
7
6
placebo
1 mg/kg
5 mg/kg
T1
T2-4

FIGURA 5

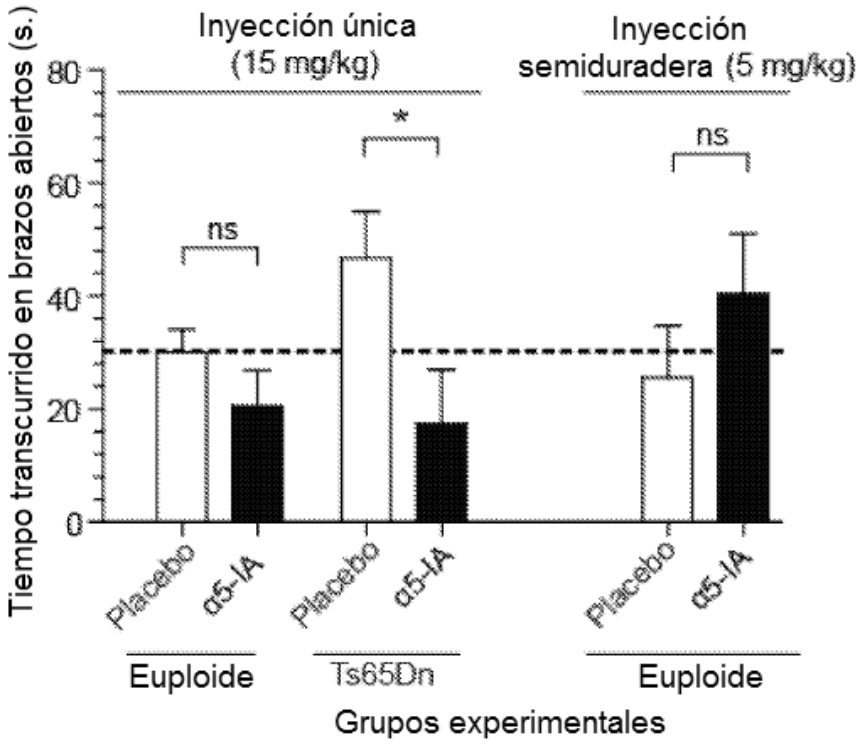


FIGURA 6

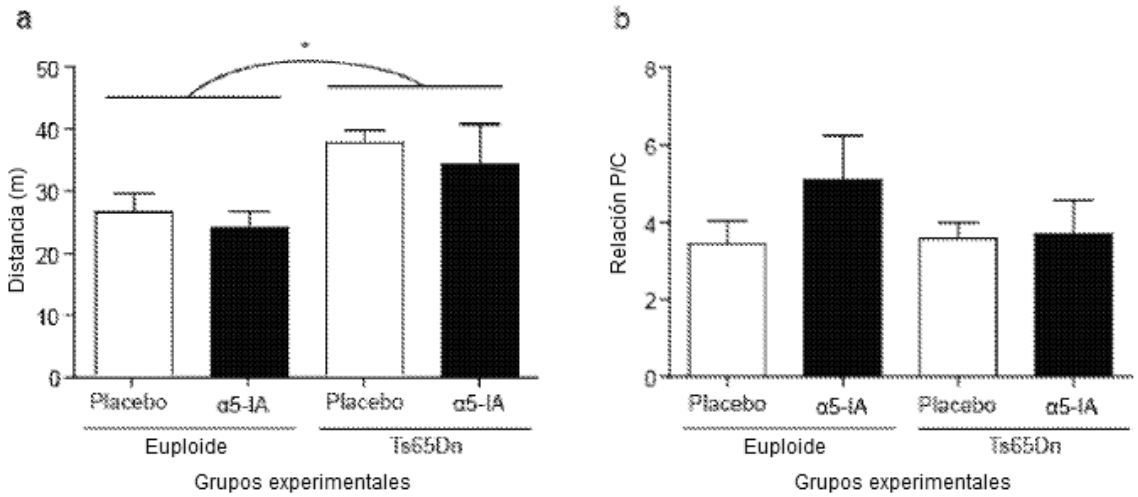


FIGURA 7

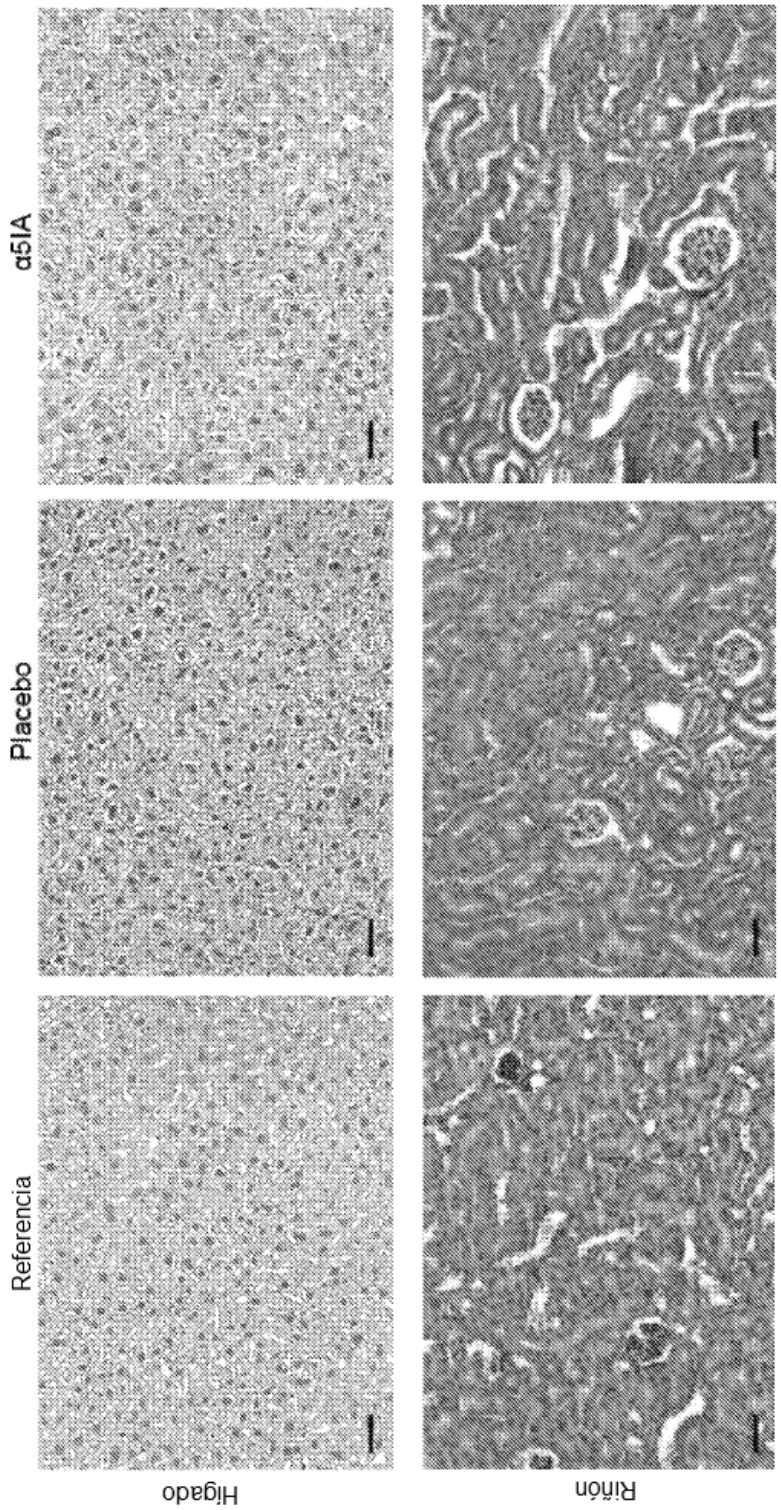


FIGURA 8

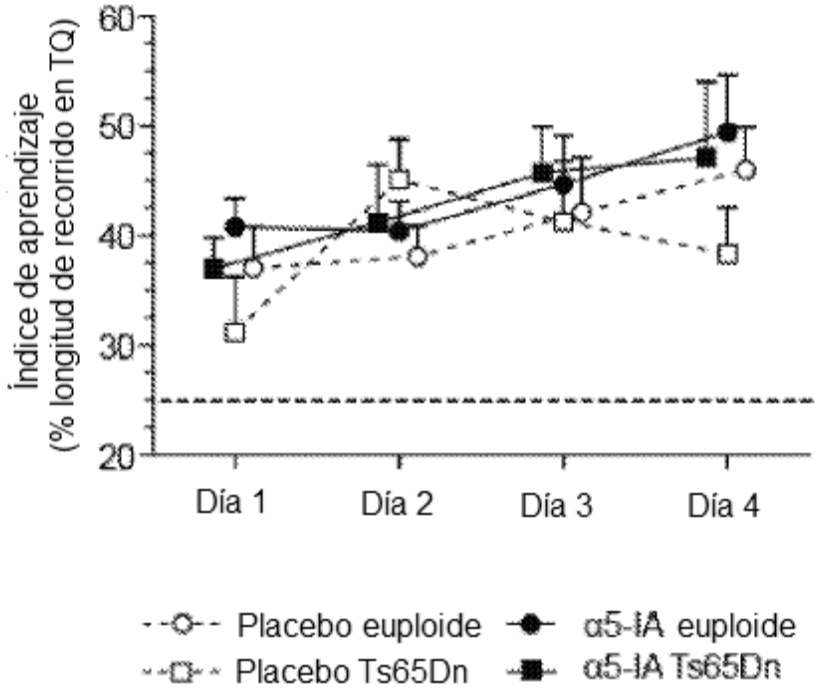


FIGURA 9

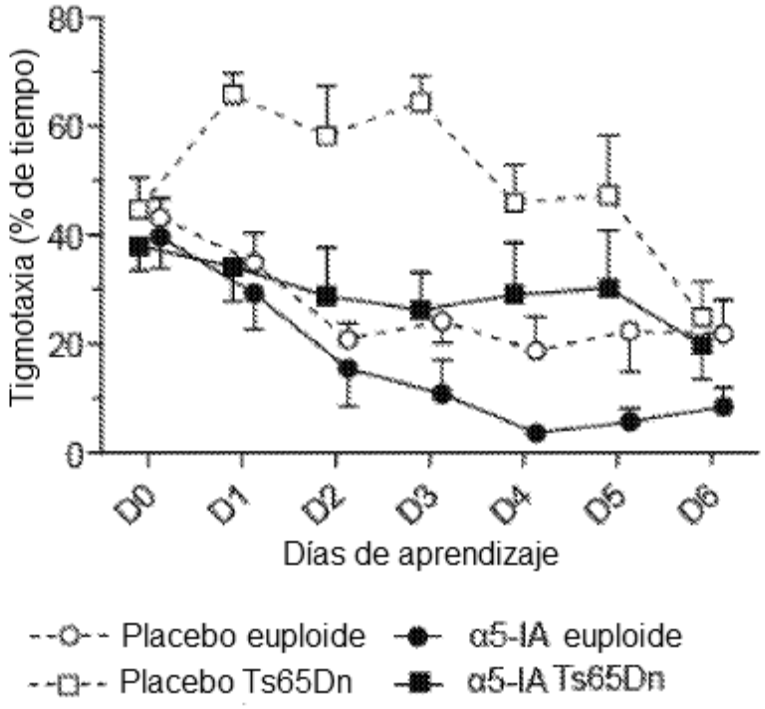


FIGURA 10

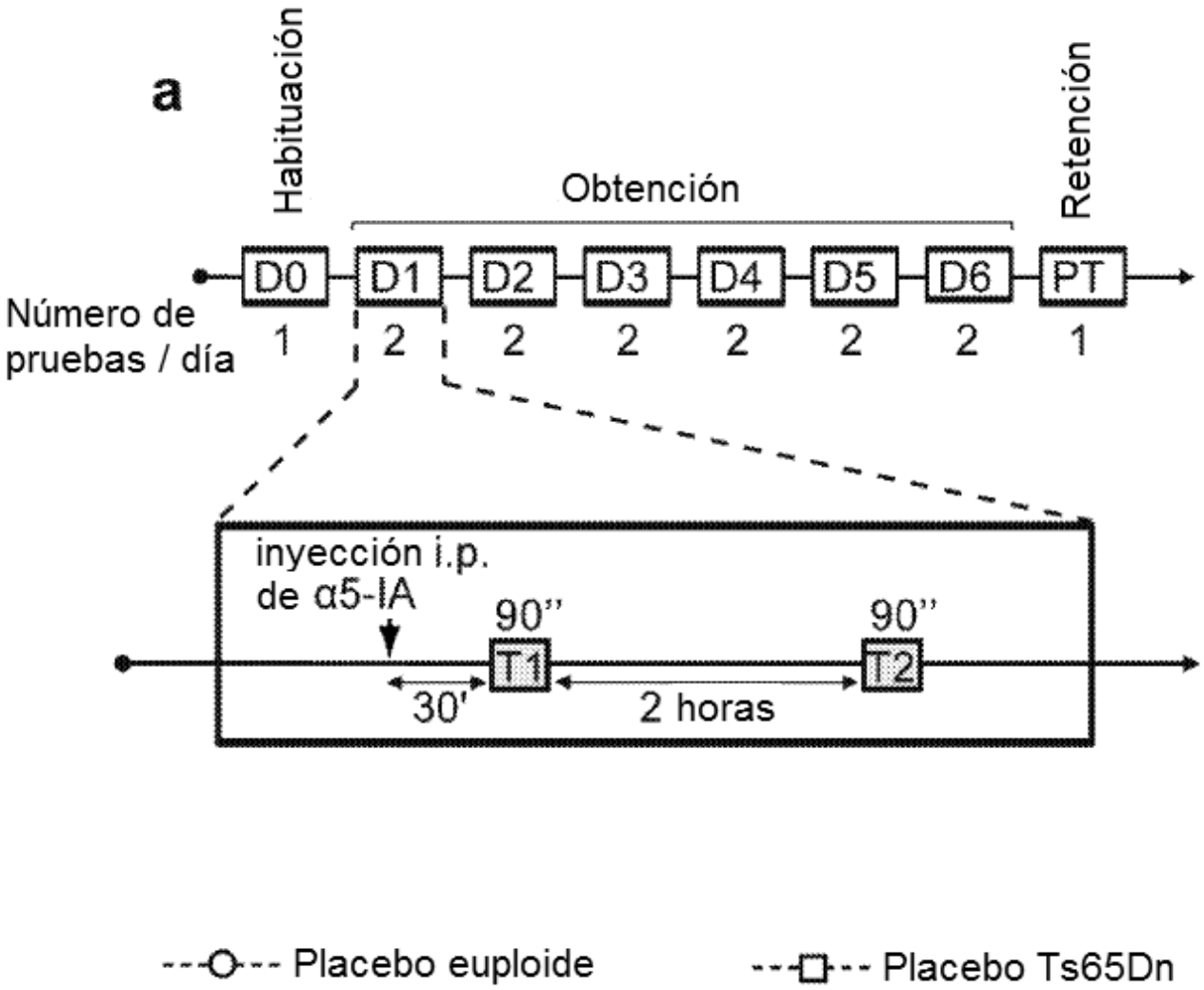

a
Habituación
Obtención
Retención
D0
D1
D2
D3
D4
D5
D6
PT
Número de pruebas / día
1
2
2
2
2
2
2
1
inyección i.p. de α5-IA
90''
90''
T1
T2
30'
2 horas
Placebo euploide
Placebo Ts65Dn

FIGURA 11 A

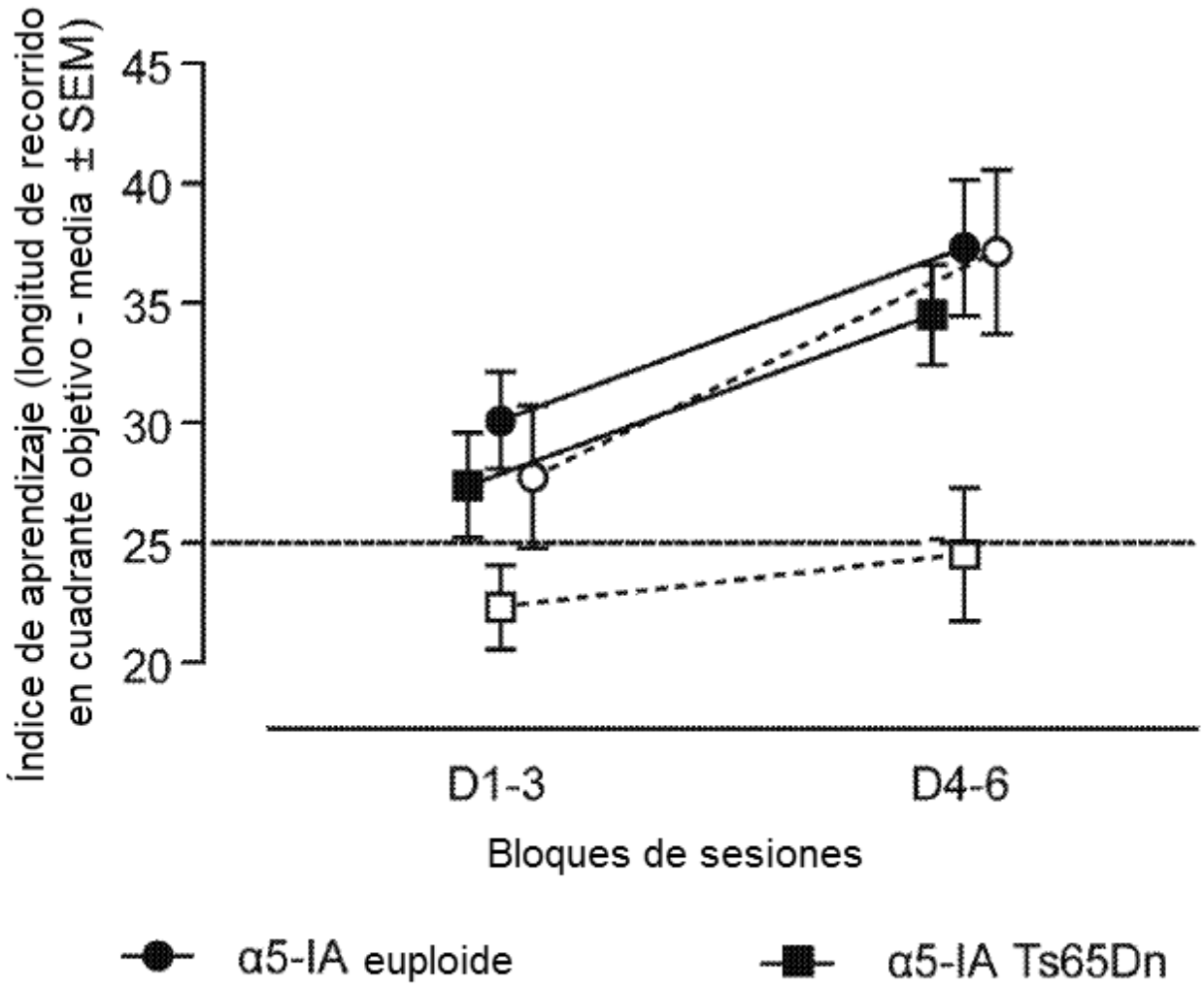

Índice de aprendizaje (longitud de recorrido en cuadrante objetivo - media ± SEM)
45
40
35
30
25
20
D1-3
D4-6
Bloques de sesiones
α5-IA euploide
α5-IA Ts65Dn

FIGURA 11 B

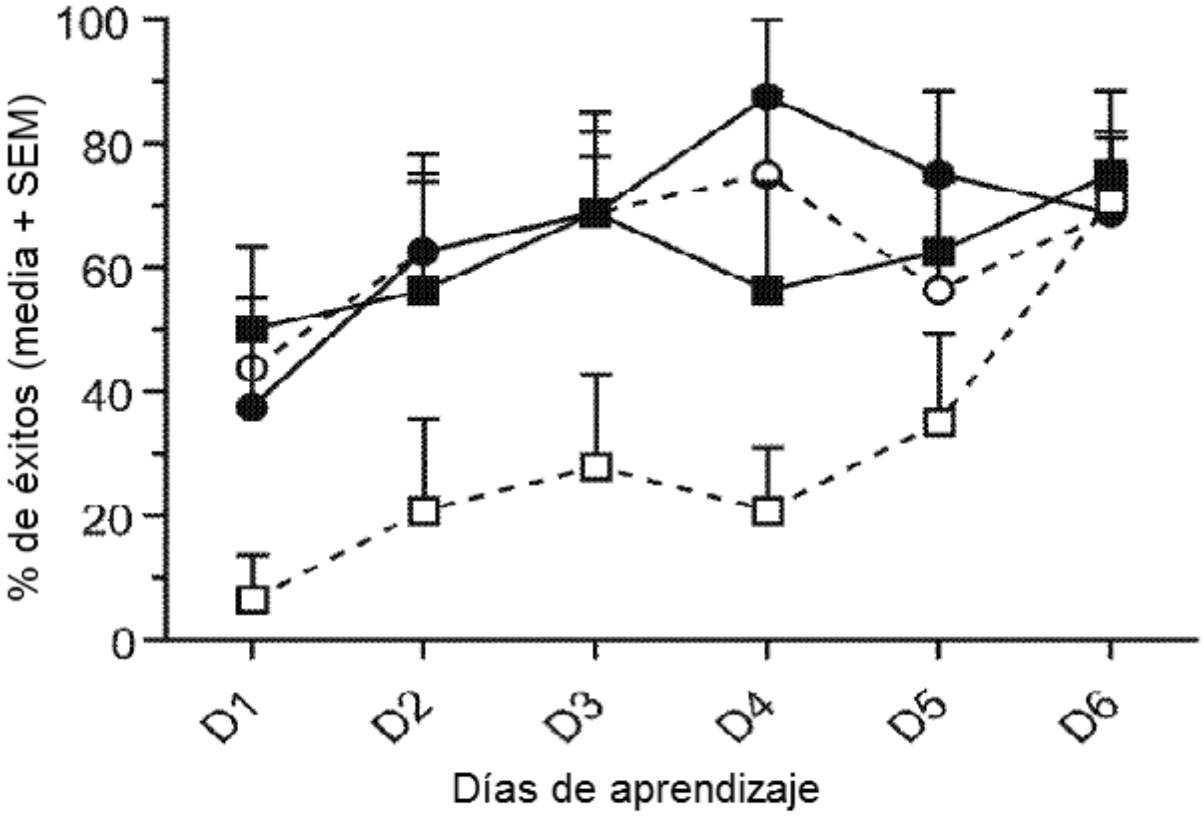

100
80
60
40
20
0
% de éxitos (media + SEM)
D1
D2
D3
D4
D5
D6
Días de aprendizaje

FIGURA 11 C

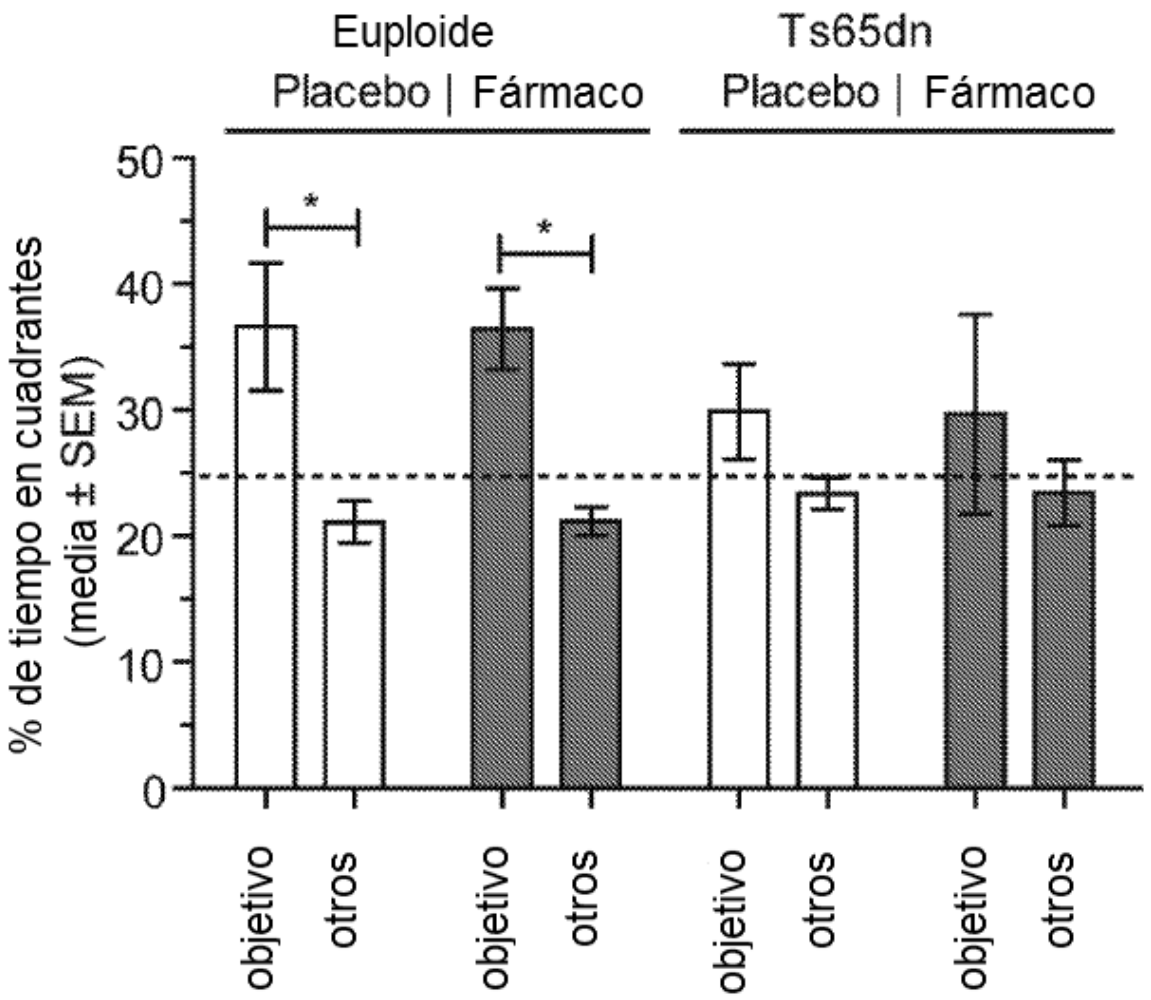

Euploide
Placebo | Fármaco
Ts65dn
Placebo | Fármaco
% de tiempo en cuadrantes
(media ± SEM)
50
40
30
20
10
0
*
*
objetivo
otros
objetivo
otros
objetivo
otros
objetivo
otros

FIGURA 11 D

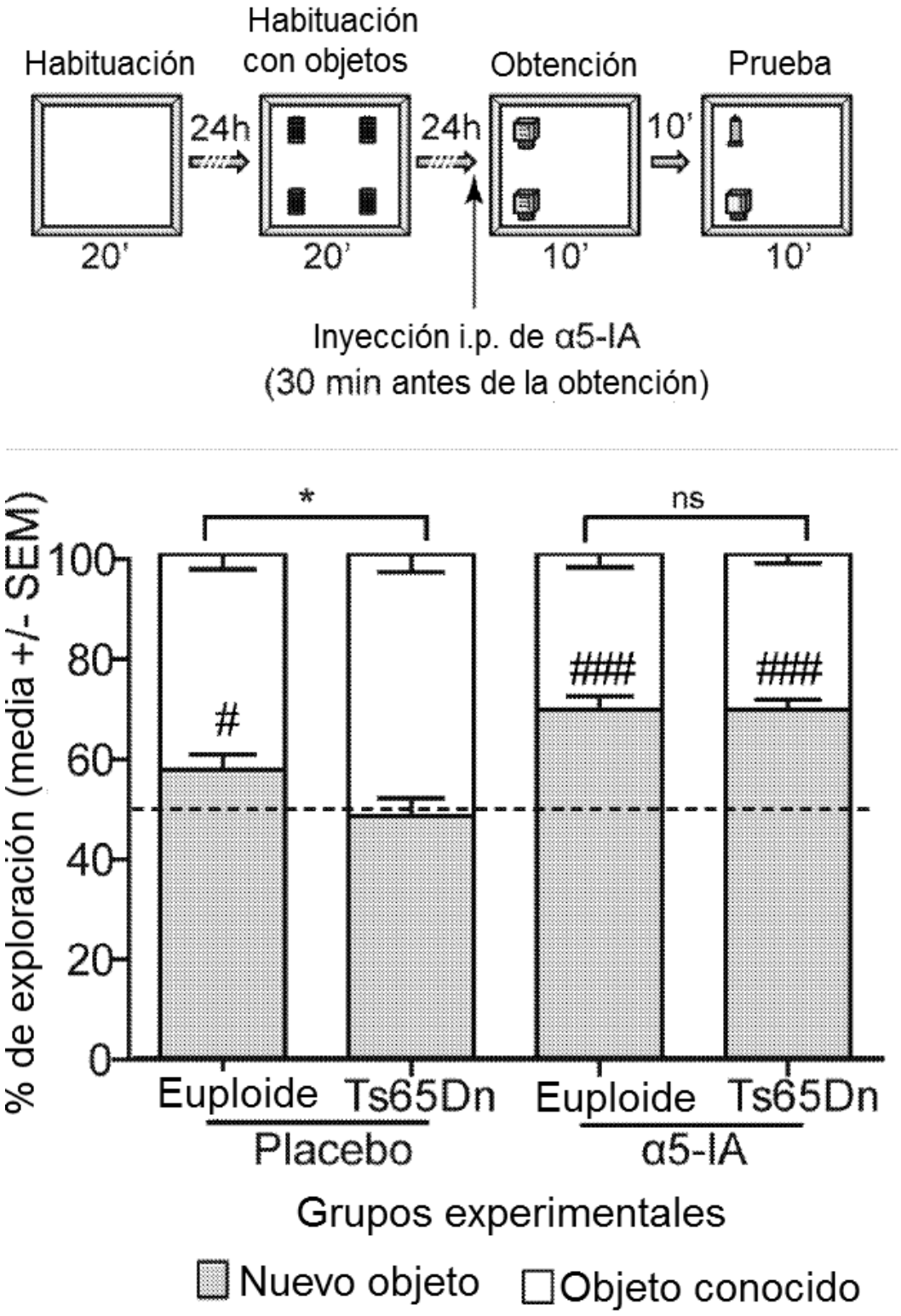

Habituación
Habituación con objetos
Obtención
Prueba
24h
24h
10'
20'
20'
10'
10'
Inyección i.p. de α5-IA
(30 min antes de la obtención)
% de exploración (media +/- SEM)
100
80
60
40
20
0
*
ns
#
####
####
Euploide
Ts65Dn
Euploide
Ts65Dn
Placebo
α5-IA
Grupos experimentales
Nuevo objeto
Objeto conocido

FIGURA 12A

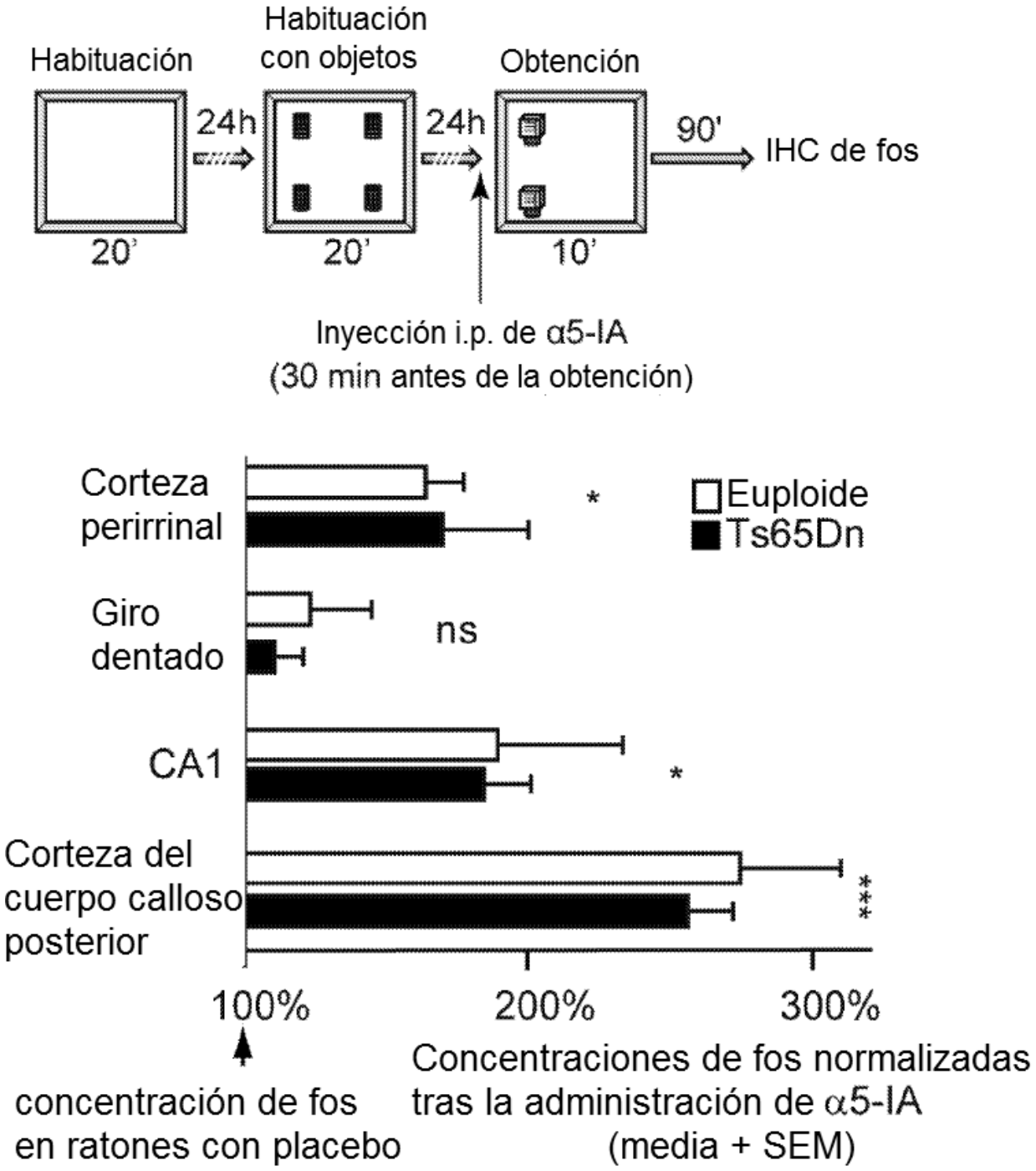

Habituación
Habituación con objetos
Obtención
24h
24h
90'
IHC de fos
20'
20'
10'
Inyección i.p. de α5-IA
(30 min antes de la obtención)
Corteza perirrinal
Giro dentado
CA1
Corteza del cuerpo calloso posterior
Euploide
Ts65Dn
*
ns
*
***
100%
200%
300%
concentración de fos en ratones con placebo
Concentraciones de fos normalizadas tras la administración de α5-IA (media + SEM)

FIGURA 12B

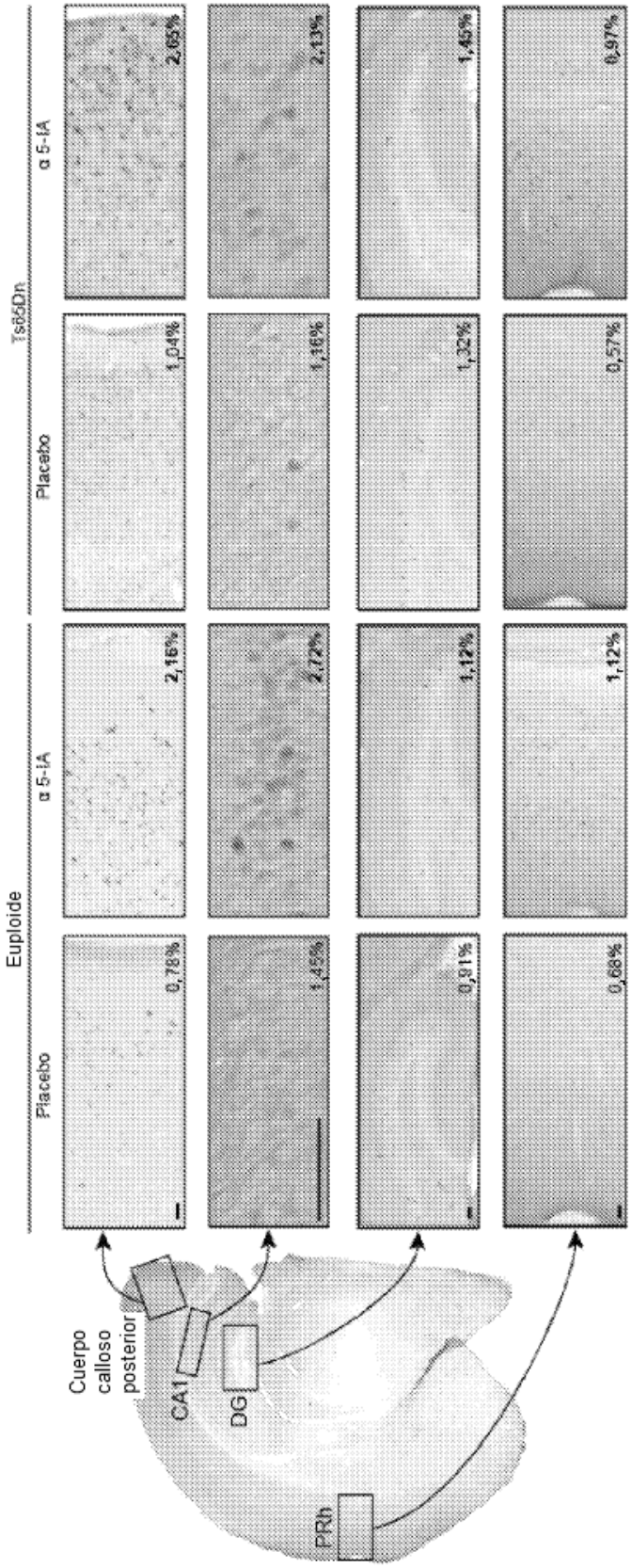

Euploide
Ts65Dn
Placebo
α 5-iA
Placebo
α 5-iA
0,78%
2,16%
1,04%
2,65%
1,45%
2,72%
1,16%
2,13%
0,91%
1,12%
1,32%
1,45%
0,68%
1,12%
0,57%
0,97%
Cuerpo calloso posterior
CA1
DG
PRh

FIGURA 13

Estructuras	Genotipo	tratamiento	relaciones de superficie	Efecto del fármaco	Efecto del gen.	Interacción fárm x gen
PRh	Euploides	placebo	0,68% ±0,16	p = 0,02	NS	NS
		GABA-IA	1,12% ±0,09			
	Ts65Dn	placebo	0,57% ±0,1			
		GABA-IA	0,97% ±0,22			
GD	Euploides	placebo	0,91% ±0,1	NS	NS	NS
		GABA-IA	1,12% ±0,19			
	Ts65Dn	placebo	1,32% ±0,33			
		GABA-IA	1,45% ±0,13			
CA1	Euploides	placebo	1,45% ±0,34	p = 0,03	NS	NS
		GABA-IA	2,72% ±0,63			
	Ts65Dn	placebo	1,16% ±0,14			
		GABA-IA	2,13% ±0,19			
Cuerpo calloso posterior	Euploides	placebo	0,78% ±0,27	p = 0,0001	NS	NS
		GABA-IA	2,16% ±0,22			
	Ts65Dn	placebo	1,04% ±0,29			
		GABA-IA	2,65% ±0,16			

FIGURA 14