

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 190**

51 Int. Cl.:

A61K 31/415 (2006.01)
A61K 31/417 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/4164 (2006.01)
A61P 25/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.08.2008 PCT/US2008/072357**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2009 WO09021055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008 E 08797300 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.05.2017 EP 2182804**

54 Título: **Métodos para tratar la dependencia**

30 Prioridad:

06.08.2007 US 935323 P
17.08.2007 US 956555 P
04.10.2007 US 960591 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2017

73 Titular/es:

BIOTIE THERAPIES, INC. (100.0%)
601 Gateway Boulevard, Suite 1200
South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

WOIWODE, TOM;
MORAN, MARK y
PICKFORD, LESLEY

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 638 190 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).

Métodos para tratar la dependencia

Descripción

5 Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad bajo 35 USC § 119 (e) a la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos Núms. de Serie 60/935.323, "Methods for Treating Dependence Using Nopicastato" presentada el 6 de agosto 2007, 60/956.555, "Methods for Treating Dependence Using Nopicastato" presentada el 17 de agosto de 2007, y 60/960.591, "Methods for Treating Dependence Using Nopicastato" presentada el 4 de octubre de 2007.

10 Campo de la invención

[0002] Proporcionado es el compuesto A para su uso en métodos de tratamiento de pacientes que sufren de o es susceptible a al menos un síntoma de abuso de la dependencia de, o abstinencia de la cocaína. El método puede ser un método para tratar al menos una fase de dependencia de cocaína en pacientes.

Antecedentes de la invención

[0003] El abuso de sustancias y la dependencia se caracterizan por el deseo de la sustancia, búsqueda y uso con la pérdida de control en la limitación de la ingesta de la sustancia. Estos comportamientos ocurren a pesar de problemas significativos relacionados con el uso de sustancias ya expensas de otros comportamientos. En 2004, aproximadamente 22,5 millones de estadounidenses de 12 años o más necesitaban tratamiento para el abuso de sustancias (alcohol o drogas ilícitas). La estimación más reciente de los costos para la sociedad del uso ilícito de drogas por sí solo es de 181.000 millones de dólares (2002).

[0004] El problema del abuso y la dependencia de cocaína es un problema médico, social y legal importante. Según la Encuesta Nacional sobre el Uso de Drogas y la Salud de 2005, aproximadamente el 13,9% de los estadounidenses de 12 años o más han probado cocaína al menos una vez en su vida y el 3,3% han probado cocaína crack al menos una vez en su vida. Más problemático, en 2005, había 2.4 millones de personas que eran usuarios actuales de cocaína, que es mayor que en 2004 cuando el número era de 2,0 millones. Del mismo modo, el número de usuarios actuales de grietas aumentó de 467.000 en 2004 a 682.000 en 2005. En 2004, la Drug Abuse Warning Network estimó 940.953 visitas a emergencias relacionadas con drogas en todo el país y la cocaína participó en la mayoría de ellas.

[0005] Claramente, hay una necesidad de un enfoque de tratamiento ampliamente eficaz, y uno que incluye un componente medicamento puede ser más eficaz que los tratamientos conductuales actuales, tales como la terapia de comportamiento cognitivo o gestión de contingencias solo. Una variedad de tratamientos se han estudiado en ensayos clínicos, sin éxito notable. En particular, se han completado numerosos ensayos clínicos controlados aleatorios de antidepresivos, incluidos ensayos de desipramina, fluoxetina, bupropión e imipramina. También se han completado ensayos clínicos de estabilizadores del estado de ánimo, incluyendo carbamazepina y litio, así como ensayos de fenitoína, agonistas de dopamina directos o indirectos, incluyendo bromocriptina, pergolida, amanadina, mazindole y metilfenidato. También se han estudiado otros fármacos como ritanserina, gepirona, nimodipina y naltrexona. Ninguno de estos compuestos ha demostrado ser fiablemente eficaz. Varios medicamentos que actúan sobre los sistemas GABA han sido evaluados como tratamientos para la dependencia de cocaína, incluyendo tiagabina, baclofeno y vigabatrina. Los resultados para tiagabina han sido equívocos, los de baclofeno han sido ligeramente más alentadores, aunque no convincentes. Los estudios de vigabatrina han sido tal vez igualmente alentadores, aunque se basan principalmente en ensayos abiertos. Los resultados de estos esfuerzos de desarrollo han sido generalmente desalentadores.

[0006] Petrakis et al., Addiction (2000) 95 (2), 219-228 informa sobre tratamiento de disulfiram para la dependencia de la cocaína en adictos a opiáceos mantenidos con metadona. El inhibidor de dopamina ®-hidroxilasa (DBH) disulfiram es el tratamiento farmacológico más eficaz para la dependencia de la cocaína actualmente disponible. Desafortunadamente, disulfiram inhibe no específicamente varias enzimas, incluyendo dehidrogenasa de aldehído y esterasas plasmáticas. El disulfiram y compuestos relacionados quelan el cobre, que es un cofactor necesario para una variedad de enzimas, incluyendo deshidrogenasa de aldehído, esterasas plasmáticas y DBH. Al inhibir la deshidrogenasa de aldehído, el disulfiram altera el metabolismo del alcohol (etanol), produciendo la reacción de disulfiram-etanol. Esta reacción consiste en rubor, náuseas e hipotensión.

[0007] La inhibición de las esterasas plasmáticas retarda la eliminación de la cocaína, que puede resultar en elevaciones en los niveles de cocaína en plasma. En estudios de laboratorio que evaluaron los efectos de la cocaína intranasal durante el tratamiento con disulfiram, el tratamiento con disulfiram aumentó notablemente los niveles plasmáticos de cocaína. Sin embargo, el aumento de los niveles de cocaína no se asoció con alteraciones en los efectos fisiológicos o subjetivos de la cocaína. Se observaron aumentos de seis veces los niveles plasmáticos de

cocaína en un estudio controlado, y pueden producirse elevaciones mayores en el contexto del uso ilícito no controlado. Un estudio posterior utilizando la dosis de cocaína IV documentó que disulfiram retardó la eliminación de la cocaína, presumiblemente mediante la inhibición de las esterasas plasmáticas. La absorción lenta tras la dosificación intranasal explicó los aumentos de las concentraciones plasmáticas observadas anteriormente.

5 [0008] Varios estudios han demostrado la eficacia preliminar de disulfiram como un tratamiento de la dependencia de la cocaína. En estudios de laboratorio en humanos, el tratamiento con disulfiram redujo los efectos subjetivos positivos producidos por la cocaína. Los pacientes con alcohol comórbido y la dependencia de cocaína había mejorado los resultados cuando se trató con disulfiram, hasta 500 mg. Similarmente, los pacientes dependientes de opiáceos y cocaína mantenidos con buprenorfina redujeron el consumo de cocaína durante el tratamiento con disulfiram. Recientemente, los resultados de un gran ensayo clínico sugirieron que el disulfiram 250 mg por día se asoció con un consumo reducido de cocaína en comparación con el placebo, independientemente del patrón de consumo de alcohol o el tipo de psicoterapia proporcionada. En este estudio, 112 voluntarios dependientes de cocaína fueron asignados al azar a placebo o disulfiram, y proporcionaron una de dos psicoterapias. El tratamiento con disulfiram se asoció con un consumo reducido de cocaína documentado por la provisión de menos muestras de orina con cocaína positiva en comparación con el tratamiento con placebo. El tamaño del efecto fue modesto y este resultado aún no se ha replicado.

20 [0009] El disulfiram inhibe DBH, la enzima sola que media la síntesis de norepinefrina (NE). El DBH se expresa en neuronas noradrenérgicas y se localiza dentro de vesículas sinápticas y se libera junto con NE. DBH se puede medir en el plasma, y la concentración de DBH es altamente heredable y la variabilidad en la actividad se debió en gran medida por la variabilidad en el locus DBH. La variante T (-1021C □ T) está asociada con la disminución de la transcripción de genes DBH y con la actividad de DBH inferior. Este alelo es bastante común. La frecuencia del alelo T es de 20% entre los afroamericanos, 22% entre los norteamericanos europeos y 16% entre los japoneses. Las frecuencias de haplotipos correspondientes son 0,32, 0,34 y 0,09 para estas poblaciones, respectivamente. Cubells et al., *Molecular Psychiatry* (2000) 5, 56-63, informa sobre un haplotipo en el locus DBH asociado con baja actividad de ®-hidroxilasa de dopamina de plasma, también asociada con la paranoia inducida por la cocaína.

30 [0010] Varios informes indican que disulfiram es más eficaz en pacientes con actividad de DBH inferior. Se ha demostrado que en los sujetos con baja actividad de DBH, la proporción de orinas positivas para cocaína disminuyó con el tiempo durante el tratamiento con 250 mg disulfiram/día en comparación con placebo, pero aumentó significativamente con el tiempo durante el tratamiento con 62,5 mg y 125 mg disulfiram/día ($P < 0,04$). En personas con alta actividad de DBH, la proporción de orina positiva a la cocaína aumentó con el tiempo con disulfiram a 62,5 mg/día en relación con placebo ($p = 0,001$). Por lo tanto, la eficacia del tratamiento disulfiram/día 250 mg parece estar limitada a aquellos con baja actividad de DBH, lo que se corresponde con el genotipo C □ T. Las dosis de disulfiram inferiores a 250 mg/día parecen aumentar el consumo de cocaína, posiblemente reduciendo la depuración de cocaína mediante la inhibición de las esterasas plasmáticas, aumentando así los efectos eufóricos relacionados con el abuso de la cocaína.

40 [0011] Disulfiram reduce más eficazmente el consumo de cocaína en los pacientes con el genotipo DBH C □ T asociado con la actividad de DBH inferior. Presumiblemente, disulfiram inhibe más completamente DBH en personas con actividad de DBH inferior, de modo que disulfiram es más eficaz en personas con genotipo C □ T de menor actividad. La observación de que el disulfiram es más eficaz en pacientes con baja actividad de genotipo DBH C □ T confirma que la inhibición de la DBH es un mecanismo clave de acción para disulfiram como terapia para la dependencia de la cocaína.

50 [0012] Si bien el disulfiram proporciona una prueba de concepto de que los inhibidores de DBH son prometedores tratamientos para la dependencia de la cocaína, la utilidad de disulfiram sí mismo como un tratamiento para la dependencia de la cocaína está severamente limitada por sus interacciones con el alcohol y la cocaína.

55 [0013] Stanley et al., *British Journal of Pharmacology* (1997) 121, 1803-1809, informa sobre los efectos de catecolaminas moduladoras de nopicastato (RS-25560-197), un inhibidor potente y selectivo de la dopamina ®-hidroxilasa.

Resumen de la invención

60 [0014] La invención proporciona el compuesto A para uso en un método de tratamiento de un paciente que sufre de o es susceptible a al menos un síntoma de abuso de la dependencia de, o abstinencia de la cocaína, en la que el compuesto A es (S)-5-Aminometilo-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol; (R)-5-Aminometilo-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol; una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o una mezcla de los mismos.

65 [0015] También se proporciona el Compuesto A para su uso en métodos de tratamiento de al menos una fase de la dependencia de cocaína en un paciente, en la que se selecciona la fase de al menos una de la adquisición, el mantenimiento, la extinción, y la recaída. Los métodos incluyen administrar al paciente una cantidad

terapéuticamente eficaz del Compuesto A.

Descripción de los dibujos

5 [0016]

La Fig. 1 muestra el tamaño del efecto logrado con tamaños de muestra que van de 5 a 15.

La Fig. 2 muestra los detalles de los ensayos enzimáticos individuales.

10 La Fig. 3 muestra una tabla con las afinidades (CI50 o PKI) de nepicastato con DAP y una gama de enzimas y receptores seleccionados.

La Fig. 4 muestra los efectos de nepicastato en% de inhibición de la actividad enzimática.

15 La Fig. 5 muestra los niveles de dopamina urinaria en voluntarios normales después del tratamiento de 24 horas con el nepicastato.

20 La Fig. 6 muestra los niveles de noradrenalina en la corteza en SHRs dosificados con vehículo o dosis variables de nepicastato.

La Fig. 7 muestra los niveles de dopamina en la corteza en SHRs dosificados con vehículo o dosis variables de nepicastato.

25 La Fig. 8 muestra la relación entre la dopamina/norepinefrina en el córtex en SHRs dosificados con vehículo o dosis variables de nepicastato.

La Fig. 9 muestra los niveles de norepinefrina en la arteria mesentérica en SHRs dosificados con vehículo o dosis variables de nepicastato.

30 La Fig. 10 muestra los niveles de dopamina en la arteria mesentérica en SHRs dosificados con vehículo o dosis variables de nepicastato.

35 La Fig. 11 muestra la relación entre la dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica en SHRs dosificados con vehículo o dosis varias de nepicastato.

Descripción detallada

40 [0017] Tal como se utiliza en la presente memoria, las siguientes palabras y frases están destinadas generalmente a tener los significados como se expone a continuación, excepto en la medida en que el contexto en el que se utilizan indique lo contrario.

45 [0018] Tal como se utiliza en el presente documento "compuesto A" incluye (S)-5-Aminometilo-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol, (R)-5-Aminometilo-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol y mezclas de los mismos, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como la sal de hidrocloreto. En algunas realizaciones se utiliza nepicastato ((S)-5-Aminometilo-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol).

50 [0019] Tal como se utiliza en el presente documento, "compuesto B" se refiere a (R)-5-Aminometilo-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, tales como la sal de hidrocloreto.

55 [0020] "Sales farmacéuticamente aceptables" incluyen, pero no se limitan a sales con ácidos inorgánicos, tales como clorato de hidrógeno, fosfato, difosfato, bromhidrato, sulfato, sulfinato, nitrato, y como sales; así como sales con un ácido orgánico, tal como malato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, acetato, lactato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, benzoato, salicilato, estearato y alcanato tal como acetato, HOOC-(CH₂)_n-COOH donde n es 0-4, y sales similares.

60 [0021] Además, si se obtiene un compuesto como una sal de adición de ácido, la base libre se puede obtener basificando una solución de la sal de ácido. Por el contrario, si el producto es una base libre, se puede producir una sal de adición, particularmente una sal de adición farmacéuticamente aceptable, disolviendo la base libre en un disolvente orgánico adecuado y tratando la solución con un ácido, de acuerdo con procedimientos convencionales para preparar sales de ácido de adición de compuestos de base. Los expertos en la técnica reconocerán diversas metodologías sintéticas que pueden usarse para preparar sales de adición no tóxicas farmacéuticamente aceptables.

65

[0022] El término "paciente", como se usa aquí, se refiere a un mamífero. En ciertas realizaciones, el término "paciente" se refiere a un ser humano.

5 **[0023]** Los términos "administrar", "administración" o "administrado", como se usa en el presente documento, se refieren a administrar directamente el Compuesto A o una composición del mismo a un paciente.

[0024] Los términos "tratar" o "tratamiento", como se usa aquí, se refiere a aliviar parcial o completamente, inhibir, prevenir, mejorar y/o aliviar la condición, o al menos un síntoma de la misma.

10 **[0025]** Los términos "sufren" o "sufrimiento" tal como se utiliza aquí se refiere a una o más condiciones con la que un paciente ha sido diagnosticado, o se sospecha que tiene.

[0026] El término "susceptible", como se usa aquí se refiere a que tiene una probabilidad de ser afectado por al menos un síntoma de una condición.

15 **[0027]** Los expertos en la técnica apreciarán que "abuso de sustancias" implica a menudo síntomas de la "dependencia" física y/o psicológica. También, cuando la sustancia del abuso se retira de un individuo dependiente, el individuo desarrolla a menudo ciertos síntomas incluyendo el sueño y la alteración del humor y el deseo intenso de la sustancia del abuso, conocida como "retiro". Los métodos descritos en la presente memoria incluyen el tratamiento del abuso de sustancias, la dependencia y también la retirada.

20 **[0028]** El término "abuso de sustancias", como se usa en el presente documento, se pueden definir con referencia a los criterios establecidos en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales, cuarta Ed. Texto revisado (2000) ("DSM-IV TR"), que fue preparado por el Grupo de Trabajo sobre el DSM-IV de la Asociación Psiquiátrica Americana. Una característica del abuso de sustancias es un patrón desadaptativo de uso de sustancias que se manifiesta por las consecuencias adversas recurrentes y significativas relacionadas con el uso repetido de sustancias. Como se indica en el DSM-IV TR, el abuso de sustancias se define como un patrón desadaptativo de abuso de sustancias que conduce a un deterioro o angustia clínicamente significativa, manifestada por al menos uno de los siguientes síntomas, que ocurren en un período de 12 meses: El uso de sustancias como resultado del incumplimiento de las principales obligaciones de rol en el trabajo, la escuela o el hogar; (2) uso recurrente de sustancias en situaciones en las que es físicamente peligroso; (3) problemas legales recurrentes relacionados con sustancias; y 4) el consumo continuado de sustancias a pesar de tener problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes causados o exacerbados por los efectos de la sustancia. Además, el DSM-IV TR requiere que los síntomas de abuso de sustancias nunca hayan cumplido los criterios de dependencia de sustancias. En algunas realizaciones, el tratamiento del abuso de sustancias con nopicastato reduce la cantidad o frecuencia del uso de la sustancia en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento del abuso de sustancias con el Compuesto A en un paciente reduce al menos un síntoma de DSM-IV TR para el abuso de sustancias. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A en un paciente reduce al menos un síntoma de abuso de sustancias que incluye a modo de ejemplo y sin limitación al menos una de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, mala opinión, agresión, cólera, ansia por la sustancia que está siendo abusada, y trastornos del estado de ánimo. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce el deseo de sustancia inducido por un evento estresante en un paciente.

45 **[0029]** Tal como se usa en este documento, la frase "reduce un síntoma" se refiere a la reducción de al menos una de la frecuencia y amplitud de un síntoma de una enfermedad en un paciente. En ciertas realizaciones, el paciente entra en remisión y ya no experimenta el síntoma.

[0030] Tal como se usa en este documento, la frase "aumenta un síntoma" se refiere al aumento de al menos una de la frecuencia y amplitud de un síntoma de una enfermedad en un paciente.

50 **[0031]** El término "dependencia de sustancias", tal como se usa en el presente documento, se puede definir con referencia a los criterios establecidos en la TR DSM-IV. Los síntomas de dependencia de sustancias establecidas en DSM-IV TR son un patrón de consumo de sustancias, que conduce a un deterioro clínico significativo o angustia manifestada por al menos tres seleccionados del siguiente grupo, que ocurre en cualquier momento dentro del mismo período de doce meses: 1) la tolerancia definida por (a) la necesidad de cantidades substancialmente incrementadas de la sustancia para lograr el efecto deseado; o (b) efecto sustancialmente disminuido con el uso continuado de la misma cantidad de la sustancia; (2) la abstinencia, como se demuestra por (a) el síndrome de abstinencia característico de la sustancia específica; o b) la misma sustancia, o una estrechamente relacionada se toma para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia; (3) la sustancia se toma a menudo en cantidades mayores o durante un período más largo de lo previsto; (4) hay un deseo persistente o esfuerzos infructuosos para reducir o controlar el consumo de sustancias; (5) se gasta mucho tiempo en actividades para obtener la sustancia, usar la sustancia o recuperarse de sus efectos; (6) se renuncian o se reducen las actividades sociales, ocupacionales o recreativas importantes debidas al uso de sustancias; y (7) el uso de la sustancia se continúa a pesar del conocimiento de tener un problema físico o psicológico persistente o recurrente que es probable que haya sido causado o exacerbado por la sustancia. Dependencia de la sustancia puede ser con la dependencia fisiológica, donde la evidencia de la tolerancia o la retirada está presente, o sin dependencia fisiológica, donde no hay evidencia

- de tolerancia o la retirada está presente. En algunas realizaciones, el compuesto A, tratamiento de la dependencia de sustancias, reduce la cantidad o frecuencia de uso de la sustancia por un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento del Compuesto A de la dependencia de sustancias reduce al menos un síntoma de DSM-IV TR para la dependencia de sustancias en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A en un paciente reduce al menos un síntoma de dependencia de sustancias que incluye a modo de ejemplo y sin limitación al menos uno de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, falta de juicio, compulsión, agresión, ira, ansia para la sustancia de dependencia, y los trastornos del estado de ánimo. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce el deseo de sustancia inducido por un evento estresante en un paciente.
- 5
- 10 **[0032]** Tal como se usa en el presente documento, "remisión" se refiere a un estado en el que se ha reducido la aparición de al menos un síntoma de abuso o dependencia de sustancias. En algunas realizaciones, el término remisión no se aplica si el paciente está en terapia agonista o en un entorno controlado en el que el acceso a la sustancia relevante está restringido. En algunas realizaciones la remisión se refiere a un estado durante el cual no se produce la aparición de al menos un síntoma de abuso de sustancias o dependencia. En algunas realizaciones, la remisión se refiere a un estado durante el cual todos los síntomas del abuso de sustancias o dependencia se han reducido en un paciente. En algunas realizaciones, la remisión se refiere a un estado durante el cual no se producen síntomas de abuso o dependencia de sustancias. En algunas realizaciones, la remisión se refiere a un estado durante el cual no se produce el uso de sustancia.
- 15
- 20 **[0033]** En algunas realizaciones, la remisión se caracteriza por al menos uno de principios de remisión completa, remisión parcial temprana, remisión completa sostenida y remisión parcial sostenida y sólo se aplica después de que ninguno de los síntomas de abuso de sustancias y la dependencia han estado presentes durante al menos un mes. La definición de estos cuatro tipos de remisión se basa en el intervalo de tiempo que ha transcurrido desde el cese de la dependencia (remisión temprana versus sostenida) y si continúa la presencia de al menos un síntoma de dependencia o abuso de sustancias (remisión parcial versus completa).
- 25
- [0034]** El calificativo "remisión completa temprana" se utiliza cuando, durante al menos un mes, pero durante al menos de doce meses, ningún síntoma de la dependencia de sustancias o el abuso de sustancias se ha cumplido.
- 30 **[0035]** El calificativo "remisión parcial temprana" se utiliza cuando durante al menos un mes, pero menos de 12 meses, al menos un síntoma de la dependencia de sustancias o el abuso de sustancias se ha cumplido, pero los criterios para la dependencia de sustancias o el abuso de sustancias no han reunido.
- [0036]** El término se utiliza "remisión completa sostenida" cuando ninguno de los síntomas de la dependencia de sustancias o el abuso de sustancias se han cumplido en cualquier momento durante un período de al menos doce meses.
- 35 **[0037]** El término "remisión parcial sostenida" se utiliza cuando durante al menos doce meses, al menos un síntoma de la dependencia de sustancias o el abuso de sustancias se ha cumplido, pero los criterios para la dependencia de sustancias o el abuso de sustancias no se han cumplido.
- 40 **[0038]** En algunas realizaciones, el compuesto A de tratamiento promueve la remisión en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A prolonga un período de período de remisión en un paciente.
- 45 **[0039]** La frase "prolongar un período de remisión" se refiere a aumentar el intervalo de tiempo durante el cual el paciente está en remisión. En algunas realizaciones, un evento estresante puede hacer que la remisión termine en un paciente. En algunas realizaciones, la recaída ocurre al final de la remisión. En algunas realizaciones, el tratamiento con Compuesto A reduce la probabilidad de que la remisión termine en un paciente después de un evento estresante. En algunas realizaciones, el tratamiento del Compuesto A promueve al menos uno de remisión parcial temprana, remisión completa sostenida, remisión parcial sostenida y remisión completa sostenida.
- 50 **[0040]** "Retirada" se refiere a un conjunto de síntomas que surge cuando se reduce la administración de una sustancia en cuestión, se retrasa, o se detiene. Los síntomas específicos de la sustancia de la abstinencia pueden causar una angustia o deterioro clínicamente significativo en áreas sociales, ocupacionales u otras áreas importantes de funcionamiento, por ejemplo. Estos síntomas no se deben a una condición médica general y no son mejor explicados por otro trastorno mental. El retiro generalmente, pero no necesariamente, está asociado con la dependencia de sustancias. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce al menos un síntoma de retirada en un paciente. En algunas realizaciones, los síntomas de abstinencia incluyen, por ejemplo, y sin limitación, apatía, irritabilidad, imprudencia, falta de juicio, compulsión, agresión, ira, deseo de sustancia, trastornos del estado de ánimo y trastornos del sueño. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce el deseo de sustancia inducido por un evento estresante en un paciente.
- 55 **[0041]** La dependencia de sustancias de término se puede caracterizar por la presencia de al menos una de las siguientes condiciones caracterizadas en el TR DSM-IV: Abuso de alcohol; Dependencia al alcohol; Intoxicación alcohólica; Delirium de la intoxicación del alcohol; Abstinencia de alcohol; Delirium de abstinencia de alcohol; Trastorno de ansiedad inducido por alcohol; Trastorno del estado de ánimo inducido por alcohol; Trastorno amnésico
- 60
- 65

persistente inducido por alcohol; Demencia persistente inducida por alcohol; Trastorno psicótico inducido por alcohol, con delusiones; Trastorno psicótico inducido por alcohol, con alucinaciones; Disfunción sexual Inducida por alcohol; Trastorno del sueño inducido por alcohol; Trastorno relacionado con el alcohol no especificado de otro modo (NOS); Abuso de anfetamina; Dependencia de amfetamina; Intoxicación por anfetaminas; Delirium de intoxicación de anfetamina; Retiro de anfetamina; Trastorno de ansiedad inducido por anfetaminas; Trastorno del estado de ánimo inducido por anfetamina; Trastorno psicótico inducido por anfetamina, con delirios; Trastorno psicótico inducido por anfetamina, con alucinaciones; Disfunción sexual inducida por anfetamina; Trastorno del sueño inducido por anfetamina; Trastorno relacionado con anfetamina NOS; Abuso de cannabis; Dependencia del cannabis; Intoxicación con cannabis; Delirio de intoxicación de cannabis; Trastorno de ansiedad inducido por cannabis; Trastorno psicótico inducido por cannabis, con delirios; Trastorno psicótico inducido por cannabis, con alucinaciones; Trastorno relacionado con cannabis NOS; Abuso de cocaína; Dependencia de Cocaína; Intoxicación por cocaína; Delirio de intoxicación de cocaína; Retirada de cocaína; Trastorno de ansiedad inducido por cocaína; Trastorno del estado de ánimo inducido por cocaína; Trastorno psicótico inducido por cocaína, con delirios; Trastorno psicótico inducido por cocaína, con alucinaciones; Disfunción Sexual Inducida por Cocaína; Trastorno del sueño inducido por cocaína; Trastorno relacionado con la cocaína NOS; Abuso de Inhalantes; Dependencia de inhalantes; Intoxicación por inhalación; Delirio por intoxicación por inhalación; Trastorno de ansiedad inducido por inhalantes; Trastorno del estado de ánimo inducido por inhalantes; Demencia persistente inducida por inhalantes; Trastorno psicótico inducido por inhalantes, con delirios; Trastorno psicótico inducido por inhalantes, con alucinaciones; Trastorno relacionado con la inhalación NOS; Abuso de opioides; Dependencia de opioides; Intoxicación por opioides; Delirio de intoxicación por opioides; Abstinencia opiácea; Trastorno del estado de ánimo inducido por opioides; Trastorno psicótico inducido por opioides, con deleciones; Trastorno psicótico inducido por opioides, con alucinaciones; Disfunción sexual inducida por opioides; Trastorno del sueño inducido por opioides; Trastorno relacionado con opioides NOS; Abuso de fenciclidina; Dependencia de fenciclidina; Intoxicación por fenciclidina; Delirio de intoxicación por fenciclidina; Trastorno de ansiedad inducido por fenciclidina; Trastorno del estado de ánimo inducido por fenciclidina; Trastorno psicótico inducido por fenciclidina, con delirios; Trastorno psicótico inducido por fenciclidina, con alucinaciones; y trastorno relacionado con la fenciclidina NOS.

[0042] Los términos "cesación" y "retirada" pueden ser, pero no tienen que ser, en referencia a las siguientes condiciones caracterizadas en el DSM-IV TR: Retirada de la nicotina; Trastorno relacionado con la nicotina no especificada; Dependencia de la nicotina, con dependencia fisiológica; Dependencia de la nicotina, sin dependencia fisiológica; Dependencia de la nicotina, remisión completa temprana; Dependencia de nicotina, remisión parcial temprana; Dependencia de nicotina, Remisión total sostenida; Dependencia de nicotina, Remisión parcial sostenida; Dependencia de la nicotina, en la terapia agonista; Abstinencia opiácea; Trastorno relacionado con opioides no especificado de otra manera; Dependencia de opioides, con dependencia fisiológica; Dependencia de opioides, sin dependencia fisiológica; Dependencia de opioides, remisión completa temprana; Dependencia opioide, Remisión parcial temprana; Dependencia de opioides, Remisión total sostenida; Dependencia de opioides, Remisión parcial sostenida; Dependencia de opioides en la terapia agonista; y Dependencia de opioides en un ambiente controlado; Retirada de etanol; Dependencia del etanol con dependencia fisiológica; Abstinencia de etanol, sin dependencia fisiológica; Retirada de etanol, Remisión completa temprana; Retirada de etanol, remisión parcial temprana; Retirada de etanol, Remisión total sostenida; Retirada de etanol, Remisión parcial sostenida; Retirada de etanol, en Terapia agonista; Retirada de etanol, en un ambiente controlado; Retirada de anfetamina; y Retirada de la cocaína.

[0043] Tal como se usa en el presente documento, "en la terapia agonista" se refiere a que está siendo tratado con un agonista para el abuso de sustancias, dependencia, o retirada. El término agonista se refiere a un factor que incluye, pero no se limita a un compuesto químico, tal como una molécula pequeña o un compuesto orgánico complejo o una proteína, que desencadena una respuesta en un paciente que es al menos una respuesta o respuesta parcial de la sustancia que está siendo abusada, depende o se retira del paciente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, "dependencia de opioides en la terapia agonista" se refiere a la dependencia de opiáceos en la terapia con metadona.

[0044] Los síntomas de abstinencia pueden surgir después de la reducción de cualquiera de una variedad de sustancias. Por ejemplo, el uso discontinuo de productos de tabaco, todos los cuales contienen nicotina, típicamente da como resultado el inicio de las condiciones de abstinencia de nicotina. Los individuos sufren a menudo de síntomas de la abstinencia de nicotina como consecuencia del uso discontinuo del tabaco en cualquier forma, incluyendo, pero no limitado a fumar tabaco de cigarrillos, cigarros o pipas o la ingestión oral o intranasal de tabaco o masticar tabaco. Dicho tabaco oral o intranasal incluye, pero no se limita a, y tabaco de mascar. El cese del uso de nicotina o la reducción en la cantidad de nicotina, a menudo es seguido dentro de las 24 horas por síntomas incluyendo humor disfórico, deprimido; aturdimiento; insomnio; irritabilidad, frustración o enojo; ansiedad; temblor nervioso; dificultad para concentrarse; inquietud; disminución de la frecuencia cardíaca; aumento del apetito o aumento de peso; y el deseo de tabaco o nicotina. Estos síntomas a menudo causan angustia o deterioro clínicamente significativo en áreas sociales, ocupacionales u otras áreas importantes de funcionamiento. Los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para aliviar uno o más síntomas atribuidos a la abstinencia de nicotina cuando tales síntomas no se deben a una condición médica general y no son mejor explicados por otro trastorno médico. El presente método también es útil para aquellos que han reemplazado, o parcialmente reemplazado, su uso de tabaco con el uso de terapia de reemplazo de nicotina. Por lo tanto, estos pacientes pueden ser asistidos para reducir e incluso eliminar completamente su dependencia de la nicotina en

todas sus formas.

[0045] La interrupción o reducción de la administración de un opiáceo, típicamente auto-administración, a través de inyección o por vía oral, a través de fumar o ingestión intranasal, a menudo resulta en la presencia de una condición de la abstinencia de opiáceos característica. Esta condición de retirada también puede precipitarse mediante la administración de un antagonista opiáceo tal como naloxona o naltrexona después del uso de opiáceos. La abstinencia de opiáceos se caracteriza por síntomas que son generalmente opuestos a los efectos del agonista opiáceo. Estos síntomas de abstinencia pueden incluir ansiedad; inquietud; Dolores musculares, a menudo en la espalda y las piernas; Deseo de opiáceos; Irritabilidad y mayor sensibilidad al dolor; Estado de ánimo disfórico; Náuseas o vómitos; Lagrimeo; Rinorrea; Dilatación pupilar; Piloerección; Transpiración; Diarrea; Bostezar; Fiebre; y el insomnio. Cuando la dependencia es de opiáceos de acción corta, como la heroína, los síntomas de abstinencia suelen ocurrir dentro de las 6 a 24 horas después de la última dosis, mientras que con opiáceos de acción prolongada, como la metadona, los síntomas pueden tardar entre 2 y 4 días en surgir. Estos síntomas a menudo causan angustia o deterioro clínicamente significativo en áreas sociales, ocupacionales u otras áreas importantes de funcionamiento. Los métodos aquí descritos se pueden utilizar para aliviar uno o más síntomas atribuidos a la abstinencia de opiáceos cuando tales síntomas no se deben a una condición médica general y no se explican mejor por otro trastorno médico.

[0046] La interrupción o reducción en el uso de etanol (por ejemplo, etanol que contiene bebidas) da como resultado la aparición de condiciones de abstinencia de etanol. Condiciones de abstinencia de etanol se caracterizan por síntomas que comienzan cuando las concentraciones sanguíneas de disminución de etanol bruscamente, dentro de 4 a 12 horas después de su uso de etanol se ha detenido o reducido. Estos síntomas de abstinencia de etanol incluyen ansia de etanol; hiperactividad autonómica (tales como sudoración o la frecuencia del pulso mayor de 100); temblor de las manos; insomnio; náusea; vómitos; transitorio, táctil, o alucinaciones o ilusiones auditivas visuales; agitación psicomotora; ansiedad; y convulsiones grand mal. Estos síntomas a menudo provocan malestar clínicamente significativo o deterioro en las áreas social, laboral o de otras áreas importantes del funcionamiento. Los métodos descritos aquí se pueden usar para aliviar uno o más síntomas atribuidos a la retirada de etanol cuando tales síntomas no se deben a una condición médica general y no se explican mejor por otro trastorno médico.

[0047] El abuso de cocaína y dependencia pueden causar síntomas cognitivos, conductuales y fisiológicos. Los síntomas de abuso de cocaína y dependencia pueden incluir diversos grados de trastorno de hiperactividad por déficit de atención y la euforia; aumento de la energía, la excitación y la sociabilidad; menos hambre y fatiga; un sentimiento marcado de la fuerza física y mental; disforia; disminución de la sensación de dolor; y ansia de cocaína. Efectos respiratorios incluyen síntomas tales como bronquitis, dificultad para respirar y dolor en el pecho, y los efectos cardiovasculares incluyen síntomas tales como palpitaciones, arritmia, cardiomiopatía, y ataques al corazón. Los síntomas también incluyen pupilas dilatadas, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, vértigo, ansiedad, mareos, psicosis y confusión. La administración de cocaína a través de resoplido o aspiración puede resultar en efectos de oído, nariz y garganta incluyendo irritación nasal, formación de costras nasales, hemorragias nasales recurrentes, congestión nasal, y dolor facial. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A reduce al menos un síntoma del abuso de cocaína y dependencia en un paciente. En algunas realizaciones, tratamiento de nepicstat aumenta al menos un síntoma subjetivo negativo del abuso de cocaína y dependencia.

[0048] Los síntomas de abstinencia de cocaína pueden incluir una fatiga, falta de placer, depresión, irritabilidad, trastornos del sueño, aumento del apetito, retraso psicomotor, la agitación, la sospecha extrema, y el deseo de cocaína. En algunas formas de realización, el tratamiento de Compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia de la cocaína.

[0049] La dependencia de sustancias puede ser caracterizada por las fases de: la adquisición, el mantenimiento, la extinción, y la recaída. Tal como se utiliza aquí, el término "adquisición" se refiere a una fase de la dependencia de sustancias en la que la dependencia de la sustancia se inicia y se adquiere por un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A inhibe el desarrollo de la fase de adquisición en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A de la fase de adquisición se reduce al menos una de la cantidad o la frecuencia de uso de sustancias por un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A de la fase de adquisición reduce al menos un síntoma DSM-IV de abuso y dependencia de sustancias en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A de la fase de adquisición reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de sustancias, que incluyen a modo de ejemplo y sin limitación al menos uno de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, juicio deficiente, compulsión, agresión, ira, deseo de la sustancia siendo abusado u objeto de dependencia, y los trastornos del estado de ánimo. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce el ansia inducida por sustancias por un acontecimiento estresante en un paciente durante la fase de adquisición.

[0050] "Mantenimiento" se refiere a una fase de la dependencia de sustancias en la que no es la administración estable o uso de la sustancia por un paciente. En algunas realizaciones, una variación del 10% en al menos una de la cantidad y la frecuencia de uso de sustancias por un paciente se considera un comportamiento estable. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A de la fase de mantenimiento reduce al menos una de la

cantidad y la frecuencia de uso de sustancias por un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A de la fase de mantenimiento reduce al menos un síntoma DSM-IV de abuso y dependencia de sustancias en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A de la fase de mantenimiento reduce al menos un síntoma de abuso de sustancias y la dependencia que incluye a modo de ejemplo y sin limitación al menos uno de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, juicio deficiente, compulsión, la agresión, la ira, deseo de la sustancia de la que se abusa y depende, y los trastornos del estado de ánimo. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce el ansia inducida por sustancias por un acontecimiento estresante en un paciente durante la fase de mantenimiento.

[0051] "Extinción" se refiere a una fase de la dependencia de sustancias en la que la sustancia no se proporciona a un paciente o un paciente se abstiene de uso de la sustancia. En algunas realizaciones, la dependencia de la sustancia se extingue o se reduce en la fase de extinción. En algunas realizaciones, al menos un síntoma de retirada se produce en la fase de extinción. En algunas realizaciones, el compuesto A de tratamiento promueve el desarrollo de la fase de extinción en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A de la fase de extinción reduce al menos un síntoma DSM-IV de abuso y dependencia de sustancias en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A durante la fase de extinción reduce al menos un síntoma de abuso de sustancias y dependencia que incluye a modo de ejemplo y sin limitación al menos uno de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, juicio deficiente, compulsión, la agresión, la ira, ansia de la sustancia de la que se abusa o depende, y los trastornos del estado de ánimo. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A reduce los síntomas de abstinencia en un paciente en la fase de extinción. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce el ansia inducida por sustancias por un acontecimiento estresante en un paciente en la fase de extinción.

[0052] "Relapse" se refiere a la recurrencia de al menos un síntoma de abuso o dependencia de sustancias después de un período de abstinencia en un paciente. En algunas realizaciones, la recaída se produce al final de la remisión. En algunas realizaciones, un paciente se ha sometido a adiestramiento de extinción antes de la recaída. En algunas realizaciones, la recaída se produce después de cebado de drogas, el estrés o la exposición a una indicación o estimulación relacionada con el entorno que se había asociado previamente con el consumo de sustancias. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A reduce la frecuencia de las recaídas en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A de la fase de recaída reduce al menos un síntoma DSM-IV de abuso y dependencia de sustancias en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A de la fase de recaída reduce al menos un síntoma de abuso de sustancias y dependencia que incluye a modo de ejemplo y sin limitación al menos uno de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, juicio deficiente, compulsión, la agresión, la ira, ansia de la sustancia de la que se abusa o depende, y los trastornos del estado de ánimo. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A reduce los síntomas de retirada en un paciente durante la fase de recaída. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce el ansia inducida por sustancias por un acontecimiento estresante en un paciente durante la fase de recaída.

[0053] El tratamiento de abuso de sustancias, dependencia y abstinencia pueden llevarse a cabo por etapas. En algunas formas de realización, se prefiere un período inicial de abstinencia del uso de la sustancia antes de la inducción del tratamiento con el Compuesto A en un paciente. En algunas realizaciones, una dosis baja inicial de Compuesto A se administra a un paciente. En algunas realizaciones, la cantidad de Compuesto A administrado a un paciente se escala hasta que se observa una respuesta terapéutica deseada. En algunas realizaciones, la cantidad de Compuesto A se escala con el fin de determinar la dosis óptima para tratar la condición y reducir al mínimo los síntomas, efectos secundarios, y los antojos para la sustancia en un paciente.

[0054] En algunas realizaciones, el compuesto A de tratamiento promueve la remisión. En algunas realizaciones, la dosis de Compuesto A permanece sin cambios o se disminuye gradualmente después de alcanzarse la remisión en un paciente.

[0055] Proporcionado es el Compuesto A para su uso en métodos de tratamiento de un paciente que padece o es susceptible a al menos un síntoma de abuso, dependencia, o abstinencia de la cocaína. Los métodos incluyen administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma del abuso de cocaína y la dependencia en el paciente seleccionado de entre trastorno de hiperactividad con déficit de atención; euforia; aumento de energía, entusiasmo y la sociabilidad; menos hambre y fatiga; un sentimiento marcado de la fuerza física y mental; disminución de la sensación de dolor; bronquitis; dificultad para respirar; dolor de pecho; palpitaciones del corazón; arritmia; cardiomiopatía; ataque al corazón; pupilas dilatadas; náusea; vómitos; dolor de cabeza; vértigo; mareo; ansiedad; psicosis; confusión; irritación nasal; formación de costras nasales; hemorragias nasales recurrentes; congestión nasal; dolor facial; disforia; y ansia de cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A aumenta al menos un síntoma del abuso de cocaína y dependencia. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia de la cocaína seleccionado de fatiga, falta de placer, depresión, irritabilidad, trastornos del sueño, aumento del apetito, retraso psicomotor, agitación, sospecha extrema, y el deseo de cocaína. En algunas realizaciones, el tratamiento de Compuesto A mejora una puntuación del paciente en al menos uno de la escala de calificación de trastorno de hiperactividad de déficit de atención IV (ADHD-IV), escala de depresión de Hamilton (HAM-D), escala de ansiedad de Hamilton (HAM-A), el inventario de depresión de Beck (BDI), la escala de la apatía de inventario

neuropsiquiátrico, y una escala de valoración de la función cognitiva. En algunas realizaciones, la escala de calificación de la función cognitiva se selecciona de la escala de inteligencia adulta de Wechsler-revisada (WAIS-R), escala de memoria de Wechsler-revisada (WMS-R), prueba de aprendizaje verbal auditorio de Rey (RAVLT, ensayos I-VII), Prueba de Figura de Complejo de Rey (RLCE), y el test de trazo (TMT, partes A y B). En algunas realizaciones, el Compuesto A se reduce en el paciente al menos una de la cantidad y la frecuencia de uso de sustancias por el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso, dependencia, o abstinencia de la cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abuso de sustancias en el paciente seleccionado de uso recurrente de la sustancia que resulta en una falta de cumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o el hogar; el uso recurrente de la sustancia en situaciones en las que es físicamente peligroso; problemas legales relacionados con sustancias recurrentes; y el uso continuado de sustancias a pesar de tener problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes causados o exacerbados por los efectos de la sustancia. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma de la dependencia de sustancias en el paciente seleccionado de tolerancia; retirada; la sustancia se toma a menudo en cantidades mayores o durante un período más largo a continuación, fue concebido; existe un deseo persistente y/o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de sustancias; una gran cantidad de tiempo que se gasta en al menos una de las actividades para obtener la sustancia, usar la sustancia, y recuperarse de sus efectos; al menos una de importantes actividades sociales, laborales y recreativas son abandonadas y/o se reducen debido al uso de sustancias; y el uso de sustancias se continúa a pesar del conocimiento de tener un problema físico y/o psicológico persistente y/o recurrente que es probable que hayan sido causados o exacerbados por la sustancia. En algunas realizaciones, el compuesto A promueve la remisión en el paciente. En algunas realizaciones, la remisión se caracteriza por al menos uno de los principios de remisión completa, remisión parcial temprana, remisión completa sostenida y remisión parcial sostenida. En algunas realizaciones, el Compuesto A prolonga un periodo de remisión en el paciente. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además el tratamiento con al menos uno de manejo de contingencias y la terapia de comportamiento cognitivo. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además co-administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos otro agente seleccionado de un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (SSRI), un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina (SNRI), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina (NRI), un inhibidor de recaptación norepinefrina-dopamina (NDRI), un antagonista de serotonina 5-hidroxitriptamina1A (5HT1A), un inhibidor α -hidroxilasa de dopamina, un antagonista de receptor de adenosina, un antagonista de receptor de adenosina A2A, un inhibidor de monoamina oxidasa (MAOI), un inhibidor de monoamina oxidasa B, un bloqueador del canal de sodio, un bloqueador de canal de calcio, un antagonista del receptor alfa adrenérgico central y periférico, un agonista adrenérgico alfa central, un antagonista del receptor adrenérgico beta central o periférico, un antagonista del receptor NK-1, antagonista de factor de liberación de corticotropina (CRF), un antidepresivo/antipsicótico, un tricíclico, un anticonvulsivo, un antagonista del glutamato, un ácido gamma-aminobutírico (GA BA), un inhibidor de enzima de metabolismo de GABA, un activador de la síntesis de GABA, un agonista de dopamina D2 parcial, un inhibidor de la enzima de metabolismo de dopamina, un inhibidor de catecol-O-metilo-transferasa, un antagonista del receptor opioide, un estabilizador del estado de ánimo, un agonista de dopamina directo o indirecto, un agonista de 5HT1 parcial, un antagonista de serotonina 5HT2, un opioide, un inhibidor de la carboxilasa, un agonista parcial de opioides, un agonista nicotínico parcial, y un inhalante. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un SSRI seleccionado de paroxetina, sertralina, citalopram, escitalopram, y fluoxetina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un SNRI seleccionado de duloxetina, mirtazapina y venlafaxina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un NRI seleccionado de bupropión y atomoxetina. En algunas realizaciones, el agente de al menos otro es el bupropion NDRI. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el inhibidor de dopamina α -hidroxilasa disulfiram. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el antagonista del receptor de adenosina A2A istradefilina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un bloqueador de canal de sodio seleccionado de lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina, y valproato. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un bloqueador de canal de calcio seleccionado de nimodopona, lamotrigina, y carbamazepina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el antagonista del receptor alfa adrenérgico central y periférico prazosin. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el agonista adrenérgico alfa central de clonidina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el antagonista del receptor beta adrenérgico central o periférico propranolol. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un antidepresivo/antipsicótico atípico seleccionado de bupropion, olanzepina, risperidona, y quetiapina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un tricíclico seleccionado de amitriptilina, amoxapina, desipramina, doxepina, imipramina, nortriptilina, protriptilina, y trimipramina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un anticonvulsivo seleccionado de fenitoína, lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina, valproato, topiramato, tiagabina, vigabatrina, y levetiracetam. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el antagonista de glutamato topiramato. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un agonista de GABA seleccionado de baclofeno, valproato, y topiramato. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el metabolismo de dopamina carbidopa inhibidor de la enzima. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el agonista de la dopamina parcial aripiprazol D2. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un antagonista del receptor opioide seleccionado de naltrexona y naloxona. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un estabilizador del humor seleccionado de carbamazepina y litio. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un agonista de la dopamina directo o indirecto seleccionado de dopamina, bromocriptina, pergolida, amantadina, mazindol, y el metilfenidato. En algunas realizaciones, el agente de al menos otro es el agonista parcial de 5HT1 gepirona. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el antagonista de serotonina 5HT2 ritanserina. En algunas formas de realización, el al menos otro agente es la metadona opioide. En algunas realizaciones, el agente de al menos otro

agente es la buprenorfina agonista opiode parcial. En algunas realizaciones, el agente de al menos otro agonista es la champix nicotínico parcial. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un inhalante seleccionado entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenzene, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno, y perfluorobenceno. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además co-administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de menos otro agente seleccionado de benzodiazepina, levodopa, carisoprodol, modafenilo, acamprosato, gamma-butirolactona, gamma-hidroxitirato, opio, psilocibina, hongo alucinógeno, tabaco y nicotina. En algunas realizaciones, el Compuesto A se administra al paciente después de un periodo de abstinencia del uso de la sustancia por el paciente. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A en el paciente se determina por la escalada de la cantidad de Compuesto A se administra al paciente hasta que se observa una respuesta terapéutica deseada. En algunas realizaciones, la cantidad de Compuesto A se estrecha después de que la remisión se alcanza en el paciente. En algunas realizaciones, la cantidad de Compuesto A no se modifica después de que la remisión se alcanza en el paciente.

15 **[0056]** También se proporciona el Compuesto A para su uso en métodos de tratamiento de al menos una fase de la dependencia de cocaína en un paciente. En algunas realizaciones, la fase de al menos uno se selecciona de adquisición, el mantenimiento, la extinción, y la recaída. Los métodos incluyen administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A. En algunas formas de realización, el Compuesto A inhibe el desarrollo de la fase de adquisición en el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A promueve el desarrollo de la fase de extinción en el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce la frecuencia de las recaídas en el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso, dependencia, o abstinencia de la cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma del abuso de cocaína en el paciente seleccionado de entre el consumo de cocaína recurrente que resulta en una falta de cumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o el hogar; el consumo de cocaína recurrente en situaciones en las que es físicamente peligroso; problemas legales recurrentes relacionados con la cocaína; y el uso continuado de cocaína a pesar de tener problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes causados o exacerbados por los efectos de la cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma de dependencia de la cocaína en el paciente seleccionado de tolerancia; retirada; la cocaína se toma a menudo en cantidades mayores o durante un periodo más largo a continuación; existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de cocaína; una gran cantidad de tiempo que se gasta en actividades para obtener la cocaína, utilizar la cocaína, o recuperarse de sus efectos; importantes actividades sociales, laborales o recreativas se dan hacia arriba o se reducen a causa del consumo de cocaína; y el consumo de cocaína se continúa a pesar del conocimiento de tener un problema físico o psicológico persistente o recurrente de que es probable que hayan sido causados o exacerbados por la cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma del abuso de cocaína y dependencia seleccionado de trastorno de hiperactividad con déficit de atención; euforia; aumento de energía, entusiasmo y sociabilidad; menos hambre y la fatiga; un sentimiento marcado de la fuerza física y mental; disminución de la sensación de dolor; bronquitis; dificultad para respirar; dolor de pecho; palpitaciones del corazón; arritmia; cardiomiopatía; ataque al corazón; pupilas dilatadas; náusea; vómitos; dolor de cabeza; vértigo; mareo; ansiedad; psicosis; confusión; irritación nasal; formación de costras nasales; hemorragias nasales recurrentes; congestión nasal; dolor facial; disforia; y ansia de cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A aumenta al menos un síntoma subjetivo negativo del abuso de cocaína y dependencia. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia de la cocaína seleccionado de fatiga, falta de placer, depresión, irritabilidad, trastornos del sueño, aumento del apetito, retraso psicomotor, la agitación, la sospecha extrema, y el deseo de cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A mejora una puntuación del paciente en al menos uno de ADHD-IV, HAM-D, HAM-A, BDI, escala de apatía de inventario neuropsiquiátrico, y una escala de calificación de la función cognitiva. En algunas realizaciones, la escala de calificación de la función cognitiva se selecciona de WAIS-R, WMS-R, RAVLT, ensayos I-VII, RLCE, y TMT, Partes A y B. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos una de las cantidad y frecuencia de uso de la cocaína por el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A promueve la remisión en el paciente. En algunas realizaciones, la remisión se caracteriza por al menos uno de principios de remisión completa, remisión parcial temprana, remisión completa sostenida y remisión parcial sostenida. En algunas realizaciones, el Compuesto A prolonga un periodo de remisión en el paciente. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además el tratamiento con al menos uno de manejo de contingencias y la terapia de comportamiento cognitivo. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además co-administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos otro agente seleccionado de un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (SSRI), un inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina (SNRI), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina (NRI), una norepinefrina, inhibidor de recaptación de dopamina (NDRI), un antagonista de 5-hidroxitriptamina1A de serotonina (5HT1A), un inhibidor de α -hidroxilasa de dopamina, un antagonista de receptor de adenosina, un antagonista de receptor de adenosina A2A, inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO), un inhibidor de monoamina oxidasa B, un bloqueador del canal de sodio, un bloqueador de canal de calcio, un antagonista del receptor alfa adrenérgico central y periférico, un agonista adrenérgico alfa central, un antagonista del receptor beta central o periférico adrenérgico, un antagonista del receptor NK-1, antagonista de factor de liberación de corticotropina (CRF), un antidepresivo atípico/antipsicótico, un tricíclico, un anticonvulsivo, un antagonista del glutamato, un agonista de ácido gamma-amino butírico (GABA), un inhibidor de enzima de metabolismo GABA, un activador de la síntesis de GABA, un agonista de dopamina D2 parcial, un inhibidor de enzima de metabolismo de dopamina, un inhibidor de catecol-O-metilo-transferasa, un antagonista opiode receptor, un estabilizador del estado de ánimo, un agonista directo o

indirecto de la dopamina, un agonista parcial 5HT1, un antagonista de la serotonina 5HT2, un opioide, un inhibidor de la carboxilasa, un agonista opioide parcial, un agonista nicotínico parcial, y un inhalante. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un SSRI seleccionado de paroxetina, sertralina, citalopram, escitalopram, y fluoxetina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un SNRI seleccionado de duloxetina, mirtazapina y venlafaxina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un NRI seleccionado de bupropión y atomoxetina. En algunas realizaciones, el agente de al menos otro es el bupropion NDRI. En algunas realizaciones, al menos otro agente es inhibidor ©-hidroxilasa de dopamina disulfiram. En algunas realizaciones, al menos otro agente es antagonista del receptor de adenosina istradefilina A2A. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un bloqueador de canal de sodio seleccionado de lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina, y valproato. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un bloqueador de canal de calcio seleccionado de nimodopona, lamotrigina, y la carbamazepina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es antagonista del receptor alfa adrenérgico prazosin central y periférico. En algunas realizaciones, al menos otro agente es agonista alfa central adrenérgico clonidina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es antagonista del receptor beta adrenérgico propranolol central o periférico. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un antidepresivo/antipsicótico atípico seleccionado de bupropion, olanzepina, risperidona, y quetiapina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un tricíclico seleccionado de amitriptilina, amoxapina, desipramina, doxepina, imipramina, nortriptilina, protriptilina, y trimipramina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un anticonvulsivo seleccionado de fenitoína, lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina, valproato, topiramato, tiagabina, vigabatrina, y levetiracetam. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el topiramato antagonista de glutamato. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un agonista de GABA seleccionado de baclofeno, valproato, y topiramato. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el metabolismo de dopamina carbidopa inhibidor de la enzima. En algunas realizaciones, al menos otro agente es agonista de aripirazol parcial de dopamina D2. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un antagonista del receptor opioide seleccionado de naltrexona y naloxona. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un estabilizador del estado de ánimo seleccionado de carbamazepina y litio. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un agonista de dopamina directo o indirecto seleccionado de dopamina, bromocriptina, pergolida, amantadina, mazindol, y el metilfenidato. En algunas realizaciones, al menos otro agente es la agonista parcial de 5HT1 gepirona. En algunas realizaciones, al menos otro agente es antagonista de serotonina 5HT2 ritanserina. En algunas formas de realización, al menos otro agente es la metadona opioide. En algunas realizaciones, al menos otro agente es el agonista opioide parcial buprenorfina. En algunas realizaciones, al menos otro agente es agonista nicotínico parcial champix. En algunas realizaciones, al menos otro agente es un inhalante seleccionado entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenceno, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno, y perfluorobenceno. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además co-administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos otro agente seleccionado de benzodiazepina, levodopa, carisoprodol, modafenilo, acamprosato, gamma-butirolactona, gamma-hidroxibutirato, opio, psilopcibina, hongo alucinógeno, tabaco y la nicotina. En algunas realizaciones, el Compuesto A se administra al paciente después de un período de abstinencia del uso de la cocaína por el paciente. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A en el paciente se determina por la escalada de la cantidad de Compuesto A administrada al paciente hasta que se observa una respuesta terapéutica deseada. En algunas realizaciones, la cantidad de Compuesto A se reduce después de alcanzarse la remisión de la dependencia de la cocaína en el paciente. En algunas realizaciones, la cantidad de Compuesto A no se modifica después de la remisión de la dependencia de la cocaína que se alcanza en el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A trata al menos un síntoma de abuso, dependencia, o retirada de al menos una sustancia secundaria en el paciente. En algunas realizaciones, al menos una sustancia secundaria se selecciona de una droga de abuso y un medicamento. En algunas realizaciones, la droga de abuso se selecciona de un agente psicoestimulante, un opioide, un alucinógeno, un inhalante, un sedante, un tranquilizante, un hipnótico, un ansiolítico, y una sustancia ilícita. En algunas realizaciones, el agente psicoestimulante es un derivado de beta-fenilo-isopropilamina. En algunas realizaciones, el derivado de beta-fenilisopropilamina se selecciona de amfetamina, dextroanfetamina, y metanfetamina. En algunas realizaciones, el agente psicoestimulante se selecciona de entre el éxtasis, fenmetrazina, metilfenidato, dietilpropión, pemolina, mazindol, (-) catión, y fenfluramina. En algunas realizaciones, el opioide se selecciona de Lortab®, Tramadol®, heroína, metadona, hidrocodona y oxicodona. En algunas realizaciones, el alucinógeno se selecciona de psilocibina, una seta alucinógena, dietilamida del ácido lisérgico (LSD), fenciclidina (PCP), y ketamina. En algunas realizaciones, el inhalante se selecciona de entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenceno, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno y perfluorobenceno. En algunas realizaciones, el medicamento se selecciona de un anestésico, un analgésico, un agente anticolinérgico, un antihistamínico, un relajante muscular, un medicamento antiinflamatoria no esteroideo, un medicamento disponible en ventanilla, y un medicamento antidepresivo. En algunas realizaciones, la droga de abuso es el alcohol, la cafeína, opio, cannabinoide, cannabis, benzodiazepinas, carisoprodol, tabaco, nicotina, vicodina, lorcet, percocet, percodan, y tylox.

[0057] Los derivados farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos, bases, éteres de enol, y ésteres, ésteres, hidratos, disolventes, y formas de profármacos. El derivado se selecciona de tal manera que sus propiedades farmacocinéticas son superiores con respecto a al menos una característica al agente neutral correspondiente. El Compuesto A puede ser derivatizado antes de la formulación.

[0058] Una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A o un derivado farmacéuticamente aceptable puede

5 variar ampliamente dependiendo de la gravedad de la adicción o dependencia, la edad y la salud relativa del sujeto, la potencia del Compuesto usado y otros factores. En ciertas formas de realización una cantidad terapéuticamente eficaz es de aproximadamente 0,1 miligramos por kg (mg/kg) de peso corporal por día a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día. En otras realizaciones, la cantidad es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 mg/kg/día. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz para un humano de 70 kg es de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 3500 mg/día, mientras que en otras formas de realización es aproximadamente 70 a aproximadamente 700 mg/día.

10 **[0059]** Un experto en el arte de tratar tales enfermedades será capaz de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A para el tratamiento o la prevención de la adicción o dependencia sin experimentación indebida y confiando en el conocimiento personal y la divulgación de esta solicitud. En general, a modo de ejemplo y sin limitación, el Compuesto A se puede administrar como composiciones farmacéuticas por una de las siguientes rutas: oral, sistémica (por ejemplo, transdérmica, intranasal o por supositorio) o parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa o subcutánea). Composiciones pueden, a modo de ejemplo y sin limitación, tomar la forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, elixires, aerosoles o cualquier otra composición apropiada y están compuestas de, en general, el compuesto A en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes aceptables son, a modo de ejemplo y sin limitación, no tóxico, ayudan a la administración y no afectan adversamente el beneficio terapéutico del compuesto. Tal excipiente puede ser, por ejemplo, cualquier sólido, líquido, semisólido o, en el caso de una composición en aerosol, un excipiente gaseoso que está generalmente disponible para un experto en la técnica.

25 **[0060]** Los excipientes farmacéuticos sólidos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, yeso, gel de sílice, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, y similares. Los excipientes líquidos y semisólidos pueden seleccionarse de, por ejemplo y sin limitación agua, etanol, glicerol, propilenglicol y varios aceites, incluyendo los de petróleo, animal, vegetal o de origen sintético (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc.). Vehículos líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables, incluyen a modo de ejemplo y sin limitación agua, solución salina, dextrosa acuosa y glicoles. Los gases comprimidos pueden utilizarse para dispersar el compuesto en forma de aerosol. Los gases inertes adecuados para este propósito son a modo de ejemplo y sin limitación de nitrógeno, dióxido de carbono, óxido nítrico, etc.

35 **[0061]** Las preparaciones farmacéuticas pueden a modo de ejemplo y sin limitación, además, contener conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, sales para variar la presión osmótica, tampones, agentes enmascarantes o antioxidantes. En ciertas realizaciones, que pueden contener todavía otras sustancias terapéuticamente valiosas. Otros vehículos farmacéuticos adecuados y sus formulaciones se describen en A.R. Alfonso Remington's Pharmaceutical Sciences de 1985, 17^a ed. Easton, Pa.: Mack Publishing Company.

40 **[0062]** La cantidad de Compuesto A en la composición puede variar ampliamente dependiendo, por ejemplo, del tipo de formulación, tamaño de una dosis unitaria, tipo de excipientes y otros factores conocidos por los expertos en la técnica de las ciencias farmacéuticas. En general, la composición final comprenderá de 10% w a 90% w del compuesto, preferiblemente 25% w a 75% w, siendo el resto el excipiente o excipientes. Preferiblemente, la composición farmacéutica se administra en una sola forma de dosificación unitaria para tratamiento continuo o en una forma de dosis de unidad única ad libitum cuando se requiere específicamente el alivio de los síntomas.

EJEMPLOS

Ejemplo de referencia 1

50 **[0063]** Después de la administración oral de [¹⁴C]-nepicastato, la mayoría de la radiactividad en plasma se asoció con el nepicastato, un glucurónido unido a N de nepicastato (metabolito 2, M2), y una fracción polar no identificada (MI). No hubo acumulación significativa de nepicastato con dosificación múltiple y T_{1/2} fue similar después de dosis únicas y múltiples. T_{1/2} fue de 10-14 horas. No hay diferencias significativas en la C_{max} o AUC para nepicastato se observaron entre los sujetos con el fenotipo acetilador rápido y aquellos con el fenotipo acetilador lento, aunque C_{max} y AUC para N-acetilo metabolito eran, como se esperaba, mucho menores en acetiladores lentos que en acetiladores rápidos. En un estudio comparativo de la farmacocinética de una tableta de 40 mg tomada durante el ayuno o después de una comida, no hubo diferencia significativa en las concentraciones en plasma. T_{ax} se incrementó a 3,5 horas después de una comida de 1,4 horas en el estado de ayuno.

60 **[0064]** La farmacocinética de nepicastato después de una sola dosis de 40 mg se comparó en hombres y mujeres. El AUC en las mujeres fue de aproximadamente 43% mayor que en los hombres y la C_{max} aproximadamente un 23% mayor en las mujeres que en los hombres. El T_{1/2} fue mayor en las mujeres que en los hombres. La comparación de la farmacocinética de nepicastato tras 10 días de la dosificación con una dosis de 40 mg, el AUC fue mayor en sujetos sanos que en pacientes con CHEF, sin diferencias en el T_{1/2}. No hubo acumulación significativa con dosis múltiples en cada población.

[0065] En los seres humanos, la radioactividad relacionada con el compuesto se elimina rápidamente. En promedio, 87,4% de radiolabel administrado se recuperó en las primeras 72 horas con 82,4% en la orina y 5,01% en las heces. Después de 10 días, la recuperación total media del radiomarcador fue del 93,8%. En el plasma, el Tax, para la radiactividad era 1-2 horas (similar a la de nepicastato). En ambos acetiladores rápidos y lentos, un glucurónido unido a N de nepicastato representó el mayor porcentaje de la radiactividad total en el plasma (26,8%) y la orina (57,9%) durante 0 a 48 horas. Se encontró que el terminal T1/2 para la radiactividad total en el plasma a ser muy larga (~ 100 horas), muy probablemente debido a una fracción polar presente en bajas concentraciones que se eliminó lentamente.

10 Ejemplo de Referencia 2

[0066] En un estudio diseñado para evaluar los efectos de nepicastato sobre la función cognitiva, los sujetos tratados con 5 o 40 mg de nepicastato demostraron deterioro significativo del estado de ánimo, el sueño, o la cognición. En los estudios de captación tiroidea de ¹²³I, dosis de 5, 40, y 100 mg de nepicastato demostraron diferencias de placebo. Reducción de la absorción después de una sola dosis de 200 mg de nepicastato fue significativamente mayor que el placebo, pero significativamente menor que después de una dosis de 10 mg de metimazol. En los estudios de fase I de dosis única, dosis de entre 5 a 800 mg (cálculo de la dosis basado en la sal de hidrocloreuro) de nepicastato fueron generalmente bien toleradas en hombres sanos.

20 Ejemplo de Referencia 3

[0067] En un estudio de dosis múltiples de fase I de nepicastato, las dosis de 5 y 40 mg fueron generalmente bien toleradas en hombres sanos.

[0068] Cinco de los 6 sujetos tratados durante 8 días o más con 200 mg desarrollaron un sarpullido que se resolvió espontáneamente.

[0069] Un sujeto desarrolló arritmias auriculares y bloqueo de rama derecha intermitente después de 6 días de dosificación con 200 mg de nepicastato.

30 Ejemplo 4

[0070] Dieciséis voluntarios dependientes de la cocaína que no buscaban tratamiento son estudiados como pacientes hospitalizados utilizando un estudio doble ciego, controlado con placebo de diseño dentro de los sujetos. Después de dar su consentimiento informado, los voluntarios potenciales completos ambulatorios psiquiátricos y el examen médico. Los voluntarios elegibles son admitidos y un examen físico, electrocardiograma, pruebas de embarazo y pruebas psiquiátricas se han completado. El estudio utiliza un diseño de escalada de dosis en el que los participantes (n = 12) reciben dosis ascendentes de cocaína (0 mg, 10 mg, 20 mg, y 40 mg) durante el tratamiento diario con dosis ascendentes de nepicastato (0 mg, 80 mg, 160 mg). Un grupo paralelo de participantes (n = 4) sólo recibe tratamiento diario con placebo para la duración del estudio con el fin de mantener el ciego. El tratamiento en cada nivel de dosis es diario durante 4 días, o bien más de 4 vidas medias de nepicastato, que es de 10 a 14 horas. En el 4º día de tratamiento en cada nivel de dosis, los participantes reciben cocaína 0 mg, 10 mg, 20 mg, y 40 mg en ese orden. La cocaína se administra a intervalos de una hora, proporcionando tiempo suficiente para que tanto los efectos cardiovasculares como subjetivos vuelvan a la línea de base. Índices cardiovasculares son cuidadosamente controlados usando EKG continuo y la presión arterial frecuente durante todos los procedimientos que implican la administración de cocaína, y detención de parámetros están en su lugar de modo que la cocaína no se puede administrar si índices cardiovasculares exceden de los límites preestablecidos. Estudios anteriores han demostrado que 6 dosis de 32 mg de cocaína administradas a intervalos de 14 minutos es seguro, y la extensión del intervalo de dosis hasta 1 hora puede mejorar la seguridad adicional. Las muestras de sangre se recogen para análisis de la farmacocinética de 10 mg de cocaína administrada en el 3º día de tratamiento con 0 mg de nepicastato y otra vez en el 3º día de tratamiento con 80 mg y 160 mg de nepicastato. Se estudian los efectos de nepicastato sobre la farmacocinética de la cocaína. Sobre la base de la información existente, no se espera ninguna interacción.

[0071] Se requieren aproximadamente 12 días por cada participante para completar el estudio. Los 16 participantes pueden completar el estudio dentro de un año.

[0072] Con el fin de participar en el estudio, los participantes deben:

1. Ser voluntarios de habla inglesa que no buscan tratamiento en el momento del estudio;
2. Tener entre 18-55 años de edad;
3. Reunir los criterios de DSM-IV TR para la dependencia de cocaína;
4. Tener un historial de auto-reporte de la utilización de cocaína por vía IV y proporcionar al menos una orina positiva para cocaína antes de la admisión;

5. Tener signos vitales del siguiente modo: pulso en reposo entre 50 y 95 lpm, la presión arterial entre 85-150 mm Hg sistólica y 45-96 mm Hg diastólica; este criterio se debe cumplir dentro del plazo de 2 días de admisión;

5 6. Tener pruebas de laboratorio de hematología y química que están dentro de los límites (+/- 10%) normales con las siguientes excepciones: a) las pruebas de función hepática (bilirrubina total, ALT, AST, y fosfatasa alcalina) δ 3 veces el límite superior de normal, y b) pruebas de función renal (creatinina y BUN) δ 2 x el límite superior de normal;

10 7. Tener una línea de base EKG que demuestra ritmo sinusal clínicamente normal, la conducción clínicamente normal, y ninguna arritmia clínicamente significativa;

15 8. Tener un historial médico y un examen físico breve que no demuestra contraindicaciones clínicamente significativas para la participación en el estudio, en el juicio del médico de admisión y del investigador principal.

[0073] Los participantes potenciales están excluidos de la participación en el estudio en cualquiera de los siguientes casos:

20 1. Tiene un historial o evidencia sugestiva de trastorno convulsivo o una lesión cerebral;

2. Tener cualquier reacción adversa médicamente anterior a la cocaína, incluyendo la pérdida de conciencia, dolor de pecho, o ataque epiléptico;

25 3. Tener trastornos neurológicos o psiquiátricos, tales como:

• psicosis, enfermedad bipolar o depresión mayor según lo evaluado por SCID;

• enfermedad cerebral orgánica o demencia evaluada por entrevista clínica;

30 • historia de cualquier trastorno psiquiátrico que requeriría un tratamiento continuo que haría difícil el cumplimiento del estudio;

• historia de intentos de suicidio en los últimos tres meses evaluados por SCID y/o ideación/plan corriente suicida según la evaluación de SCID;

35 4. tener evidencia de la enfermedad cardíaca clínicamente significativa o hipertensión, como se determina por el PI, aunque los participantes pueden estar tomando medicación antihipertensiva;

40 5. Tener un historial familiar en parientes de primer grado de morbilidad cardiovascular precoz o la mortalidad, según lo determinado por la PI;

6. Tener evidencia de enfermedad médica no tratada o inestable incluyendo: neuroendocrino, autoinmune, renal, hepática, o enfermedad infecciosa activa;

45 7. Tener VIH y actualmente estar sintomáticos, tener un diagnóstico de SIDA, o estar recibiendo la medicación antirretroviral;

50 8. Estar embarazada o en lactancia. Otras mujeres deben o bien no poder concebir (es decir, quirúrgicamente esterilizadas, estériles, o postmenopáusicas) o estar usando un método anticonceptivo confiable (por ejemplo, abstinencia, píldoras anticonceptivas, dispositivo intrauterino, condones o espermicida). Todas las mujeres deben proporcionar pruebas de embarazo en orina negativas antes de ingresar al estudio, a su ingreso hospitalario, y al final de la participación en el estudio;

55 9. Tener asma o actualmente utilizar agonistas alfa o beta, teofilina, u otros simpaticomiméticos;

10. Tener cualquier otra enfermedad, condición, o el uso de medicamentos psicotrópicos, que en opinión de la PI y/o del médico de admisión impediría la realización segura y/o éxito del estudio.

60 Criterios de suspensión después de la iniciación

[0074]

65 11. Detección de drogas de orina positiva o prueba de aliento que indica el uso ilícito de la cocaína, la cocaína, alcohol, opiáceos, u otras drogas de abuso no entregadas como parte de este protocolo;

12. Incapacidad para cumplir con los procedimientos del estudio;

13. Reunir criterios de interrupción debido a la respuesta exagerada a la cocaína, descrita a continuación.

5 Criterios de parada

[0075] Los participantes deben continuar cumpliendo con los criterios de inclusión con el fin de permanecer en el protocolo. La administración de cocaína no se inicia si hay arritmias significativas clínicamente o si los signos vitales están fuera de los rangos aceptables: pulso en reposo <130 bpm y la presión arterial por debajo de 165 mm Hg sistólica y 100 mm Hg diastólica. Estos valores son superiores a los criterios de inclusión/exclusión porque aumentos transitorios en los signos vitales pueden ocurrir en expectativa de recibir la cocaína. Además, las dosis repetidas de cocaína no se administran (y el médico del estudio detiene administración de cocaína continuada) si hay manifestaciones conductuales de toxicidad de la cocaína (agitación, psicosis, incapacidad para cooperar con procedimientos de estudio).

15 Criterios de parada para una mayor participación

[0076] Participación de los sujetos se termina si presenta cualquiera de los siguientes eventos:

- 20 1. PA sistólica > 180 mm Hg continuada durante 5 minutos o más;
2. PA diastólica > 120 mm Hg continuada durante 5 minutos o más;
- 25 3. Frecuencia cardiaca > (220 - edad x 0,85) bpm continuada durante 5 minutos o más.

Justificación de los criterios de selección de sujetos

[0077] Los participantes que han utilizado cocaína por la vía IV para evitar la exposición a los participantes a vías de administración que producen efectos interoceptivos más intensivos. Se seleccionaron los criterios de edad principalmente para evitar los participantes que se inscriben con enfermedad cardiovascular sin diagnosticar. Los participantes con enfermedad activa del VIH están excluidos para evitar la posible exacerbación de su enfermedad subyacente; participantes con VIH asintomática se incluyen porque este grupo está en alto riesgo de dependencia de la cocaína. Los participantes con asma (o que toman medicamentos para el asma) están excluidos debido a las interacciones adversas potenciales entre los medicamentos agonistas beta y la cocaína.

35 Medicamentos de estudio

[0078] La cocaína produce efectos estimulantes prototípicos mediante la inhibición de la captación de DA, NE, y la serotonina en gránulos de almacenamiento presinápticos. La cocaína tiene una vida media de eliminación corta, aproximadamente 90 min. Los principales efectos clínicos de la cocaína son de activación psicomotora y aumentos en el tono simpático, evidentes a medida que aumenta la frecuencia cardíaca y la presión arterial.

[0079] La cocaína se administra a un máximo de 40 mg en dosis únicas y hasta 200 mg en las sesiones de auto-administración que constan de 10 dosis de 20 mg administradas a intervalos de 13 min. Estas dosis son modestas en comparación con las cantidades que los participantes en estos estudios han informado que utilizan todos los días; patrones típicos de dosificación diaria son un promedio de 250 mg a 500 mg o más.

[0080] Las dosis muy superiores a las que aquí se propone se han asociado con convulsiones y con una toxicidad cardiovascular grave y la muerte. Estas toxicidades potenciales se mejoran mediante el uso de dosis relativamente bajas, cuidadosa selección de los voluntarios potenciales, por un control cuidadoso de los participantes después de la administración de la cocaína, y por la disponibilidad de la intervención médica en el caso de un evento adverso.

[0081] La cocaína se administra IV, por lo que la disponibilidad es completa. La cocaína se metaboliza principalmente a benzoilecgonina por esterasas plasmáticas que no se sabe que están afectadas por el nepicastato. Bencioleconine y otros metabolitos menores se excretan por vía renal.

[0082] La cocaína para su uso en seres humanos IV se obtiene a partir de un contratista NIDA y una carta de autorización para permitir que nos refiramos a IND del NIDA para que se obtenga la cocaína y se someta a la FDA.

[0083] Las dosis ascendentes de nepicastato (0 mg, 80 mg, y 160 mg) se administran a las 7 AM. El tratamiento en cada nivel de dosis se continúa durante 4 días.

[0084] Al iniciar a una dosis más baja y aumento de la dosis después de completar la primera serie de procedimientos de estudio, se pueden minimizar los riesgos de la combinación de nepicastato y la cocaína. Este enfoque también puede reducir el riesgo para la erupción, que se produjo en un 7% a 20% de los voluntarios hasta el momento. Incidencia de sarpullido se asoció con la duración del tratamiento de dosis. Las dosis por encima de

160 mg conferirían un mayor riesgo de erupción.

[0085] No se esperan interacciones farmacocinéticas porque nepicastato no es un inhibidor de la enzima, aunque la evaluación farmacocinética de la dosis de 10 mg de cocaína administrada en el tercer día de tratamiento en cada nivel de dosis de nepicastato puede confirmar esto. Debido a que nepicastato reduce la síntesis de NE, los efectos de recompensa de la cocaína pueden ser más bajos durante el tratamiento con el nepicastato. Ya que el nepicastato aumenta las concentraciones plasmáticas y el cerebro de DA, efectos secundarios mediados por DA como paranoia puede ocurrir. Estos síntomas no se observaron durante los ensayos para la CHF, pero estimulantes no se administraron en esos estudios.

[0086] Después del consentimiento, los participantes están obligados a presentar una muestra de orina de cocaína positiva para la documentación de uso continuo de drogas. También se pide a algunos participantes (limitado por el número de dispositivos disponibles) para usar un dispositivo de telemetría durante la investigación y durante todo el estudio que registra la frecuencia cardíaca y el movimiento. Los datos de este dispositivo pueden identificar episodios de consumo de drogas sobre la base de los cambios en estos parámetros.

[0087] Para el control de exposición a la nicotina, está prohibido fumar dentro de 2 horas de los procedimientos del estudio que implican la administración de cocaína o la exposición de referencia. Los participantes están obligados a abstenerse del uso de drogas ilícitas y la prescripción para la duración del estudio y esto se confirma con la orina todos los días y las pruebas de alcohol en el aliento.

[0088] Las sesiones experimentales se llevan a cabo aproximadamente a la misma hora del día para un participante dado. La cocaína se administra en una habitación experimental. La cocaína se administra utilizando una bomba de jeringa, que administra la dosis correcta de la cocaína o placebo de solución salina durante 2 minutos. Durante 1 hora después de sesiones de administración de drogas, se monitorean la frecuencia cardíaca y la presión arterial.

[0089] Los participantes se someten a una anamnesis y exploración física. La sangre se extrae para el examen de laboratorio estándar, incluyendo CBC, electrolitos, LFT y creatinina. La detección de VIH se realiza como un servicio a los participantes y personas que dan resultados positivos reciben asesoramiento y se refieren para el tratamiento.

[0090] El Actiheart MiniMitter se utiliza para medir la frecuencia cardíaca y el movimiento antes de la admisión en algunos voluntarios (el número está limitado por el número de dispositivos disponibles). El MiniMitter se adhiere a la piel de los participantes utilizando pasta y registros de ECG de forma no invasiva y el movimiento durante un máximo de dos semanas. Los datos pueden ser descargados a un PC para su posterior análisis.

[0091] Los participantes deben cumplir los criterios DSM-IV-TR para la cocaína y dependencia a la nicotina, determinados por el Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI) y definidos por los criterios de inclusión/exclusión. El MINI es una entrevista de diagnóstico corto estructurado desarrollado en 1990 por los psiquiatras y los médicos en los Estados Unidos y Europa para trastornos psiquiátricos de DSM-IV TR y la CIE-10. El MINI es la entrevista psiquiátrica estructurada de elección para la evaluación psiquiátrica y el resultado del seguimiento en los ensayos clínicos de psicofarmacología y estudios epidemiológicos, y es el instrumento de entrevista de diagnóstico psiquiátrico estructurado más utilizado en el mundo. Este instrumento puede utilizarse para determinar si el sujeto cumplió con los criterios DSM-IV TR para la dependencia de drogas y para descartar cualesquiera trastornos psiquiátricos mayores (por ejemplo, trastornos afectivos, esquizofrenia).

[0092] La versión (ASI-Lite CF) de factores clínicos índice-lite de gravedad de adicción se administra por un miembro del personal capacitado de investigación durante el cribado. La ASI-Lite es la estimación del entrevistador de la gravedad del estado del participante en siete áreas (médicas, de empleo, de consumo de drogas, de uso de alcohol, legales, familiares/sociales y psicológicas). La versión Lite es una versión más corta de la ASI que aún conserva todas las preguntas que se utilizan para calcular las puntuaciones compuestas de ASI. La sección de antecedentes familiares de la ASI, como la versión de ASI-Lite recoge la información mínima de antecedentes familiares, se retiene.

[0093] Hay un Inventario de Depresión de Beck de tercera generación (BDI), revisado en 1996. El instrumento conserva su formato de cuestionario de 21 ítems originales que requiere aproximadamente 10 minutos para compleción. El BDI-II ha sido validado en contra de la BDI-IA y continúa siendo un excelente índice de depresión/angustia. Este indicador se utiliza para supervisar los participantes que son clínicamente deprimidos durante el juicio, por lo que es también una medida para la seguridad de los participantes.

[0094] Los síntomas de trastorno de hiperactividad con déficit de atención actual (TDAH) se evalúan semanalmente, con la escala de calificación de TDAH-IV.

[0095] La escala de la apatía del inventario neuropsiquiátrico se recoge en la línea base.

[0096] ADN se recoge con hisopos bucales aplicados a tarjetas de Whatman FTA. Estas tarjetas permiten el almacenamiento seguro y estable de muestras biológicas para la extracción de ADN. El rendimiento previsto de ADN

genómico es de 50-100 mg, que es adecuado para más de 500 ensayos de genotipo utilizando métodos disponibles en la actualidad.

5 **[0097]** Los genotipos se determinaron usando ensayos de genotipificación basados en 5' exonucleasa (Taqman). Los ensayos se desarrollaron por Applied Biosystems (ABI; ensayos por diseño). La discriminación de alelos se realizó usando el cicladador PCR en tiempo real ABI 3730.

10 **[0098]** Se recogen muestras de sangre para análisis de la farmacocinética de la cocaína durante el tratamiento con 0 mg de nepicastato (día de estudio 1) y durante el tratamiento con 80 mg y 160 mg de nepicastato (día de estudio 4 y 8). Las muestras de sangre se recogen a -15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 minutos después de la dosificación de 10 mg de cocaína en el 3^{er} día de tratamiento con cada nivel de dosis de nepicastato. Tenga en cuenta que otras dosis de cocaína (0-40 mg) son administradas en el 4^o día de tratamiento con cada nivel de dosis de nepicastato, por lo que la evaluación farmacocinética no interfiere con las otras evaluaciones. La sangre se recoge y el plasma se separa y se congela a -70°C hasta su análisis. La cocaína y BE se analizan utilizando cromatografía líquida/espectrometría de masas tandem (LC/MS/MS). El laboratorio de referencia tiene un límite de cuantificación de 2,5 ng/ml para estos ensayos. El análisis farmacocinético aclara efectos de nepicastato en la farmacocinética de cocaína.

20 **[0099]** DBH se almacena en gránulos de almacenamiento NE y se libera junto con NE. Por lo tanto el plasma DAP da un buen índice de la actividad enzimática en el SNC. La sangre se muestreó diariamente a 10 AM (antes de la cocaína de dosificación/placebo) y se almacena para su posterior análisis. La actividad de DBH se mide utilizando el método de tiramina-octopamina usando un sistema cromatográfico-fluorométrico líquido de alto rendimiento, como se describió previamente. Esto permite el examen de los cambios en DBH a lo largo del tiempo, proporcionando una penetración en la farmacodinámica de la inhibición de nepicastato de DBH. El BDI se administra repetidamente a lo largo del protocolo para monitorear los cambios en el estado de ánimo.

30 **[0100]** Los efectos subjetivos se miden utilizando una escala visual analógica computarizada (VAS) que consiste en una línea de 10 cm continua digitalizada para fines de puntuación de 0 a 100. Los participantes son necesarios para mover el cursor sobre la mano izquierda extrema y en la línea de pulsar los botones izquierdo o derecho del ratón para los movimientos de izquierda y derecha en la línea. El VAS está diseñado para proporcionar calificaciones rápidamente adquiridas de euforia de cocaína, disforia y deseo. Estos incluyen las calificaciones de "cualquier efecto de droga", "alto", "buenos efectos", "estimulado", y "malos efectos", "sensación de paranoia", "sensación de sospecha" y "usaría cocaína si está disponible", "deseo de cocaína", "podía rechazar la cocaína ahora," y "deseo de cocaína." Medidas VAS se recogen antes de la administración de cocaína y a los 5, 10, 15, 20, 30, y 45 minutos después de la administración de drogas.

40 **[0101]** Quince minutos después de la administración de cocaína se pide a los participantes cuánto estarían dispuestos a pagar por esa dosis de drogas, en base a \$ 50/gm (costo actual si se compra de fuentes ilícitas). Se proporciona esta ancla para estandarizar las respuestas dado que el precio de la cocaína varía con el tiempo y el lugar.

45 **[0102]** En el Día 13, el último día de tratamiento con la medicación del estudio, todos los pacientes participan en "sesiones experimentales" donde los sujetos hacen una serie de opciones entre dinero y una infusión de placebo, doble ciego (solución salina) o 20 mg de cocaína. En una de las sesiones, sólo el placebo (solución salina) está disponible. En la otra sesión, sólo 20 mg de cocaína está disponible. Los participantes deciden auto-administrar el placebo o aceptar dinero y 20 mg de cocaína vs dinero. Esto ocurre por la mañana (am) y por la tarde (pm), con el orden aleatorio y contrapesado de modo que el placebo o nepicastato se administra primero en igual número de sujetos.

50 Sesión experimental (elección):

55 **[0103]** Durante cada sesión se les pide a los sujetos que hagan una serie de opciones entre una infusión correspondiente a un color ("azul" o "verde"), y dinero. El color corresponde a la dosis (cocaína 0 mg o 20 mg) administrada al sujeto durante la sesión de muestra. Para cada una de las 2 sesiones de elección, los participantes hacen 10 opciones para la infusión (0 mg de cocaína IV en una sola sesión y 20 mg de cocaína en la otra) o dinero. El participante realiza una serie de opciones entre las opciones de dinero de valor ascendente (\$ 0,05, \$ 0,05, \$ 0,05, \$ 0,05, \$ 1, \$ 4, \$ 7, \$ 10, \$ 13, y \$ 16) o cocaína (0 mg o 20 mg/IV/infusión) usando una analgesia controlada por paciente (PCA) de la bomba.

60 **[0104]** Opciones de infusión se llevan a cabo por parte del participante con el botón PCA, mientras que las opciones para el dinero se indican verbalmente al investigador. Infusiones tienen lugar durante 2 min seguido de un periodo de tiempo de espera de 3 min. Como tal, las selecciones se realizan a intervalos de 5 min.

65 **[0105]** Los participantes reciben dosis de cocaína inmediatamente después de indicar su elección, siempre que los signos vitales se mantienen dentro de límites preestablecidos hasta un máximo de 200 mg de cocaína (10 X 20 mg). Opciones de dinero se dan directamente al paciente inmediatamente después de la elección, pero este dinero debe

ser gastado antes de la descarga.

[0106] La tabla muestra las sesiones de elección experimentales con 16 participantes totales.

5

10

15

20

25

30

	Elecciones	8 participantes	8 participantes
am	Opción 1	0 mg cocaína IV o \$ 0,05	20 mg cocaína IV o \$ 0,05
am	Opción 2	0 mg cocaína IV o \$ 0,05	20 mg cocaína IV o \$ 0,05
am	Opción 3	0 mg cocaína IV o \$ 0,05	20 mg cocaína IV o \$ 0,05
am	Opción 4	0 mg cocaína IV o \$ 0,05	20 mg cocaína IV o \$ 0,05
am	Opción 5	0 mg cocaína IV o \$ 1,00	20 mg cocaína IV o \$ 1,00
am	Opción 6	0 mg cocaína IV o \$ 4,00	20 mg cocaína IV o \$ 4,00
am	Opción 7	0 mg cocaína IV o \$ 7,00	20 mg cocaína IV o \$ 7,00
am	Opción 8	0 mg cocaína IV o \$ 10,00	20 mg cocaína IV o \$ 10,00
am	Opción 9	0 mg cocaína IV o \$ 13,00	20 mg cocaína IV o \$ 13,00
am	Opción 10	0 mg cocaína IV o \$ 16,00	20 mg cocaína IV o \$ 16,00
pm	Opción 1	20 mg cocaína IV o \$ 0,05	0 mg cocaína IV o \$ 0,05
pm	Opción 2	20 mg cocaína IV o \$ 0,05	0 mg cocaína IV o \$ 0,05
pm	Opción 3	20 mg cocaína IV o \$ 0,05	0 mg cocaína IV o \$ 0,05
pm	Opción 4	20 mg cocaína IV o \$,05	0 mg cocaína IV o \$ 0,05
pm	Opción 5	20 mg cocaína IV o \$ 1,00	0 mg cocaína IV o \$ 1,00
pm	Opción 6	20 mg cocaína IV o \$ 4,00	0 mg cocaína IV o \$ 4,00
pm	Opción 7	20 mg cocaína IV o \$ 7,00	0 mg cocaína IV o \$ 7,00
pm	Opción 8	20 mg cocaína IV o \$ 10,00	0 mg cocaína IV o \$ 10,00
pm	Opción 9	20 mg cocaína IV o \$ 13,00	0 mg cocaína IV o \$ 13,00
pm	Opción 10	20 mg cocaína IV o \$ 16,00	0 mg cocaína IV o \$ 16,00

35

[0107] Un tamaño de muestra de 12 en el grupo tratado con el nepicastato permite la detección de medianas a grandes efectos, que es apropiado para una evaluación inicial. La trama (Figura 1) muestra el tamaño del efecto logrado con tamaños de muestra que van desde 5 a 15. El aumento del tamaño de la muestra por encima de 12 mejoraría poder analítico para detectar diferencias entre los tratamientos pero al coste creciente. El grupo tratado con placebo se incluye sólo para mantener los ciegos y no está destinado a servir como grupo de comparación.

40

[0108] El análisis se centra principalmente en los efectos de nepicastato en el grupo tratado por nepicastato. El grupo tratado con placebo se incluye principalmente para mantener los ciegos. Los efectos secundarios y los eventos adversos (AA) están tabulados y comparados a través de las condiciones de tratamiento mediante ANOVA o Chi-cuadrado. Los efectos subjetivos y cardiovasculares producidos por la cocaína IV y placebo durante el tratamiento con el nepicastato se comparan con los producidos durante el tratamiento con placebo usando análisis de medidas repetidas (siendo tiempo la medida repetida) de la varianza (ANOVA), efecto de pico de ANOVA de una vía, y si está indicado, área bajo la curva de ANOVA.

45

Ejemplo 5

50

[0109] Actividad de e^- -hidroxilasa de dopamina bovina y humana se ensayaron midiendo la conversión de tiramina a octopamina. e^- -hidroxilasa de dopamina bovina adrenal se obtuvo de Sigma Chemicals (St Louis, MO, EE.UU.), mientras que e^- -hidroxilasa de dopamina humana se purificó a partir del medio de cultivo de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH. El ensayo se realizó a pH 5,2 y 32°C en un medio que contiene 0,125 M NaAc, 10 mM de fumarato, 0,5 a 2 μM de CuSO_4 , 0,1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ catalasa, 0,1 mM de tiramina y ascorbato de 4 mM. En un ensayo típico, se añadieron 0,5 - 1 miliunidades de enzima a la mezcla de reacción y, posteriormente, se añadió una mezcla de sustrato que contiene la catalasa, la tiramina y ascorbato para iniciar la reacción (volumen final de 200 μl). Las muestras se incubaron con o sin la concentración apropiada de nepicastato o Compuesto B a 37°C durante 30 a 40 minutos. La reacción se inactivó mediante la disolución de parada que contenía 25 mM de EDTA y 240 μM 3-hidroxitiramina (patrón interno). Las muestras se analizaron para octopamina por cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (HPLC) utilizando detección ultravioleta a 280 nM. La cromatografía HPLC se llevó a cabo a la velocidad de flujo de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ utilizando una columna LiChroCART 125-4 RP-18 y elución isocrática con 10 mM de ácido ácida, 10 mM de ácido sulfónico 1-heptano, tetrabutilo 12 mM fosfato de amonio y 10% de metanol. La actividad porcentual restante se calculó basándose en los controles, corregida utilizando estándares internos y se ajustaron a una curva de concentración-respuesta no lineal de cuatro parámetros.

60

65

[0110] Nepicastato (S-enantiómero) y el Compuesto B (R-enantiómero) produjo una inhibición dependiente de concentración de actividad e^- -hidroxilasa de dopamina bovina y humana. Los CI_{50} calculados para nepicastato eran $8,5 \pm 0,8$ nM y $9,0 \pm 0,8$ nM para la enzima bovina y humana, respectivamente. Compuesto B fue ligeramente menos

potente (CI_{50} de $25,1 \pm 0,6$ nM y $18,3 \pm 0,6$ nM para el humana bovina y enzima, respectivamente) que nepicastato. Nepicastato ha demostrado ser un potente inhibidor de la dopamina humana y bovina α -hidroxilasa *in vitro*. Los efectos inhibidores del compuesto eran estereoespecíficos ya que el S-enantiómero (nepicastato) fue marginalmente, pero significativamente, más potentes que el enantiómero R (Compuesto B).

[0111] La actividad de nepicastato en doce enzimas y receptores seleccionados se determinó usando ensayos establecidos. Una breve del principio subyacente a cada uno de los ensayos enzimáticos se da en la Figura 2. Los datos de unión se analizaron por ajuste de curvas a una ecuación logística de cuatro parámetros iterativos. Los valores de K_i se calcularon a partir de valores CI_{50} utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff. La actividad inhibidora de la enzima se expresó como CI_{50} (concentración requerida para producir 50% de inhibición de la actividad enzimática).

[0112] Nepicastato tenía afinidad insignificante (CI_{50} o $K_{is} > 10 \mu M$) para una serie de otras enzimas (hidroxilasa de tirosina, acetilo CoA sintetasa, acilo CoA-colesterol acilo transferasa, Ca^{2+} /calmodulina proteína quinasa II, ciclooxigenasa I, inhibidores de la reductasa HMG-CoA, la endopeptidasa neutra, la sintasa de óxido nítrico, la fosfodiesterasa III, fosfolipasa A_2 , y quinasa de proteínas C) y receptores de neurotransmisores (α_{1A} , α_{1B} , α_{2A} , α_{2B} , β_1 y β_2 adrenoceptores, receptores muscarínicos M_1 , receptores de dopamina D_1 y D_2 , receptores opioides μ , receptores de serotonina 5-HT $_{1A}$, 5-HT $_{2A}$ y 5-HT $_{2C}$). Nepicastato mostró un alto grado de selectividad para α -hidroxilasa de dopamina ya que el compuesto poseía afinidad insignificante para otras doce enzimas y trece receptores de neurotransmisores.

[0113] En estudios con SHR, los fármacos, el nepicastato ((S)-5-aminometilo-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-1,3-dihidroimidazol-2-clorhidrato de tiona) y el correspondiente enantiómero R (Compuesto B), se disolvieron en agua destilada y se dosificaron por vía oral con una aguja de sonda. En los estudios en perros, los fármacos se llenaron en cápsulas y se dosificaron por vía oral. Todas las dosis se expresan como equivalentes de base libre.

[0114] SHR macho (15-16 semanas de edad, Charles River, Wilmington, MA, EE.UU.) se utilizaron en estudios *in vivo*. En el día del estudio, los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente a dosificar con vehículo (control) o la dosis apropiada de nepicastato (3, 10, 30 o 100 mg.kg $^{-1}$, po) o el Compuesto B (30 mg.kg $^{-1}$, po) tres veces consecutivas, doce horas de diferencia. A las seis horas después de la tercera dosis, las ratas se anestesiaron con halotano, se decapitaron y los tejidos (corteza cerebral, arteria mesentérica y el ventrículo izquierdo) se recogieron rápidamente, se pesaron, se colocaron en ácido perclórico helado (0,4 M), se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su análisis posterior. Para cuantificar las concentraciones de noradrenalina y dopamina, los tejidos se homogeneizaron por sonicación breve y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante, claveteado con 3, 4-dihidroxibencilamina (patrón interno), se ensayó para determinar la noradrenalina y la dopamina por HPLC usando detección electroquímica.

[0115] Contenido de catecolaminas de tejido basal ($\mu g \cdot g^{-1}$ peso húmedo) en los animales de control fueron los siguientes: arteria mesentérica (noradrenalina, $10,40 \pm 1,03$; dopamina, $0,25 \pm 0,02$), ventrículo izquierdo (noradrenalina, $1,30 \pm 0,06$; dopamina, $0,02 \pm 0,00$) y la corteza cerebral (noradrenalina, $0,76 \pm 0,03$; dopamina, $0,14 \pm 0,01$). Reducción dependiente de la dosis producida por nepicastato en el contenido de la noradrenalina y la mejora del contenido de dopamina y la relación dopamina/noradrenalina en los tres tejidos que fueron estudiados.

[0116] Estos cambios alcanzaron significación estadística ($p < 0,05$) a dosis de $\epsilon 3$ mg.kg $^{-1}$ en la arteria mesentérica y el ventrículo izquierdo, pero sólo a dosis de 30 y 100 mg.kg $^{-1}$ en la corteza cerebral. A la dosis más alta estudiada (100 mg.kg $^{-1}$, po), las disminuciones en la noradrenalina fueron 47%, 35%, 42% y el aumento de dopamina eran 820%, 800% y 86% en la arteria mesentérica, ventrículo izquierdo y en la corteza cerebral, respectivamente. Cuando se ensayaron a 30 mg.kg $^{-1}$, po, nepicastato produce significativamente mayores cambios en el contenido de catecolaminas, en comparación con el enantiómero R (Compuesto B), en la arteria mesentérica y el ventrículo izquierdo.

[0117] Perros beagle macho (10-16 kg, Marshall Farms USA Inc, North Rose, NY, EE.UU.) también se utilizaron en estudios *in vivo*. En el día del estudio, los perros fueron pesados y asignados aleatoriamente a dosificarse por vía oral, ya sea con cápsulas vacías (control) o la dosis apropiada de nepicastato (0,05, 0,5, 1,5 o 5 mg.kg $^{-1}$; po, b.i.d.) durante 5 días. A las seis horas siguientes a la primera dosis del día-5, los perros fueron sacrificados con pentobarbital y los tejidos (corteza cerebral, arteria renal, ventrículo izquierdo) se recogieron rápidamente. Los tejidos se procesaron posteriormente y se analizaron para la noradrenalina y la dopamina.

[0118] Los datos se expresan como error estándar de media \pm de la media (SEM). Datos de catecolaminas de tejidos y de plasma se analizaron mediante un análisis de una vía no paramétrica de la varianza (ANOVA) o ANOVA de dos vías, respectivamente, seguidos por comparación por pares usando la prueba de Fisher LSD. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

[0119] Contenido de catecolaminas de tejido basal ($\mu g \cdot g^{-1}$ peso húmedo) en los animales de control fueron los siguientes: arteria renal (noradrenalina, $10,7 \pm 1,05$; dopamina, $0,22 \pm 0,01$), ventrículo izquierdo (noradrenalina,

2,11 ± 0,18; dopamina, 0,07 ± 0,03) y la corteza cerebral (noradrenalina, 0,26 ± 0,02; dopamina, 0,03 ± 0,00). Cuando se compara con los animales de control, nepicastato produjo una reducción dependiente de la dosis en el contenido de la noradrenalina y la mejora del contenido de dopamina y la relación dopamina/noradrenalina en los tres tejidos que fueron estudiados.

[0120] Estos cambios alcanzaron significación estadística ($p < 0,05$) a dosis de $\varepsilon 0,1 \text{ mg.kg}^{-1} \cdot \text{día}^{-1}$ en los tres tejidos. A la dosis más alta estudiada (5 mg.kg^{-1} , bid, po), las disminuciones en la noradrenalina fueron 88%, 91% y 96% y el aumento de la dopamina eran 627%, 700% y 166% en la arteria renal, ventrículo izquierdo y la corteza cerebral, respectivamente.

[0121] Perros beagle macho se asignaron al azar a dosificarse por vía oral, ya sea con cápsulas vacías (control) o nepicastato (2 mg.kg^{-1} , po, b.i.d.) durante 15 días. Muestras diarias de sangre venosa se elaboraron, seis horas después de la primera dosis, para la medición de las concentraciones plasmáticas de la dopamina y la noradrenalina. Las muestras se recogieron en tubos que contienen heparina y el glutatión, se centrifugaron a -4°C y el plasma separado se almacenó a -70°C hasta su análisis. Las concentraciones basales de catecolaminas en dos grupos de animales no fueron significativamente diferentes entre sí: las concentraciones de noradrenalina en plasma y de dopamina eran $460,3 \pm 59,6$ y $34,4 \pm 11,9 \text{ pg.ml}^{-1}$, respectivamente, en el grupo de control y $401,9 \pm 25,5$ y $41,1 \pm 8,8 \text{ pg.ml}^{-1}$, respectivamente, en el grupo tratado por nepicastato. Cuando se compara con el grupo de control, el nepicastato (2 mg.kg^{-1} , bid, po) produjo una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas de noradrenalina y los aumentos en las concentraciones plasmáticas de la dopamina y la relación de dopamina/noradrenalina.

[0122] La modulación inhibitoria de la función del nervio simpático, a través de medios farmacológicos, es una estrategia terapéutica atractiva para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, en la medida en actividad como elevada de este sistema ha sido implicada en el empeoramiento progresivo de la enfermedad. El objetivo de este estudio consistió en caracterizar farmacológicamente los efectos del nepicastato, un compuesto que modula la síntesis de noradrenalina en los nervios simpáticos mediante la inhibición de la enzima α -hidroxilasa de dopamina.

[0123] Se espera que la inhibición de la α -hidroxilasa de dopamina *in vivo* resulta en niveles elevados de sustrato (dopamina) y niveles disminuidos de producto (noradrenalina) en los tejidos que reciben inervación noradrenérgica. Esta expectativa se confirma en experimentos que investigaron los efectos de nepicastato en los niveles de catecolaminas en los tejidos centrales y periféricos *in vivo*. En perros SHR y beagle, nepicastato produjo reducciones dependientes de la dosis en el contenido y los aumentos de noradrenalina en el contenido de dopamina en los tejidos centrales (corteza cerebral) periféricos (mesentéricos o arteria renal, ventrículo izquierdo). A este respecto, el Compuesto B fue menos potente que el nepicastato que es consistente con CI_{50} inferior del enantiómero anterior para la enzima. Aunque la relación de dopamina/noradrenalina también fue elevada, no parecía ser la sustitución estequiométrica de noradrenalina con la dopamina. La explicación más probable de este hallazgo es que los niveles tisulares de dopamina pueden haberse subestimado debido al metabolismo de dopamina intraneuronal.

[0124] La capacidad de nepicastato para alterar los niveles de catecolaminas en la corteza cerebral sugiere que el fármaco hace penetrar en la barrera hematoencefálica. En los perros, la magnitud de los cambios en las catecolaminas en la corteza cerebral parecieron comparables a las de los tejidos periféricos. En SHRs, sin embargo, el nepicastato, a dosis bajas ($\delta 10 \text{ mg.kg}^{-1}$), produjo cambios significativos en el contenido de noradrenalina y dopamina en los tejidos periféricos sin que afecte a las catecolaminas en la corteza cerebral. Esto sugiere que, al menos en SHR, el fármaco no posee selectividad periférica modesta.

[0125] Las concentraciones plasmáticas de noradrenalina proporcionan una medida útil de la actividad global del nervio simpático aunque este parámetro puede estar influenciado por las alteraciones en la absorción neuronal y el aclaramiento metabólico de la catecolamina. Las concentraciones basales de noradrenalina en el plasma fueron sorprendentemente elevadas en los perros y es, quizás, un reflejo de la tensión inicial inducida por el procedimiento de flebotomía sangre-muestreo. Sin embargo, en comparación con el grupo control, el nepicastato produjo disminuciones significativas en las concentraciones de noradrenalina en plasma consistentes con la síntesis de transmisor reducida y liberación aunque un efecto indirecto, secundario a la facilitación de la absorción neuronal o aclaramiento metabólico, no se puede descartar. Ya que la noradrenalina liberada representa una pequeña fracción del total de depósitos neuronales de noradrenalina, un inhibidor de la biosíntesis de noradrenalina afectaría a la liberación de noradrenalina sólo después de depósitos existentes de la catecolamina han sido suficientemente agotados. En consecuencia, las disminuciones en las concentraciones de noradrenalina en plasma no alcanzaron significación estadística hasta 4 días de la dosificación con el nepicastato sugiriendo modulación gradual del sistema nervioso simpático.

[0126] Un cuerpo creciente de evidencia sugiere que la activación crónica del sistema nervioso simpático en la insuficiencia cardíaca congestiva es una respuesta mal adaptada. Esta afirmación se apoya en los ensayos clínicos que han demostrado un efecto beneficioso de carvedilol en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva con respecto a la morbilidad y mortalidad a largo plazo. Sin embargo, cabe señalar que la mayoría de los pacientes requieren un cierto nivel de impulso simpático para apoyar la homeostasis cardiovascular. De hecho, el valor

terapéutico de β -bloqueantes, incluyendo carvedilol, puede estar limitado por su propensión a causar deterioro hemodinámico especialmente durante la iniciación de la terapia. Este efecto no deseado, que resulta de la retirada brusca de apoyo simpático, requiere una titulación cuidadosa de la dosis. Los inhibidores de la dopamina α -hidroxilasa, tales como el nepicastato, pueden estar desprovistos de este efecto indeseable por las razones siguientes. En primer lugar, esta clase de fármacos atenuaría, pero no aboliría, la liberación de noradrenalina y, en segundo lugar, producen modulación gradual del sistema obviando así la necesidad de titulación de la dosis. Otra ventaja de nepicastato sobre β -bloqueantes es que mejora los niveles de dopamina que, a través de agonismo de los receptores de dopamina, pueden tener efectos saludables sobre la función renal tales como la vasodilación renal, diuresis y natriuresis.

[0127] Nepicastato es un inhibidor potente, selectivo y activo por vía oral de la dopamina α -hidroxilasa que puede ser de valor en el tratamiento de los trastornos cardiovasculares asociados con la activación excesiva del sistema nervioso simpático.

Ejemplo 6

[0128] La preparación de nepicastato se basó en la reducción quiral de tetralona 3 (disponible de la reacción de Friedel-Crafts AlCl_3 -catalizada de cloruro de 3,5-difluorofenilacetilo con etileno en CH_2Cl_2 a -65°C) en las condiciones descritas por Terashima (LAH, (-)-1*R*, 2*S*-*N*-metilefedrina, 2-etilaminopiridina) para dar *R*-(+)-tetralol 4a (92-95% ee), que se convirtió en el *R*-(+)-mesilato, seguido de la reacción con azida de sodio proporcionó una mezcla (9: 1) de azida y dihidronaftaleno 7. La azida se hidrogenó y el producto se trató con HCl anhidro para dar *S*-(-)-amina, convertida por una reacción de Strecker (complejo de bisulfito de formaldehído y KCN) de *S*-(-)-aminonitrilo. Formación del heterociclo se logró mediante la diformilación secuencial de aminonitrilo seguido por tratamiento posterior con ácido tiocianico. El conflicto de hidrólisis del nitrilo proporcionó cantidades comparables de amida primaria. La reducción del nitrilo a amina (93-96% ee) se realizó usando LAH en THF. El enantiómero (91,6% ee) estaba disponible por la misma ruta descrita anteriormente usando (+)-1*S*, 2*R*-*N*-metilefedrina como un auxiliar quiral en la reducción Terashima de cetona. La configuración absoluta del centro quiral se basó en la precedencia de literatura del *S*-(-)-2-tetralol anteriormente descrito.

[0129] Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de punto de fusión Uni-Melt Thomas Hoover capilar o una célula 81HT Mettler FB con un procesador de Mettler FP90 y están sin corregir. Los espectros de masas se obtuvieron ya sea con Finnigan MAT 8230 (por impacto electrónico o ionización química) o espectrómetro Finnigan MAT TSQ70 (por LSIMS). Espectros de ^1H RMN se registraron en un espectrómetro Bruker ACF300, AM300, AMX300 o espectrómetro de EM390 y cambios químicos se dan en ppm ($^{\text{TM}}$) de tetrametilsilano como patrón interno. Los espectros IR se registraron en un espectrómetro Nicolet SPC FT-IR. Los espectros de UV se registraron en un espectrómetro de Varian Cary 3 UV-Visible, Leeman Labs Inc. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer Modelo 141. Mediciones de HPLC quiral se realizaron en una columna Regis Chiral AGP (4,6 x 100 mm) eluyendo con 2% de acetonitrilo-98% 20 mM KH_2PO_4 (pH 4,7) a 1 ml/min a 20°C .

[0130] 5,7-difluoro-2-tetralona. SOCl_2 (100 ml) se añadió en una porción a ácido 3,5-difluorofenilacético (100 g, 0,58 mol) y después de agitarse durante 15 h, los volátiles se evaporaron bajo presión reducida. El cloruro de ácido oleoso resultante se disolvió en CH_2Cl_2 (200 ml) y se añadió gota a gota a una suspensión agitada mecánicamente de AlCl_3 (154 g, 1,16 mol) en CH_2Cl_2 (1,0 L). La suspensión agitada se enfrió a una temperatura interna de -65°C en un baño de hielo seco/acetona, y se añadió la solución de cloruro de ácido a una velocidad tal para mantener una temperatura interna $<-60^\circ\text{C}$. Después de completar la adición, se burbujeó gas etileno a través de la mezcla de reacción a una velocidad rápida durante 10 min a -65°C . Se dejó que la mezcla de reacción se calentara a 0°C durante 2 h con agitación, y luego se enfrió a -10°C y se trató con H_2O (500 ml) inicialmente gota a gota, seguido de la adición rápida. La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (100 ml) y se secó sobre MgSO_4 . La evaporación bajo presión reducida dio un residuo oleoso oscuro que se destiló a vacío sobre un material de recogida de Kugelrohr punto de ebullición entre $90-110^\circ\text{C}$ (1,0 a 0,7 mm de Hg). El destilado se redestiló a $100-105^\circ\text{C}$ (0,3 mm Hg) para dar el producto como un sólido blanco, (73,6 g, 0,40 mol; 70%): mp 46°C ; IR (KBr) 1705 cm^{-1} ; ^1H RMN (CDCl_3) δ 2,55 (t, $J = 7,5\text{ Hz}$, 2H), 3,10 (t, $J = 7,5\text{ Hz}$, 2H), 3,58 (s, 2H), 6,70 (m, 2H); MS m/z 182 (M^+). Anal. Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{F}_2\text{O}$: C, 65,93; H, 4,42. Encontrado: C, 65,54; H, 4,42.

[0131] (*R*)-(+)-2-hidroxi-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno. Una solución de (-)-1*R*, 2*S*-*N*-metilefedrina (81,3 g, 0,454 mol) en anhidro Et_2O (1,1 L) se añadió gota a gota (45 min) a 1,0 M de hidruro de litio y aluminio (416 ml, 0,416 mol) en Et_2O a una velocidad suficiente para mantener un reflujo suave. Después de completarse la adición, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h, después se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. Una solución de 2-etilaminopiridina (111 g, 0,98 moles) en Et_2O anhidro (100 ml) se añadió (45 min) a una velocidad tal como para mantener un reflujo suave. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h, tiempo durante el cual apareció una suspensión de color amarillo-verde claro. La mezcla se enfrió a una temperatura interna de -65°C usando un baño de hielo seco/acetona y una solución de 5,7-difluoro-2-tetralona (23,0 g, 126 mmol) en Et_2O (125 ml) se añadió gota a gota a una velocidad manteniendo la temperatura interna por debajo de -60°C . Después de completarse la adición, la mezcla se agitó a -65°C a -68°C durante 3 h y se inactivó mediante la adición de MeOH (100 ml) manteniendo la temperatura interna por debajo de -60°C . La reacción se agitó durante otros 10 min a -65°C

y se dejó calentar a aproximadamente -20°C . A continuación, se añadió una solución de HCl_3N (2 L) a una velocidad para limitar la temperatura a $<35^{\circ}\text{C}$. Después de agitarse a una tasa mayor para lograr la disolución total, se separaron las capas y la capa etérea se lavó con salmuera (200 ml) y se secaron (MgSO_4). La solución etérea se evaporó a presión reducida y el residuo se disolvió en caliente Et_2O (20 ml) seguido de la adición de hexano (200 ml). La solución sembrada se enfrió en un baño de hielo y se mantuvo a 0°C durante 1 h, después de lo cual los cristales depositados resultantes se recogieron y se secaron a vacío para dar el alcohol (10,9 g, 47%): $\text{pf } 85^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 38,1^{\circ}$ ($c = 1,83, \text{CHCl}_3$); 93,4% ee por HPLC quiral: $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ 1,70 (br s, 1H), 1,76-1,88 (m, 2H), 1,99-2,06 (m, 2H), 2,63-3,08 (m, 3H), 4,15 (m, 1H), 6,60 (m, 2H). Anal. Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}$: C, 65,21; H, 5,47. Encontrado: C, 65,38; H, 5,42. Los espectros para el (S)-enantiómero 4b son idénticos: $\text{mp } 84\text{-}85^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -37,8^{\circ}$ ($c = 1,24, \text{CHCl}_3$); 92,4% ee por HPLC quiral. Anal. Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}$: C, 65,21; H, 5,47. Encontrado: C, 65,47; H, 5,39.

[0132] (R)-(+)-2-metanosulfonilo-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno. Una solución de R-(+)-5,7-difluoro-2-tetralol (59,0 g, 320 mmol) y Et_3N (74,2 ml, 53,9 g, 530 mmol) en Et_2O anhidro (1,78 L) se enfrió (-15°C) utilizando un baño de hielo-MeOH y se trató en atmósfera de argón con agitación con MsCl (37,2 ml, 55,3 g, 480 mmol) durante 5-10 min. Después de 5 h la reacción era completa (según lo determinado por TLC) y se añadió agua para disolver los sólidos. Se añadió una pequeña cantidad de EtOAc para ayudar a la disolución completa de los sólidos. La fase orgánica se separó y se lavó secuencialmente con 1 N HCl , ac. NaHCO_3 , salmuera y se secó sobre MgSO_4 . La evaporación del disolvente dio un sólido blanquecino (87,1 g, 332 mmol) de color blanquecino, que se utiliza directamente en la siguiente etapa. La trituración de una pequeña muestra con $i\text{-Pr}_2\text{O}$ dio una muestra analítica: $\text{pf } 78,8\text{-}80,5^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 16,8^{\circ}$ ($c = 1,86, \text{CHCl}_3$); $^1\text{H RMN}$ δ 2,13 a 2,28 (m, 2H), 2,78- 2,96 (m, 2H), 3,07 (s, 3H), 3,09 (dd, $J = 17,1$ Hz, 4,7, 1H), 3,20 (dd, $J = 17,2$, 4,7 Hz, 1H), 5,20 (m, 1H), 6,67 (m, 2H). Anal. Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 50,37; H, 4,61. Encontrado: C, 50,41; H, 4,64. Los espectros para el enantiómero (S)-5b son idénticos: $\text{mp } 79,9\text{-}80,9^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -16,6^{\circ}$ ($c = 2,23, \text{CHCl}_3$). Anal. Calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 50,37; H, 4,61. Encontrado: C, 50,41; H, 4,65.

[0133] (S)-(-)-2-Amino-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno clorhidrato. Se añadió azida de sodio (40,0 g, 0,62 mol) a DMSO (1 L) con agitación hasta que se obtuvo una solución clara. Se añadió el mesilato (138 g, 0,53 mol) en una porción y la mezcla se calentó a 50°C durante 16 h bajo una atmósfera N_2 . La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (1,8 L) y se extrajo con pentano (4 x 250 ml) seguido de lavado secuencialmente de los extractos de pentano combinados con H_2O (2 x 100 ml), salmuera (100 ml) y secado sobre MgSO_4 . La evaporación del disolvente a presión reducida dio un aceite volátil que se cromatógrafió rápidamente sobre sílice usando pentano como eluyente para dar dihidronaftaleno (8,50 g, 51,2 mmol) como un aceite volátil. La elución adicional con pentano/ CH_2Cl_2 (9: 1) proporcionó la azida (101 g, 483 mmol) como un aceite incoloro: IR (CHCl_3) 2103 cm^{-1} ; m/z 171 (M^+). La azida 6a se disolvió en EtOAc (1200 ml) y se hidrogenó sobre al 10% Pd/C (6 g) en una botella Parr de 2,5 L (60 psi) durante 6 h. Después de cada hora, la botella se evacuó y se recargó con hidrógeno para eliminar N_2 evolucionado. La mezcla resultante se filtró a través de Celite, se agitó con HCl etéreo (1 N, 500 ml), y el precipitado fino se separó por filtración y se lavó con EtOAc , y después con éter anhidro. (La filtración tardó aproximadamente 4 h). El sólido húmedo se transfirió a un matraz de fondo redondo, y el restante disolvente se eliminó a vacío para dar un sólido blanco (90,4 g, 412 mmol; 77,9%): $\text{pf} > 280^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -60,2^{\circ}$ ($c = 2,68, \text{MeOH}$); $^1\text{H RMN}$ ($d_6\text{-DMSO}$) δ 1,79 (m, 1H), 2,33 (m, 1H), 2,63 (m, 1H), 2,83-2,92 (m, 2H), 3,14 (dd, $J = 16,7, 5,0$ Hz, 1H), 3,46 (m, 1H), 6,93 (d, $J = 9,4$ Hz, 1H), 7,00 (dt, $J = 9,4, 2,5$ Hz, 1H). Anal. Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{ClF}_2\text{N}$: C, 54,68; H, 5,05; N, 6,37. Encontrado: C, 54,31; H, 5,52; N, 6,44. Los espectros para el (R)-enantiómero 8b son idénticos: $\text{mp} > 280^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 58,5^{\circ}$ ($c = 1,63, \text{MeOH}$). Anal. Calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{ClF}_2\text{N}$: C, 54,68; H, 5,51; N, 6,37. Encontrado: C, 54,64; H, 5,51; N, 6,40.

[0134] (S)-(-)-(5, 7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo) (cianometil) amina. El clorhidrato de amina 8a (50,27 g, 229 mmol) se trató con una solución de NaOH (10,0 g, 250 mmol) en agua (150 ml), seguido por unos pocos gránulos adicionales de NaOH suficiente para obtener una solución. Se añadió más agua (300 ml) y la mezcla se colocó en un baño de 50°C y se trató con sodio formaldehído complejo de bisulfito (30,8 g, 230 mmol). Después de agitarse la mezcla durante 30 min, KCN (15,0 g, 230 mmol) se añadió. La mezcla de reacción se agitó durante 1 h a 80°C , se enfrió a temperatura ambiente, y se extrajo con EtOAc para dar un aceite (51,3 g) que se solidificó. TLC (5% de $\text{MeOH-CH}_2\text{Cl}_2$) mostró que permanecía ca. 10-15% de amina de partida. La cromatografía sobre sílice dio el producto del nitrilo (39,4 g) y a partir de amina libre (7,12 g), que forma rápidamente el carbonato en el aire. Reciclaje de esta amina dio un 5,35 g adicionales de producto. Rendimiento combinado (44,8 g, 202 mmol; 87,5%): $\text{mp } 73,1\text{-}76,5^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -58,0^{\circ}$ ($c = 1,63, \text{CHCl}_3$); $^1\text{H RMN}$ (CDCl_3) δ 1,50 (s ancho, 1H), 1,70 (m, 1H), 2,05 (m, 1H), 2,55-3,04 (m, 4H), 3,22 (m, 1H), 3,70 (s, 2H), 6,62 (m, 2H); MS m/z 222 (M^+). Anal. Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_2$: C, 64,85; H, 5,44; N, 12,60. Encontrado: C, 65,07; H, 5,47; N, 12,44. Los espectros para el (R)-9b enantiómero son idénticos: $\text{mp } 64,4\text{-}73,6^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} + 52,3^{\circ}$ ($c = 2,12, \text{CHCl}_3$). Anal. Calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{N}_2$: C, 64,85; H, 5,44; N, 12,60. Encontrado: C, 65,14; H, 5,54; N, 12,53.

[0135] (S)-(-)-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-5-ciano-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol. El nitrilo (44,7 g, 201 mmol) en formiato de butilo (240 ml) se calentó a reflujo (baño de 120°C) bajo N_2 durante 19 h, y se eliminó el disolvente a presión reducida. Se añadió tolueno y se evaporó para eliminar las últimas trazas de disolvente, y el residuo se secó a alto vacío para dar un aceite (53,2 g). La formamida y formiato de etilo resultante (48,7 ml, 44,7 g, 604 mmol) en THF anhidro (935 ml) se enfrió en hielo/MeOH (-15°C) y se agitó mientras $t\text{-BuOK}$ (1M en THF, 302

ml, 302 mmol) se añadió durante 20 min. Después de agitarse la reacción durante 18 h, se evaporó el disolvente, el residuo se disolvió en 1 N HCl (990 ml) y etanol (497 ml), y se trató con KSCN (78,1 g, 804 mmol). La mezcla se agitó durante 135 min a 85°C y después se colocó en un baño de hielo para dar un precipitado. El sólido filtrado se cargó como una suspensión en 10% de MeOH/CH₂Cl₂ a una columna de sílice (1 kg) de relleno en hexano. La elución con 10% de acetona/CH₂Cl₂ dio el producto (18,05 g, 62,1 mmol; 30,8%): mp 240,7-249,2°C; [α]_D²⁵ -69,1°(c = 1,18, DMSO); ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 2,18 (br m, 1H), 2,47 (m, 1H), 2,75 (m, 1H), 3,03-3,35 (m, 3H), 5,19 (m, 1H), 6,94 (d, *J* = 9,3 Hz, 1H), 7,03 (dt, *J* = 9,3, 2,4 Hz, 1H), 8,29 (s, 1H), 13,3 (br s, 1H); MS *m/z* 291 (M⁺). Una al. Calculado para C₁₄H₁₁F₂N₃S: C, 57,72; H, 3,80; N, 14,42. Encontrado: C, 57,82; H, 3,92; N, 14,37. (La elución adicional de la columna con 1: 1 MeOH/CH₂Cl₂ dio la amida primaria 11a: mp 261,9-262,7°C; [α]_D²⁵ -90,5°(c = 0,398); IR (KBr) 1593, 1630 cm⁻¹; ¹H RMN (d₆-DMSO) δ 2,14 (m, 1H), 2,15-2,28 (m, 1H), 2,74-3,05 (m, 4H), 5,64 (m, 1H), 6,90 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H), 7,05 (dt, *J* = 9,5, 2,4 Hz, 1H), 8,73 (s, 1H), 9,70 (br s, 1H), 13,7 (br s, 1H); MS *m/z* 309 (M⁺) Análisis calculado para C₁₄H₁₃F₂N₃OS • 0,25H₂O: C, 53,57; H, 4,33; N, 13,39 encontrado: C, 53,32; H, 3,96; N, 13,24. Los espectros para el (*R*)-enantiómero son idénticos: mp 243,1-244,7°C; [α]_D²⁵ + 74,9°(c = 2,14, DMSO) Análisis Calculado para C₁₄H₁₁F₂N₃S: C, 57,72; H, 3,80; N, 14,42 encontrado: C, 57,85; H, 3,85; N, 14,45.

[0136] (*S*)-1-(5,7-Difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-5-aminometilo-2,3-dihidro-2-tioxo-1*H*-imidazol. El nitrilo anterior (5,00 g, 17,2 mmol) en THF (75 ml) se agitó en atmósfera de argón en un baño de hielo hasta que se obtuvo una solución homogénea. Se añadió una solución de LAH en THF (1 M, 34,3 ml, 34,3 mmol) gota a gota durante 10 min, después la solución se agitó durante 30 min a 0°C y se dejó llegar a temperatura ambiente durante 1,5 h. La reacción se enfrió de nuevo a 0°C y se trató con una solución saturada de tartrato de sodio y potasio hasta que la mezcla se convirtió en libremente agitable. Se añadió solución adicional de tartrato (30 ml), seguido de 10% de MeOH/CH₂Cl₂ (200 ml) y la mezcla se agitó durante 15 min y se trató con agua (100-150 ml). La capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con 10% MeOH/CH₂Cl₂ (2 x 125 ml). Los extractos combinados se lavaron, se secaron (MgSO₄) y se evaporaron. La cromatografía del residuo (5,2 g) sobre sílice eluyendo con 5% MeOH/CH₂Cl₂ dio la amina libre (2,92 g, 9,89 mmol; 58%): mp 170°C; [α]_D²⁵ -11,0°(c = 1,59, DMSO). Anal. Calculado para C₁₄H₁₅F₂N₃S • 0,25H₂O: C, 56,07; H, 5,21; N, 14,01. Encontrado: C, 56,11; H, 5,10; N, 14,14.

[0137] (*S*)-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-5-aminometilo-2,3-dihidro-2-tioxo-1*H*-imidazol hidrocloreto (nepicastato). La sal de hidrocloreto se preparó por la adición de HCl etéreo (1 M, 20 ml, 20 mmol) a la amina libre 2a (3,12 g, 10,6 mmol) que había sido disuelto en MeOH (250 ml) por calentamiento. El disolvente se eliminó parcialmente a presión reducida y se desplazó por co-evaporación con EtOAc varias veces sin evaporarse a sequedad. El precipitado resultante se trató con EtOAc (150 ml) y éter (150 ml), se filtró, se lavó con éter, y se secó en atmósfera de nitrógeno y luego bajo alto vacío a 78°C durante 20 h para dar la sal de hidrocloreto (3,87 g): punto de fusión 245°C (dec); [α]_D²⁵ + 9,65°(c = 1,70, DMSO); (93% ee por HPLC quiral); ¹H RMN (T = 320°K, DMSO) δ 2,07 (m, 1H), 2,68-3,08 (m, 4H), 4,09 (m, 3H), 4,77 (m, 1H), 6,84 (m, 2H), 7,05 (s, 1H), 8,57 (br s, 3H), 12,4 (br s, 1H). Anal. Calculado para C₁₄H₁₆ClF₂N₃S • 0,5H₂O: C, 49,33; H, 5,03; N, 12,33. Encontrado: C, 49,44; H, 4,96; N, 12,18. Los espectros para el (*R*)-enantiómero (*R*)-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-5-Aminometilo-2,3-dihidro- son idénticos; mp 261-263°C; [α]_D²⁵ -10,8°(c = 1,43, DMSO), 91,6% ee por HPLC quiral. Anal. Calculado para C₁₄H₁₆ClF₂N₃S • 0,35H₂O: C, 49,73; H, 4,98; N, 12,42. Encontrado: C, 49,80; H, 4,93; N, 12,39.

[0138] Nepicastato demostró ser un inhibidor competitivo de DBH bovino (Cl₅₀ = 8,5 ± 0,8 nM) y humano (Cl₅₀ = 9,0 ± 0,8 nM). El *R*-enantiómero (*R*)-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-5-Aminometilo-2,3-dihidro- (Cl₅₀ s = 25,1 ± 0,6 nM; 18,3 ± 0,6 nM) y SKF 102698 (Cl₅₀ s = 67,0 ± 4,2 nM; 85,0 ± 3,7 nM) son menos potentes inhibidores de las enzimas bovinas y humanas, respectivamente. La actividad de DBH se ensayó midiendo la conversión de tiramina a octopamina. DBH bovina de las glándulas suprarrenales se obtuvo de Sigma Chemical Co (St Louis, MO). DBH secretora humana se purificó a partir del medio de cultivo de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH. El ensayo se realizó a pH 5,2 y 32°C en 0,125 M NaOAc, fumarato 10 mM, 0,5 -2 μM CUSO₄ 0,1 mg/ml de catalasa, tiramina 0,1 mM y 4 mM de ascorbato. En un ensayo típico, se añadieron 0,5-1 miliunidades de enzima a la mezcla de reacción y después se añadió una mezcla de sustrato que contiene la catalasa, la tiramina y ascorbato para iniciar la reacción (volumen final de 200 μl). Las muestras se incubaron con o sin la concentración apropiada de inhibidor a 37°C durante 30-40 min. La reacción se inactivó mediante la disolución de parada que contenía EDTA 25 mM y 240 μM 3-hidroxitiramina (patrón interno). Las muestras se analizaron para octopamina por HPLC de fase inversa usando detección UV a 280 nM. La actividad porcentual restante se calculó basándose en los controles (sin inhibidor), corregidos utilizando estándares internos y montados en una curva de concentración-respuesta no lineal 4-parámetro para obtener valores Cl₅₀.

[0139] La actividad de nepicastato en once enzimas diferentes se determinó usando ensayos establecidos. La afinidad de nepicastato durante trece receptores seleccionados se determinó mediante ensayos de unión de radioligando utilizando técnicas de filtración estándar y preparaciones de membrana. Los datos de unión se analizaron por ajuste de curva iterativa a una ecuación logística de cuatro parámetros. Valores K_i se calcularon utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff. La Figura 3 muestra una tabla que describe la interacción de nepicastato en DBH y una gama de enzimas y receptores seleccionados. Nepicastato mostró una afinidad débil para una serie de otras enzimas y receptores de neurotransmisores. Estos datos sugieren que nepicastato es un inhibidor potente y altamente selectivo de DBH *in vitro*. Por otra parte, el nepicastato enantiómero *S* es aproximadamente 23 veces más potente que el *R*-enantiómero sugiriendo estereoselectividad.

[0140] La administración oral de nepicastato a ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y perros normales produjeron aumentos potentes y dependientes de la dosis en relaciones de dopamina tisular (DA)/norepinefrina (NE) en arterias periféricas (renales o mesentéricas), ventrículo izquierdo y corteza cerebral. La administración oral crónica de nepicastato a perros normales también produjeron aumentos sostenidos en la relación de plasma DA/NE. En SHR conscientes, la administración oral aguda de nepicastato produjo efectos antihipertensivos dependientes de la dosis y de larga duración (> 4 h) y también la atenuación de las respuestas presoras a estimulación nerviosa simpática pre-ganglionar. Niveles de suero T₃ y T₄ no se vieron afectados por una dosis (6,2 mg/kg, po, b.i.d. durante 10 días), que eleva la relación de dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica. Sobre la base de su capacidad para modular potentemente el impulso simpático a los tejidos cardiovasculares, nepicastato ha sido clínicamente evaluado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva.

[0141] La insuficiencia cardíaca congestiva (CHF) es la principal causa de mortalidad en los Estados Unidos. CHF se caracteriza por la marcada activación del sistema nervioso simpático (SNS) y del sistema renina-angiotensina (RAS). La activación simultánea de estos dos sistemas neurohormonales se ha implicado cada vez más en la perpetuación y la progresión de la CHF. Las intervenciones terapéuticas que bloquean los efectos de estos sistemas neurohormonales son susceptibles de alterar favorablemente la historia natural de CHF. De hecho, los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), que bloquean la formación de angiotensina II, se ha demostrado para reducir la morbilidad y la mortalidad en pacientes con CHF. Inhibidores de la ECA, sin embargo, tienen una capacidad limitada indirecta para atenuar SNS. La inhibición de la SNS con antagonistas β-adrenoreceptores es un enfoque prometedor que está actualmente bajo evaluación clínica. Una estrategia alternativa para modular directamente la SNS es la inhibición de la biosíntesis de norepinefrina (NE) a través de la inhibición de la α-hidroxilasa de dopamina (DBH), la enzima responsable de la conversión de NE a la dopamina (DA). Se esperaría que la inhibición de la DBH redujera los niveles tisulares de NE y elevara los niveles tisulares de DA aumentando de ese modo la relación de tejido DA/NE. Este enfoque tiene ventajas potenciales sobre agonistas α-adrenoreceptores, tales como la estimulación reducida de α-adrenoreceptores y niveles elevados de DA que pueden producir vasodilatación renal, natriuresis y liberación de aldosterona disminuida. Inhibidores de DBH anteriores, tales como el ácido fusárico y SKF-102698, tienen inconvenientes tales como baja potencia y especificidad, que han impedido su desarrollo clínico en la insuficiencia cardíaca.

[0142] Nepicastato se utilizó en estudios bioquímicos *in vivo* para estudiar los efectos en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y perros beagle normales. En el día del estudio, los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente para recibir placebo (vehículo) o la dosis apropiada de nepicastato. Cada rata se dosificó por vía oral tres veces, 12 h de diferencia, a partir de la mañana. A las 6 h después de la tercera dosis, las ratas se anestesiaron con halotano, se decapitaron, y los tejidos (corteza cerebral, arteria mesentérica y ventrículo izquierdo) se recogieron rápidamente, se pesaron, se colocaron en ácido perclórico helado 0,4 M, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Concentraciones de tejido NE y DA se ensayaron por HPLC usando detección electroquímica. Perros beagle machos (10-16 kg, Marshall Granjas EE.UU. Inc, North Rose, NY) se utilizaron en el estudio. En el día del estudio, los perros fueron asignados aleatoriamente para recibir placebo (cápsula de vacío) o la dosis apropiada de nepicastato. Cada perro se dosificó dos veces al día durante 4,5 días. 6 h después de la primera dosis en el día 5, los perros fueron sacrificados con pentobarbital y los tejidos (corteza cerebral, arteria renal, ventrículo izquierdo) se cosecharon, se pesaron, se colocaron en ácido perclórico helado 0,4 M, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su análisis. Concentraciones de tejido NE y DA se ensayaron por HPLC usando detección electroquímica.

[0143] La administración oral de nepicastato produjo aumentos dependientes de la dosis en las relaciones DA/NE en la arteria (mesentérica o renal), ventrículo izquierdo y corteza cerebral en SHR y perros.

[0144] A la dosis más alta probada (100 mg/kg en SHR y 5 mg/kg en perros) los aumentos máximos en relación DA/NE eran 14, 11 y 3,2 veces (en SHR) y 95, 151 y 80 veces (en perros) en la arteria, el ventrículo izquierdo y la corteza cerebral, respectivamente. Cuando se ensayaron a 30 mg/kg en SHR, SKF-102698 (1) aumenta la relación DA/NE por 5,5 veces, 3,5 veces y 2,7 veces, mientras que el nepicastato, a la misma dosis, el aumento de la proporción en 8,3, 7,5 y 1,5 veces en la arteria mesentérica, ventrículo y la corteza cerebral izquierda, respectivamente. Compuesto B a 30 mg/kg en SHR, produjo sólo 2,6, 3,5 y 1,1 veces los aumentos de la relación DA/NE en la arteria mesentérica, ventrículo izquierdo y la corteza cerebral, respectivamente. Estos datos sugieren que nepicastato produce los efectos bioquímicos esperados en ambos SHR y perros, pero es más potente en esta última especie. Además, el nepicastato es más potente que su Compuesto B y SKF-102698 (1) en SHR.

[0145] Los efectos crónicos de nepicastato (tratamiento durante 14,5 días) sobre la relación de plasma DA/NE se investigaron en los perros normales. Los animales fueron asignados aleatoriamente para recibir, por vía oral, ya sea placebo (cápsula vacía) o nepicastato (2 mg/kg, b.i.d.) durante 14,5 días. Muestras de sangre diarias se elaboraron, 6 h después de la primera dosis, para la medición de las concentraciones plasmáticas de DA y NE. Las muestras se recogieron en tubos que contienen heparina y el glutatión, se centrifugaron a -4°C y se almacenaron a -70°C hasta su análisis.

[0146] La administración oral de nepicastato (2 mg/kg; b.i.d.) produjo un aumento significativo en la relación DA/NE que alcanza su efecto pico en aproximadamente 6-7 días, a continuación, se estabilizó a un nuevo estado de

equilibrio entre 7-14 días.

[0147] La actividad hemodinámica *in vivo* de nepicastato se evaluó adicionalmente en SHR consciente, restringido, un modelo que tiene un alto impulso simpático a los tejidos cardiovasculares. El estudio hemodinámico en SHR. SHR macho (15-16 semanas de edad) fueron utilizados en el estudio. Los animales se anestesiaron ligeramente con la arteria y la vena femoral éter y la izquierda se cateterizaron para la medición de la presión arterial y la administración del fármaco, respectivamente. Los animales fueron colocados en presionadores y se dejaron recuperar durante 30-40 min. Después de obtener las mediciones de referencia, los animales fueron tratados, por vía oral, con o bien vehículo o la dosis apropiada de parámetros de nepicastato y hemodinámicos fueron registrados continuamente durante 4 h. Los animales se anestesiaron con pentobarbital, colocado sobre una almohadilla de calentamiento (37°C) y se ventilaron con un ventilador de roedores Harvard. Después de la administración de atropina (1 mg/kg, iv) y tubocurarina (1 mg/kg, iv), los animales fueron amedulados a través de la órbita del ojo con una varilla de acero inoxidable. La varilla de descabello se estimuló eléctricamente con pulsos de 1 ms de 80V a diferentes frecuencias (0,15, 0,45, 1,5, 5, 15 Hz), para obtener curvas de respuesta de frecuencia-presor.

[0148] La dosificación oral de nepicastato resultó en un efecto antihipertensivo dependiente de la dosis. Los animales fueron colocados en presionadores y se dejaron recuperar durante 30-40 minutos. Después de obtener las mediciones de referencia, los animales fueron tratados, por vía oral, con o bien vehículo o la dosis apropiada de parámetros de nepicastato y hemodinámicos fueron registrados continuamente durante 4 h. Nepicastato produce disminución significativa ($p < 0,05$) de la presión arterial media en todas las dosis y puntos temporales, excepto a 0,3 mg/kg (180, 210 y 240 min) y 1 mg/kg (30, 210 y 240 min).

[0149] Una disminución máxima de la presión arterial media de 53 ± 4 mm de Hg (33% de reducción con respecto al control de vehículo) se observó a la dosis de 10 mg/kg. La respuesta fue lenta en el inicio, alcanzando su meseta en 3-4 h. La razón precisa por la pérdida de la eficacia anti-hipertensiva a la dosis más alta (30 mg/kg) es clara en la actualidad. La frecuencia cardíaca no fue significativamente afectada excepto por una disminución ligera pero significativa a las 10 y 30 mg/kg, (9,8 y 10,5%, respectivamente). Tras este estudio, las ratas se amedulan y los efectos de nepicastato sobre la respuesta presora a la estimulación del nervio pre-ganglionar (PNS) de la médula espinal se evaluaron 5 h después de la dosificación. La curva de respuesta de frecuencia-presor se cambió significativamente ($p < 0,05$) a la derecha de una manera dependiente de la dosis (cambio máximo de ~ 5 veces en la curva de respuesta en frecuencia). La respuesta de frecuencia cardíaca a PNS no se vio afectada de manera significativa. Estos datos sugieren que nepicastato inhibe el impulso simpático a la vasculatura y es el mecanismo probable para su efecto antihipertensivo en SHR.

[0150] Puesto que la porción heterocíclica de nepicastato es estructuralmente similar a metimazol, un conocido potente supresor de la función tiroidea de los mamíferos, los efectos de nepicastato sobre la función tiroidea se evaluaron a dosis de 2,0 y 6,2 mg/kg, po, b.i.d. en ratas Sprague-Dawley deficientes en yodo ($n = 9-12$) durante 10 días. Metimazol (1 mg/kg, po, b.i.d.), utilizado como control positivo, causó una reducción significativa en los niveles séricos de T_3 (día 3, el 31%, $p < 0,05$; día 7 y 9, 42% y 44%, $p < 0,01$) y T_4 (días 3 y 7, 46% y 58%, $p < 0,01$) 4 h después de la dosis, mientras que nepicastato no mostró efectos significativos durante todo el estudio (días 3, 7 y 9). Ambas dosis de nepicastato aumentaron de manera importante la relación de DA/NE en la arteria mesentérica ($p < 0,01$ en relación con los controles del vehículo), pero no en la corteza 4 h después de la dosis final en el día 10.

[0151] Los resultados de este estudio sugieren que el nepicastato es un inhibidor potente, selectivo y activo por vía oral de DBH. El compuesto también está desprovisto de efectos en el comportamiento significativo en modelos animales y estos resultados serán objeto de una publicación futura. A medida que el compuesto de nepicastato modula eficazmente el impulso simpático a los tejidos cardiovasculares, se ha probado para el tratamiento de CHF.

Ejemplo 7

[0152] Las concentraciones de dopamina y norepinefrina se determinaron en 942 muestras de plasma recogidas de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (CHF). Los objetivos del estudio fueron:

1. Para evaluar los efectos de varias dosis de nepicastato en transmición cardíaca (seno arterial coronario) y los niveles de catecolaminas de seno coronario después de cuatro semanas, y para evaluar la seguridad y tolerabilidad de nepicastato durante 12 semanas.

2. Para evaluar los efectos de nepicastato sobre cambios desde el inicio en:

a) Niveles de catecolaminas de plasma (venosa) después de cuatro semanas y 12 semanas

b) Calidad de vida (CdV), síntomas de CHF, evaluaciones globales, y clase NYHA después de cuatro semanas y 12 semanas

c) parámetros hemodinámicos, incluyendo el gasto cardíaco, resistencia vascular sistémica, MVO_2 , la presión arterial pulmonar, y la presión de cuña arterial pulmonar después de cuatro semanas

d) hospitalizaciones y cambios en las dosis de medicación para el tratamiento de CHF de más de 12 semanas

5 e) tipo de presión arterial y corazón a los cuatro y 12 semanas

f) prueba de andar a seis minutos después de cuatro semanas y 12 semanas

10 g) fracción de eyección ventricular izquierda, sistólica final del ventrículo izquierdo, y volúmenes diastólicos finales ventriculares izquierdos a las 12 semanas.

15 **[0153]** Las muestras de sangre se recogieron de pacientes de una vena periférica, mientras que estaban en posición supina, a las 2 horas después de la dosis durante las semanas 4 y 12. Otras muestras de pacientes en posición supina se recogieron en el día 0 (es decir, el día antes del comienzo de la dosificación) en un momento que corresponde a 2 horas después de la dosis. Además, un grupo de pacientes se sometió a cateterismo del seno de corazón derecho y coronario durante semana 4 a las 2 horas después de la dosis y en el día 0 (es decir, el día antes del comienzo de la dosificación) en un momento que corresponde a 2 horas después de la dosis. Muestras por triplicado de sangre se recogieron de la vena arterial y el seno coronario de estos pacientes.

20 **[0154]** Las concentraciones de la base libre de la dopamina y la norepinefrina se determinaron por un método radioenzimático. El método implica la incubación de las muestras de plasma con transferasa de catecol-O-metilo y metionina de S-adenosilo tritiada. Al término de la incubación, las catecolaminas O-metiladas se extraen del plasma por extracción líquido/líquido y luego se separaron por cromatografía en capa fina. Las bandas relevantes para cada catecolamina están marcadas y luego se rasparon en viales de centelleo para el recuento. El límite de cuantificación del método es 1 pg de la dopamina o la norepinefrina por ml de plasma. El intervalo lineal es de 1 a 333,000 pg de dopamina o norepinefrina por ml de plasma usando alícuotas de 0,045 ml a 1 ml.

25 **[0155]** Una muestra de plasma humano reunido se utilizó como la muestra de control de calidad (CC) y se analizó en singlicato cada día durante el uso rutinario del método para supervisar el rendimiento del método.

30 Ejemplo 8

35 **[0156]** Estudios de farmacología preclínicos *in vitro* y *in vivo* se llevaron a cabo con el nepicastato. Los estudios *in vitro* evaluaron la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de DBH, y su afinidad de unión a los receptores seleccionados. Los estudios *in vivo* se subdividen en cuatro categorías: 1) los efectos bioquímicos (es decir, la capacidad de disminuir los niveles de norepinefrina de tejidos y aumentar los niveles de dopamina), 2) efectos sobre la función de la tiroides, 3) efectos cardiovasculares, y 4) efectos de comportamiento.

40 **[0157]** Nepicastato era un potente inhibidor de DBH tanto bovino como humano. El CI_{50} para nepicastato en DBH humana era 9 nM (CL 6960), significativamente menor que para el inhibidor de DBH SKF-102698 (85 nM). El nepicastato de enantiómero S era más potente que el enantiómero R (18 nM), denotado como Compuesto B.

45 **[0158]** La afinidad de unión para el nepicastato fue proyectado en receptores seleccionados. Nepicastato mostró una afinidad de unión de menos de 5,0 para M1, D1 y D2, y 5HT_{1A}, 2A y 2C. El metabolito N-acetilo del nepicastato en ratas y monos, mostró una falta similar de afinidad de unión por estos receptores. Por lo tanto nepicastato y su metabolito principal no eran inhibidores potentes para los receptores mencionados anteriormente.

50 **[0159]** La respuesta contráctil de la aorta *in vitro* a la fenilefrina se altera en ratas hipertensas (SHR) con relación espontáneamente a ratas normotensas Wistar-Kyoto. El tratamiento diario con el nepicastato (10 mg/kg, po) en SHR durante 21 días restaurados capacidad de respuesta de fenilefrina a valores comparables a las ratas Wistar-Kyoto.

55 **[0160]** En general, el nepicastato era un inhibidor eficaz de DBH en ratas y perros. La administración oral o intravenosa resultó en una disminución significativa ($p < 0,05$) en la norepinefrina de tejido, un aumento de la dopamina, y un aumento en los niveles de dopamina/norepinefrina en el corazón, mesentérica o una arteria renal, y la corteza cerebral en ambas especies.

60 **[0161]** En estudios con ratas macho espontáneamente hipertensas (SHR), nepicastato disminuyó significativamente la noradrenalina y el aumento de la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica de 0,5 a 4 horas después de la administración oral o iv a 6,2 mg/kg. Los cambios significativos en estos parámetros también se observaron en el ventrículo izquierdo de ratas macho Sprague-Dawley de 6 horas después de la segunda de las dos inyecciones iv (15 mg/kg) administradas con 12 horas de diferencia. El transcurso de tiempo durante 24 horas de catecolaminas de tejido se estudió en SHR macho después de la administración oral de 10 o 30 mg/kg, respectivamente. El aumento de la relación dopamina/norepinefrina fue significativo a 1 hora, y fue de larga duración (12 horas a 10 mg/kg, la arteria mesentérica, y 24 horas a 30 mg/kg, ventrículo izquierdo). Se observaron cambios significativos en los niveles de dopamina y norepinefrina arteria mesentérica después de 10 días de administración a ratas Sprague-Dawley macho en 2,0 y 6,2 mg/kg p.o. b.i.d., con efectos significativos observados en la corteza

cerebral. SHRs dosificadas a 1 o 10 mg/kg/d p.o. durante 7 ó 25 días tenían aumentos significativos en la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica y la corteza cerebral. Tomados en conjunto, nepicastato resultó en una disminución significativa de la norepinefrina y una elevación de la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica en ratas con (hasta 25 días) de dosificación aguda o crónica.

[0162] Se encontró que los efectos del nepicastato en SHR macho y ratas Sprague-Dawley eran sensibles a la dosis cuando se evaluaron 6 horas después de una dosis oral única a 0,3, 1, 3, 10, 30, y 100 mg/kg. En SHRs hubo cambios significativos en la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica a dosis de 0,3 mg/kg, en el ventrículo izquierdo a 3,0 mg/kg, y en la corteza cerebral en 10 mg/kg. En ratas Sprague-Dawley hubo aumentos significativos en la proporción de dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica a 3,0 mg/kg, en el ventrículo izquierdo a 1,0 mg/kg, y en la corteza cerebral sólo a 100 mg/kg. En un segundo estudio de dosis-respuesta en SHR, tres dosis se administraron con 12 horas de diferencia, ya sea en 3,0, 10, 30, o 100 mg/kg, y el tejido se recogió seis horas después de la tercera dosis. Nepicastato causó una disminución significativa dependiente de la dosis en norepinefrina (10 mg/kg) y el aumento de la dopamina (3,0 mg/kg) y la relación dopamina/norepinefrina (3,0 mg/kg) en el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica. Los efectos de nepicastato en las concentraciones de dopamina y norepinefrina, y la relación dopamina/norepinefrina en la corteza cerebral fueron significativas solamente en 30 y 100 mg/kg. Efectos de dosis-respuesta significativos similares en el ventrículo izquierdo se observaron en ratas Wistar hembras dosificadas con nepicastato durante 7 días a través del agua potable (0,3, 0,6, y 1,0 mg/ml). En conclusión, el nepicastato fue menos potente en la inhibición de DBH en la corteza cerebral de ratas (60-100 mg/kg/d) que en el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica (1-6 mg/kg/d).

[0163] Nepicastato (el enantiómero S) era significativamente más potente, entonces el enantiómero R en el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica en SHRs después de tres dosis administradas cada 12 horas (30 mg/kg po). Nepicastato fue significativamente más potente que el inhibidor de la DBH SKF-102698 en la disminución de norepinefrina y el aumento de la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina en el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica en SHRs después de una sola dosis, o tres dosis a 30 mg/kg. Las relaciones de potencia en el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica resultantes de estos estudios *in vivo* se asemejan fuertemente a las obtenidas a partir de estudios *in vitro* utilizando DBH purificada (véase arriba). Sin embargo, el nepicastato tenía significativamente menos efectos que SKF-102698 en la disminución de los niveles de norepinefrina y el aumento de los niveles de dopamina en la corteza cerebral. Se ha demostrado que la norepinefrina estimula la liberación de renina y aumenta la actividad de la renina plasmática. Es por tanto de interés evaluar si la disminución de los niveles de norepinefrina con nepicastato resultaría en una disminución de la actividad de la renina plasmática. Sin embargo, el nepicastato (30 y 100 mg/kg/d p.o. durante 5 días) no alteró la actividad de la renina plasmática en SHRs masculinos. Por lo tanto, el nepicastato, cuando se administra a dosis que reducen los niveles de norepinefrina de tejido, no altera la actividad de la renina plasmática en SHR.

[0164] Nepicastato causó una disminución significativa en los niveles de norepinefrina y un aumento en la relación dopamina/norepinefrina, pero no alteró los niveles de dopamina, en la arteria mesentérica de perros beagle machos 5 horas después de la administración de 30 mg/kg por vía intraduodenal. Cuando se le dio nepicastato a los perros beagle machos durante 4,5 días (5, 15, y 30 mg/kg dos veces, o 10, 30, y 60 mg/kg/d) hubo una disminución significativa en la norepinefrina, y un aumento de la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina en la arteria renal, la corteza renal y la médula renal, con una meseta en respuesta a partir de las 10 mg/kg/d y que se extiende a través de 60 mg/kg/d. Se observaron resultados similares en el ventrículo izquierdo, con la excepción de que no hubo un aumento significativo en la dopamina. En la corteza cerebral, norepinefrina disminuyó significativamente los 30 y 60 mg/kg/d, y la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina aumentó significativamente en todas las dosis. En conclusión, nepicastato era un inhibidor potente oralmente activo de DBH en perros en dosis de al menos 10 mg/kg/d.

[0165] Nepicastato tiene similitudes estructurales con metimazol, un potente inhibidor de la peroxidasa tiroidea *in vivo*. Nepicastato a dosis de 4 o 12,4 mg/kg/d, p.o. no tuvo efecto sobre los niveles séricos de triiodotiramina o tiroxina en ratas Sprague-Dawley macho alimentados con una dieta baja en yodo y se dosifica durante 10 días, mientras que el metimazol (2 mg/kg/d) redujo significativamente los niveles séricos de triiodothyramina o tiroxina. Por lo tanto, el nepicastato, a diferencia de metimazol, no afectó los niveles séricos de triiodotiramina o tiroxina.

[0166] Nepicastato indujo un efecto antihipertensivo significativo para un máximo de 4 horas en SHRs conscientes, refrenados (1,0 a 30 mg/kg, po) y la frecuencia cardíaca significativamente reducida (10 y 30 mg/kg). Los efectos antihipertensivos de nepicastato en SHR conscientes restringidos (10 mg/kg, po) no fueron atenuados por el pretratamiento con el receptor de dopamina (DA-1) antagonista SCH-23390. Nepicastato (10 mg/kg) también redujo la presión arterial 4 horas después de la dosificación en ratas normotensas conscientes refrenadas Wistar-Kyoto; sin embargo, la disminución de la presión fue menor (-13 mmHg) que con SHR (-46 mmHg). Para resumir, nepicastato produce una disminución de la presión arterial en ratas tanto SHR como normotensas, aunque el efecto antihipertensivo es más pronunciado en SHR. Los efectos antihipertensivos en SHR no parecen estar mediados a través de receptores DA-1.

[0167] Nepicastato también atenuó significativamente las respuestas hipertensivas y taquicardias a la estimulación nerviosa preganglionar en SHR amedulares 5 horas después de la dosificación (3 mg/kg p.o.). Por lo tanto, el

nepicastato reduce el aumento de la presión sanguínea en respuesta a la estimulación del nervio simpático.

5 **[0168]** Tratamiento por vía intravenosa aguda de SHR anestesiadas con el nepicastato (3,0 mg/kg, i.v.) disminuyó la presión arterial media durante un periodo de 3 horas, pero no disminuyó el flujo sanguíneo renal ni alteró la producción de orina o la excreción urinaria de sodio o potasio. La resistencia vascular renal calculada se redujo después de la dosificación. Un intento se hizo utilizando el antagonista DA-1 SCH-23390 para evaluar si los efectos vasodilatadores renales de nepicastato estaban mediados por los receptores de DA-1. Sin embargo, este compuesto reduce la presión sanguínea cuando se administra solo, con lo que los resultados se hacían no interpretables. En general, el nepicastato no perjudicó la función renal en SHR anestesiadas, y no disminuyó el flujo sanguíneo renal a pesar de causar una disminución en la presión sanguínea arterial.

15 **[0169]** El tratamiento diario con el nepicastato (1 y 10 mg/kg, p.o.) en SHR durante 21 días no alteraron la frecuencia cardíaca ni la presión sanguínea sistólica como se mide por el método manguito en la cola. Sin embargo, el nepicastato (10 mg/kg, p.o.) indujo un efecto antihipertensivo significativo cuando las ratas fueron restringidas y su presión arterial medida directamente a través de una cánula arterial.

20 **[0170]** Nepicastato redujo significativamente presión arterial en SHR instrumentados con transductores de presión de sangre de radioteleetría en dosis de 30 y 100 mg/kg/d durante 30 días, pero no se observaron efectos significativos en 3 y 10 mg/kg/d. El efecto a los 30 y 100 mg/kg/d persistió durante un período de 24 horas después de una sola dosis, y no había pérdida del efecto de más de 30 días. La frecuencia cardíaca no se incrementó, y la actividad motora no se vio afectada. Una combinación de una dosis de la enzima inhibidora de la conversión de la angiotensina enalapril (1 mg/kg, p.o.) que no logró disminuir la presión arterial con el nepicastato (30 mg/kg) causó una potenciación de los efectos antihipertensivos del nepicastato durante más de 30 días de dosificación, y resultó en una reducción significativa de la masa del ventrículo izquierdo. Una reducción de la masa del ventrículo izquierdo no se produjo con enalapril solo. Por lo tanto, 30 días de tratamiento de SHR con nepicastato a 30 y 100 mg/kg/d resultó en una disminución en la presión sanguínea y, cuando se combina con enalapril, la presión arterial adicional se disminuye junto con una reducción de la masa del ventrículo izquierdo.

30 **[0171]** El efecto de reducción de nepicastato en ratas Wistar normotensas instrumentadas con transductores de presión de sangre de radioteleetría reductora de la presión arterial fue menor que el efecto observado en SHR en dosis de 30 y 100 mg/kg/d durante 7 días. A 30 mg/kg/d de la disminución máxima de la presión arterial fue -10 mmHg, en comparación con -20 en SHR. A 100 mg/kg/d de la disminución máxima de la presión arterial fue -17 mmHg, en comparación con -42 en SHR. Por lo tanto, el nepicastato tuvo un mayor efecto reductor de la presión arterial en SHR que en las ratas normotensas.

35 **[0172]** Los estudios en perros anestesiados normales no mostraron efectos cardiovasculares de nepicastato después de la dosificación intravenosa aguda (1-10 mg/kg i.v.) sin cambios en la presión sanguínea arterial, la presión del ventrículo izquierdo (incluyendo pico dp/dt), frecuencia cardíaca, salida cardíaca o el flujo sanguíneo renal hasta cinco horas después de la dosificación. Se observó una similar falta de efecto en perros crónicamente instrumentados, conscientes estudiados durante 12 horas después de una sola dosis (3-30 mg/kg i.v.).

40 **[0173]** Nepicastato (30 mg/kg por vía intraduodenal) no inhibió significativamente ya sea la disminución del flujo sanguíneo renal en respuesta a la estimulación directa del nervio renal, ni el aumento de la presión sanguínea arterial en respuesta a oclusión de la arteria carótida hasta 5 horas después de la dosificación en perros anestesiados beagle machos. Sin embargo, el nepicastato causó una disminución significativa en los niveles de norepinefrina y un aumento en la relación dopamina/norepinefrina, pero no los niveles de dopamina, en la arteria mesentérica 5 horas después de la dosificación. Por lo tanto, aunque los niveles de tejido de norepinefrina se redujeron significativamente, no hubo inhibición significativa de respuestas funcionales simpáticamente evocadas.

45 **[0174]** Cuando se les administró nepicastato a los perros beagle machos durante 4,5 días a 10 mg/kg/día no hubo ninguna disminución estadísticamente significativa en el grado de aumento de la presión arterial y frecuencia cardíaca en respuesta a oclusión de la arteria carótida en animales anestesiados. Tratamiento de nepicastato redujo significativamente el aumento de la frecuencia cardíaca en respuesta a un desafío de tiramina i.v., pero sólo produjo una inhibición leve y no significativa de aumentos de presión arterial. Por lo tanto, la administración crónica con el nepicastato a una dosis que se ha demostrado que resulta en una disminución máxima en los niveles de norepinefrina de tejido, no tiene un efecto inhibitorio importante en las respuestas funcionales simpáticamente evocadas.

50 **[0175]** Nepicastato no causó efectos significativos en el comportamiento motor bruto en ratones después de la dosificación aguda a 1,0 a 30 mg/kg, p.o., y no afectó la actividad locomotora en ratones (10-100 mg/kg ip). La administración aguda a ratas no afectó la actividad locomotora o reactividad de sobresalto acústico (3-100 mg/kg ip).

55 **[0176]** No se observaron efectos en el comportamiento en ratas después de 10 días de dosificación a los 10, 30, y 100 mg/kg/d, p.o.. La temperatura rectal también se vio afectada. La actividad motora y reflejo de sobresalto auditivo se redujeron significativamente por el tratamiento con el inhibidor de DBH SKF-102698 (100 mg/kg/d, p.o.), y por el agonista α -adrenérgico de acción central clonidina (20 mg/kg, b.i.d., p.o.). La actividad motora tampoco fue afectada

durante más de 30 días de dosificación en SHR (3-100 mg/kg/d, p.o.). Por lo tanto, el nepicastato no causó cambios detectables en efectos conductuales centralmente mediados del sistema nervioso en ratas.

[0177] Nepicastato es un inhibidor competitivo potente de DAP humana *in vitro*, y en ratas y perros *in vivo*. En ratas, el tratamiento oral con el nepicastato resultó en evidencia significativa para la inhibición de DBH en el corazón y la arteria mesentérica a una dosis de 6 mg/kg/d. En contraste con otro inhibidor de la DBH, SKF-102698, nepicastato mostró alguna selectividad para el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica con relación a la corteza cerebral. No se observaron efectos en el comportamiento con el nepicastato en ratas. En los perros, un efecto de meseta para la inhibición DBH se produjo a 10 mg/kg/d en el corazón, la arteria renal y el riñón. Nepicastato redujo significativamente la respuesta hipertensiva a la estimulación del nervio simpático en ratas (3 mg/kg p.o.), y redujo significativamente la presión sanguínea a lo largo del día cuando se dosificó una vez al día (30 mg/kg/d p.o.) durante 30 días en SHR. En conclusión, el nepicastato es un inhibidor de la DBH potente que modula la acción del sistema nervioso simpático.

15 Ejemplo 9

[0178] Los estudios descritos aquí se han diseñado para evaluar la farmacocinética de dosis orales más altas de nepicastato, para comparar la farmacocinética en ratas macho y hembra, y para determinar la penetración de nepicastato en el SNC mediante la cuantificación de los niveles de nepicastato en el cerebro.

[0179] Las ratas macho (Crl: CD BR Vaf +) con un peso de 180-220 g se mantuvieron en ayunas durante la noche antes de la dosificación y hasta 4 horas después de la dosificación. Las dosis se formuló en agua que contenía 2% de metilcelulosa 1-hidroxipropilo (viscosidad de 50 centipoises), alcohol bencílico al 1%, y 0,6% de Tween 80 (todos obtenidos de Sigma Chemical Company). La concentración de fármaco en las soluciones de dosis era de 5, 15, y 50 mg/ml para el 10, 30, y 100 mg/kg de dosis, respectivamente, y se verificó por cromatografía de líquido (LC). La dosis de 5 mg/ml era una solución transparente y las concentraciones más altas fueron una suspensión translúcida. Volúmenes de dosis fueron 2,0 ml/kg. En diversos momentos después de la dosificación, las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción cardiaca con jeringas heparinizadas, y el plasma se preparó por centrifugación. Los cerebros de las ratas fueron extirpados quirúrgicamente, y todas las muestras se congelaron a -20°C hasta su análisis.

[0180] Las alícuotas de plasma (0,05 o 0,5 ml) se mezclaron con estándar interno (50 µl de metanol que contiene 5 µg/ml de análogo de monofluoro de nepicastato, y 5 mg/ml de ditiotreitól). Las muestras se mezclaron con tampón de 200 mM de fosfato de sodio, pH 7,0, (0,5 ml) y se extrajeron con 3 ml de acetato de etilo/hexano (1/1 v/v). La fase orgánica que contiene analitos se extrajo de nuevo con 250 µl de 250 mM de ácido acético y alícuotas de 100 µl de la fase acuosa se analizaron por LC. El sistema LC utiliza una columna C₈ Keystone Hypersil BDS 15 cm a temperatura ambiente. La fase móvil A era 12,5 mM de fosfato potásico, pH 3,0, con 5 mM de ácido dodecanosulfónico y la fase móvil B era acetonitrilo. La composición del disolvente era 40% de B y se bombeó a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La detección fue por absorción de UV a 261 nm. Las concentraciones de analitos se determinaron a partir de una curva estándar generada a partir del análisis del plasma de las ratas no tratadas fortificadas con concentraciones conocidas de analito. Datos de concentración de plasma se expresan como µg (base libre) por ml.

[0181] Los cerebros se lavaron brevemente con solución salina, se transfirieron sobre una toalla de papel, después se pesaron (1,5-2,0 g). Se añadió patrón interno (50 µl de metanol que contenía 20 µg/ml un análogo monofluoro de nepicastato), y los cerebros se homogeneizaron en 5 ml de fosfato de sodio 200 mM, pH 7,0, que contiene 0,5 mg/ml de ditiotreitól. Las alícuotas se homogeneizaron (2 ml) se extrajeron con 10 ml de acetato de etilo/hexano (, v v 1/1 /). La fase orgánica se extrajo suavemente de nuevo con 150 µl de 250 mM de ácido acético.

[0182] Después de la adición de 100 µl de metanol a la fase acuosa (para dispersar cualquier emulsión), 100 µl alícuotas se analizaron por LC como se describe para plasma. Niveles en el cerebro se expresan como µg (base libre) por g de tejido cerebral.

[0183] Los parámetros farmacocinéticos se calcularon a partir de concentraciones medias de plasma. La vida media plasmática ($T_{1/2}$) se calculó como $0,693/\otimes$, donde \otimes es la constante de velocidad de eliminación determinada por regresión lineal de la concentración de plasma log frente a los datos de tiempo dentro de la porción lineal terminal de los datos. Las áreas bajo la concentración de plasma frente a la curva de tiempo (AUC) desde cero hasta el tiempo de las últimas concentraciones plasmáticas cuantificables se calcularon mediante la regla trapezoidal. AUC de cero a infinito (AUC_{total}) se calculó como:

$$AUC_{total} = AUC (0-C_{última}) + C_{última}/\beta$$

donde $C_{última}$ es la última concentración en plasma cuantificable.

[0184] Se obtuvieron concentraciones de nepicastato en el plasma de las ratas macho que recibieron 10, 30, o 100 mg/kg de dosis orales únicas. Las concentraciones de nepicastato en plasma aumentaron con el aumento de la

dosis, y la relación entre AUC_{total} y la dosis fue lineal. La vida media de eliminación pareció aumentarse ligeramente en dosis más altas (1,70, 2,09, y 3,88 hr después de los 10, 30, y 100 mg/dosis orales kg a ratas macho, respectivamente). Después de una dosis de 30 mg/kg por vía oral de nepicastato a ratas hembra, la AUC plasmática total de nepicastato era 77% mayor en las ratas hembra que en ratas macho da una dosis equivalente de nepicastato. Los niveles de nepicastato en el cerebro (expresados como $\mu\text{g/g}$) fueron inicialmente más bajos que los del plasma (expresados como $\mu\text{g/ml}$). De 2 horas después de la dosificación en adelante, sin embargo, las concentraciones de nepicastato en el cerebro excedieron las del plasma.

[0185] Los niveles plasmáticos de nepicastato en ratas macho se aumentaron linealmente con las dosis crecientes entre 10 y 100 mg/kg, basadas en los valores de AUC_{total} .

[0186] Los niveles plasmáticos de nepicastato fueron mayores en las ratas hembras que en ratas macho después de una dosis oral de 30 mg/kg.

[0187] Tras la administración de una dosis oral de 10 mg/kg de nepicastato a ratas macho, los niveles de nepicastato en el cerebro eran inicialmente inferiores a los de plasma, pero a partir de 2 h en adelante, los niveles de nepicastato en el cerebro fueron mayores que en el plasma.

Ejemplo 10

[0188] El propósito de este estudio consistió determinar el curso de tiempo de 24 horas de los efectos de nepicastato (10 mg/kg) sobre los niveles de dopamina y norepinefrina en la arteria mesentérica después de una dosis oral única en ratas espontáneamente hipertensas. Los niveles de catecolaminas se midieron a 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, y 24 horas después de una sola administración oral de cualquiera de nepicastato (10 mg/kg) o vehículo (dH_2O ; 10 ml/kg).

[0189] A dieciséis ratas hipertensas espontáneas de 17 semanas de edad (SHR) con un peso de 300-400 gramos se les permitió alimento y agua ad libitum. Los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente, la tarde antes del estudio, a uno de los siguientes grupos de tratamiento (n = 9 por grupo): una sola administración oral de nepicastato a 10 mg/kg o de una sola administración oral de vehículo (10 ml/kg) para sacrificarse a 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, o 24 horas.

[0190] Nepicastato se sintetizó como sal de clorhidrato y el nepicastato se disolvió en vehículo (dH_2O) para producir una dosis oral que se podría administrar en repetidas volúmenes de 10 ml/kg. Todas las dosis de nepicastato se administraron como equivalentes de base libre y se prepararon de la mañana de la administración.

[0191] Los animales fueron dosificados cada minuto durante la mañana del sacrificio. En 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 24 horas después de la administración, 9 animales tratados y 9 animales de vehículo fueron anestesiados con halotano, decapitados, y el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica se recogieron y se pesaron rápidamente. La arteria mesentérica se puso en 0,5 ml de 0,4 M de ácido perclórico en un tubo de centrifuga y el ventrículo izquierdo puesto en un criotubo vacío. Ambos tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C . Los niveles mesentéricos de catecolaminas de la arteria se determinaron usando HPLC con detección electroquímica. En el momento de la decapitación, muestras de plasma se tomaron mediante el drenaje de la sangre del canal en un tubo que contenía heparina, y centrifugación a 4°C .

[0192] Cada grupo de tratamiento se comparó con el vehículo en cada punto de tiempo. Un análisis de dos vías de la varianza (ANOVA) con efectos TRT, HARVEST se realizó su interacción. Un ANOVA de una vía con el factor TRT se realizó para cada momento de la cosecha. Los análisis por pares entre los animales tratados y de vehículos, en cada punto de tiempo, se llevaron a cabo utilizando la estrategia LSD de Fisher para controlar la tasa de error de experimentos. Valores de norepinefrina fueron significativamente ($p < 0,05$) más bajos que el vehículo sólo en el punto de tiempo de 4 h. Los niveles fueron marginalmente ($0,05 < p < 0,1$) inferiores en el punto de tiempo de 6 horas. Los niveles de dopamina fueron significativamente ($p < 0,05$) superiores a los de vehículo en los tiempos de cosecha de 2 y 6 h. La relación de dopamina/norepinefrina fue significativamente ($p < 0,05$) mayor que la de los animales tratados con vehículo en los puntos de tiempo de 1, 2, 4, 6 y 12 horas.

[0193] En general, el nepicastato tenía pocos efectos estadísticamente significativos sobre los niveles de norepinefrina de arteria mesentérica o de dopamina después de una única administración oral a 10 mg/kg en ratas espontáneamente hipertensas en 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 o 24 horas después de la dosificación. Sin embargo, un aumento constante en las proporciones de dopamina/norepinefrina se observó en la mayor parte de las primeras 12 horas de tratamiento. En el momento de la cosecha 16 y 24 no se observaron cambios en ninguno de los tres parámetros.

Ejemplo 11

[0194] El propósito de este estudio consistió en determinar los efectos de la administración intravenosa de nepicastato (en lo sucesivo, el nepicastato) en los niveles de dopamina y norepinefrina en el ventrículo izquierdo en

ratas Sprague-Dawley. Los animales recibieron dos (I.V.) administraciones intravenosas, a una diferencia de 12 horas, de cada vehículo (75% de propileno glicol + 25% de DMSO; 1,0 ml/kg) o 15 mg/kg de nepicastato. Niveles de tejido de norepinefrina y dopamina se midieron seis horas después de la última administración del compuesto.

5 **[0195]** A dieciséis ratas macho Sprague-Dawley de 17 semanas de edad, con un peso de 300-400 gramos, se les permitió alimento y agua ad libitum. Los animales se pesaron y se asignaron al azar, la tarde antes del estudio, a uno de los siguientes grupos de tratamiento (n = 10 por grupo): vehículo (1,0 ml/kg) o nepicastato a 15 mg/kg.

10 **[0196]** Nepicastato se sintetizó y se disolvió en la cantidad adecuada de vehículo (75% de propileno glicol + 25% de DMSO) para obtener un volumen de dosificación de 1,0 ml/kg. Nepicastato se administró como el equivalente de base libre y se preparó la tarde antes de la primera administración.

15 **[0197]** Cada rata se dosificó i.v. en la vena de la cola por la tarde antes de la cosecha. La dosificación se repitió 12 horas más tarde la mañana siguiente. Seis horas después de anestesiarse las ratas con halotano, se decapitaron, y el ventrículo izquierdo se recogió y se pesaron rápidamente. El ventrículo se colocó en 1,0 ml de ácido perclórico helado de 0,4 M. Los tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. Las concentraciones de dopamina y norepinefrina de tejido se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución usando detección electroquímica.

20 **[0198]** Se realizó un análisis unidireccional de la varianza (ANOVA) con un efecto principal de tratamiento para la norepinefrina. A Kruskal-Wallis se realizó por dopamina y su relación principalmente debido a las variaciones heterogéneas entre los grupos de tratamiento. Comparaciones por pares subsiguientes entre las ratas tratadas con nepicastato y vehículo se realizaron usando la prueba de LSD de Fisher. Un ajuste de Bonferroni se realizó en todos los valores de p para asegurar una tasa de error de tipo 1 global de experimento de 5%.

25 **[0199]** Nepicastato administrado a 15 mg/kg disminuyó significativamente (p <0,01) los niveles de norepinefrina en un 51%, y de manera significativa (p <0,01) el aumento de los niveles de dopamina por 472%, y aumentó de manera significativa (p <0,01) la relación de dopamina/norepinefrina por 1117%, en comparación con animales tratados con vehículo.

30 **[0200]** En conclusión, la administración intravenosa de nepicastato resultó en una inhibición significativa de DBH en el ventrículo izquierdo de ratas Sprague-Dawley.

35 Ejemplo 12

[0201] Este estudio evaluó la eficacia de nepicastato en la alteración de los niveles de dopamina y norepinefrina en el córtex, el ventrículo izquierdo, y la arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas masculinas (SHR). Los animales recibieron tres dosis, 12 horas de diferencia a los 3, 10, 30 o 100 mg/kg p.o.

40 **[0202]** Este estudio también comparó la eficacia del enantiómero S (nepicastato) con el enantiómero R (Compuesto B) después de tres dosis (30 mg/kg). Este estudio también comparó los efectos de nepicastato con SKF-102698, un inhibidor de la DBH previamente demostrado ser activo por vía oral en ratas.

45 **[0203]** Los compuestos se prepararon y se administraron como el equivalente de base libre. Nepicastato se disolvió en la cantidad adecuada de vehículo (dH₂O para nepicastato y PEG 400: dH₂O, 50:50 vol: Vol. De SKF-102698 Las dosis de 3, 10, 30, y 100 mg/kg de nepicastato, y 30 mg/kg SKF-102698 se prepararon de 10,0 ml/kg de volúmenes de dosificación.

50 **[0204]** Se les permitió a ratas macho espontáneamente hipertensas de quince a dieciséis semanas de edad (SHR) (Charles River Labs) alimento y agua ad libitum. Los animales se pesaron y se asignaron al azar a uno de los siguientes grupos de tratamiento: 1) vehículo de agua destilada (dH₂O), o nepicastato a los 3, 10, 30, y 100 mg/kg, 2) Compuesto B a 30 mg/kg en agua destilada, o 3) PEG 400: dH₂O vehículo o SKF-102698 a 30 mg/kg. Cada rata se dosificó por vía oral (p.o., usando una aguja de sonda) tres veces cada 12 horas, a partir de la mañana. A las seis horas después de la tercera dosis las ratas fueron anestesiadas con halotano, se decapitaron, y se extrajeron rápidamente la corteza, la arteria mesentérica, y el ventrículo izquierdo, se pesaron, se colocaron en ácido perclórico helado 0,4 M, se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -70°C. Las concentraciones de dopamina y norepinefrina de tejido se analizaron por cromatografía líquida de alto rendimiento y detección electroquímica.

60 **[0205]** Se realizaron cuatro series de análisis estadísticos. La primera serie compara las ratas tratadas con varias dosis de nepicastato, y el Compuesto B a 30 mg/kg a los animales de control del vehículo. Se realizó un análisis de una vía no paramétrica de la varianza (ANOVA) con la dosis de factor y día de bloqueo de factor para cada tejido y la tensión por separado. Se reportan los resultados globales. El análisis por pares entre tratados y controles en cada dosis se llevaron a cabo utilizando la prueba de Dunnett para controlar la tasa de error de experimento. La segunda prueba estadística en comparación SKF-102698 al grupo tratado con vehículo PEG-dH₂O usando un ensayo t no paramétrico. La tercera estadística de prueba comparó el Compuesto B a nepicastato a dosis de 30 mg/kg usando una prueba t no paramétrica. Un cuarto análisis estadístico comparó nepicastato a SKF-102698 en dosis de 30

mg/kg. Al utilizarse dos vehículos diferentes, un contraste lineal fue desarrollado que calcula la diferencia de las diferencias del siguiente modo:

$$\text{Cambio} = (30 \text{ mg/kg} - \text{Vehículo})_{\text{NEPICASTAT}} - (30 \text{ mg/kg} - \text{Vehículo})_{\text{SKF-102698}}$$

5 **[0206]** Esta nueva variable se puso a prueba por la igualdad a cero por el procedimiento SAS General Linear Models.

10 **[0207]** La concentración de dopamina en la corteza cerebral fue significativamente ($p < 0,05$) mayor, la concentración de norepinefrina fue significativamente inferior ($p < 0,05$), y las relaciones de la dopamina/norepinefrina significativamente ($p < 0,05$) mayor que vehículo a dosis de 30 y 100 mg/kg de nepicastato.

15 **[0208]** la concentración de dopamina en el ventrículo izquierdo fue significativamente ($p < 0,05$) mayor de vehículo en dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg. La concentración de norepinefrina fue significativamente ($p < 0,05$) más baja que el vehículo a dosis de 10, 30 y 100 mg/kg. La relación dopamina/norepinefrina en el ventrículo izquierdo fue significativamente ($p < 0,05$) mayor que vehículo en dosis de 3, 10, 30, y 100 mg/kg de nepicastato.

20 **[0209]** La concentración de dopamina en la arteria mesentérica de SHR fue significativamente ($p < 0,05$) mayor que vehículo en dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg. La concentración de norepinefrina no fue significativamente menor ($p > 0,05$) que el vehículo a los 10, 30, y 100 mg/kg. Las relaciones de la dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica fueron significativamente ($p < 0,05$) mayores que vehículo en todas las dosis de nepicastato.

25 **[0210]** En la corteza cerebral, en relación con el tratamiento con vehículo, el Compuesto B dio lugar a un aumento significativo tanto en la dopamina y la norepinefrina ($p < 0,01$), y no tuvo efecto sobre la relación dopamina/norepinefrina. Los niveles de noradrenalina fueron significativamente más bajos con el nepicastato en comparación con el Compuesto B ($p < 0,01$).

30 **[0211]** En el ventrículo izquierdo, con relación al tratamiento con vehículo, el Compuesto B dio como resultado un aumento significativo de la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina ($p < 0,01$), pero los niveles de norepinefrina no significativamente inferiores. Nepicastato fue significativamente más eficaz ($p < 0,01$) de Compuesto B en la reducción de los niveles de norepinefrina, y el aumento de la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina.

35 **[0212]** En la arteria mesentérica, en relación con el tratamiento con vehículo, el Compuesto B dio como resultado un aumento significativo de la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina ($p < 0,01$), pero los niveles de norepinefrina no significativamente inferiores. Nepicastato fue significativamente más eficaz ($p < 0,01$) de Compuesto B en la reducción de los niveles de norepinefrina, y el aumento de la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina.

40 **[0213]** La comparación de nepicastato con SKF-102698 a 30 mg/kg en la corteza cerebral, la concentración de dopamina en la corteza fue significativamente mayor ($p < 0,01$) que vehículo para SKF-102698 a una dosis de 30 mg/kg. El aumento por encima de vehículo fue mayor para SKF-102698 que para el nepicastato ($p < 0,01$). La concentración de norepinefrina fue significativamente menor que vehículo para SKF-102698, y la disminución fue mayor para SKF-102698 que para el nepicastato ($p < 0,01$). Las relaciones de dopamina/norepinefrina en la corteza fueron significativamente ($p < 0,01$) mayores que vehículo para SKF-102698, y el aumento por encima de vehículo fue mayor para SKF-102698 que para el nepicastato ($p < 0,01$).

45 **[0214]** La concentración de dopamina en el ventrículo izquierdo fue significativamente mayor ($p < 0,01$) que vehículo para SK-F102698, y el aumento por encima de vehículo fue mayor para nepicastato que para SKF-102698 ($p < 0,01$). La concentración de norepinefrina no fue diferente del vehículo con el tratamiento SKF-102698, sin embargo el tratamiento con nepicastato redujo significativamente norepinefrina respecto al vehículo más de SKF-102698 ($p < 0,01$). Las relaciones de dopamina/norepinefrina en el ventrículo izquierdo fueron significativamente mayores que vehículo que para SKF-102698, y el aumento por encima de vehículo fue mayor para nepicastato que para SKF-102698 ($p < 0,05$).

50 **[0215]** La concentración de dopamina en la arteria mesentérica era significativamente mayor que vehículo para SKF-102698, y el aumento por encima de vehículo fue mayor para el nepicastato que para SKF-102698. La concentración de norepinefrina fue significativamente menor que con el vehículo de tratamiento SKF-102698, y el tratamiento con el nepicastato redujo significativamente norepinefrina respecto al vehículo más que SKF-102698. Las relaciones de la dopamina/norepinefrina en el ventrículo izquierdo fueron significativamente mayores que vehículo que para SKF-102698, y el aumento por encima de vehículo fue mayor para nepicastato que para SKF-102698.

55 **[0216]** En conclusión, los datos muestran que nepicastato es un potente inhibidor de DBH in vivo en la arteria mesentérica, ventrículo izquierdo, y la corteza cerebral de SHR seis horas después de la tercera de las tres dosis orales administradas a 12 horas de diferencia. El enantiómero S, nepicastato era más potente que el enantiómero R (Compuesto B) en los tres tejidos en 30 mg/kg. Además, nepicastato fue más eficaz que SKF-102698 en la arteria mesentérica y el ventrículo izquierdo, pero menos eficaz en la corteza cerebral, después de tres dosis a 30 mg/kg

administradas de más de 24 horas.

Ejemplo 13

5 **[0217]** Nepicastato se preparó y se administró como el equivalente de base libre. Nepicastato y metimazol se disolvieron en vehículo (propilenglicol 66,7%: 33,3% dH₂O) para producir soluciones de dosificación de las concentraciones apropiadas de modo que todas las dosis podrían administrarse en un volumen de 1,0 ml/kg.

10 **[0218]** Ratas macho Sprague-Dawley, con un peso de 180-200 gramos, fueron alimentadas con una dieta deficiente en yodo (Purina, 5891C, Lote 1478, 0,066 ± 0,042 mg de yodo/kg de muestra) ad libitum 14 días antes del tratamiento. Los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de tratamiento (n = 12 por grupo): nepicastato a 2,0 mg/kg, nepicastato a 6,2 mg/kg, metimazol a 1 mg/kg, o vehículo a 1 ml/kg. Cada grupo de ratas se dosificó por vía oral por la noche y la mañana siguiente, aproximadamente a 12 horas de diferencia, durante 10 días consecutivos.

15 **[0219]** A las cuatro horas después de la segunda dosis, en el día 10, las ratas se anestesiaron con halotano, se decapitaron, y la corteza, el cuerpo estriado, y la arteria mesentérica se recogieron y se pesaron. Las muestras de tejido no se recogieron de los grupos metimazol, ya que sólo sirvió como controles positivos para la determinación de la función tiroidea. La arteria mesentérica, la corteza, y el cuerpo estriado se colocaron inmediatamente en ácido perclórico de 0,4 M helado y se analizaron para los niveles de norepinefrina y dopamina en el mismo día usando HPLC.

20 **[0220]** Se tomaron muestras de sangre orbitales a día -3, 0, 3, 7, y 9 (día 0 fue el primer día de dosificación). Las muestras de suero se analizaron para niveles T₃ y T₄ usando un radioinmunoensayo.

25 **[0221]** Para evaluar estadísticamente los cambios en niveles T₃ y T₄, un cambio desde la línea base se calculó a partir del punto de tiempo del día -3. Se realizó una de dos vías no paramétricas dentro de análisis objeto de la varianza (ANOVA). También un ANOVA de una vía se realizó para detectar si se ha producido una diferencia significativa del control. Análisis por pares entre los controles y cada grupo de tratamiento se llevaron a cabo utilizando la estrategia LSD de Fisher para controlar la tasa de error de experimento. Para el análisis estadístico de los niveles de catecolaminas, se realizó un ANOVA de una vía con el factor de la dosis. El análisis por pares entre tratados y controles en cada dosis se llevaron a cabo utilizando la estrategia LSD de Fisher para controlar la tasa de error de experimento.

35 **[0222]** los niveles de norepinefrina en los animales tratados con nepicastato no fueron significativamente (p > 0,05) diferentes en la corteza en comparación con el control del vehículo a dosis de 2,0 y 6,2 mg/kg. Los niveles de norepinefrina en la arteria mesentérica fueron significativamente (p < 0,05) más bajos en los grupos de dosis 2,0 y 6,2 mg/kg, y los niveles de norepinefrina en el cuerpo estriado fueron marginalmente (p < 0,10) menores tanto en los grupos de dosis de 2,0 y 6,2 mg/kg, en comparación con el control del vehículo.

40 **[0223]** Los niveles de dopamina en los tres tejidos no fueron significativamente (p > 0,05) diferentes del control del vehículo, ya sea en el grupo de dosis 2,0 o 6,2 mg/kg de nepicastato.

45 **[0224]** La relación dopamina/norepinefrina de la corteza y el cuerpo estriado en 2,0 y 6,2 mg/kg nepicastato no fueron significativamente (p > 0,05) diferentes de control del vehículo, mientras que la relación de la arteria mesentérica, tanto en 2,0 y 6,2 mg/kg de nepicastato fueron significativamente (p < 0,05) más altos que el control del vehículo.

50 **[0225]** Ni 2,0 ni 6,2 mg/kg de función tiroidea afectada de nepicastato por la alteración de niveles de T₃ libre o T₄ total en el suero de rata. Una dosis de 1,0 mg/kg de metimazol, el control positivo, disminuyó de manera significativa (p < 0,05) niveles T₃ en todos los días de tratamiento y niveles T₄ en los días 3 y 7, en comparación con el control del vehículo. Niveles T₄ de los animales tratados con metimazol eran sólo marginalmente (p < 0,10) más bajos en el día nueve.

55 **[0226]** Nepicastato (2,0 o 6,2 mg/kg) no causó ningún cambio significativo (p > 0,05) en dopamina o los niveles de norepinefrina, o la relación dopamina/norepinefrina, en comparación con vehículo. En el cuerpo estriado, se observó una disminución marginalmente significativa (p < 0,10) en el nivel de norepinefrina en el grupo de dosis de 6,2 mg/kg, pero no se observaron otros cambios significativos. En la arteria mesentérica, nepicastato tanto de 2,0 como 6,2 mg/kg producen niveles de norepinefrina significativamente (p < 0,05) más bajos y relaciones significativamente (P < 0,05) más altas de dopamina/norepinefrina, en comparación con vehículo, sin cambios significativos observados en los niveles de dopamina. Por lo tanto nepicastato parece ser un inhibidor eficaz de ®-hidroxilasa de dopamina in vivo, con un mayor efecto en la arteria mesentérica de la corteza cerebral o cuerpo estriado después de 10 días de dosificación en ratas Sprague-Dawley.

65 Ejemplo 14

[0227] Se llevó a cabo este estudio para determinar las concentraciones de dopamina y norepinefrina en médula renal y la corteza renal de perros dosificados con nepicastato. Perros adultos de raza beagle machos fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos de 8 perros por grupo y se dosificaron por vía oral con el nepicastato. Nepicastato fue entregado en dosis de 5, 15 y 30 mg/kg colocadas en cápsulas individuales. El vehículo era una cápsula vacía. Cada perro recibió 2 dosis al día, mañana y tarde (8-10 horas de diferencia) durante cuatro días. En el quinto día, cada perro recibió una dosis única por la mañana y los perros fueron sacrificados seis horas después de la última dosis. Las muestras de médula renal y la corteza renal se recogieron rápidamente, se pesaron, se colocaron en ácido perclórico frío de 0,4 M, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C.

[0228] Para cuantificar concentraciones de norepinefrina (NE) y dopamina (D), cada tejido se homogeneizó mediante una breve sonicación en ácido perclórico 0,4 M. Después de la sonicación, los homogeneizados se centrifugaron a 13.000 rpm en una microcentrífuga durante 30 minutos a 4°C. Una alícuota de cada sobrenadante se retiró y se enriqueció con 3,4-dihidroxibencilamina (DHBA) como estándar interno. El extracto de cada muestra se sometió a separación HPLC usando detección electroquímica. El método tiene un límite de cuantificación de 2,0 ng/ml y un intervalo lineal de 2,0 ng/ml a 400 ng/ml para cada analito.

[0229] Cada determinación del analito se normalizó al peso de la muestra de tejido y se expresa como µg de analito por gramo de tejido. Se obtuvieron las concentraciones de dopamina, norepinefrina y la relación de la concentración de dopamina a concentración de norepinefrina (D/NE) para cada perro. Además, se proporcionaron los medios calculados y las desviaciones estándar para cada analito y la relación de D/NE para cada grupo de tratamiento.

Ejemplo 15

[0230] Los perros machos Beagle (Marshall farms, North Rose, NY) con un peso entre 9-16 kg se utilizaron en el estudio. A los animales se les permitió agua ad libitum y se les dio comida una vez al día a ~ 10.00 am. Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de tratamiento (n = 8/grupo): placebo (cápsula vacía), o nepicastato a 2 mg/kg b.i.d. (4 mg/kg/día). Cada animal recibió 2 dosis al día, mañana y tarde (8-10 horas de diferencia). Muestras de sangre diarias (10 ml) se extrajeron 6 h después de la dosis AM para la medición de los niveles plasmáticos de nepicastato y catecolaminas. La sangre se recogió en tubos que contienen heparina y glutatión y se centrifugó a -4°C dentro de la LH de la recogida. El plasma se separó y se dividió en dos muestras, una para la medición de las catecolaminas plasmáticas y la otra para el análisis de nepicastato.

[0231] Las muestras de tejido también se tomaron de los perros en el final del estudio en caso de que se consideró necesario para analizar las catecolaminas de tejido en un momento posterior. En el día 15, 6 horas después de la dosis de la mañana, se tomó una muestra de sangre final (10 ml). Los perros fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.v.), colocado sobre una mesa de necropsia y se sacrificaron con una segunda inyección de pentobarbital (80 mg/kg, i.v.). Se realizó una transtoracotomía bilateral rápida y la incisión abdominal. Se tomaron biopsias de la arteria renal y el ventrículo izquierdo. El cráneo se abrió para exponer el lóbulo frontal de la corteza cerebral y se tomó una biopsia. Las muestras de tejido se pesaron, se colocaron en ácido perclórico helado de 0,4 M, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta que se analizó.

[0232] Norepinefrina de plasma (NE), dopamina (DA) y epinefrina (EPI) se analizaron por HPLC usando detección electroquímica. La concentración plasmática de nepicastato se determinó por HPLC usando detección electroquímica.

[0233] Las transformaciones Box-Cox indicaron que el logaritmo era una transformación de estabilización de varianza apropiada; por lo tanto, todos los análisis se realizaron en los valores de registro. El BQL (por debajo del límite de cuantificación) en la concentración de DA de perro 1 en el día 10 fue establecido en 0; 1n (0) se estableció en falta. El análisis se realizó usando un modelo mixto (utilizando PROC MIXED) con las variables categóricas de día y de tratamiento estando fijadas y el perro dentro del tratamiento de ser un factor aleatorio. Para los efectos fijos, se incluyó la interacción entre el día y el tratamiento, ya que la diferencia entre los grupos de fármaco y el placebo varía de día a día. Contrastes se calcularon utilizando la sentencia de contraste, que tiene en cuenta correctamente los términos de error para cada contraste particular. En particular, los contrastes que comparan el grupo de tratamiento al grupo de fármacos utiliza el cuadrado medio de perro por su término de error, mientras que las comparaciones utilizadas para establecer el estado de equilibrio se encuentran dentro de comparaciones de perro, y requieren cuadrado medio del error.

[0234] El período de tiempo de estado estacionario se calculó utilizando la transformación Helmert (cf. manual de SAS PROC GLM). Estas transformaciones comparan cada medio de tratamiento con la media de los medios de tratamiento de los puntos de tiempo siguientes. El período de estado estacionario se define para comenzar en el primer punto de tiempo después de la hora máxima a la que el contraste de Helmert es estadísticamente significativo. Sin embargo, ya que este método puede no detectar un proceso de cambio continuo, como parece que podría ser el caso aquí, también se calculó la pendiente de la concentración de analito durante el período de estado estacionario. La pendiente durante el período de estado estacionario se calculó para cada perro individualmente, produciendo una pendiente por animal. Estadística univariante en las laderas se calcularon entonces, con intervalos de confianza de teoría normal construidos sobre la pendiente media, y se puso a prueba la hipótesis de la pendiente

igual a cero, y se calculó su valor normal p-teoría. Este análisis pendiente se usó como la base para determinar si el período de estado estacionario fue un período de cambio de concentración.

5 **[0235]** Cuando se compara con el grupo de placebo, el nepicastato (2 mg/kg, b.i.d.) produjo disminuciones significativas en plasma NE (2,1 veces) y EPI (1,91 veces) y aumentos significativos en plasma DA (7,5 veces) y la relación de DA/NE (13,6 veces).

10 **[0236]** Se observaron los picos de disminuciones en plasma NE y EPI en el día 6 y el día 8, respectivamente, mientras que se observaron los picos de los aumentos de plasma DA y la relación DA/NE en el día 7 y el día 6, respectivamente. Los efectos sobre plasma NE, DA y EPI alcanzaron el estado de equilibrio en aproximadamente 4, 8 y 6 días después de la dosis, respectivamente. Los cambios en plasma DA y la relación DA/NE fueron significativamente diferentes del placebo en todos los días después de la dosis. Los cambios en plasma NE fueron significativamente diferentes del placebo en los días 4-9 y días de post dosis 11-13. Los cambios en plasma EPI fueron significativamente diferentes del placebo en los días 7-9 y el día 12 después de la dosis.

15 **[0237]** La administración de nepicastato (2 mg/kg, b.i.d.) produjo niveles significativos de la droga en todos los días de plasma. Se observaron los niveles de pico a los 2 días después de la dosis. No se detectaron niveles significativos de metabolito N-acetilo del nepicastato en cualquiera de los días.

20 **[0238]** La administración crónica (14,5 días) de nepicastato (2 mg/kg, b.i.d., p.o.) produjo disminuciones significativas en plasma NE y EPI y aumentos significativos en plasma DA y la relación DA/NE. Estos cambios reflejan la inhibición del sistema simpatoadrenal a través de la inhibición de la enzima de α -hidroxilasa de dopamina.

25 Ejemplo 16

30 **[0239]** Nepicastato se pesó y se puso en cápsulas (tamaño 13-Torpac; East Hanover, NJ) para producir dosis de 5, 15 y 30 mg/kg por cápsula (dada b.i.d. para dar dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día). Se utilizó el peso de perro inicial para determinar la dosis para cada animal. Los perros que recibieron 0 mg/kg/día recibieron cápsulas vacías (placebo). Todas las dosis de nepicastato se administraron como equivalentes de base libre.

35 **[0240]** Treinta y dos perros beagle machos, con un peso de 10-12 kg, fueron asignados al azar a uno de los siguientes 4 grupos de tratamiento (n = 8 por grupo): nepicastato a 0 mg/kg/día (placebo), 10 mg/kg/día (5 mg/kg dos veces), 30 mg/kg (15 mg/kg b.i.d.), o 60 mg/kg/día (30 mg/kg b.i.d.). Números de perro 1-16 fueron asignados como grupo de dosis A y números de perros 17-32 como grupo de dosis B. La cirugía terminal para la cosecha de tejidos se realizó durante 2 días con 16 animales estudiados por día. Dos o 3 días antes de la primera administración del compuesto se pesó cada perro y se afeitó regiones de la piel que recubren ambas venas cefálicas, safena y yugulares. Dosificación consistió en la administración oral de una cápsula con la segunda administrada 8-10 horas más tarde. Los perros fueron dosificados como estaba previsto en los días 1-3. En el día 4, antes de la dosis de la mañana, se obtuvieron 3 ml de sangre de una vena yugular para la determinación de niveles de de línea de base de compuesto de plasma. Entonces al perro se le administró la dosis de la mañana y a las 1, 2, 4 y 8 h después de la dosis, se recogieron muestras de sangre adicionales de 3 ml para la determinación de niveles de compuesto de plasma. Las muestras de sangre se pusieron en tubos que contenían heparina, se centrifugaron a 4°C y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. La dosis PM se administró a continuación, como estaba previsto. La dosis AM se administró como estaba previsto en los días de la cirugía. Aproximadamente 6 horas después de la dosis de la mañana, una muestra de sangre final de 3 ml se tomó de la vena yugular para la determinación de niveles de compuesto de plasma. Entonces el perro se anestesió con pentobarbital Na (~ 40 mg/kg), administrado i.v. en una vena cefálica o safena, y administrado a la sala de necropsia donde se administró una dosis adicional de pentobarbital Na (~ 80 mg/kg, i.v.). El ventrículo izquierdo, la arteria renal, riñón, médula renal, la corteza renal y la corteza cerebral A continuación se recogieron rápidamente, se pesaron, se metieron en 2 ml de ácido perclórico de 0,4 M helado, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta su análisis para catecolaminas por HPLC usando detección electroquímica. Todas las muestras de tejido se dividieron en 2 partes, la segunda de las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C para la determinación de niveles de compuesto de tejido. Una tercera muestra transmural tomada desde el ventrículo izquierdo se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C para su uso en estudios de unión de receptores.

55 **[0241]** Los ventrículos se homogeneizaron en 50 mM Tris-HCl, 5 mM de tampón de Na₂EDTA (pH 7,4 a 4°C) usando un disruptor de tejidos Polytron P-10 (ajuste 10, 2 x 15 segundos ráfagas). Los homogeneizados se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos y los sobrenadantes se almacenaron en hielo. Los sedimentos se lavaron por resuspensión y centrifugación a 500 x g y los sobrenadantes combinados. Los sobrenadantes combinados se centrifugaron a 48.000 x g durante 20 minutos. Los sedimentos se lavaron por resuspensión y centrifugación una vez en tampón de homogeneización y dos veces en 50 mM Tris-HCl, tampón EDTA 0,5 mM (pH 7,4 a 4°C). Las membranas se almacenaron a -70°C hasta su utilización. Los experimentos de saturación se realizaron utilizando [³H] CGP-12177 en tampón que contiene 50 mM Tris-HCl, EDTA 0,5 mM (pH 7,4 a 32°C). La unión no específica se definió por 10 μM de isoproterenol. Tubos unidos totales, unidos no específicos y de recuento total se establecen para ocho concentraciones de [³H] CGP-12177 que van desde 0,016 nM a 2 nM. Las muestras se incubaron a 32°C durante 60 minutos. Las muestras se filtraron sobre filtros de fibra de vidrio GF/B tratados previamente con 0,1% de

PEI empleando un recogedor de células Brandel. Las muestras se lavaron con agua de temperatura ambiente tres veces durante 3 segundos. Se añadió fluido de centelleo Aquasol a cada vial y se determinó la radiactividad por recuento de centelleo líquido. Las isothermas de unión de saturación se analizaron después de convertir primero la concentración total de ligando a concentraciones de ligando libre (unido total = libre). Isothermas de saturación individuales se completaron para cada tejido. Las membranas se sometieron a ensayo para la proteína usando el método de unión y el uso de globulina gamma como el estándar de la proteína Bio-Rad. La densidad de los receptores se expresaron, por mg de proteína, como media para cada grupo de tratamiento. Los niveles de catecolaminas de tejido se analizaron mediante la comparación de los grupos de nepicastato tratados con grupos tratados con placebo (control). Un análisis de varianza no paramétrico de una vía (ANOVA) con el factor de dosis se realiza para cada tejido y cada medida de catecolaminas por separado. Análisis por pares entre tratados y controles en cada dosis se llevaron a cabo utilizando la prueba de Dunnett para controlar la tasa de error de experimento. Pruebas de LSD de Fisher Student-Neuman-Kuels se realizaron como validación. Análisis de los niveles de tejido y compuestos de plasma se realizaron en 2 maneras. En primer lugar, las pruebas t individuales se llevaron a cabo para comparar cada nivel de dosis a un nivel factorizado de su dosis asociada para cada parámetro. Por ejemplo, tres veces el nivel de compuesto presente en 10 mg/kg en un tejido o plasma particular, debería ser comparable al nivel de compuesto observado en el grupo de 30 mg/kg. Además, un contraste ortogonal lineal se calculó para las tres dosis en el contexto de ANOVA de una vía. Se utilizó una prueba t pareada para determinar cualquier diferencia en la unión entre el grupo tratado con vehículo y el grupo de nepicastato de 10 mg/kg/día.

[0242] A los perros se les administró por vía oral 0, 5, 15, o 30 mg/kg b.i.d. de cápsulas de nepicastato para dar dosis de 10, 30, y 60 mg/kg/día durante 4,5 días y el tejido se recogió 6 horas después de la administración final. En la arteria renal, nepicastato administrado a dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día de manera significativa ($p < 0,01$) disminuyó los niveles de norepinefrina en un 86%, 81% y 85%, respectivamente. Los niveles de dopamina fueron significativamente ($p < 0,01$) aumentados con dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día por 180%, 273% y 268%, respectivamente. Las dosis de nepicastato de 10, 30 y 60 mg/kg/día significativamente ($p < 0,01$) aumenta la relación de dopamina/norepinefrina por 1,711%, 1,767% y 1,944%, respectivamente, en comparación con placebo. Siguiendo el modo de gestión de nepicastato de 10 y 60 mg/kg/día, los niveles de dopamina se aumentaron significativamente ($p < 0,01$) 632% y 411%, respectivamente, en la corteza cerebral. La relación dopamina/norepinefrina se aumentó significativamente ($p < 0,01$) 531% después de 10 mg/kg/día nepicastato y 612% después de la administración de 60 mg/kg/día nepicastato. Los niveles de norepinefrina no se vieron afectados significativamente ($p > 0,01$) en estas 2 dosis. A 30 mg/kg/día, norepinefrina se redujo significativamente ($p < 0,01$) en un 63% y la proporción se elevó significativamente ($p < 0,01$) por 86%, mientras que los niveles de dopamina marginalmente ($0,05 < p < 0,10$) se aumentaron 174%, en comparación con el placebo. Tras la administración de nepicastato de 10, 30 y 60 mg/kg/día, los niveles de noradrenalina se disminuyeron significativamente ($p < 0,01$) en un 85%, 58% y 79%, respectivamente en el ventrículo izquierdo. La relación de dopamina/norepinefrina se aumentó significativamente ($p < 0,01$) 852%, 279% y 607%, respectivamente, en comparación con animales tratados con placebo. No se observaron cambios significativos en los niveles de dopamina a dosis de nepicastato de 10, 30 y 60 mg/kg/día.

[0243] En la corteza renal, en comparación con placebo, los niveles de norepinefrina se redujeron significativamente ($p < 0,01$) en un 86%, 66% y 85%, respectivamente, después de dosis de nepicastato de 10, 30 y 60 mg/kg/día. Los niveles de dopamina se aumentaron significativamente ($p < 0,01$) 156%, 502% y 208%, respectivamente, a estas dosis. La relación de dopamina/norepinefrina se aumentó significativamente ($p < 0,01$) en 1653%, 1,440% y 1,693%, respectivamente, a dosis de 10, 30, y 60 mg/kg/día. En la médula renal, las proporciones de dopamina/norepinefrina se aumentaron significativamente ($p < 0,01$) en 555%, 636% y 677%, respectivamente, a dosis de nepicastato de 10, 30 y 60 mg/kg/día, en comparación con placebo. Los niveles de dopamina se aumentaron significativamente ($p < 0,01$) 522% a 30 mg/kg/día y se aumentaron marginalmente ($0,05 < p < 0,10$) en un 150% y 156%, respectivamente, en 10 y 60 mg/kg/día. Los niveles de noradrenalina se disminuyeron significativamente ($p < 0,01$) 72% tras la administración de nepicastato de 10 mg/kg/día, en comparación con el placebo, y marginalmente ($0,05 < p < 0,10$) se disminuyeron en un 69% después de 60 mg/kg/día.

[0244] El análisis estadístico indicó que la concentración de nepicastato en plasma obtenido en el Día 4 y el tejido y plasma obtenido en el Día 5 fue proporcional a la dosis entre cada nivel de dosis y factorizar los niveles de su dosis pareja. Por lo tanto, los puntos de dosis se determinaron para ser lineales, con las siguientes excepciones (un resultado significativo sugiere que los datos no son lineales):

Médula renal: $3 \times 10 < 30$ ($p < 0,05$)
 Médula renal: $6 \times 10 < 60$ ($p = 0,077$)
 Plasma (día 4): $2 \times 30 > 60$ ($p = 0,076$)

[0245] En el Día 5, los niveles de nepicastato en todos los tejidos examinados fueron más altos que los de plasma.

[0246] Los resultados no demostraron ninguna diferencia entre las muestras del ventrículo izquierdo del grupo tratado con nepicastato de 10 mg/kg/día y el grupo tratado con vehículo.

Ejemplo 17

[0247] Nepicastato se evaluó por su actividad en una gama de enzimas que incluye la hidroxilasa de tirosina, sintasa NO, fosfodiesterasa III, fosfolipasa A₂, endopeptidasa neutra, Ca²⁺/proteína calmodulina quinasa II, sintetasa de CoA de acetilo, transferasa de acilo de CoA-colesterol de acilo, reductasa HMG-CoA, quinasa de proteína (no selectiva) y ciclooxigenasa-I. Como se muestra en la Figura 4, el nepicastato tenía un CI₅₀ de >10 µM en todas las 12 enzimas estudiadas, y por lo tanto es un inhibidor altamente selectivo (> 1000 veces) de la α-hidroxilasa de dopamina.

Ejemplo 18

[0248] Bovina DBH de las glándulas suprarrenales se obtuvo de Sigma Chemicals (St. Louis, MO). DBH secretora humana se purificó a partir del medio de cultivo de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH y se utilizó para obtener los datos de inhibición. Una columna de lectina-sefarosa de lentilo que contiene 25 ml de gel se preparó y se equilibró con 50 mM KH₂PO₄, pH 6,5, 0,5 M NaCl. La columna se eluyó con 35 ml de 10% de metilo α, D-manopiranosido en 50 mM KH₂PO₄, pH 6,5, NaCl 0,5 M a 0,5 ml/min. Las fracciones que contenían actividades más enzimáticas se agruparon y se concentraron con una célula agitada Amicon utilizando una membrana YM30. Metilo α, D-manopiranosido se eliminó por intercambio de tampón con 50 mM de KH₂PO₄, pH 6,5, 0,1 M de NaCl. La solución de enzima concentrada se repartió en alícuotas y se almacenó a -25°C.

[0249] Un ensayo de HPLC se utilizó para medir la actividad de DBH utilizando tiramina y ascorbato como sustratos. El método se basa en la separación y cuantificación de tiramina y octopamina por cromatografía HPLC en fase inversa (Feilchenfeld, NB, Richter, H. & Waddell, WH (1982) Anal Biochem: Un ensayo de resolución temporal de la actividad de α-hidroxilasa de dopamina utilizando cromatografía líquida de alta presión 122: 124-128). El ensayo se realizó a pH 5,2 y 37°C en 0,125 M NaAc, fumarato 10 mM, 0,5 ~ 2,0 µM CuSO₄, 0,1 mg/ml de catalasa (6500 u, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), 0,1 mM de tiramina, y 4 mM de ascorbato. En un ensayo típico, se añadieron 0,5-1,0 mili-unidades de la enzima a la mezcla de reacción y después se añadió una mezcla de sustrato que contiene la catalasa, la tiramina y el ascorbato para iniciar la reacción (volumen final de 200 µl). Las muestras se incubaron a 37°C durante 30 ~ 40 minutos. Las reacciones se inactivaron mediante la disolución de parada que contenía EDTA 25 mM y 240 µM 3-hidroxitiramina (patrón interno). Las muestras (150 µl) se cargaron a un automuestreador Gilson y se analizaron por HPLC usando detección UV a 280 nm. Software PC-1000 (productos Thermo Separations, Fremont, CA) se utilizó para el análisis de la integración y de datos. La carrera de HPLC se llevó a cabo a la velocidad de flujo de 1 ml/min utilizando una columna LiChroCART 125-4 RP-18 y elución isocrática con 10 mM de ácido ácida, ácido 1-heptanosulfónico 10, fosfato de tetrabutilamonio 12 mM, y 10% de metanol. La actividad porcentual restante se calculó basándose en el control sin inhibidor, se corrigió utilizando estándares internos y se ajustaron a una curva de respuesta a la dosis de 4 parámetros no lineal para obtener los valores CI₅₀.

[0250] La purificación de [¹⁴C]-Tyramina. [¹⁴C] Hidrocloruro de tiramina se purificó por una columna de carga ligera C18 (dos columnas combinadas en una) que se lavó con 2 ml de MeOH, 2 ml de 50 mM KH₂PO₄, pH 2,3, 30% de acetonitrilo, y luego 4 ml de 50 mM KH₂PO₄, pH 2,3. Un colector de vacío (Speed Mate 30, de Applied Separations) se utilizó para lavar y eluir la columna por vacío. Después de la carga de [¹⁴C] tiramina, la columna se lavó con 6 ml de 50 mM de KH₂PO₄, pH 2,3 y se eluyó con 2 ml de 50 mM de KH₂PO₄, pH 2,3 que contiene 30% de acetonitrilo. El eluato se liofilizó para eliminar el acetonitrilo, se resuspendió en H₂O, y se almacenó a -20°C.

[0251] Ensayo de enzimas por el Método Radiactivo. La actividad enzimática se ensayó usando [¹⁴C tiramina] como sustrato y una columna C18 para separar el producto. El ensayo se realizó en el volumen de 200 ml que contiene 100 mM NaAc, pH 5,2, 10 mM de ácido fumárico, 0,5 µM de CuSO₄, ácido ascórbico 4 mM, 0,1 mg/ml de catalasa y diversas concentraciones de tiramina. Los recuentos totales de cada reacción era ~ 150.000 cpm. DBH bovina (0,18 ng para cada reacción) se mezcló con tiramina e inhibidor en el tampón de reacción a 37°C. La reacción se inició mediante la adición de ascorbato de mezcla/catalasa y se incubó a 37°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo por la adición de 100 ml de 25 mM de EDTA, 50 mM de KH₂PO₄, pH 2,3. Toda la mezcla se cargó a una columna de carga ligera C18 (dos combinadas en una sola) que se pre-lavó con MeOH y se equilibró con 50 mM de KH₂PO₄, pH 2,3. La elución en viales de centelleo se llevó a cabo con 1 ml de KH₂PO₄, pH 2,3 tampón dos veces, seguido de 2 ml del mismo tampón. Se añadió fluido de centelleo ReadySafe (16 ml) a los viales de centelleo y las muestras se contaron para radiactividad de ¹⁴C.

[0252] Concentraciones de nepicastato de 0, 1, 2, 4, 8 nM se utilizaron para estudiar la cinética de inhibición a las siguientes concentraciones de tiramina: 0,5, 1, 2, 3, 4 mM. Los recuentos de ¹⁴C eran idénticos en cada reacción que se llevó a cabo como se describe anteriormente. Un control en blanco sin la enzima se utilizó para obtener el fondo. Los datos se corrigieron para el fondo, se convirtieron a la actividad en nmol/min, y se representaron (1/V vs 1/S). Km' se calculó a partir de las pendientes y Y intercepta y regresión lineal se utilizó para obtener valor de Ki.

[0253] Los valores de CI₅₀ para SKF-102698, nepicastato y el Compuesto B contra DBH humana y bovina se obtuvieron utilizando el ensayo de HPLC en las concentraciones de sustrato de tiramina 0,1 mM, ascorbato de 4 mM a pH 5,2 y 37°C. Los tres compuestos provocaron una inhibición dependiente de la dosis de la actividad de DBH en enzima tanto bovina como humana.

[0254] Los valores de CI₅₀ se calcularon para nepicastato, el Compuesto B y SKF-102698 mostraron que el

enantiómero S (nepicastato) era más potente que el enantiómero R (Compuesto B por 3 veces contra DBH bovina y 2 veces) contra la enzima humana. Nepicastato era más potente que SKF-102698 por 8 veces frente a la enzima bovina, y 9 veces contra DBH humano.

5 **[0255]** Una K_m de 0,6 mM se determinó a partir de la gráfica de Lineweaver-Burk. Nepicastato (1-8 nM) causó un cambio importante en K_m , como se predijo para un inhibidor competitivo. La inhibición de la DBH bovina por nepicastato parece ser competitiva con tiramina. Una K_i de $4,7 \pm 0,4$ nM se calculó por regresión lineal.

10 **[0256]** Nepicastato era un potente inhibidor de DAP tanto humana como bovina. Era 8-9-veces más potente que SKF-102698. Nepicastato (el enantiómero S) es 2-3 veces más potente que el Compuesto B (el enantiómero R). La inhibición de la DBH bovina por nepicastato parecía ser competitiva con tiramina, con una K_i de $4,7 \pm 0,4$ nM.

Ejemplo 19

15 **[0257]** La afinidad de nepicastato se determinó en los ensayos de enlaces descritos utilizando los métodos de unión de filtración de radioligandos estándares.

20 **[0258]** Datos de unión competitiva se analizaron por ajuste de curva iterativa a una ecuación logística de cuatro parámetros. Coeficientes de Hill y Cl_{50} se obtuvieron directamente. pK_i (-log de K_i) de ligandos de competencia se calcularon a partir de valores de Cl_{50} utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff.

[0259] nepicastato tenía una afinidad moderada por receptores α_1 (pK_i de 6,9 a 6,7). La afinidad a todos los otros receptores examinados fue relativamente baja ($pK_i < 6,2$).

Ejemplo 20

25 **[0260]** En el momento de la dosificación, una formulación de nepicastato de 60-mg/ml se preparó mediante la mezcla de vehículo con polvo de nepicastato, seguido de agitación. Las formulaciones de nepicastato de 6- y 20-mg/ml se prepararon por dilución de la formulación de 60-mg/ml con vehículo. Las formulaciones de nepicastato reconstituidas retuvieron la potencia durante la duración de uso. Las formulaciones de vehículos y el nepicastato acuosas contenían hidroxipropilmetilcelulosa, alcohol bencílico, y polisorbato 80.

30 **[0261]** La selección de la dosis se basó en un estudio de toxicidad aguda en la que los ratones se les administraron dosis orales únicas de 250, 1000, o 2500 mg/kg de nepicastato. Los signos clínicos de toxicidad y muerte se produjeron en 1000 y 2500 mg/kg.

35 **[0262]** Una dosis oral única de la formulación de vehículo o nepicastato se administró por sonda a cada ratón utilizando un intubador de roedor. La vía oral se seleccionó porque es una ruta clínica propuesta de administración. Volúmenes de dosis se calcularon sobre la base de los pesos corporales individuales registrados antes de la dosificación (datos de peso corporal no se tabulan en este informe). Alimentos y agua fueron retenidos de los ratones de 2,5 a 3,5 horas antes de la dosificación, en lugar de 1,5 horas como se especifica en el protocolo. Este desvío no afecta a la integridad del estudio.

40 **[0263]** Las observaciones clínicas se registraron antes de dosificación. A partir de 60 minutos después de la dosificación, los ratones en cada grupo de tratamiento se evaluaron en grupos de hasta 3 en un intervalo de aproximadamente 10 minutos cada uno para las observaciones clínicas y las pruebas de comportamiento especificadas en el protocolo. Un ratón en el grupo de 30 mg/kg y 1 ratón en el grupo de 100 mg/kg murieron después de la dosificación y fueron retirados del estudio. Los ratones supervivientes se sacrificaron y se retiraron del estudio al final del período de observación/prueba.

45 **[0264]** Los ratones en grupos de 6 machos cada uno se administraron dosis orales únicas de 0 (vehículo), 30, 100, o 300 mg/kg de nepicastato por sonda. Las observaciones clínicas y pruebas de comportamiento se iniciaron 60 minutos después de la administración de la formulación de ensayo. Al final del periodo de observación, todos los ratones supervivientes se sacrificaron y se retiraron del estudio.

50 **[0265]** Temperaturas corporales más bajas estaban presentes en los grupos de 30-, 100-, y 300 mg/kg en comparación con el grupo de control con vehículo. No hay cambios de comportamiento clínicos o brutos relacionados con el tratamiento estaban presentes. Datos de la temperatura corporal rectal se obtienen y se obtuvieron los datos de observación y prueba de comportamiento. Ningún cambio de comportamiento clínico o bruto relacionado con el tratamiento está presente. Agrupación social anormal (que aparece como otra reacción) se produjo entre los ratones en el grupo de 100 mg/kg, pero no el grupo de 300 mg/kg; este hallazgo fue considerado incidental. Cambios de comportamiento/clínicos en 1 ratón en el grupo de 100 mg/kg incluyen inactividad, alteración de la marcha y la postura, disminución de la actividad inducida, pasividad anormal, y la vocalización suave/continua; estos cambios no fueron atribuidos a nepicastato. Un ratón en el grupo de 30 y 100 mg/kg murió después de la dosificación; las muertes se consideraron incidentales y los ratones fueron retirados del estudio.

Ejemplo de Referencia 21

[0266] El propósito de este estudio consistió en determinar si los inhibidores de DBH SKF-102698 y el nepicastato produce cambios en la actividad locomotora o reactividad de sobresalto acústico. Por lo tanto cambios en estos comportamientos pueden reflejar la actividad de estos compuestos en el sistema nervioso central.

[0267] Ratas macho adultas Sprague Dawley (250-350 g en el día de estudio) se obtuvieron de Charles Rivers Labs. Las ratas se alojaron bajo un ciclo normal de luz/oscuridad con luces en entre 0900 h y 2100 h. Los animales se alojaron en pares en jaulas de alambre de metal estándar, y se permitió comida y agua ad libitum.

[0268] Las cajas de actividad locomotora consistían en un cuadro Plexiglas® de medición de 18" x 18" por 12" de altura. Alrededor de las cajas de Plexiglas® estuvieron Omnitech Digiscan Monitors (modelo # RXXCM 16) que consistía en una prohibición de una pulgada de sensores de luz y fotosensores de numeración 32 por caja. El número de roturas de PHOTOBEM se analizó por un Omnitech Digiscan Analyzer (modelo # DCM-8). Los animales se ensayaron en una habitación cerrada con un ruido blanco generador en funcionamiento para enmascarar los ruidos extraños.

[0269] Pruebas de reactividad de sobresalto acústico se llevaron a cabo en ocho estaciones de prueba automatizadas de SR-Lab (San Diego Instruments, San Diego, CA). Las ratas se colocaron individualmente en un cilindro Plexiglas® (10 cm de diámetro) que está alojado en un recinto de atenuación de sonido ventilado. Ráfagas de ruido acústico (un ruido de banda ancha con un tiempo de subida y caída de tiempo de 1 mseg) fue presentado a través de un altavoz montado de 30 cm por encima del animal. Un acelerómetro piezoeléctrico transforma el movimiento del sujeto en una tensión arbitraria en una escala de de 0 a 4095.

[0270] Antes de la administración del fármaco, cada una de setenta y dos ratas se colocaron en el aparato de sobresalto, y después de un período de adaptación de 5 minutos que recibieron un ruido acústico cada 20 segundos durante 15 minutos (45 sobresaltos en total). El sobresalto medio se calculó para cada rata tomando la media de número de sobresalto 11 a través de 45 (los primeros diez sobresaltos se tendrán en cuenta). Sesenta y cuatro de estas ratas se colocaron entonces en uno de los ocho grupos de tratamiento de manera que cada grupo tenía valores de sobresalto medios similares. Los ocho grupos de tratamiento fueron los siguientes: SKF-102698 (100 mg/kg) y su vehículo (50% de agua/50% de glicol de polietileno), clonidina (40 µg/kg), el nepicastato (3, 10, 30 y 100 mg/kg), y su vehículo, dH₂O. El trabajo previo ha demostrado que este procedimiento de adaptación es el más apropiado para sobresalto ya que hay una variabilidad significativa en la respuesta de sobresalto entre las ratas, pero un alto grado de consistencia dentro de ratas de un día al siguiente.

[0271] Cada día después de este procedimiento de prueba, ocho ratas (una rata de cada uno de los ocho grupos de tratamiento) se inyectó con su tratamiento de fármaco asignado e inmediatamente colocado individualmente en una caja de la actividad motora. La actividad motora de las ratas se controló durante cuatro horas. A continuación, las ratas se colocaron en una jaula de transferencia durante quince minutos. Al principio de estos quince minutos la rata a la que se ha asignado el tratamiento de clonidina recibirá otra inyección de 40 µg/kg. A continuación, las ratas se colocaron en el aparato de sobresalto, y después de un período de aclimatación de cinco minutos recibieron un ruido de 90 dB cada minuto durante cuatro horas.

[0272] Para evaluar la actividad motora, la actividad horizontal, número de movimientos, y se midieron el tiempo de descanso. Cada parámetro se analizó por separado. En cada intervalo de tiempo (o muestra), se realizó un análisis de dos vías de la varianza (ANOVA) utilizando los datos clasificados (técnica no paramétrica) para probar el efecto del tratamiento bloqueado por día. Las comparaciones por pares para los grupos tratados en el control del vehículo también se realizaron usando la prueba t de Dunnett.

[0273] Para evaluar la reactividad de sobresalto, para los 200 milisegundos inmediatamente posteriores a cada sobresalto, la fuerza media ejercida por cada rata de sorpresa sobre la totalidad de los 200 milisegundos, y la fuerza máxima, se midieron. Los voltajes máximo y promedio de medias (MAXMEAN y AVGMEAN) se calcularon para cada tratamiento (TREAT) en cada ensayo (TRIALN), y a continuación, estos valores se representaron gráficamente frente al número de ensayo para cada tratamiento. Las parcelas se adjuntan al informe. Ensayos 1-60 se fijaron a tiempo = 1, los ensayos 61-120 a tiempo = 2, los ensayos 121-180 a tiempo = 3 y los ensayos 181-240 a tiempo = 4. Las respuestas de sobresalto máximo y promedio de medias se calcularon en cada momento y para cada tratamiento. Los medios se utilizaron luego en el análisis estadístico. Las respuestas de sobresalto se analizaron mediante análisis de covarianza. Comparaciones de tratamiento dentro del tiempo eran de interés para los investigadores, pero no tienen tiempo de efectos dentro de los tratamientos. Por lo tanto, las respuestas de sobresalto se analizaron por el tiempo. El modelo incluyó términos para el día en el que la rata se puso a prueba (fecha), respuesta de sobresalto de línea de base, y el tratamiento. Fecha era un factor de respuesta de sobresalto y la línea de base fue el bloqueo de una covariable. Había tres modelos separados para cada uno de los objetivos indicados anteriormente. Las dosis variables de nepicastato se compararon con vehículo usando el procedimiento de Dunnett con el fin de controlar para comparaciones múltiples.

[0274] Cuando los cuatro grupos de nepicastato tratados se compararon con los controles tratados con vehículo, no

hubo en general diferencias significativas por parejas en cualquier momento examinado en cualquiera de los 3 parámetros.

5 **[0275]** Cuando se compara con los controles tratados con vehículo, el grupo tratado con clonidina tenía actividades significativamente más horizontales en 2 y 2,5 horas, significativamente más movimientos en 2 horas, y tiempo de descanso significativamente menor a las 2 horas (todo $p < 0,05$). Tenga en cuenta que el grupo tratado con clonidina tenía significativamente más tiempo de descanso que los controles tratados con vehículo a 1 hora ($p < 0,05$).

10 **[0276]** Cuando se compara con los controles tratados con vehículo, el grupo tratado con SKF-102698 tenía actividades significativamente menos horizontales y significativamente menos movimientos en 2,5 horas (tanto $p < 0,05$). Tenga en cuenta que el grupo tratado con SKF-102698 tuvo significativamente más movimientos que los controles tratados con vehículo en 1,5 y 4 horas (ambos $p < 0,05$). No se detectaron diferencias significativas entre SKF-102698 y vehículo en cualquier momento examinado en el tiempo de descanso.

15 **[0277]** En general, la actividad horizontal y el número de movimientos se disminuyó durante las primeras 2 horas y se mantuvo baja para las últimas 2 horas. Del mismo modo, el tiempo de descanso se aumentó durante las primeras 2 horas y permaneció elevado durante las últimas 2 horas.

20 **[0278]** Nopicastato no tuvo efectos significativos sobre la actividad locomotora en ratas. Los animales tratados con 3, 10, 30 o 100 mg/kg de nopicastato no fueron significativamente diferentes de los controles tratados con vehículo en cualquier momento examinado en la actividad horizontal, nº de movimientos o tiempo de descanso.

25 **[0279]** En respuesta de sobresalto, los efectos globales de tratamiento para nopicastato y el vehículo no fueron significativos ($p > 0,05$) en cualquier momento, para cualquiera de las respuestas. El efecto global del tratamiento para la respuesta media de sobresalto en el momento 2 fue marginalmente significativo ($p = 0,0703$), y la prueba de Dunnett reveló que nopicastato de 30 mg/kg tuvo una respuesta de sobresalto media significativamente mayor que el grupo de vehículo ($p < 0,05$). La respuesta de sobresalto media de línea de base fue estadísticamente significativa en tiempos 3 y 4 para ambas respuestas ($p \delta 0,05$), y marginalmente significativa a veces 1 y 2 para la máxima respuesta de sobresalto, y en tiempo de 2 para la respuesta de sobresalto media ($p \delta 0,10$).

30 **[0280]** SKF-102698 (100 mg/kg) no fue estadísticamente significativamente diferente de vehículo en cualquier momento, para cualquiera de las mediciones de respuestas de sobresalto.

35 **[0281]** La clonidina tenía respuestas de sobresalto medias estadísticamente significativamente más bajas máximas que el vehículo en el momento 1 ($p < 0,01$) y en el tiempo 2 de sobresalto medio solamente ($p = 0,0352$). La respuesta de sobresalto máximo en el tiempo 2 y el promedio de respuesta de sobresalto en el tiempo 3 para el grupo de clonidina fueron marginalmente significativamente más bajas que el grupo de agua.

40 **[0282]** Nopicastato administrado a los 3, 10, 30, o 100 mg/kg no parece efectuar el máximo o promedio de respuesta de sobresalto en ratas en cualquier momento cuando se compara con vehículo. SKF-102698 se comportó de manera similar al vehículo (PEG), para ambas respuestas de sobresalto en todo momento. La clonidina redujo con éxito tanto la respuesta máxima como media de sobresalto en tiempos anteriores, y se comportó de manera similar al vehículo durante los últimos tiempos.

45 Ejemplo de Referencia 22

50 **[0283]** Se examinaron los efectos de la administración crónica de nopicastato en ratas. Entre tres y trece días antes del primer día de dosificación, las ratas se colocaron en el interior del aparato de sobresalto y después de un período de aclimatación de cinco minutos que se presentaron con un ruido 118dB en promedio una vez por minuto (se utilizará un intervalo inter-ensayo variable que oscila entre 30 y 90 segundos) durante 20 minutos. Las respuestas de sobresalto se midieron y un medio para las últimas veinte respuestas de sobresalto se calcularon para cada rata. Las ratas se colocaron aleatoriamente en uno de los ocho grupos de tratamiento (nopicastato, 5, 15 o 50 mg/kg, b.i.d.; SKF-102698, 50 mg/kg, b.i.d.; clonidina, 20 µg/kg, b.i.d.; d-anfetamina, 2 mg/kg, b.i.d.; dH₂O o ciclodextrina (vehículo de SKF-102698) las ratas se dosificaron mediante sonda oral con un volumen de dosificación de 10 ml/kg las ratas se dosificaron por la mañana y por la tarde todos los días durante diez días. El tiempo entre la mañana y la dosificación vespertina será de entre 6 y 10 horas. El trabajo previo ha demostrado que este procedimiento de adaptación es más apropiado para la reactividad de sobresalto acústico, ya que hay una variabilidad significativa en la respuesta de sobresalto entre las ratas, pero un alto grado de coherencia dentro de ratas de un día al siguiente.

60 **[0284]** Ya que era imposible examinar todas las 96 ratas (8 grupos de tratamiento, $n = 12$) en el mismo día, el programa de dosificación se escalonó de tal manera que sólo 8 ratas se llevaron a cabo todos los días. Estos 12 grupos de ocho ratas cada uno consistía en una rata de cada uno de los ocho grupos de tratamiento de modo que los grupos de tratamiento estaban equilibrados a lo largo de los días. Además, todos los grupos de tratamiento fueron equilibrados a través de las ocho cámaras de actividad de motor, sin embargo, los grupos de tratamiento podrían no equilibrarse a través de las cámaras de sobresalto.

65

[0285] Las siguientes pruebas de comportamiento se administraron durante y después de la dosificación crónica; la temperatura corporal, la actividad motora, la reactividad de sobresalto acústico, y la inhibición pre-pulso de sobresalto acústico.

5 **[0286]** Los animales se ensayaron en una habitación cerrada con un blanco generador de ruido en funcionamiento. Pruebas de la actividad motora se realizaron inmediatamente después de la lectura de la temperatura corporal central tomada en la dosificación en el día diez (aproximadamente 3 horas y 35 minutos después de la dosis diaria de la mañana de nepicastato, y SKF-102698, y 20 minutos antes de la administración diaria de la clonidina y d-anfetamina en día diez de dosificación). Pruebas de la actividad motora se realizaron durante una hora. Un programa de diagnóstico se ejecuta en cada uno de las cámaras de actividad del motor antes de cada sesión de pruebas para asegurar que los haces de fotos y sensores de luz estaban operando correctamente. La actividad motora se ha demostrado ser sensible a los cambios en los niveles de dopamina centrales (Dietze y Kuschinsky, 1994) que hace este ensayo de comportamiento un ensayo sensible potencial de los efectos de inhibidores de DBH in-vivo. D-anfetamina se utilizó como control positivo para este ensayo.

15 **[0287]** Temperaturas del núcleo del cuerpo de la rata se obtuvieron mediante la inserción de la sonda rectal 2 cm en el colon de cada rata. La temperatura corporal central de cada rata se midió tres veces y se calculó la media de las tres lecturas. Lecturas de la temperatura corporal central se obtuvieron inmediatamente antes del calendario de dosificación crónica de diez días (para obtener una línea de base), y tres horas y media después de la dosis diaria por la mañana de nepicastato, y SKF-102698, y 15 minutos antes de la administración diaria de clonidina y d-anfetamina, en los días de dosificación de uno, cinco y diez. La temperatura corporal central se ha demostrado ser sensible a los dos niveles de dopamina y norepinefrina, lo que hace esta prueba de comportamiento un potencial de ensayo sensible a los efectos de inhibidores de DBH in-vivo. Tanto clonidina (un agonista alfa₂) como d-anfetamina (un liberador de dopamina) se utilizaron como los controles positivos para este ensayo.

20 **[0288]** La reactividad acústica de sobresalto (una serie de contracciones musculares provocadas por un intenso ruido con un inicio rápido), y la inhibición pre-pulso (gating sensoriomotor medido mediante el análisis de cualquier disminución en la reactividad de sobresalto que se produce cuando un estímulo sorprendente es precedido inmediatamente por un estímulo no sorprendente) fueron medidos en ocho estaciones de prueba SR-Lab (San Diego Instruments, San Diego, CA). Las ratas se colocaron individualmente en un cilindro de Plexiglas (10 cm de diámetro), que se encuentra en un recinto de atenuación de sonido ventilado. Ruidos acústicos (un ruido de banda ancha con un tiempo de subida y caída de tiempo de 1 mseg) se presentaron a través de un altavoz montado de 30 cm por encima del animal. Además, estos altavoces producen un nivel de 68 dB de ruido de fondo a lo largo de todas las sesiones de prueba. Un acelerómetro piezoeléctrico unido debajo del cilindro de plexiglas transduce el movimiento del sujeto en una tensión que a continuación se rectifica y se digitaliza (en una escala del 0 al 4,095 mil) por un ordenador PC equipado con software SR-Lab y el montaje de interfaz. Un medidor de decibelios se utilizó para calibrar los altavoces en cada una de la estación de ocho de prueba a $\pm 1\%$ de la media. Además, un instrumento de calibración SR-Lab se utiliza para calibrar cada uno de los aparatos de detección de ocho de sobresalto a $\pm 2\%$ de la media. Pruebas de reactividad de sobresalto e inhibición prepulso se ejecutan simultáneamente alterando inmediatamente la prueba de la actividad motora (aproximadamente 4 horas y 40 minutos después de la inyección diaria de la mañana de nepicastato, y SKF-102698, y 10 minutos después de una administración suplementaria de la clonidina y la d-anfetamina en la dosificación en el día diez). La reactividad de sobresalto y pruebas de inhibición pre-pulso consistieron en colocar cada rata individual en una estación de prueba SR-Lab y después de un período de aclimatación de cinco minutos, las ratas se presentaron con uno de tres tipos diferentes de ruidos (y reacción de sobresalto medida) en promedio una vez por minuto (se usó un intervalo de ensayo intervariable que va entre 30 y 90 segundos) durante una hora (60 ráfagas de ruido totales y reacciones de sobresalto). Los tres tipos diferentes de ráfagas de ruido consistieron de una ráfaga de ruido fuerte (118 dB), y una ráfaga de ruido relativamente suave (77 dB), la ráfaga suave anterior a las ráfagas de ruido fuertes de 100 mseg (pre-pulso de prueba de inhibición). Estos ensayos se presentan en orden pseudo-aleatorio. Inhibición pre-pulso se ha demostrado ser sensible a los cambios en los niveles de dopamina mesolímbica. Además, la reactividad de sobresalto acústico también se ha demostrado ser sensible a los cambios en los niveles de dopamina y norepinefrina que hace estas pruebas de comportamiento un potencial de ensayo sensible a los efectos de inhibidores de DBH en vivo. La clonidina y la d-anfetamina sirvieron como el control positivo para la reactividad de sobresalto acústico e inhibición de pre-pulso de las pruebas de sobresalto acústico.

55 **[0289]** El programa de pruebas de comportamiento diarias era del siguiente modo. En $t = 0$, se inyecta inhibidor de DBH. Tras 3,5 horas, se mide la temperatura corporal central. A las 3 h, 35 minutos, se evalúa la actividad motora. A las 4 h, se evalúan 40 minutos, la reactividad de sobresalto y la inhibición pre-pulso.

60 **[0290]** Tres lecturas de temperatura se tomaron de cada sujeto por tiempo de prueba. Luego se calculó la media de estas tres lecturas.

[0291] Locomoción espontánea se obtuvo mediante el cálculo del número total de haces de foto que el sujeto se rompió durante la sesión de prueba.

65 **[0292]** La reacción del sujeto se midió durante cada ensayo para la ventana de 40 mseg después de que se

presentó el estímulo. Cada reacción de sobresalto se calcula tomando la media de 40 lecturas (una por milisegundo) empezando inmediatamente después de cada ráfaga de ruido. La reactividad de sobresalto acústico se calculó determinando la respuesta media para cada uno de los sujetos de sobresalto provocado por la explosión acústica de 118 dB. Valores de inhibición de pre-pulso se calcularon restando la respuesta de sobresalto media provocada por el ensayo emparejado de pulso de 77 dB - pulso de 118 dB (ensayo de inhibición pre-pulso descrito anteriormente) a partir del ensayo 118 dB solo y luego dividiendo este valor por el ensayo 118 db solo para cada rata, es decir, ([valor de ensayo 118 dB-valor de ensayo de inhibición pre-pulso] ÷ valor de ensayo 118 db).

[0293] Un ANOVA de una vía general con un efecto principal para el tratamiento se realizó en cada tiempo en el cambio de la línea base para cada animal. Pruebas t posteriores se realizaron para cada comparación de interés.

[0294] Se midió la actividad motora espontánea para cada animal cada 15 min durante 1 hora. Cada bloque de tiempo (cada 15 min) se analizó por separado. La prueba de Kruskal-Wallis (técnica no paramétrica) se realizó para probar la diferencia entre los grupos de tratamiento. Si no se detecta la diferencia significativa en general, a continuación, se hace un ajuste de Bonferroni para múltiples comparaciones.

[0295] La tensión media promedia (AVGMEAN) y la inhibición pre-pulso de porcentaje medio (RATIO) se calcularon para cada tratamiento (TREAT) y el tipo de ensayo (TRIALT) en cada ensayo (TRIALN). Valores de inhibición pre-pulso se calcularon restando la respuesta de sobresalto media provocada por el ensayo emparejado de pulso de 77 dB - pulso 118 dB (ensayo de inhibición pre-pulso descrito anteriormente) a partir del ensayo 118 dB solo y luego dividiendo este valor por el ensayo de 118 db solos para cada rata, es decir, ([valor de ensayo 118 dB - valor de ensayo de inhibición pre-pulso] ÷ valor de ensayo de 118 db).

[0296] Estos valores se representaron gráficamente frente al número de ensayo para cada tratamiento y tipo de ensayo, y estos gráficos están unidos al informe. Tenga en cuenta que el eje Y en los gráficos varía. Los ensayos 1-15 corresponden a tiempo 1, 16-30 tiempo 2, 31-45 tiempo 3, y 46-60 tiempo 4. Se adjuntan también los gráficos que muestran el porcentaje medio de la inhibición pre-pulso y el sobresalto medio aritmético de los animales a través del tiempo para cada tratamiento.

[0297] La respuesta de sobresalto medio y la inhibición pre-pulso de porcentaje se analizaron usando análisis de varianza. El modelo incluyó términos para el tratamiento, los animales anidados dentro del tratamiento, el tiempo y el tratamiento por tiempo de interacción. Efectos generales de tratamiento se ensayaron usando el término de error para los animales anidados dentro tratamiento. Se estudiaron los efectos del tratamiento en general y los efectos del tratamiento por el tiempo. El método de diferencias menos significativos de Fisher se utilizó para ajustar para comparaciones múltiples. Si el tratamiento global o el tratamiento por los efectos del tiempo no fueron significativos (p -valor > 0,05) y luego se hizo un ajuste de Bonferroni. Si los efectos generales de tratamiento no fueron significativos, a continuación, el ajuste se aplica a las comparaciones por pares específicos. Además, si el efecto específico de tratamiento por pares no fue significativo (p -valor > 0,05), entonces el ajuste se aplica también a los efectos del tratamiento en el tiempo. Si tanto el tratamiento en general como el tratamiento por los efectos del tiempo no fueron significativos (p -valor > 0,05), entonces un ajuste de Bonferroni se hizo para las comparaciones individuales dentro del tiempo y un promedio en el tiempo.

[0298] El cambio de pre-dosis en los pesos corporales se calculó para cada animal para el análisis. A medidas repetidas de dos vías ANOVA se utilizó para la prueba de los efectos generales de tratamiento, el tiempo y el tratamiento por interacción en tiempo. Entonces, ANOVA de una vía se realizaron para comprobar el efecto de tratamiento en cada día.

[0299] Los controles positivos (d-anfetamina y clonidina) que aumentan significativamente la temperatura corporal central en día uno de la dosificación crónica, pero ningún otro compuesto no tenía ningún efecto significativo en la temperatura corporal central en cualquier momento.

[0300] El grupo de d-anfetamina tenía significativamente mayor actividad locomotora que el control del vehículo en todos los momentos examinados. El grupo de clonidina, sin embargo, no fue significativamente diferente de los controles de vehículo en cualquier tiempo examinado. El grupo SKF-102698 de 50 mg/kg b.i.d. tenía actividad locomotora significativamente menor que su control de vehículo en los primeros 45 minutos (es decir, muestras 1-3), pero no significativa después de 45 minutos.

[0301] No hubo ningún efecto significativo del tratamiento general para nepicastato en cualquier tiempo examinado. Las comparaciones por pares revelaron que ninguno de los grupos tratados con el nepicastato fueron significativamente diferentes de los controles del vehículo en cualquier tiempo examinado. Además, no hubo diferencia significativa entre los dos controles de vehículo (dH₂O y vehículo de SKF) en cualquier tiempo examinado.

[0302] Ninguno de los grupos de tratamiento produjo ningún cambio significativo en la inhibición pre-pulso. El efecto global de tiempo fue estadísticamente significativo para el grupo SKF-102698 y el grupo ciclodextrina ($p = 0,0001$). El tratamiento por interacción de tiempo fue estadísticamente significativo para ciclodextrina frente a dH₂O ($p = 0,0283$), pero no otros. Los efectos del tratamiento no fueron significativos para las comparaciones de interés. Sin

embargo, el grupo SKF tenía inhibición pre-pulso de porcentaje marginalmente mayor de comparación con el grupo de ciclodextrina ($p = 0,0782$).

5 **[0303]** Durante los tiempos 1 y 2, el grupo clonidina tenía inhibición pre-pulso de porcentaje simplemente significativamente mayor que el control del vehículo y no fueron significativamente diferentes de vehículo durante tiempos 3 y 4. Ni d-anfetamina ni SKF-102698 fue significativamente diferente de su propio vehículo en cualquier momento. Ninguno de los grupos de dosis nepicastato fueron significativamente diferentes de dH₂O en cualquier momento.

10 **[0304]** Sólo el grupo de tratamiento SKF-102698 produce un cambio significativo en la reactividad de sobresalto acústico. El efecto global de tiempo fue estadísticamente significativo para todas las comparaciones de interés (todos $p = 0,0001$). El tratamiento por interacción de tiempo fue estadísticamente significativo para las comparaciones de la anfetamina en comparación con clonidina de dH₂O, frente a dH₂O y ciclodextrina frente a dH₂O (todos $p < 0,05$), pero no otros. Los efectos del tratamiento fueron significativos para SKF-102698 de 50 mg/kg b.i.d. frente a ciclodextrina ($p = 0,0007$) y para nepicastato 50 mg/kg dos veces frente a SKF-102698 50 mg/kg dos veces ($p = 0,0047$), pero no otros. El grupo SKF-102698 50 mg/kg b.i.d. tenía significativamente menor respuesta de sobresalto en comparación con ciclodextrina, y también tenía respuesta de sobresalto significativamente menor en comparación con el grupo de nepicastato 50 mg/kg b.i.d.

20 **[0305]** El grupo SKF-102698 (50 mg/kg b.i.d.) tenía significativamente menor respuesta de sobresalto que el grupo de ciclodextrina en todo momento. Durante los tiempos 1 y 3, el grupo de nepicastato (50 mg/kg b.i.d.) tenía significativamente mayor respuesta de sobresalto que el grupo SKF-102698 (50 mg/kg b.i.d.). No se detectaron otras diferencias significativas.

25 **[0306]** No hubo diferencias significativas en general o por parejas en el peso corporal entre los grupos en la línea de base antes de la dosis.

30 **[0307]** El grupo de d-anfetamina tuvo un cambio significativamente menor en el peso corporal desde antes de la dosis que los controles de vehículo ($p < 0,01$). Cuando se analizaron dentro de cada día, los controles de vehículo tenían un aumento significativamente mayor de pre-dosis en el peso corporal que el grupo de la anfetamina en los días de tratamiento 4-10. El grupo de clonidina, sin embargo, no fue significativamente diferente de los controles de vehículo en cualquier tiempo examinado. El grupo SKF-102698 (50 mg/kg b.i.d.) mostró un aumento significativamente menor ($p < 0,01$) en el peso corporal de línea de base antes de la dosis de su vehículo de control (SKF-vehículo). Cuando se analizaron dentro de cada día, los controles de vehículo SKF tenía un aumento significativamente mayor desde antes de la dosis en el peso corporal que el grupo SKF-102698 en los días de tratamiento 2-10, excepto días 3 y 6. Es importante destacar, no hubo diferencia en los cambios en el peso corporal entre el vehículo SKF y los grupos de control del vehículo en cualquier día.

40 **[0308]** No hubo efecto significativo del tratamiento en general sobre el peso corporal para cualquier dosis de nepicastato en cualquier tiempo examinado. Las comparaciones por pares revelaron que ninguno de los grupos tratados con el nepicastato fueron significativamente diferentes de los controles del vehículo en cualquier tiempo examinado. Curiosamente, no hubo una disminución significativa ($p < 0,05$) diferencia global entre el grupo SKF-102698 (50 mg/kg b.i.d.) y el grupo de nepicastato (50 mg/kg b.i.d.) con respecto a los cambios en el peso corporal. Cuando se analizaron dentro de cada día, el grupo SKF-102698 (50 mg/kg b.i.d.) tenía pesos corporales significativamente más bajos que el grupo de nepicastato (50 mg/kg b.i.d.) en días 7-9.

Ejemplo de Referencia 23

50 **[0309]** 1-metilo-4-fenilo-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) se adquirió de RBI, Inc, (Natick, MA). Para administración, MPTP se suspendió en agua a una concentración de 2 mg/ml (base libre) y se inyectó por vía subcutánea en un volumen (ml) igual al peso (kg) de cada animal. Por ejemplo, un animal de 950 gramos recibió una inyección de 0,95 ml de MPTP a 2 mg/ml resultante en 2,0 mg/kg final por inyección.

55 **[0310]** Los monos se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 13h/11h, con comida y agua disponible *ad libitum*. Todos los procedimientos utilizados en este estudio siguieron las directrices del NIH y fueron aprobados por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional (IACUC). Los animales fueron alojados individualmente y se les permite un mínimo de un mes para aclimatarse a la colonia antes de comenzar los estudios de comportamiento.

60 **[0311]** Seis monos de ardilla, tres no lesionados y tres lesionados (recibieron 2 mg/kg de MPTP 3 meses antes), se utilizaron para estudiar la vía óptima de administración de nepicastato. Tres enfoques diferentes fueron examinados incluyendo (i) la inserción en golosinas, (ii) de la jeringa oral, y (ii) una sonda oral. La inserción de solución de nepicastato (5 mg/ml) en malvaviscos se probó en 3 monos no lesionados y resultó ser una ruta pobre de la administración del fármaco debido a un fallo de los animales para ingerir golosinas probablemente debido al sabor desagradable. La inyección de jeringa oral de nepicastato (0,5, 2, y 5 mg/kg) en la boca de tres monos no lesionados y tres lesionados también no era una ruta aceptable ya que los animales tienden a escupir la solución a la concentración más alta de drogas. La administración de sonda oral se llevó a cabo en 3 monos con lesiones por

MPTP a la dosis más alta (5 mg/kg) y fue bien aceptado.

[0312] Seis monos de ardilla, tres no lesionados y tres lesionados (recibieron 2 mg/kg de MPTP 3 meses antes), se utilizaron para estudiar la seguridad y la tolerabilidad de nepicastato. Los animales recibieron nepicastato a una concentración de 0,5, 2,0, o 5,0 mg/kg dos veces al día, (10:00 y 14:00), durante 5 días con un lavado de dos días entre los diferentes niveles de dosis. Nepicastato se administró mediante una jeringa oral en las dosis 0,5, 2,0 y 5,0 mg/kg y alimentación oral en la dosis de 5,0 mg/kg. El fármaco fue bien tolerado a las dos dosis más bajas. Un mono no lesionado de recibir 5,0 mg/kg tuvieron heces sueltas de color ligero amarillento en los dos últimos días de la administración que se resolvieron en retirada de fármaco de un día.

[0313] Veinticuatro monos de ardilla, catorce hembras y diez machos fueron utilizados en un modelo de Parkinson. Los veinticuatro animales fueron asignados aleatoriamente a uno de cuatro grupos de tratamiento, con 6 animales por grupo. Los grupos consistían en lo siguiente: Grupo A (6 animales) recibió tratamiento de placebo (agua); Grupo B (5 animales) recibió fármaco de nepicastato a 1 mg/kg/día (0,5 mg/kg dos veces al día); Grupo C (6 animales) recibió 4 mg/kg/día (2 mg/kg dos veces al día); y Grupo D (6 animales) recibió 10 mg/kg/día (5 mg/kg dos veces al día). En el Grupo B, un animal murió de forma aguda después de lesión de MPTP, y no fue reemplazado.

[0314] Antes de lesión, los animales se sometieron a la evaluación cuantitativa de la actividad motora espontánea utilizando un jaula de monitor de actividad de infrarrojos (IRAM). Todas las sesiones de grabación fueron 60 minutos de duración y se llevaron a cabo durante 10 sesiones en un período de 2 semanas. El comportamiento de los animales también se evaluó por 1 a 3 evaluadores clínicos usando una escala de puntuación parkinsoniana clínica (CRS) una vez al día (12 horas a 13:00) durante 3 a 5 días consecutivos. Los animales normales no puntuaron típicamente por encima de 3 en el CRS. Tanto el monitoreo de actividad (IRAM) y evaluaciones de calificación clínica estableció la actividad media de línea de base de cada animal.

[0315] Los animales se lesionaron por medio de la administración de MPTP a una concentración de 2,0 mg/kg (base libre) a través de inyección subcutánea para lograr un estado parkinsoniano. Una evaluación de conducta de lesión post-MPTP se llevó a cabo de 2 a 4 semanas después de la última lesión de MPTP. La actividad locomotora se controló por IRAM en sesiones de 60 minutos durante 3 a 5 días. El comportamiento clínico (CAS) se evaluó por uno a tres individuos recomendados para menores de un período de 3 a 5 días.

[0316] En algunos casos, los animales requirieron dosis adicionales de MPTP (2 mg/kg) para obtener un grado suficiente de lesión para mostrar los síntomas parkinsonianos, definidos como una puntuación de calificación clínica media total superior a 3. Todos los animales recibieron una evaluación de comportamiento post-definitiva MPTP (IRAM y CRS), dentro de tres semanas de iniciar el estudio de eficacia. Esta evaluación final post-MPTP se utilizó para establecer un estado parkinsoniano clínico de línea de base y se utiliza como un valor de pretratamiento para el análisis estadístico.

[0317] Los animales se ensayaron para la respuesta a la L-Dopa y la eficacia de nepicastato de drogas. Las pruebas se llevaron a cabo 4 a 12 semanas después de la última dosis de MPTP. L-Dopa se administró a una concentración de o bien 2,5, 5, o 7,5 mg/kg por sonda oral dos veces al día (a las 10:00 y 14:00) durante 7 días consecutivos. El comportamiento se determinó por IRAM y CRS. La evaluación clínica se llevó a cabo de 60 a 90 minutos después de la dosis de la mañana a las 10 horas en los últimos 4 días de tratamiento. Los evaluadores (uno a tres individuos) fueron cegados a los diferentes grupos de tratamiento. La evaluación de IRAM fue preformada durante 90 minutos inmediatamente después de la administración de fármacos a las 14:00 en los últimos 2 a 5 días de tratamiento con el fármaco. Había un período de lavado mínimo de 2 días entre cada dosis de tratamiento.

[0318] Nepicastato o agua (como placebo) se administró durante 12 días tras un mínimo de lavado de 2 días después de dosificación L-Dopa. El fármaco se administró dos veces al día a las 10:00 y 14:00 por sonda oral. El comportamiento fue calificado por el IRAM y el SRC. El CRS se llevó a cabo en la mañana, de 60 a 90 minutos después de la dosis a 10 horas del nepicastato en los últimos 5 días de tratamiento con el fármaco. Los evaluadores (uno a tres individuos) fueron cegados a los diferentes grupos de tratamiento. Evaluaciones IRAM fueron preformadas durante 90 minutos inmediatamente después de la administración de drogas a 14:00 en los últimos 5 días de tratamiento con el fármaco. **[0319]** Para el análisis estadístico, la actividad locomotora y las puntuaciones de evaluación clínicas se controlaron. La actividad media locomotora se calculó antes y después de lesión de MPTP para cada animal. La línea de base de lesión de pre-MPTP se determinó promediando diez sesiones de monitoreo de 1 hora. Se obtuvo la evaluación de la conducta posterior a la MPTP (pre-tratamiento) dentro de tres semanas de comenzar el estudio de eficacia. La actividad locomotora de lesión post-MPTP se determinó promediando tres a cinco sesiones de monitoreo de 1-hora (IRAMS). Monitorización de la actividad se informó como "movimientos/10 minutos". Una puntuación más alta fue considerada un animal más rápido. Se usó la prueba de rangos con signo de Wilcoxon para comparar la actividad de lesión pre y post-MPTP para cada grupo de animales (grupos A a D).

[0320] La actividad locomotora IRAM se controló cada 10 minutos durante un mínimo de 90 minutos después de cada nivel de fármaco. Una calificación más alta se considera un animal más rápido (menos parkinsoniano).

[0321] El análisis estadístico consistió en estadística descriptiva y gráfica de la media de cada bloque de datos de 10

minutos de placebo y fármaco experimental en 1, 4, y 10 mg/kg. Se examinó entonces la gráfica para detectar cualquier tendencia. Además, no se realizó análisis estadístico ya que no se determinó ninguna diferencia de análisis gráfico.

5 **[0322]** El análisis estadístico comparando lesión post-MPTP (pre-tratamiento) a 2,5, 5,0, y 7,5 mg/kg de L-Dopa y el nepicastato (1, 4, 10 mg/kg/día o placebo) no se realizó debido a la insuficiente la recopilación de datos IRAM. Sólo sesiones de 60 minutos se recogieron en Post-MPTP, frente a 90 minutos para el nepicastato.

10 **[0323]** En las mediciones de clasificación clínica, ningún animal lesionado con pre-MPTP anotó más que tres en el CRS. Una puntuación de clasificación clínica post-MPTP se determinó dentro de tres semanas de comenzar el estudio de eficacia promediando CRS total de 1 a 3 evaluadores individuales de datos a través de 3 a 5 días consecutivos.

15 **[0324]** Ocho características parkinsonianas fueron calificadas en cada animal y la puntuación total se deriva de la suma de estas ocho características. Para cada animal, se obtuvo una única puntuación de clasificación clínica para cada dosis de fármaco promediando las puntuaciones de calificación clínicas de todos los evaluadores (de uno a tres) realizados durante los días de administración de dosis múltiples consecutivas (con la misma dosis). Este promedio CRS se utilizó para el análisis estadístico. Una puntuación más baja fue considerada un estado de comportamiento menos parkinsoniano.

20 **[0325]** El análisis estadístico consistió en: (1) las comparaciones entre CRS medio de placebo a nepicastato en 1, 4, y 10 mg/kg/día utilizando la prueba de Kruskal-Wallis (análisis no paramétrico de la varianza). Esta comparación se repitió utilizando CRS promedio para cada concentración de fármaco experimental corregido por las calificaciones finales post-MPTP para cada animal. Las puntuaciones clínicas corregidas son las puntuaciones clínicas de fármaco experimental en cada concentración como una relación de las puntuaciones clínicas post-MPTP. (2) Las comparaciones por pares entre la lesión promedio CRS post-MPTP (pre-tratamiento) a 2,5, 5,0, y 7,5 mg/kg de L-Dopa y tratamiento placebo usando análisis (análisis no paramétrico de la varianza, medidas repetidas) de Friedman. El mismo análisis se realizó para nepicastato a concentraciones de 1, 4, y 10 mg/kg. Se realizó un análisis post hoc de Dunnett para datos no paramétricos, cuando sea necesario.

30 **[0326]** IRAM (monitorización de la actividad) y CRS (escala de calificación clínica) se utilizaron para evaluar el grado de lesión MPTP en cada mono de ardilla.

35 **[0327]** No hubo diferencia significativa entre los grupos de IRAM pre-lesionados y post-lesionados debido al alto grado de variabilidad de movimientos por cada 10 minutos por animal, en el Grupo A: Tratamiento de Placebo. Prueba de Wilcoxon: $W = 19$, $N = 6$, $P < 0,06$ Aceptar hipótesis nula. CRS promedio para el grupo A fue de 8,9, rango de 4,8 a 15,4. Todos los animales mostraron un aumento sustancial en los puntajes de calificación clínicos después de lesión MPTP. Los animales normales (no lesionados) típicamente tienen puntuaciones de menos de 3.

40 **[0328]** No hubo diferencia significativa entre los grupos de IRAM pre-lesionados y post-lesionados debido al alto grado de variabilidad de movimientos por cada 10 minutos por animal para el Grupo B: tratamiento de 1 mg/kg/día. Prueba de Wilcoxon: $W = 9$, $N = 5$, $p < 0,06$ Aceptar Puntuación de Calificación de Hipótesis Clínica Nula (CRS). CRS promedio para el grupo B fue 10,32, rango de 4,3 a 16,1. Todos los animales mostraron un aumento sustancial en los puntajes de calificación clínicos después de lesión MPTP. Los animales normales (no lesionados) típicamente tienen puntuaciones de menos de 3.

50 **[0329]** No hubo diferencia significativa entre los grupos de IRAM pre-lesionados y post-lesionados debido al alto grado de variabilidad de movimientos por cada 10 minutos por animal, en el Grupo C: tratamiento de 4 mg/kg/día. Prueba de Wilcoxon: $W = 17$, $N = 6$, $P > 0,06$ Aceptar Hipótesis Nula. CRS promedio para el grupo C fue 8,97, intervalo de 6,5 a 17,3. Todos los animales mostraron un aumento sustancial en los puntajes de calificación clínicos después de lesión MPTP. Los animales normales (no lesionados) típicamente tienen puntuaciones de menos de 3.

55 **[0330]** No hubo diferencia significativa entre los grupos de IRAM pre-lesionados y post-lesionados debido al alto grado de variabilidad de movimientos por cada 10 minutos por animal, en el Grupo D: tratamiento de 10 mg/kg/día. Prueba de Wilcoxon: $W = 21$, $N = 6$, $P > 0,06$ Aceptar hipótesis nula. Todos los animales mostraron un aumento sustancial en los puntajes de calificación clínicos después de lesión MPTP. CRS promedio para el grupo C fue 8,02, rango de 4,0 a 15,6. Los animales normales (no lesionados) típicamente tienen puntuaciones de menos de 3.

60 **[0331]** En general, no hubo diferencia significativa en la actividad locomotora medida por IRAM entre la línea de base (lesión pre-MPTP) y lesión post-MPTP dentro de los grupos, debido al alto grado de variabilidad de los resultados de RAM para cada animal. Los resultados de CRS mostraron una diferencia entre estados de lesión de pre-MPTP y post-MPTP. Animales lesionados pre-MPTP puntuaron no más de 3 en el CRS. Animales post-lesionados con MPTP puntuaron más de 3. Todos los grupos (A a D) tenían un CRS promedio que van del 8 al 10 de un máximo de puntuación total CRS de 24.

65 **[0332]** No hubo diferencias detectables entre el tratamiento con placebo y tres concentraciones diferentes de

nepicastato (1, 4, 10 mg/kg/día) en el mono de ardilla lesionado con MPTP. Tanto 4 como 10 mg/kg/día de nepicastato y placebo mostraron una mejora significativa sobre el estado post-MPTP (pre-tratamiento). Todos los grupos de animales mostraron una mejora significativa tanto con 5 mg/kg como 7,6 mg/kg de L-Dopa en comparación con post-MPTP (pre-tratamiento), con la excepción del Grupo C para dosis de 7,5 mg/kg y el Grupo B de el 5 mg/kg/dosis. Ningún grupo de animales mostró una mejoría significativa en 2,5 mg/kg de L-Dopa en comparación con post-MPTP.

[0333] Se realizó una comparación de los grupos de tratamiento y L-DOPA, resultados de la prueba de Friedman, estadísticas descriptivas, y análisis post hoc de prueba de Dunnett, y una comparación entre la monitorización de la actividad de tratamiento con placebo a todas las demás concentraciones de nepicastato en puntos de tiempo 10 a 90 minutos después de la dosificación. Intervalos de diez minutos se representaron gráficamente para cada nivel de dosis de drogas. No hubo diferencias de tratamiento de drogas (nepicastato) al nivel de dosis/kg/día 4 y 10 mg en comparación con placebo. A 1 mg/kg/día, los animales eran más lentos que el tratamiento con placebo. Basado en un análisis comparativo no por pares de 4 diferentes grupos de tratamiento (1,4, y 10 mg/kg de nepicastato y placebo), nepicastato no produce ningún efecto significativo en los síntomas parkinsonianos en comparación con placebo (tratamiento de agua) en el modelo de primate no humano lesionado con MPTP de PD. Sobre la base de un análisis comparativo por parejas de animales, (animales de un mismo grupo examinados antes y después del tratamiento), nepicastato a las concentraciones 4 y 10 mg/kg/día mostraron un efecto significativo en los síntomas parkinsonianos en comparación con la lesión post-MPTP, (pre- evaluación del tratamiento). El placebo tuvo un efecto significativo en el límite. Utilizando la misma comparación por pares, 5 y 7,5 mg/kg de L-Dopa demostró un efecto significativo en comparación con el estado lesionado post MPTP en todos los grupos, con la excepción de animales de Grupo B (sin efecto en 5 mg/kg de L-Dopa) y el grupo C (ningún efecto en 7,5 mg/kg L-Dopa). Sin embargo, 2,5 mg/kg de L-Dopa no demostró ningún efecto significativo.

[0334] Un estudio farmacocinético se llevó a cabo para determinar la concentración plasmática de nepicastato en el mono de ardilla. Este estudio se llevó a cabo simultáneamente con el estudio de seguridad y tolerabilidad. Se utilizaron tres monos de ardilla con lesiones por MPTP (# 353, 358 y 374). Se recogió un mililitro de sangre (de la vena femoral de cada animal) para el análisis. Nepicastato se administró a concentraciones de 1, 4, y 10 mg/kg durante 5 días con un lavado de 2 días entre cada concentración de fármaco. La sangre se recogió para análisis de 1 hora antes de la primera dosis para establecer la línea de base y a las 6 horas después de esta primera dosis del fármaco de cada uno de los diferentes niveles de fármaco.

[0335] Un segundo estudio farmacocinético se llevó a cabo para determinar el nivel plasmático en estado estacionario de nepicastato. Este estudio se llevó a cabo de forma concomitante con el estudio de eficacia, donde los animales fueron probados en cada uno de tres concentraciones de fármaco diferentes durante 12 días. Un mililitro de sangre se extrajo de la vena femoral 6 horas después de la primera dosis el día 1, a continuación, se determinaron las 6 horas después de la primera dosis en el día 7 y, finalmente, 6 horas después de la primera dosis el día 12. Niveles plasmáticos basales en muestras recogidas la semana antes de la dosificación de drogas.

[0336] Este estudio también demostró que un análisis de pares, lo que reduce los animales a la variabilidad de los animales mediante la comparación del mismo animal antes y después del tratamiento, se adapta mejor para la detección de un efecto significativo de drogas que un diseño de estudio no por pares cuando se utiliza un pequeño número de animales.

Ejemplo de Referencia 24

[0337] Ratas hipertensas espontáneas masculinas (280-345g; Charles River Labs, Kingston, NY) se mantuvieron en ayunas durante la noche y luego se anestesiaron con éter. Una arteria femoral y la vena femoral se canuló con un tubo de PE50 para la grabación de la presión arterial y la administración de compuestos, respectivamente. Los animales fueron colocados en refrenadores MAYO y sus pies ligeramente pegados al presionador. La solución salina heparinizada (50 unidades de heparina sódica/ml) se utilizó para mantener la permeabilidad de cada cánula durante todo el experimento. Los siguientes parámetros se registraron continuamente usando software Modular Instrumentos MI² BioReport™ instalado en un ordenador personal IBM: presión arterial media (MAP), la frecuencia cardíaca (HR), y el cambio desde la línea base para cada parámetro en puntos de tiempo especificados en el experimento.

[0338] Todos los compuestos se disolvieron en el día de uso. Nepicastato se disolvió en agua desionizada (vehículo) a una concentración de base libre de 1 mg/ml. Volumen de dosificación oral para el nepicastato o vehículo fue de 10 ml/kg. SCH-23390 se disolvió en solución salina (vehículo) a una concentración de base libre de 0,2 mg/ml. Nepicastato o solución salina se administraron por vía intravenosa como un bolo en un volumen de 1,0 ml/kg seguido de 0,2 ml a ras de solución salina isotónica.

[0339] Después de la preparación quirúrgica, cada animal se permitió un período de recuperación mínimo de una hora. Los animales fueron asignados aleatoriamente a cuatro grupos de tratamiento: vehículo (i.v.)/vehículo (p.o.); vehículo (i.v.)/nepicastato (p.o.); SCH-23390 (i.v.)/vehículo (p.o.); o SCH-23390 (i.v.)/nepicastato (p.o.). Una vez que los animales se estabilizaron (mínimo de una hora), la presión arterial basal y la frecuencia cardíaca se determinó tomando un promedio de cada parámetro durante un período de 15 min de tiempo. Una vez que se establecieron la

presión arterial basal y la frecuencia cardíaca, los animales se dosifican por vía intravenosa, ya sea con SCH-23390 (200 µg/kg) o vehículo (solución salina, 1 ml/kg). Quince minutos más tarde, los animales se dosificaron por vía oral, ya sea con el nepicastato (10 mg/kg) o vehículo (agua desionizada, 10 ml/kg).

5 **[0340]** Parámetros registrados se midieron 15 min antes de la dosificación intravenosa para establecer la presión arterial basal y la frecuencia cardíaca. A continuación, los parámetros registrados se midieron a 5, 10, y 15 min después de la administración intravenosa de SCH-23390 o vehículo. Después de la administración oral de nepicastato o vehículo, se midieron los parámetros registrados a los 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, y 240 min.

10 **[0341]** Al final del experimento, cada animal se anestesió con halotano y se sacrificaron mediante decapitación. La corteza, ventrículo izquierdo (ápice), y la arteria mesentérica se diseccionaron, se pesaron, y se fijaron en 0,4 M de ácido perclórico. Los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C. El análisis bioquímico se realiza en estos tejidos en una fecha posterior para determinar los niveles de catecolaminas incluyendo los niveles de dopamina y norepinefrina. La presión arterial y el ritmo cardíaco se analizaron por separado. El cambio desde la línea base para la presión arterial y la frecuencia cardíaca se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con efectos para el tratamiento, el tiempo, y su interacción. Este análisis se realizó tanto para el período de tiempo post-I.V. como para el período de tiempo post-oral. Otros análisis se realizaron cada vez por un ANOVA con un efecto principal de tiempo. Las comparaciones por pares se realizaron siguiendo cada ANOVA por la estrategia de LSD de Fisher con una corrección de Bonferroni cuando el efecto global del tratamiento no fue significativo.

20 **[0342]** Se realizó un análisis adicional para comparar las medias basales de cada grupo de tratamiento por un ANOVA con un efecto principal para el tratamiento y comparaciones por pares subsiguientes. Las comparaciones de SCH-23390 (i.v.)/vehículo (p.o.) vs. vehículo (i.v.)/vehículo (p.o.), vehículo (i.v.)/nepicastato (p.o.) vs. vehículo (i.v.)/vehículo (p.o.), y SCH-23390 (i.v.)/nepicastato (p.o.) vs. vehículo (i.v.)/nepicastato (p.o.) se hicieron.

25 **[0343]** No hubo diferencias significativas en la frecuencia cardíaca basal o la presión arterial media entre los grupos de tratamiento.

30 **[0344]** El tratamiento intravenoso con SCH-23390 resultó en una disminución significativa ($p < 0,05$) en la frecuencia cardíaca durante el período post-oral a 120 min y 240 min en comparación con el control del vehículo. Nepicastato no disminuyó el ritmo cardíaco tanto como observado en los animales tratados con vehículo. Esto fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) en dosis de 150 y 180 min después. La gran variabilidad de la frecuencia cardíaca observada en el transcurso de este experimento debe tenerse en cuenta.

35 **[0345]** La administración intravenosa de SCH-23390 produjo una disminución pequeña (5 ± 1 mmHg) pero significativa ($p < 0,05$) en la presión arterial media en comparación con los animales que recibieron vehículo durante el período de post-i.v. de 15 min. El tratamiento oral con nepicastato causó una disminución significativa ($p < 0,05$) en la presión arterial media por 30 min después de la dosis que continuó durante la duración del experimento. El pretratamiento con SCH-23390 no atenuó significativamente los efectos antihipertensivos observados con la administración de nepicastato solo.

Ejemplo de Referencia 25

45 **[0346]** Se utilizaron ratas macho Crl:COBS(WI)BR de 15 semanas de edad. Veinticuatro ratas se implantaron crónicamente con implantes de telemetría (TA11PA-C40, Data Sciences, Inc., St. Paul, MN) para la medición de la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la actividad motora. La rata se anestesió con pentobarbital sódico (60 mg/kg, ip) y su abdomen afeitado. En condiciones asépticas, se realizó una incisión en la línea media. La aorta abdominal se expuso, y se canuló con el catéter de una unidad de transmisor de telemetría. Después de que el transmisor se suturó a la musculatura abdominal, la piel se cerró. Cada rata se dejó recuperar durante al menos 2 semanas antes de someterse a la administración del fármaco. Tres días antes del inicio del experimento, las ratas se dividieron aleatoriamente en 4 grupos de tratamiento: vehículo (p.o.), hidralazina (10 mg/kg, p.o.), nepicastato (30 mg/kg, p.o.), nepicastato (100 mg/kg, p.o.).

50 **[0347]** La presión arterial sistólica (SBP), la presión arterial diastólica (DBP), la presión arterial media (MBP), frecuencia cardíaca (HR), y la actividad motora (MA) fueron monitoreadas. Tanto nepicastato como hidralazina se prepararon en agua con trazas de Tween 80. Todas las dosis se administraron por vía oral a la rata en 10 ml/kg y se expresaron como equivalentes de base libre.

55 **[0348]** Un sistema de recogida de datos computarizados se utilizó para recoger continuamente datos sobre SBP, DBP, MBP, HR, y MA. Los datos sobre cada rata se recogieron cada 5 min. durante 10 s. Fueron entonces promediados por hora y los errores estándar de la media (SEM) calculada. Todos los valores se expresaron como medios \pm SEM. La significancia estadística se definió como el nivel de p inferior a 0,05. Los datos sobre MBP, HR y MA se analizaron por separado. Cada análisis se realizó en 26 puntos de tiempo medidos cada día. Se utilizó un ANOVA de dos vías con efectos principales para el tratamiento y el tiempo y su interacción. Si se detectó un efecto del tratamiento global o una interacción significativa, se realizó una serie de ANOVA de una vía en cada punto de tiempo. Las comparaciones por parejas en cada punto de tiempo se realizaron mediante el procedimiento de Dunn.

Si no se detectó ningún efecto global del tratamiento, entonces la diferencia de pares de control se llevaría a cabo ajustando el valor crítico usando un ajuste de Bonferroni.

5 **[0349]** Después se establecieron los valores pre-dosis para estos parámetros, los grupos respectivos de las ratas recibieron un tratamiento diario de 7 días de vehículo, nepicastato o hidralazina.

10 **[0350]** La administración oral de nepicastato a 30 mg/kg (todas las dosis expresadas en lo sucesivo son p.o.) tendían a la presión arterial baja lentamente pero no indujo un efecto hipotensor consistente en el día 1. A medida que avanzaba el efecto, un efecto hipotensor pico de -10 mmHg se observó en el día 2 en hora 13. Se indujeron grados similares de efectos antihipertensivos durante todo el estudio. A 100 mg/kg, el compuesto indujo una respuesta antihipertensiva pico de -11 mmHg 22 h después de la dosificación en el día 1 ($p < 0,01$). MBP continuó disminuyéndose y alcanzó su punto más bajo de aproximadamente -17 mmHg en el día 3 ($p < 0,01$). La MBP se mantuvo baja durante todo el estudio.

15 **[0351]** La hidralazina a 10 mg/kg provocó un efecto hipotensor inmediato que se disminuyó en 10 hr, y una disminución máxima de -24 mmHg ($p < 0,01$) en MBP se observó dentro de 1 hora después de la dosificación en el día 1. Los efectos hipotensores transitorios similares se observaron durante todo el estudio.

20 **[0352]** nepicastato a los 30 y 100 mg/kg, no afectó consistentemente HR en el día 1. En el día 2, sin embargo, el nepicastato a 100 mg/kg causó una respuesta bradicárdica de -100 b/mm³ horas después de la dosificación. Se observaron respuestas significativas con bradicardia, pero menos pronunciadas en los días 3-7. En comparación, la hidralazina a 10 mg/kg indujo diversos grados de taquicardia durante todo el estudio.

25 **[0353]** Durante todo el estudio, ninguno de los tratamientos con fármacos mostró un efecto consistente sobre MA.

30 **[0354]** Los pesos corporales se registraron diariamente. Para el peso corporal, un ANOVA de dos vías con respecto a los cambios de pre-dosis se utilizó para analizar los efectos generales para el tratamiento, día, y el tratamiento por interacción de día. A continuación, un ANOVA de una vía se realizó para cada día, y las comparaciones por pares para los grupos tratados con fármaco a los controles de vehículo se hicieron usando el procedimiento de Dunn y la estrategia de LSD de Fisher para ajustar para comparaciones múltiples. En comparación con el tratado con vehículo, ninguno de los tratamientos con fármacos tuvo ningún efecto sobre los pesos corporales ($p < 0,05$). Aunque el tratamiento con nepicastato a 100 mg/kg tendía a disminuir el peso corporal en el día 3, no fue estadísticamente significativo.

35 Ejemplo 26

40 **[0355]** Nepicastato reduce la conversión de la dopamina a noradrenalina. Pruebas básicas para la actividad de nepicastato miden los niveles de plasma o dopamina urinaria o la relación de la dopamina a noradrenalina. El tratamiento de nepicastato puede aumentar plasma o los niveles urinarios de dopamina o aumentar la relación dopamina/norepinefrina en plasma o orina.

[0356] Se muestra en la Figura 5 niveles en niveles de dopamina urinarios en voluntarios normales después del tratamiento de 24 horas con el nepicastato.

45 **[0357]** Usando el análisis de medidas repetidas de modelo de varianza, un aumento significativo en la relación media de plasma supino dopamina/norepinefrina se detectó en los sujetos que recibieron 200 mg de nepicastato en comparación con los que recibieron placebo ($p < 0,05$). Los niveles de dopamina urinarios se aumentaron después de 10 días de dosificación tanto con 40 mg como 200 mg de nepicastato.

50 Ejemplo 27

55 **[0358]** En pacientes con insuficiencia cardiaca crónica (CHF), dosis diarias de 40, 80, y 120 mg de nepicastato administradas durante 10 días fueron generalmente bien toleradas. La dosis a la que aumenta la frecuencia de eventos adversos significativos fue de 160 mg.

[0359] Cuatro de los 8 pacientes tratados con 160 mg durante 8 días o más desarrollaron un sarpullido. Dos de las erupciones estaban acompañadas de prurito. Un paciente también tenía dificultad para respirar con la erupción.

60 **[0360]** Un paciente tratado con la dosis de 80 mg fue retirado del estudio debido a la hipotensión ortostática sintomática. Medicaciones concomitantes incluyen hidralazina y tres diuréticos. Se reportaron casos ocasionales de hipotensión ortostática en pacientes en todas las dosis, incluyendo placebo. Hipotensión ortostática sintomática se informó en 6 de los 8 pacientes que recibieron 160 mg.

65 **[0361]** En un estudio en curso en pacientes con CHF, se han producido 2 muertes: una muerte se debió al empeoramiento de la CHF (el paciente recibía 80 mg una vez al día) y uno era la muerte súbita en un paciente que recibía placebo.

[0362] Un evento adverso serio que se informó como posiblemente relacionado con el fármaco fue un nivel de creatinina en aumento, que requiere hospitalización. Eventos médicamente significativos no considerados relacionados con el fármaco del estudio incluyen: empeoramiento de la CHF en 2 pacientes (uno de los cuales posteriormente tuvo un IM agudo y paro cardíaco), angina inestable en 1 paciente, dolor torácico atípico en 1 paciente, y una masa suprarrenal en 1 paciente que tenía un historial de cáncer de mama.

[0363] En los estudios de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, se determinaron los cambios en los niveles plasmáticos de la dopamina, los niveles de norepinefrina, y relaciones de dopamina/norepinefrina después del tratamiento con el nepicastato en un estudio de 10 días. El tratamiento de nepicastato aumentó los niveles de dopamina/norepinefrina en el estudio de 10 días.

[0364] En los estudios de pacientes de insuficiencia cardíaca congestiva, los niveles de dopamina en plasma, los niveles de norepinefrina, y relaciones dopamina/norepinefrina y los cambios de los niveles y las relaciones de después del tratamiento con el nepicastato en un estudio de 30 días se determinaron. Tratamiento de nepicastato aumentó los niveles de dopamina/norepinefrina en el estudio de 30 días.

Ejemplo 28

[0365] Se determinaron las proporciones de dopamina/norepinefrina en el cerebro de roedores tratados con nepicastato. Relaciones de dopamina/norepinefrina se aumentan en los cerebros de los roedores tratados con nepicastato o disulfiram.

[0366] Será fácilmente evidente para un experto ordinario en las técnicas relevantes que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas a los métodos y aplicaciones descritas en este documento son adecuados y pueden realizarse sin apartarse del alcance de la invención o cualquier realización de los mismos.

Ejemplo 29

[0367] La prueba de igualación retrasada a la posición (DMTP) se utiliza para examinar los efectos potenciales de las drogas en corto plazo o memoria de trabajo en ratas.

[0368] Antes de la iniciación de pruebas de nepicastato en la igualación retrasada al estudio de posición, se realizaron estudios piloto con los objetivos de la evaluación de los efectos de comportamiento/fisiológicos tanto de la administración aguda como repetida de la dosis propuesta más alta de nepicastato (100 mg/kg p.o.) y el establecimiento de la dosis oral máxima tolerada de fisostigmina administrada repetidamente.

[0369] En estudios piloto, el nepicastato (30 y 100 mg/kg p.o.) o vehículo se administró de forma aguda a ratas macho Sprague-Dawley (n = 8) dentro del mismo rango de peso que los animales entrenados (400-480 g). Los animales fueron observados por un observador ciego al estado de tratamiento de cada animal a las 1, 3 y 24 h después de la administración de vehículo o fármaco. Del mismo modo, en un estudio separado, se administraron fisostigmina (1, 3, 10 o 30 mg/kg p.o.) o vehículo de forma aguda a grupos de 8 ratas. Se hicieron observaciones a las 1, 3 y 24 h después de la administración del fármaco o vehículo.

[0370] En estudios piloto de la administración repetida, el nepicastato (100 mg/kg p.o.) o vehículo se administró dos veces al día (06:00 y 18:00 h) durante 10 días (una vez en el día 11) para grupos de 8 ratas. Los pesos de los animales se controlaron durante todo el estudio y, en el día 5, se observaron los animales 'ciegamente' por un observador independiente con el fin de evaluar cualesquiera efectos de comportamiento/fisiológicos manifiestos después de la administración repetida. En un estudio separado, grupos de 8 ratas recibieron vehículo o fisostigmina (0,3, 1, 3 o 10 mg/kg p.o.) utilizando el mismo programa de dosificación. Los pesos de los animales se controlaron durante todo el estudio.

[0371] Nepicastato (30 o 100 mg/kg p.o. de forma aguda) no indujo ningún cambio de comportamiento/fisiológico manifiesto. Del mismo modo, no hubo efectos evidentes de la administración repetida de nepicastato a una dosis de 100 mg/kg p.o. Sin embargo, en el último estudio los animales tratados con el fármaco mostraron una pérdida media del peso corporal de 28 g después de 11 días mientras que los controles tenían un aumento medio del peso corporal de 1 g. Los animales tratados con el fármaco también se convirtieron en más irritables que los controles cuando se manejaban durante el estudio de 11 días.

[0372] La administración aguda de la fisostigmina a dosis de 3 mg/kg o más indujeron efectos conductuales manifiestos superiores (movimientos de masticación en la boca y la salivación). No se observaron signos de toxicidad en 30 mg/kg p.o. (cianosis, temblores, sacudidas de cabeza, ataxia). La administración repetida de 3 y 10 mg/kg p.o. fisostigmina era tóxica (3 de 8 animales fueron encontrados muertos en el día 2 en el grupo de 10 mg/kg, y 2 de 8 animales se convulsionaron en el día 5 en el grupo de 3 mg/kg). No hubo efectos de la administración repetida de 0,3 o 1 mg/kg de fisostigmina.

[0373] Como resultado de estos estudios, la dosis más alta de nepicastato para el estudio DMTP se redujo a 30

mg/kg p.o. y una dosis de 1 mg/kg p.o. de la fisostigmina se eligió para la administración repetida.

[0374] En el presente estudio de DMTP, las ratas fueron entrenadas para recordar la posición de una palanca a través de un retardo programado ya sea de 0, 8, 16 o 32 s con el fin de ganar recompensa de comida. Después del entrenamiento, los efectos de la administración repetida de nepicastato (1, 3, 10 y 30 mg/kg p.o. b.i.d.) o fisostigmina (1,0 mg/kg p.o., b.i.d.) se examinaron a lo largo de 10 días sucesivos de prueba en la tarea DMTP. En el undécimo día del experimento, los animales que fueron tratados con el nepicastato y fisostigmina se co-administraron escopolamina Hbr (0,1 mg/kg, sc, 30 mm tiempo de pretratamiento). La dosis de escopolamina se seleccionó sobre la base de datos de un estudio piloto en el que se encontró que DMTP/0,1 mg/kg de escopolamina inducía un deterioro significativo en la precisión de elección. Además de los animales tratados con el nepicastato o fisostigmina, un grupo de animales que habían sido previamente tratados con vehículo, se trató con escopolamina. Otro grupo de ratas recibió sólo el tratamiento con vehículo durante todo el experimento. El propósito de la prueba de escopolamina final consistió en determinar si la administración crónica de nepicastato o fisostigmina podría revertir un deterioro de escopolamina inducido en la precisión de elección en la tarea DMTP.

[0375] Las medidas dependientes en el presente estudio incluyeron porcentaje de decisiones correctas, la latencia para hacer respuestas de elección y el número de ensayos que los animales fueron capaces de completar durante las sesiones de prueba de 70 min. Los cambios en la medida anterior pueden indicar cambios en la memoria y/o función atencional mientras que los cambios en las dos últimas medidas pueden ser indicativos de otros efectos no cognitivos de los fármacos.

[0376] Se utilizaron cincuenta y seis ratas Sprague Dawley macho, con un peso entre 200-290 g al comienzo de la formación. Se alojaron en grupos de cuatro por jaula y se alimentaron cada uno aproximadamente 12-15 g de alimento por rata por día. Esta cantidad de comida mantiene las ratas a aproximadamente 85% de su peso de alimentación libre. A todo tipo de animales que comenzaron a caer por debajo de este peso se les dio alimentos adicionales. El agua estaba disponible libremente. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas con el período de luz a partir de las 6:00.

[0377] Doce cámaras operantes de Campden Instruments con dos palancas retráctiles y un almacén de alimentos situado en el centro se utilizaron para las pruebas de comportamiento. Una aleta, la cual podría ser empujada hacia atrás por la rata para que pudiera obtener bolitas de comida, se coloca delante del almacén de alimentos. Las cajas fueron modificadas para que las particiones podrían colocarse en ambos lados del almacén de alimentos. Las particiones eran Perspex clarao, alcanzando desde el suelo de rejilla al techo de la cámara y que se extiende 105 mm en la zona central. Las cajas operantes estaban contenidas en armazones atenuantes de luz y sonido. Paul Fray Control System Interlaces y un ordenador Acorn A5000 programado con el software Arachnid se utilizan para controlar el equipo operante.

[0378] Con la luz de la casa en toda la sesión, las ratas fueron inicialmente entrenadas para recuperar gránulos de alimentos de Noyes 45 mg Fórmula 'A' desde detrás de la tapa del almacén. Las ratas fueron entrenadas para presionar las palancas tanto a la izquierda como a la derecha para obtener recompensa de comida. Ya sea la palanca izquierda o derecha se presentó al azar durante una sesión de 30 mm. Una respuesta a la palanca insertada dio lugar a la retracción de la palanca, la entrega de una bola de comida y la iluminación de la luz del almacén. La luz del almacén se mantuvo hasta que se recuperó el sedimento.

[0379] A continuación se inició la igualación al entrenamiento de posición. Este y todo el posterior entrenamiento se llevó a cabo con los tabiques instalados en las cajas operantes. Las sesiones fueron inicialmente de 50 minutos de duración. Las ratas fueron colocadas en la caja operante y la sesión comenzó cuando la luz de casa se iluminó. Después de un intervalo entre ensayos de 30 s (ITI), una de las dos palancas (la palanca de muestra) se inserta en la cámara. La palanca permaneció inserta en la cámara hasta que se produjo una respuesta de palanca de prensa. Una respuesta a la palanca resultó en la retracción de la palanca y la iluminación de la luz de almacén (pero no la entrega de gránulos). Tan pronto como se pulsa la solapa de almacén, la luz de almacén se extinguió y se insertaron las dos palancas. Una respuesta a la palanca de muestra (es decir, la misma palanca como se presentó anteriormente) resultó en la retracción de ambas palancas, la entrega de una bola de comida y la iluminación de la luz de almacén. La luz de almacén se mantuvo hasta que se presionó la solapa. Una respuesta a la palanca incorrecta (la palanca opuesta a la presentada como la palanca de la muestra) no produjo una bola de comida e inició un período de 10 s de tiempo de espera (A) durante el cual se extinguió la luz de casa. A 30 s ITI se inició antes del comienzo de un nuevo juicio. La palanca insertada como la palanca de la muestra fue semi-aleatoriamente determinada de tal manera que las palancas derecha e izquierda se presentaron como la palanca de muestra de 8 veces en un bloque de 16 ensayos.

[0380] Un procedimiento de corrección se utiliza en este y todo el entrenamiento posterior. La palanca que se inserta (izquierda o derecha) como la palanca de muestra se determinó al azar por el ordenador en ensayos no de corrección (es decir, el primer ensayo de la sesión y ensayos que siguieron inmediatamente a un ensayo en el que se produjo una elección correcta). Cada vez que se produjo una respuesta incorrecta, la palanca que no fue elegida (es decir, la palanca de 'correcta') se presentó como la muestra en el subsiguiente ensayo de 'corrección'. Estos ensayos de corrección impidieron costumbres de posición (es decir, respondiendo siempre a palancas tanto

izquierda como derecha y el logro de 50% correcto). Se registró el número de ensayos de corrección, pero sólo los datos recogidos en los ensayos no de corrección se utilizaron para evaluar el porcentaje de decisiones correctas.

5 **[0381]** Después de 24 sesiones, los animales estaban realizando la adaptación a la posición de trabajo con un alto grado de precisión. En Sesión 25 un intervalo de retardo variable se interpone entre la depresión de la palanca de la muestra y la presentación de las palancas en el ensayo de elección. Después de una respuesta a la palanca de la muestra, se insertaron las palancas de elección después de la primera tapa de prensa que ocurre después de retardo de 0 s (inmediata), 4, 8 o 16 s. El orden de los cuatro tipos de ensayos (0, 4, 8 o 16 s de retardo) se determinó con la restricción de que en un bloque 16 de prueba, cada retardo se produjo 4 veces semi-aleatoriamente; dos veces en un ensayo izquierdo y dos veces en un ensayo correcto. Una retención limitada se utilizó tal que si la rata no tenía una respuesta de elección dentro de los 30 s del final del período de retardo programado, el ensayo se terminó y comenzó el intervalo entre ensayos. Tal ensayo se contó como incompleto y no contribuyó al análisis de datos. El mismo ensayo se restableció después del final de la ITI. De la Sesión 25 en adelante el período de tiempo de espera tras decisiones incorrectas se omitió y la duración de la sesión se aumentó a 70 minutos.

20 **[0382]** Después de 26 sesiones con retardo de 0-16 s (Sesión 25-50) el intervalo entre ensayos se disminuyó a 10 s y, durante las siguientes 8 sesiones (Sesión 51-58), se utilizó un retraso de hasta 64 s. Debido a los malos resultados en el 64 s de retardo, sin embargo, este retraso no se utilizó en todas las sesiones adicionales. En la sesión 59, se utilizaron los retrasos de 0, 8, 16 y 32 s. Estos retrasos se utilizan en todas las sesiones subsiguientes. Sólo 51 de las 56 ratas completaron más de 24 ensayos (corrección más no corrección) durante la sesión 59. Se seleccionaron estas ratas y se asignaron semi-aleatoriamente a los 7 grupos siguientes tales que los grupos se emparejaron en el rendimiento (por ciento correcto, latencia de respuesta y número de ensayos completados): Vehículo/Vehículo (n = 7), Vehículo/escopolamina (n = 7), nepicastato 1,0 mg/kg/escopolamina (n = 7), nepicastato 3,0 mg/kg/escopolamina (n = 7), nepicastato 10,0 mg/kg/escopolamina (n = 7), nepicastato 30 mg/kg/escopolamina, y Fis/escopolamina (n = 8).

30 **[0383]** A las 6:00 y las 18:00 de los días consecutivos durante los cuales se realizaron Sesiones 60-69, las ratas recibieron la administración oral de cualquiera de los vehículos, la fisostigmina (Fis) o nepicastato (1, 3, 10 o 30 mg/kg). Debido al alto grado de precisión de elección mostrada por los animales tratados con vehículo durante las sesiones de 68 y 69, se utilizó también el retardo de 0, 8, 16 y 32s durante la sesión de prueba final (Sesión 70) en la que todos, menos el grupo tratado de Vehículo/Vehículo recibió 0,1 mg/kg de escopolamina HBr administró s.c. 30 minutos antes del ensayo. Los animales en el grupo Vehículo/Vehículo recibieron una inyección s.c. de solución salina 30 minutos antes de la sesión de prueba final. Por lo tanto, los tratamientos con fármacos administrados a los siete grupos durante los 11 días consecutivos de la presente experimento fueron:

Grupo	Sesión 60-69 (0, 8, 16, y 32 s de retardo)	Sesión 70 (retardo de 0, 4, 8, y 32 s)
40 1	Vehículo	Vehículo/vehículo
2	Vehículo	Vehículo/escopolamina
3	nepicastato 1,0 mg/kg	nepicastato 1,0 mg/kg/escopolamina
4	nepicastato 3,0 mg/kg	nepicastato 3,0 mg/kg/escopolamina
5	nepicastato 10 mg/kg	nepicastato 10 mg/kg/escopolamina
45 6	nepicastato 30 mg/kg	nepicastato 30 mg/kg/escopolamina
7	Fisostigmina	Fisostigmina/escopolamina

50 **[0384]** Los datos recogidos y analizados en el presente estudio DMTP incluyen 1) el porcentaje de respuestas correctas; 2) la latencia entre el rendimiento de una respuesta a la palanca de la muestra y el rendimiento de la respuesta de elección y 3) el número total de ensayos de corrección y no de corrección completados. Se recogieron las dos medidas anteriores dependientes únicamente para los ensayos no de corrección.

55 **[0385]** Con el fin de aumentar la potencia y la sensibilidad de los análisis estadísticos, durante las primeras 10 sesiones de tratamiento de drogas (Sesión 60-69) los datos se colapsaron en bloques de dos sesiones (bloque 1-5), aunque las cifras para los datos recogidas en el día 1-día 10 del estudio están incluidos. También, debido a que los animales en el vehículo/vehículo y grupos de vehículo/escopolamina recibieron el mismo tratamiento durante los primeros 10 días de la prueba, los animales de estos dos grupos se combinaron con el propósito de análisis estadístico durante Bloques 1-5.

60 **[0386]** El análisis de dos vías de la varianza (ANOVA) con el tratamiento farmacológico como el factor entre sujetos y el retardo (0, 8, 16 o 32s) como el factor dentro de los sujetos se utilizó para analizar el porcentaje de decisiones correctas y la latencia de respuesta. Estos análisis se llevaron a cabo por separado para cada bloque de datos. Interacciones significativas fueron seguidas por un ANOVA de una vía que se realizó a cada retardo. Un efecto principal significativo de un ANOVA de una vía fue seguido por una prueba t de Dunnett de dos colas. ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnett post hoc, cuando fue apropiado, se usa para analizar el número medio de ensayos completados.

[0387] Todas las pruebas estadísticas se realizaron en un ordenador Macintosh utilizando el software SuperAnova. Alfa se estableció a lo largo de 0,05. Los animales que no pudieron completar los ensayos en cada uno de los cuatro periodos de retardo fueron excluidos de los análisis de porcentaje de decisiones correctas y la latencia de respuesta. Se registró el número de animales que fueron incluidos en el análisis de porcentaje de decisiones correctas y la latencia para responder por cada uno de los 5 bloques de pruebas de drogas y en el día de la prueba escopolamina (SCOP). Para evaluar los efectos generales de los fármacos sobre la capacidad para realizar la coincidencia demorada a la tarea de muestra, todos los animales se incluyeron en el análisis de número de ensayos completados.

[0388] Sulfato de fisostigmina (1,0 mg/kg, suministrado por RBI) y el nepicastato (1, 3, 10 y 30 mg/kg, suministrado por Roche) se administraron p.o. dos veces al día comenzando a las 6:00 y 18:00. La escopolamina HBr (0,1 mg/kg, suministrado por Sigma) fue administrado s.c. 30 minutos antes de la última sesión de prueba. La fisostigmina y nepicastato se disolvieron o suspendieron en agua destilada y se inyectaron en un volumen de 2,5 ml/kg. La escopolamina HBr se disolvió en solución salina y se inyectó en un volumen de 1,0 ml/kg. Todas las dosis de los fármacos se expresan como peso base.

[0389] Durante el primer bloque de prueba, los fármacos no tuvieron efectos significativos en el porcentaje de decisiones correctas o la latencia para llevar a cabo una respuesta de elección en la tarea DMTP. El tratamiento con medicamentos también falló para afectar el número de ensayos completados, $F(5,45) = 0,319$, $p = 0,899$.

[0390] En el bloque 2, nepicastato y fisostigmina no tuvieron efectos significativos sobre ninguna de las medidas dependientes durante este bloque de la prueba. Aunque el efecto no fue estadísticamente significativo, $F(5,45) = 1,717$, $p = 0,150$, hubo una tendencia hacia una disminución en el número de ensayos completados. Este efecto aparente fue ligeramente más marcado en los grupos tratados con 3 ó 30 mg/kg de nepicastato, y en el grupo tratado con la fisostigmina. De hecho, durante este bloque de formación sólo 4 de 7 de los animales tratados con 30,0 mg/kg de nepicastato fueron capaces de completar los ensayos en absoluto de los cuatro retrasos.

[0391] Durante el bloque 3 de la prueba los animales tratados con fisostigmina muestran un deterioro de retardo independiente en la precisión de elección. ANOVA en el porcentaje de decisiones correctas reveló un efecto principal significativo del tratamiento farmacológico, pero la interacción de retardo de tratamiento farmacológico X no alcanzó significación estadística. Prueba de Dunnett post hoc en el efecto principal de tratamiento de drogas reveló que sólo el grupo tratado con fisostigmina difería significativamente del grupo tratado con vehículo. El tratamiento farmacológico no afectó significativamente la latencia de respuesta o número de ensayos completado, $F(5,45) = 0,701$, $p = 0,625$, durante este bloque de prueba.

[0392] Los efectos de tratamiento con el fármaco en el porcentaje de decisiones correctas acercaron, pero no alcanzaron significación estadística en el bloque 4 ($p = 0,056$). El tratamiento con medicamentos no perjudicó significativamente la latencia de respuesta con el ANOVA revelando una interacción de retardo X de tratamiento de drogas significativo. Posteriores ANOVAs unidireccionales realizados en los retardos de 0, 8, 16 y 32 s encontraron un efecto de grupo significativo estadísticamente en sólo el 32 s de retardo; $F(5,40) = 2,115$, $p = 0,084$; $F(5,40) = 1,403$, $p = 0,244$; $F(5,40) = 2,259$, $p = 0,067$; $F(5,40) = 3,325$, $p = 0,013$, de los retrasos 0, 8, 16 y 32 s, respectivamente. Prueba de Dunnett post hoc en el 32 s de retardo encontrado que sólo el grupo tratado con 10,0 mg/kg de nepicastato tenía una latencia más larga para llevar a cabo la respuesta de elección que el grupo tratado con vehículo. El tratamiento farmacológico no afectó significativamente el número de ensayos completados durante el bloque 4 de la prueba, $F(5,45) = 1,0533$, $p = 0,199$.

[0393] Durante el bloque 5 del ensayo, el nepicastato indujo un deterioro por una dosis marcada y dependiente de retardo en la precisión de elección. ANOVA de dos vías reveló una interacción de retardo X de tratamiento farmacológico significativo y ANOVA de una vía posterior a retrasos de 0, 8, 16 y 32 s encontró una diferencia significativa del grupo en porcentaje de decisiones correctas en sólo el 32 s de retardo, $F(5,39) = 0,327$, $p = 0,894$; $F(5,39) = 0,825$, $p = 0,539$; $F(5,39) = 1,188$, $p = 0,333$; $F(5,39) = 3,018$, $p = 0,021$, de los retrasos 0, 8, 16 y 32 s, respectivamente. Una prueba post hoc de Dunnett realizada en el retardo de 32 s encontró que tanto los grupos 10 mg/kg como los grupos 30 mg/kg tratados con nepicastato mostraron alteraciones en porcentaje de decisiones correctas con respecto a los animales tratados con vehículo.

[0394] Nepicastato y fisostigmina no afectó significativamente la latencia de respuesta o número de ensayos completados, $F(5,45) = 1,692$, $p = 0,156$, durante el bloque 5 de la prueba.

[0395] Muchos de los animales no realizaron la igualación retardada a la muestra de ensayo después de la administración de HBr de escopolamina. Sólo 1 rata tratada con 10,0 mg/kg de nepicastato más escopolamina, y sólo 2 ratas tratadas con 30,0 mg/kg de nepicastato más escopolamina fueron capaces de completar los ensayos en cada uno de las cuatro retrasos. De hecho $n < 4$ ocurrió en todos los grupos, excepto para el vehículo/vehículo y el vehículo/escopolamina en el que siete y cuatro ratas, respectivamente, completaron ensayos en cada uno de los cuatro retrasos.

[0396] El número de ensayos realizados por los animales en todos los grupos tratados con escopolamina se redujo

significativamente, $F(6, 16) = 8,801$, $p = 0,001$.

[0397] Debido al pequeño número de sujetos en los grupos tratados con escopolamina, la precisión de elección y los datos de latencia de respuesta no fueron sometidos a ANOVA. Además, el porcentaje medio de elecciones correctas se derrumbó en los cuatro retrasos. Una prueba t de comparación de la precisión de elección en el grupo de vehículo/escopolamina al grupo Vehículo/Vehículo encontró que la escopolamina significativamente afectó el porcentaje de elecciones correctas, $t_{(9)} = 4,15$, $p = 0,003$. Con menos de 4 sujetos en los otros grupos, otros análisis estadísticos no se llevaron a cabo. Es interesante notar, sin embargo, que los dos animales en el grupo que recibió 30,0 mg/kg de nepicastato más escopolamina rindió bien en comparación con el grupo tratado con escopolamina solo: los dos animales tratados con 30,0 mg/kg de nepicastato más escopolamina hizo más elecciones correctas que cualquiera de los animales en el grupo tratado con vehículo/escopolamina o cualquiera de los animales en los otros grupos tratados con escopolamina.

[0398] Nepicastato cuando se administra solo no parece induce efectos de mejora de memoria en la prueba de DMTP. Es notable que el deterioro inducido por el retraso de la memoria observado en los animales de control tratados con vehículo parecía disiparse a través de los cinco bloques de prueba. Sin embargo, en el quinto bloque de prueba los animales de control tratados con vehículo seguían mostrando un deterioro de la memoria de retardo dependiente con 100% de precisión de elección en el retardo de 0 s y 80% de precisión de elección en el retardo de 32 s. Por lo tanto, no se observó un efecto de techo en el rendimiento de los animales tratados con vehículo en el retardo de 32 s.

[0399] En particular, el quinto bloque de entrenamiento de nepicastato puede tener efectos perturbadores de memoria selectiva. Fisostigmina no mejoró el rendimiento en cualquiera de los días de tratamiento y, de hecho produjo un deterioro de retardo independiente en la precisión de elección durante el Bloque 3 de la prueba (días 5 y 6). Los resultados de una prueba de provocación de escopolamina en el día 11 en que a los animales se les administró escopolamina HBr (0,1 mg/kg) y el nepicastato o fisostigmina no pudieron analizarse debido al pequeño número de sujetos en el nepicastato y los grupos tratados con fisostigmina que eran capaces de realizar la tarea DMTP. Sin embargo, dos ratas que recibieron 30,0 mg/kg de nepicastato y escopolamina que fueron capaces de realizar la tarea DMTP muestran una precisión de elección más alto que cualquiera de los otros animales tratados con escopolamina. Es posible que nepicastato es capaz de revertir algunos de los trastornos cognitivos inducidos por la escopolamina, un efecto que puede ser enmascarado por otras acciones "no cognitivas" del compuesto.

[0400] Nepicastato indujo la dosis significativa y deterioros de retardo dependiente en la precisión de elección. Los animales tratados con 10,0 mg/kg de nepicastato mostraron absolutamente ninguna alteración en la precisión de elección en los retardos de 0, 8 y 16 s. Por el contrario, en el retardo de 32 s, los animales en el grupo de nepicastato 10,0 mg/kg fueron perjudicados en relación al grupo tratado con vehículo. El grupo tratado con la dosis más alta de 30,0 mg/kg de nepicastato no mostró deterioro en la precisión de elección en el retardo de 0 s, una tendencia a la alteración de precisión de elección en retrasos de 8 y 16 s y un deterioro significativo en la precisión de elección con respecto a grupos de vehículo tratados en el retardo de 32 s. La naturaleza de retardo dependiente de estas alteraciones inducidas por fármacos en la precisión de elección sugiere que el compuesto puede estar actuando directamente sobre la memoria a corto plazo o de trabajo. Los animales son suficientemente motivados y capaces de realizar con precisión la tarea DMTP por los retrasos más cortos y mostrar deterioros sólo cuando el intervalo de retención es largo. Pocos compuestos que han sido examinados en este modelo han demostrado este perfil. Muchos compuestos que han sido reivindicados para afectar la memoria típicamente inducen alteraciones en la precisión de la elección que se observan en todos los retardos (por ejemplo, MK-801, escopolamina). Nepicastato tuvo un pequeño efecto sobre la latencia para completar los ensayos que era evidente en el cuarto bloque de formación, durante el cual los animales tratados con 10,0 mg/kg de nepicastato tardaban más en completar los ensayos de retardo de 32 s que los animales tratados con vehículo. Este efecto no se depende de la dosis y no se observó en el grupo tratado con 30,0 mg/kg. También hubo una tendencia para los animales tratados con el nepicastato para completar un menor número de ensayos que los animales tratados con vehículo: tendencias para las reducciones en el número de ensayos completados fueron observados durante los dos últimos bloques de entrenamiento. Debido a la variabilidad de los datos, sin embargo, estas tendencias no alcanzaron significación estadística. Esta variabilidad en los datos fue inesperada. Parece probable que la tensión inicial inducida por el régimen de dosificación oral crónica puede haber interrumpido el rendimiento de estos animales privadas de alimento, particularmente durante los primeros bloques del experimento. Todos los grupos mostraron reducciones en el número de ensayos realizados entre el primero y el segundo bloque de la entrenamiento. Los animales se recuperaron de este descenso inicial y mostraron un rendimiento más consistente a través de los siguientes tres bloques de entrenamiento.

[0401] Se encontró que algunos de los animales en este estudio comenzaron a perder peso, en algunos casos en más del 5% del peso corporal total. Los animales que mostraban pérdida de peso se separaron, y recibirán suplementos de alimentación al final de su sesión de entrenamiento diario. Esta alimentación adicional puede haber contribuido a la variabilidad en el número de ensayos completados. Aunque registros sistemáticos no se hicieron, la observación casual sugirió que más animales en el grupo de 30 mg/kg que en los otros grupos tuvieron que recibir alimentos adicionales. Esta observación es consistente con los resultados de un estudio piloto en el que la administración diaria de 100 mg/kg p.o. de nepicastato indujo una marcada pérdida de peso corporal.

[0402] La fisostigmina no mejoró el rendimiento de las ratas en la prueba DMTP. De hecho, los animales tratados con fisostigmina mostraron un deterioro significativo en el porcentaje de decisiones correctas durante el bloque 3 de entrenamiento. En contraste con los efectos obtenidos con el nepicastato, el deterioro en la precisión de elección inducida por fisostigmina era de retardo independiente: el término de interacción a partir del análisis de la varianza no se acercó a la significación estadística. Por lo tanto, los efectos de la fisostigmina en la precisión de respuesta son propensos a ser secundarios a efectos de comportamiento tóxicos del fármaco cuando se administra a esta dosis. Los animales parecían desarrollar tolerancia a estos efectos durante los dos últimos bloques de entrenamiento durante el cual las deficiencias en la precisión de la elección inducida por fisostigmina ya no alcanzaron significación estadística.

[0403] Por último, la fisostigmina no pareció revertir los efectos de la escopolamina durante la prueba de escopolamina. Es posible que una dosis diferente de la fisostigmina puede haber sido eficaz contra la escopolamina. No hemos intentado con anterioridad revertir la escopolamina con fisostigmina utilizando el presente régimen de dosificación y por lo tanto no tienen datos históricos para comparar con los resultados actuales. Esta falta de efecto de la fisostigmina puede deberse al hecho de que, en comparación con la administración aguda, una dosis más baja de la fisostigmina tuvo que emplearse para la administración crónica. Los animales no habrían tolerado la administración repetida de una dosis mayor de la fisostigmina (véanse los resultados del estudio piloto), que pueda ser necesaria para revertir los efectos de la escopolamina. Además, el nepicastato no pareció revertir los efectos de la escopolamina aunque es interesante que los dos animales tratados con 30,0 mg/kg de nepicastato que eran capaces de realizarse durante la prueba de escopolamina mostró una mayor precisión de elección que cualquiera de los animales en cualquiera de los otros grupos tratados con escopolamina. Sería necesaria más investigación para determinar de manera inequívoca si el tratamiento agudo o crónico con el nepicastato puede revertir los efectos de la escopolamina en esta prueba.

[0404] Nepicastato parece tener efectos específicos de memoria disruptores que son evidentes después de 8 días de dosificación. Fisostigmina no mejoró el rendimiento en cualquiera de los días de tratamiento y, de hecho produjo un deterioro de retardo independiente en la precisión de elección durante el Bloque 3 de la prueba (días 5 y 6). Los resultados de una prueba de provocación de escopolamina en el día 11 en el que a los animales se les co-administró escopolamina HBr (0,1 mg/kg) y el nepicastato o fisostigmina no pudieron analizarse debido al pequeño número de sujetos en el nepicastato y los grupos tratados con fisostigmina que eran capaces de realizar la tarea DMTP. Sin embargo, dos ratas que recibieron 30,0 mg/kg de nepicastato y escopolamina que fueron capaces de realizar la tarea DMTP muestran una precisión de elección más alta que cualquiera de los otros animales tratados con escopolamina. Es posible que nepicastato es capaz de revertir algunos de los trastornos cognitivos inducidos por la escopolamina, un efecto que puede ser enmascarado por otras acciones "no cognitivas" del compuesto. En el bloque final del entrenamiento, el nepicastato indujo deterioros dependientes de la dosis y retardo de la precisión de elección. Este es un hallazgo inesperado dado que muchas otras drogas que interrumpen memoria, tales como escopolamina y MK-801, inducen alteraciones de retardo independiente en la precisión de elección que probablemente se deben a las deficiencias en la atención y/o factores de motor/motivación. Por el contrario, es poco probable que los cambios en la atención o el rendimiento de motor/motivación podría ser responsable de los resultados actuales con nepicastato. Si este fármaco es selectivo para un nuevo receptor o mecanismo farmacológico, estos resultados sugieren un papel importante para este sustrato en la memoria de trabajo.

Ejemplo de Referencia 30

[0405] Recientemente hemos demostrado que el nepicastato, un inhibidor selectivo de α -hidroxilasa de dopamina, exhibió una actividad antihipertensiva eficaz en estudios de toxicidad aguda en SHR. Los efectos antihipertensivos de nepicastato se examinaron crónicamente en la misma cepa de ratas. Además, también exploramos los posibles efectos de potenciación de la co-administración del compuesto con el inhibidor de enzima convertidor de angiotensina enalapril. También se examinaron los efectos de los tratamientos sobre la hipertrofia cardíaca en SHR.

[0406] Ratas macho SHR/NCr1 BR (22-28 semanas de edad en el inicio de la dosificación), y ratas WKY/NCRI BR de peso coincidente se utilizaron. Cuatro series de experimentos se llevaron a cabo secuencialmente:

Serie I

Vehículo	
Enalapril	10 mg/kg
nepicastato	3 mg/kg
nepicastato	10 mg/kg

Serie II

Vehículo	
Enalapril	10 mg/kg

nepicastato 30 mg/kg
nepicastato 100 mg/kg

Serie III

Vehículo
Enalapril 1 mg/kg
nepicastato 30 mg/kg
nepicastato 30 mg/kg + enalapril 1 mg/kg

Serie IV

Enalapril 1 mg/kg (E1)
nepicastato 15 mg/kg + E1
nepicastato 30 mg/kg + E1
nepicastato 60 mg/kg + E1

[0407] En cada serie, 24 SHR se implantaron crónicamente con implantes de telemetría para la medición de la presión arterial, la frecuencia cardíaca y la actividad motora. La rata se anestesió con pentobarbital sódico (60 mg/kg, ip) y se afeitó su abdomen. En condiciones asépticas, se realizó una incisión en la línea media. La aorta abdominal se expuso, y se canuló con el catéter de una unidad de transmisor de telemetría. Después de que el transmisor se suturó a la musculatura abdominal, la piel se cerró. Cada rata se dejó recuperar durante al menos 2 semanas antes de someterse a la administración de fármacos. Las ratas se alojaron individualmente en una habitación tranquila con el ciclo invertido de luz/oscuridad (08:00-20:00, luces apagadas).

[0408] Tres días antes del inicio del experimento, las ratas fueron divididas aleatoriamente en 4 grupos y su presión arterial sistólica (SBP), la presión arterial diastólica (DBP), la presión arterial media (MBP), frecuencia cardíaca (HR), y la actividad motora (MA) se monitorearon. Después se establecieron los valores previos a la dosis para estos parámetros, los grupos respectivos de las ratas recibieron un tratamiento diario de 30 días de nepicastato y/o enalapril (véase abajo).

[0409] Veinticuatro horas después del último tratamiento, las ratas se sacrificaron y se recogieron los ventrículos izquierdo, ponderado (peso húmedo), y se liofilizaron durante al menos 24 h para obtener los pesos secos.

[0410] Al comienzo de cada experimento, el número de ratas en cada grupo sometido a monitorización de telemetría fue siempre 6. En la serie I, sin embargo, 7 ratas Wistar Kyoto (WKY) se alojaron de manera similar y se dosificaron con vehículo (agua), mientras que en Serie III y IV 2 ratas adicionales en cada grupo se trataron de manera similar (para aumentar el número de animales para el análisis estadístico de los efectos sobre la hipertrofia de SHR). Ninguna instrumentación de telemetría o monitoreo se llevó a cabo en estas ratas.

[0411] Tanto nepicastato como enalapril se prepararon en agua. Todas las dosis se administraron por vía oral a la rata en 10 ml/kg y se expresaron como equivalentes de base libre. Enalapril (Vasotec®) se obtuvo comercialmente de una farmacia local.

[0412] Un sistema de recogida de datos computarizada se utilizó para recoger continuamente datos sobre SBP, DBP, MBP, HR, y MA. Los datos sobre cada rata se recogieron cada 5 min. durante 10 s. A continuación se promediaron por hora y los errores estándar de la media (SEM) se calcularon. Al final del tratamiento, se obtuvieron masa ventricular izquierda (pesos en seco y en húmedo). Los pesos corporales se registraron diariamente.

[0413] Todos los valores se expresaron como medias \pm SEM. La significancia estadística se definió como el nivel de p inferior a 0,05.

[0414] Los datos sobre MBP, HR y MA se analizaron por separado. Cada análisis se realizó en 26 puntos de tiempo medidos. Se utilizó un ANOVA de dos vías con efectos principales para el tratamiento y el tiempo y su interacción. Si se detectó un efecto del tratamiento global o una interacción significativa, se realizó una serie de ANOVA de una vía en cada punto de tiempo. Las comparaciones por parejas en cada punto de tiempo se realizaron mediante el procedimiento de Dunn. Si no se detectó ningún efecto global del tratamiento, entonces la diferencia de pares de control se llevaría a cabo ajustando el valor crítico usando un ajuste de Bonferroni.

[0415] Para la masa del ventrículo izquierdo, se utilizó un análisis de covarianza con una covariable de los pesos corporales finales para analizar los pesos en húmedo de tejido y pesos en seco de tejidos, mientras que se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar las proporciones de peso húmedo de tejido/peso corporal y peso seco/pesos de cuerpo de tejido. Si no se detectó un efecto global del tratamiento entre todos los grupos, a continuación, se hizo un ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples.

[0416] Para el peso corporal de un ANOVA de dos vías con respecto a los cambios desde antes de la dosis se

utilizó para analizar los efectos generales para el tratamiento, día, y el tratamiento por interacción de día. A continuación, un ANOVA de una vía se realizó para cada día, y las comparaciones por pares para los grupos tratados con fármaco a los controles de vehículo se hicieron usando el procedimiento de Dunn y la estrategia de LSD de Fisher para ajustar para comparaciones múltiples.

- 5
- 10 **[0417]** Para las series I y II, la administración oral de nepicastato a 3 y 10 mg/kg (todas las dosis expresadas en lo sucesivo son p.o.) no afectó significativamente la presión arterial en cualquiera de los 30 días de tratamiento (datos no mostrados). A 30 mg/kg, nepicastato bajó gradualmente MBP en el día 1 y continuó para disminuir el MBP a una máxima de -20 mmHg en el día 3 ($p < 0,01$), con poca recuperación dentro de 24 h. Se indujeron efectos antihipertensivos similares durante todo el estudio. A 100 mg/kg, el compuesto indujo una respuesta antihipertensiva pico de 29 mmHg 21 h después de la dosificación en el día 1 ($p < 0,01$). MBP continuó disminuyéndose y alcanzó su punto más bajo de aproximadamente -42 mmHg en el día 3 ($p < 0,01$). La MBP se mantuvo baja durante todo el estudio.
- 15 **[0418]** Enalaprilato en 10 mg/kg, consistentemente baja MBP durante todo el estudio. Se observó una disminución máxima de -29 mmHg ($p < 0,01$) en MBP dentro de 1 hora después de la dosificación en el día 5.
- 20 **[0419]** En la serie III, aunque mono-administración de enalaprilato a 1 mg/kg ($n = 6$) o nepicastato a 30 mg/kg ($n = 6$) indujo sólo un pequeño efecto antihipertensivo, la co-administración de los dos compuestos ($n = 6$) indujo una mayor respuesta antihipertensiva (-21 mmHg a hr 16 en el día 1, $p < 0,01$). El inicio de la respuesta fue lento y gradual. Con una segunda administración en el día 2, se observó una mayor respuesta antihipertensiva la mayor parte del día con el tratamiento combinado (-25 mmHg en h 13, $p < 0,01$). Se observó la potenciación a lo largo del estudio.
- 25 **[0420]** En la serie IV, potenciación de los efectos de nepicastato por una dosis no antihipertensiva de enalaprilato se estudió adicionalmente. En presencia de enalaprilato (1 mg/kg), aunque nepicastato a 60 mg/kg produce inicialmente un efecto antihipertensivo mayor y más largo que los inducidos por el compuesto en 15 o 30 mg/kg, no se observó un mayor efecto en un día 8 a través del día 30. Por lo tanto, la potenciación no estaba relacionada con la dosis de nepicastato ensayada (15, 30 y 60 mg/kg). El grupo que recibió el nepicastato 15 mg/kg y E1 exhibió baja presión media de la sangre con un gran error estándar (dos ratas mostraron mayores respuestas antihipertensivas que el resto).
- 30 **[0421]** Nepicastato a 3 y 10 mg/kg, no afectó constantemente la frecuencia cardíaca (HR) en los estudios de 30 días. Los grupos tratados con el nepicastato a 100 mg/kg, sin embargo, tienden a exhibir HR menor que el grupo control del vehículo, por lo menos en las primeras horas después de la dosificación. Aunque enalaprilato a 1 mg/kg no afectó HR, el compuesto a 10 mg/kg tendió a inducir una pequeña taquicardia transitoria dentro de 2 h después de la dosificación. En la Serie III, ninguno de los tratamientos, es decir, enalaprilato (1 mg/kg), el nepicastato (30 mg/kg) o la combinación, afectó consistentemente HR. En Serie I.V., los grupos tratados con el nepicastato (15, 30 y 60 mg/kg) y enalaprilato (1 mg/kg) tendían a exhibir HR más baja que el grupo tratado con enalaprilato (1 mg/kg) solo.
- 35 **[0422]** Durante todo el estudio, ninguno de los tratamientos con fármacos mostró un efecto significativo sobre la actividad motora (MA).
- 40 **[0423]** Nepicastato con un 3-100 mg/kg no afectó a la hipertrofia cardíaca observada en SHR ($p > 0,05$). Enalaprilato (10 mg/kg) redujo significativamente la masa del ventrículo izquierdo en la Serie II, pero no en la Serie I. En Serie III, enalaprilato a 1 mg/kg no retrocede la hipertrofia, pero la co-administración de enalaprilato (1 mg/kg) y el nepicastato (30 mg/kg) redujo significativamente la masa ventricular izquierda de la SHR ($p < 0,01$). En Serie IV, sin embargo, efectos de la co-administración de enalaprilato (1 mg/kg) y el nepicastato a los 15, 30 y 60 mg/kg de la masa ventricular izquierda no eran diferentes de enalaprilato solo ($p > 0,05$).
- 45 **[0424]** En comparación con el tratado con vehículo, el tratamiento de las SHR con nepicastato a los 3 y 10 mg/kg no tuvo ningún efecto sobre los pesos corporales en SHR ($p > 0,05$). El tratamiento con el compuesto a 30 y 100 mg/kg, sin embargo, induce un mayor aumento en el peso corporal ($p < 0,05$).
- 50 **[0425]** En comparación, enalaprilato a 10 mg/kg disminuyó significativamente ($p < 0,05$) o no tuvo efecto sobre el peso corporal de la rata. Aunque el tratamiento con enalaprilato a 1 mg/kg disminuyó ligeramente el peso corporal, la co-administración de enalaprilato (1 mg/kg) y el nepicastato (30 y 60 mg/kg) aumentó ligeramente los pesos corporales de la rata.
- 55 **[0426]** Los pesos corporales antes de la dosis de las ratas tratadas con vehículo, enalaprilato, y el nepicastato a las 3 y 10 mg/kg eran 387 ± 11 , 415 ± 12 , 407 ± 4 , y 415 ± 12 g, respectivamente.
- 60 **[0427]** Los pesos corporales antes de la dosis de las ratas tratadas con vehículo, enalaprilato, y el nepicastato a los 30 y 100 mg/kg eran 399 ± 10 , 389 ± 6 , 389 ± 9 , y 401 ± 10 g, respectivamente.
- 65 **[0428]** Los pesos corporales antes de la dosis de las ratas tratadas con vehículo, enalaprilato, y el nepicastato a 30 mg/kg sin y con enalaprilato eran 365 ± 9 , 371 ± 8 , 361 ± 7 , y 369 ± 7 g, respectivamente.

[0429] Los pesos corporales antes de la dosis de las ratas tratadas con enalapril solo y compañeros de administraciones de nepicastato a los 15, 30, y 60 mg/kg eran 357 ± 6 , 363 ± 6 , 347 ± 8 , y $z8$ g, respectivamente.

5 **[0430]** Se observaron cuatro muertes en la serie 4 de los tratamientos de 30 días. Las causas de estas muertes eran indeterminadas, pero parecía poco probable que estas muertes estuvieran relacionadas con el tratamiento de nepicastato.

10 **[0431]** Los efectos de 30 días de la administración oral crónica de nepicastato sobre la presión arterial, la frecuencia cardíaca, la actividad motora y la masa ventricular izquierda se evaluaron en cuatro series de experimentos en ratas espontáneamente hipertensas (SHR) con implantes de radiotelemedría. El tratamiento diario de nepicastato a 3 y 10 mg/kg ($n = 6$) no afectó a la presión arterial. Nepicastato a 30 mg/kg ($n = 6$) indujo un efecto antihipertensivo pico de -20 mmHg en el día 3 ($p < 0,01$). El efecto antihipertensivo fue modesto pero se detectaron durante todo el estudio. A 100 mg/kg, el nepicastato ($n = 5$) indujo un mayor efecto antihipertensivo. El efecto fue gradual y alcanzó su pico de -42 mmHg en el día 3 ($p < 0,01$). Se observaron magnitudes comparables de efectos anti-hipertensivos para el resto del estudio. En comparación, el inhibidor de enzima de conversión de angiotensina enalapril (10 mg/kg, $n = 6$) indujo un efecto antihipertensivo de -20 a -30 mmHg durante todo el estudio. Aunque la mono-administración de enalapril (1 mg/kg) no indujo efectos antihipertensivos significativos, la co-administración con nepicastato (30 mg/kg; $n = 6$) inducida por un efecto mayor y duradero antihipertensivo ($p < 0,01$). Se observó la potenciación a lo largo del estudio de 30 días. La potenciación de los efectos antihipertensivos del nepicastato por enalapril (1 mg/kg) también fue visto en dosis de 15, 30 y 60 mg/kg, aunque estos efectos no fueron dependientes de la dosis.

25 **[0432]** En los grupos tratados con el nepicastato a 3-10 mg/kg o enalapril a 1 mg/kg, no se observaron efectos significativos sobre la frecuencia cardíaca. Los grupos que recibieron nepicastato a 30 o 100 mg/kg, sin embargo, mostraron una ligera bradicardia durante las horas de vigilia de la rata. En contraste, enalapril a 10 mg/kg indujo una taquicardia transitoria. Co-administración de nepicastato (15, 30, y 60 mg/kg) y enalapril (1 mg/kg) tendía a exhibir la frecuencia cardíaca más lenta que enalapril (1 mg/kg) solo. En cualquiera de los grupos de tratamiento, no se detectó ningún efecto significativo sobre la actividad motora.

30 **[0433]** El tratamiento con el nepicastato en 30 ($n = 6$) y 100 ($n = 5$) mg/kg no tuvo efectos significativos sobre la hipertrofia ventricular izquierda observada en SHRs. Aunque enalapril (1 mg/kg, $n = 8$) o nepicastato (30 mg/kg, $n = 7$) por sí solo no retroceden la hipertrofia, la co-administración de los dos compuestos ($n = 8$) disminuyó significativamente la masa ventricular izquierda de las SHRs. El efecto de la co-administración de la masa ventricular izquierda, sin embargo, no estaba relacionada con la dosis a nepicastato (15, 30 y 60 mg/kg) y no fue estadísticamente diferente de la de enalapril (1 mg/kg) solo.

40 **[0434]** En las cuatro series de experimentos, cuatro muertes ocurrieron durante el curso de los tratamientos de 30 días. Tres ratas se encuentran en los grupos tratados con el nepicastato y una con vehículo. Las causas de muerte fueron indeterminadas, pero parecían no relacionarse con el tratamiento de nepicastato.

45 **[0435]** Nepicastato redujo significativamente la presión arterial en SHR en el período de 30 días a los 30 y 100 mg/kg sin causar ningún taquicardia refleja. Co-administración de nepicastato (30 mg/kg) con una dosis no antihipertensiva de enalapril (1 mg/kg) tuvo un mayor efecto antihipertensivo y un mayor efecto sobre la regresión de la hipertrofia en SHR que el tratamiento de nepicastato solo. Estos efectos, sin embargo, no estaban relacionados con la dosis para el nepicastato (15, 30 y 60 mg/kg).

Ejemplo 31

50 **[0436]** Se realizó un estudio para evaluar los efectos de nepicastato sobre las respuestas a los agentes autonómicos en perros instrumentados anestesiados.

55 **[0437]** A perros Beagle se les administró dosis intraduodenales individuales de 0 (vehículo) o 60 mg/kg de nepicastato a través de una cánula intraduodenal. El grupo de control de vehículo constaba de 1 macho y 1 hembra, y el grupo de tratamiento de nepicastato constaba de 2 machos y 2 hembras. Cada animal se instrumentó quirúrgicamente mientras que se anestesió con gas isoflurano. Antes de la dosificación con la formulación de prueba, las respuestas de presión arterial promedia a dosis intravenosas de agentes autónomos, norepinefrina (3 $\mu\text{g/kg}$), isoproterenol (0,3 $\mu\text{g/kg}$), y acetilcolina (10 $\mu\text{g/kg}$), se evaluaron. Una sola dosis de formulación de prueba se administró a continuación, a cada animal y las respuestas de la presión arterial a los agentes autonómicos se evaluaron aproximadamente 1, 2, y 3 horas después de la dosificación. Al final del experimento, cada perro fue eutanasiado y se retiró del estudio.

65 **[0438]** Se seleccionó el perro ya que se utilizó comúnmente para evaluar los efectos de los compuestos de ensayo sobre los parámetros hemodinámicos. Perros beagle se obtuvieron de Marshall Farms, Inc., North Rose, Nueva York. Cada perro fue identificado por un tatuaje de oído aplicado por el vendedor. Los animales se aclimataron a las condiciones de laboratorio al menos 3 semanas antes de la dosificación. Durante el período de aclimatación, se evaluó el estado general de cada animal y se utilizan los que se consideran sanos. Los perros se asignaron

aleatoriamente a grupos de tratamiento; a los machos se les asignó números impares y a las hembras se les asignó números pares.

5 [0439] Después de la asignación para el estudio, los perros se alojaron individualmente en jaulas de acero inoxidable identificadas con el número de estudio, el número de animal, y número de tatuaje. La sala que alberga los perros se controló con el medio ambiente. Las jaulas se limpian diariamente y los animales se transfirieron a jaulas desinfectadas cada dos semanas. Purina Certified Canine Chow® se ofreció una vez al día y se proporcionó agua ad libitum.

10 [0440] En el día del tratamiento, los perros fueron de aproximadamente 14 a 16 meses de edad. Los machos pesaron 10,3 a 12,9 kg y las hembras pesaron 8,5 a 11,2 kg.

15 [0441] En el momento de la dosificación, una suspensión de 60 mg/ml se preparó mediante la mezcla de polvo de nepicastato con vehículo. La formulación de nepicastato de 60-mg/ml constituida retuvieron la potencia durante la duración de uso. En cada día de dosificación, soluciones acuosas de norepinefrina (60 µg/ml), isoproterenol (6 µg/ml), y la acetilcolina (200 µg/ml) se prepararon en agua estéril.

20 [0442] A un grupo de control de vehículo de 1 macho y 1 hembra se les administró 1 ml/kg de vehículo y a un grupo de tratamiento de nepicastato de 2 machos y 2 hembras se les administró 1 ml/kg de una solución de nepicastato de 60 mg/ml. La dosis total de nepicastato administrada a cada animal fue de 60 mg/kg.

25 [0443] La selección de la dosis se basó en los datos de dos estudios con nepicastato. En un estudio de toxicidad aguda en los perros, una dosis oral única de 400 mg/kg resultó en signos clínicos transitorios de toxicidad. En un estudio de 1 mes, las dosis de 5, 20, o 80 mg/kg se administraron a los perros por vía oral una vez al día. Los signos clínicos de toxicidad estuvieron presentes en 80 mg/kg/día.

30 [0444] Una dosis intraduodenal única de la formulación de vehículo o nepicastato se administró directamente en el duodeno a través de una cánula intraduodenal. La ruta intraduodenal fue seleccionada debido a la vía oral es una ruta clínica propuesta de administración de nepicastato. Volúmenes de dosis se calcularon sobre la base de los pesos corporales individuales registrados antes de la dosificación (datos no tabulados en este informe). Al final de cada experimento, el perro sometido a evaluación se eutanasió con una sobredosis de pentobarbital sódico (300 mg/kg, IV) y se retiró del estudio.

35 [0445] Los perros fueron instrumentados quirúrgicamente según los procedimientos descritos en el protocolo. La comida fue retenida de los animales durante la noche antes de instrumentación quirúrgica. Cada animal bajo evaluación fue anestesiado inicialmente mediante la inyección de (IV) una mezcla de ketamina (10 mg/kg) y diazepam (0,5 mg/kg). Cada animal se colocó sobre una mesa quirúrgica en la parte superior de una almohadilla de aguas calientes circulantes para mantener la temperatura corporal y se ventiló mecánicamente durante todo el experimento. Un plano quirúrgico de anestesia se mantuvo con gas de isoflurano (1,5% a 2% del volumen de corriente suministrado en oxígeno a una velocidad de flujo de aproximadamente 1,5 L/minuto). Se monitorizó la temperatura corporal rectal sólo para uso en la medición de los niveles de gases en sangre y los datos no se presentan en este informe. Electrodo de aguja se colocaron subcutáneamente externos para supervisar un electrocardiograma de cable de extremidad II estándar (ECG) para la evaluación de la anestesia.

45 [0446] La vena femoral izquierda se canuló y la punta del tubo de polietileno se hizo avanzar en la vena cava para la administración de agentes autonómicos. La arteria femoral izquierda se canuló con un tubo de polietileno lleno de 50 U/ml de solución de heparina-solución salina. La punta de la cánula arterial se hace avanzar en la aorta torácica y se acopla a un transductor de presión externa y la presión aórtica sistólica y diastólica se registraron. Muestras de sangre arterial se retiraron de la cánula arterial para análisis de sangre pH, PCO₂ y PO₂.

50 [0447] Una laparotomía media fue realizada y el duodeno se aisló caudal al esfínter pilórico. Una aguja se insertó en el duodeno y la punta de una cánula llena de solución salina se hizo avanzar a través de la aguja y hacia el lumen para la administración de formulación de ensayo. La aguja se retira del lugar de la incisión, la cánula se ancló en su posición, la llave de paso de la cánula se exteriorizó fuera del abdomen, y se realizó reposición de la piel de la incisión abdominal.

55 [0448] Después de la instrumentación quirúrgica, se hicieron ajustes ventilatorios, si es necesario, para llevar pH de sangre arterial y niveles PCO₂ dentro de rangos fisiológicos aproximadamente normales (pH = 7,43 a 7,50 y PCO₂ = 22 a 27 mmHg).

60 [0449] Los agentes autonómicos, norepinefrina (3 µg/kg), isoproterenol (0,3 µg/kg), y acetilcolina (10 µg/kg), se administraron por vía intravenosa mediante inyección de bolo (más de aproximadamente 15 segundos) utilizando la cánula de vena femoral con aproximadamente 10 minutos entre cada dosis. Después de cada administración de un agente, la cánula se enjuagó con 3 ml de agua. La administración de los agentes se repitió aproximadamente 20 minutos después de la primera administración de acetilcolina.

65

5 **[0450]** Aproximadamente 30 minutos después de la segunda administración de acetilcolina, cada animal se dosificó con vehículo o nepicastato. El volumen de dosis fue de 1 ml/kg administrada como un bolo directamente en el duodeno mediante la cánula intraduodenal. Inmediatamente después de la dosificación, la cánula intraduodenal se lavó abundantemente con 3 ml de solución de vehículo. Aproximadamente 50, 110, y 170 minutos después de la dosificación, la administración de los agentes autonómicos se repitió con aproximadamente 10 minutos entre la administración de cada agente.

10 **[0451]** Parámetros de presión aórtica arterial, frecuencia cardíaca, y ECG se registran directamente de forma continua en un registrador de polígrafo. Los valores pH de sangre, PCO₂ y PO₂ desde el analizador de gases en sangre se registraron manualmente en la tabla de polígrafo en el momento aproximado en el que se retiraron las muestras de sangre. La frecuencia cardíaca se utilizó en el ECG, y los parámetros de gases en sangre sólo para evaluar el nivel de anestesia y la estabilidad de la preparación de los animales; estos datos no se presentan en este informe.

15 **[0452]** Presión arterial sistólica, diastólica y media de la aorta se evaluaron antes de la administración (línea base) y en el momento de pico de respuesta a cada agente (cambio máximo desde la línea de base). Presión arterial sistólica, diastólica y media de la aorta, y pH de la sangre, PCO₂ y PO₂ se evaluaron antes de la dosificación y aproximadamente 50, 110, y 170 minutos después de la dosificación con la formulación de prueba.

20 **[0453]** Las respuestas a la norepinefrina se caracterizaron mediante la evaluación de la presión arterial aórtica media justo antes y en el momento de aumento de la presión de pico para cada administración de norepinefrina. Las respuestas a isoproterenol y acetilcolina se caracterizaron mediante la evaluación de la presión arterial aórtica diastólica justo antes y en el momento de disminución de la presión pico para cada administración de isoproterenol y acetilcolina.

25 **[0454]** Al final del experimento, cada perro fue sacrificado mediante una sobredosis de pentobarbital de sodio (aproximadamente 300 mg/kg, IV) y se retiró del estudio.

30 **[0455]** No hay diferencias relacionadas con el tratamiento entre antes de la dosis y las respuestas después de la dosis a la norepinefrina estaban presentes. En los perros de control de vehículo, las respuestas posteriores a la dosis a la noradrenalina eran de menor magnitud que las respuestas anteriores a la dosis; esto fue considerado incidental. Ninguna diferencia relacionada con el tratamiento entre antes de la dosis y las respuestas posteriores a la dosis a isoproterenol estaba presente. Ninguna diferencia relacionada con el tratamiento entre antes de la dosis y las respuestas posteriores a la dosis a la acetilcolina estaba presente.

35 **[0456]** A perros beagle quirúrgicamente instrumentados, anestesiados se les administró una única dosis intraduodenal de 60 mg/kg de nepicastato. Respuestas de la presión arterial a dosis intravenosas de agentes autónomos (norepinefrina, isoproterenol, y acetilcolina) se evaluaron antes de la dosificación y aproximadamente 1, 2, y 3 horas después de la dosificación. Ninguna diferencia relacionada con el tratamiento entre antes de la dosis y las respuestas después de la dosis a los agentes autonómicos estaba presente.

Ejemplo 32

45 **[0457]** Los efectos de la administración intraperitoneal aguda de nepicastato, un inhibidor de DBH (DBHI), sobre la actividad locomotora en ratones. Se ha sugerido que los compuestos de esta clase tienen efectos sobre la actividad locomotora.

50 **[0458]** Ratones de CD-1 adulto macho (ICR) (30-40 g en el día de estudio) fueron alojados en grupos de ocho bajo un ciclo normal de luz/oscuridad con luces encendidas entre 0900 h y 2100 h. Se permitió alimentos y agua ad libitum. Todos los animales eran ingenuos a tratamiento de drogas y pruebas de comportamiento. Cada animal fue utilizado solamente una vez.

55 **[0459]** La actividad locomotora se controló en un sistema automatizado de seguimiento de la actividad de 14 estaciones (San Diego Instrument Co.). Cada estación consistía en una jaula de plexiglas transparente (25 cm x 45 cm x 20 cm; w x l x h) colocados dentro de un marco de metal que contiene 3 fotoemisores y 3 fotodetectores espaciados igualmente a lo largo de la longitud de la pared. La parte inferior de cada jaula fue ligeramente cubierta de ropa de cama de cedro limpio.

60 **[0460]** Los ratones se colocaron en la sala de pruebas al menos 1 h antes de la prueba. Los ratones se colocaron individualmente en una de las jaulas de actividad y se permite explorar durante 30 min. Después de este periodo de habituación, los ratones fueron dosificados por vía intraperitoneal ya sea con el nepicastato (10, 30 y 100 mg/kg), SKF-102698 (30 y 100 mg/kg), cocaína (30 mg/kg) o vehículo y se devolvieron inmediatamente a la misma jaula. Después de un período de tratamiento previo de 60 minutos, la actividad motora se controló durante 180 minutos. Los recuentos de actividad y ambulaciones (definidas como una pausa de 2 haces de foto consecutivos) para cada animal se registraron cada 30 minutos.

65

[0461] Un análisis de dos vías de medidas repetidas de varianza (ANOVA) se realizó utilizando los datos clasificados generales (técnica no paramétrica) para examinar los efectos generales de tratamiento, intervalo de tiempo y tratamiento por intervalo de tiempo de interacción. En cada intervalo de tiempo, un ANOVA de una vía se realizó para ver en cuál de los intervalos existieron efectos del tratamiento. A continuación, comparaciones por pares se realizaron en cada intervalo de tiempo utilizando el procedimiento de Dunn y la estrategia de LSD de Fisher para ajustar por el problema de comparaciones múltiples.

[0462] Para el nepicastato, el rango de dosis fue de 3-100 mg/kg y se disolvió en dH₂O y se sonicó. Para SKF-102698, el intervalo de dosis fue 30-100 mg/kg. Para clorhidrato de cocaína, la dosis fue de 30 mg/kg. Los compuestos se administraron en un volumen de 1 ml/100 g. Todas las dosis reportadas están representadas como base libre, a excepción de la cocaína en que se utilizó el peso de sal.

[0463] En el modelo general, hubo un efecto significativo tanto para el tratamiento como el tiempo (ambos $p < 0,01$), mientras que el tratamiento por interacción en tiempo no fue significativo. El análisis en cada punto de tiempo reveló que había significativos efectos globales de tratamiento a intervalos de tiempo de 1-4 (es decir, los primeros 120 minutos de la prueba; todos $p < 0,01$), mientras que ningún efecto de tratamiento global significativo se detectó a intervalos de tiempo 5 y 6 (es decir, los últimos 60 minutos de la prueba).

[0464] Al comparar la cocaína con el grupo vehículo con respecto a ambos recuentos de actividad y ambulaciones, hubo un efecto de disminución significativa general para el tratamiento y el tiempo (ambos $p < 0,01$), mientras que el tratamiento por interacción en tiempo no fue significativo. El análisis en cada intervalo de tiempo reveló que el grupo de cocaína tenía significativamente mayores recuentos de actividad totales y un número significativamente mayor de ambulaciones a intervalos de tiempo de 1-4, pero no 5 y 6 (todos $p < 0,05$).

[0465] En contraste, no hubo diferencias significativa en cualquiera de los recuentos de actividad totales o las ambulaciones para cualquiera de los grupos de nepicastato tratados o los grupos tratados con SKF-102698 en comparación con el control del vehículo en cualquier intervalo de tiempo.

[0466] Se demostró la cocaína eficazmente como estimulante locomotor a la dosis de 30 mg/kg. En contraste, la administración aguda de nepicastato a dosis de 3, 10, 30 o 100 mg/kg no causó ningún cambio significativo en la actividad total o las ambulaciones en cualquier intervalo de tiempo, en comparación con el control del vehículo. Del mismo modo, SKF-102698 en dosis de 30 y 100 mg/kg no tuvo efectos significativos sobre la actividad total o ambulaciones en cualquier momento examinado intervalo. Estos datos sugieren que estos DBHI están desprovistos de acciones motoras en ratones.

Ejemplo 33

[0467] Se ha demostrado que dosificación aguda con inhibidor de dopamina- α -hidroxilasa nepicastato inhibe la enzima en la arteria mesentérica y el ventrículo izquierdo en ratas espontáneamente hipertensas. Se examinaron cambios en los niveles de noradrenalina y dopamina en la corteza de cerebro de rata hipertensa espontánea y la arteria mesentérica después de 7 y 25 días de la administración oral de 1 mg/kg o 10 mg/kg de nepicastato.

[0468] Nepicastato a 1 y 10 mg/kg se preparó en términos de la base libre. Las pesadas se disolvieron en vehículo (dH₂O) para producir dosis orales que podrían ser administradas en un volumen de 10,0 ml/kg.

[0469] Las ratas macho espontáneas hipertensas (SHR), 16-17 semanas de edad en el inicio del estudio, se utilizaron. Se permitió a los animales alimento y agua ad libitum. Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de tratamiento: administración oral de nepicastato a 10 mg/kg, 1 mg/kg, o un grupo de vehículo de agua desionizada a 10 ml/kg. Las ratas se dosificaron por vía oral una vez al día durante 7 o 25 días con vehículo, 1 mg/kg o 10 mg/kg nepicastato ($n = 8$), excepto para el día 25, en donde $n = 9$. En el día 7, cuatro horas después de la administración del compuesto, los animales fueron anestesiados con halotano, se decapitaron y se cosecharon la corteza y la arteria mesentérica, se pesaron, y se analizaron a partir de las 24 ratas ($n = 8$ /grupo de tratamiento). Las 31 ratas restantes continuaron recibiendo la administración oral con uno de los tres tratamientos durante los siguientes 18 días. A las 4 horas después del último tratamiento, se recogieron la arteria mesentérica y la corteza de este grupo, se pesaron, y se analizaron para los niveles de catecolamina.

[0470] Los animales sacrificados en el día 25 también se utilizaron para mediciones de la presión arterial. La última medición de la presión arterial se realizó el día 22.

[0471] Estadísticamente, los tres tratamientos se compararon en cada período de tiempo (7 o 25 días) utilizando un análisis de una vía no paramétrica de la varianza (ANOVA). Comparaciones por pares de cada tratamiento con el control se realizaron utilizando la estrategia LSD de Fisher sobre los medios, ajustados por diferencias en el tamaño de la muestra, para controlar la tasa de error de experimento. Cada variable se analizó por separado. Para las figuras 6-11, *, $p < 0,05$ y **, $P < 0,01$.

[0472] En la corteza cerebral, después de siete días de tratamiento, el grupo de dosis de 10 mg/kg tuvo niveles de

norepinefrina ($p < 0,1$) significativamente más bajos y una relación de dopamina/norepinefrina ($p < 0,05$) significativamente más alta en comparación con el grupo de vehículo. No hubo ($p > 0,05$) diferencias significativas en los niveles de dopamina en comparación con el vehículo en cualquiera de los dos grupos de tratamiento (1 o 10 mg/kg de nepicastato), o en los niveles de noradrenalina o la relación de dopamina/norepinefrina del grupo de dosis de 1 mg/kg de nepicastato, después de siete días de tratamiento (figuras 6-8). Hubo un ligero aumento significativo ($p < 0,05$) en la relación de la corteza de la dopamina/norepinefrina en el día 7 con la dosis de 10 mg/kg de nepicastato.

[0473] Después de 25 días de tratamiento, los niveles de la corteza de la dopamina en el grupo de dosis de 1 mg/kg de nepicastato fueron significativamente ($p < 0,05$) más altos en comparación con el grupo vehículo. La relación de corteza de la dopamina/norepinefrina en este grupo también es significativamente ($p < 0,01$) mayor que la relación del vehículo. La relación del grupo de dosis de 10 mg/kg de nepicastato fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación con vehículo. Los niveles de norepinefrina en ninguno de los grupos de dosis no fueron significativamente ($p > 0,05$) diferentes de control, ni eran los niveles de dopamina en grupo de dosis de 10 mg/kg (Figuras 6-8).

[0474] En la arteria mesentérica, después de que ambos 7 días ($p < 0,05$) y 25 días ($p < 0,01$) de la dosificación, el grupo de dosis de 10 mg/kg tuvo significativamente más altos niveles de dopamina y relaciones de la dopamina/norepinefrina, comparada con el grupo de vehículo, pero no hubo diferencias en los niveles de norepinefrina. Ninguno de los parámetros medidos fueron significativamente ($p < 0,05$) diferente de control en el 1 mg/kg nepicastato dos e grupo (Figuras 9-11).

[0475] Nepicastato, administrado por vía oral durante 7 y 25 días, significativamente ($p < 0,05$) inhibió @-hidroxilasa de dopamina en la corteza y la arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Mayor inhibición se observó con administración de 10 mg/kg en comparación con el nepicastato 1 mg/kg, por lo tanto, los efectos observados eran dependientes de la dosis.

[0476] Será fácilmente evidente para un experto ordinario en las técnicas relevantes que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas a los métodos y aplicaciones descritas en este documento son adecuadas y pueden ser realizadas sin apartarse del alcance de la invención o cualquier realización de la misma.

Reivindicaciones

1. Compuesto A para uso en un método de tratamiento de un paciente que sufre de o es susceptible a al menos un síntoma de abuso, dependencia, o abstinencia de la cocaína,
 5 en donde el compuesto A es (S)-5-Aminometilo-1-(5,7 difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol; (R)-5-Aminometilo-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-ilo)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol; una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o una mezcla de los mismos.
2. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el método comprende además co-
 10 administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos otro agente seleccionado de benzodiazepina, levodopa, carisoprodol, modafenilo, acamprosato, gamma-butirolactona, gamma-hidroxibutirato, opio, psilocibina, hongo alucinógeno, el tabaco y la nicotina.
3. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el Compuesto A se administra al
 15 paciente después de un período de abstinencia del uso de la cocaína por el paciente.
4. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que el método es un método de
 20 tratamiento de al menos una fase de la dependencia de cocaína en un paciente, en el que la fase de al menos uno de la dependencia de cocaína se selecciona de adquisición, el mantenimiento, la extinción, y la recaída.
5. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 1,
 25 en el que el Compuesto A aumenta al menos un síntoma subjetivo negativo del abuso de cocaína y dependencia; o en el que el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia de la cocaína seleccionada de fatiga, falta de placer, depresión, irritabilidad, trastornos del sueño, aumento del apetito, retraso psicomotor, agitación, sospecha extrema, y deseo de cocaína.
6. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 4,
 30 en el que el Compuesto A inhibe el desarrollo de la fase de adquisición en el paciente; o en el que el Compuesto A promueve el desarrollo de la fase de extinción en el paciente; o en el que el Compuesto A reduce la frecuencia de las recaídas en el paciente.
7. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 6, en el que el Compuesto A reduce en el
 35 paciente al menos un síntoma de abuso, dependencia, o abstinencia de la cocaína.
8. Compuesto A para su uso como se reivindica en método de la reivindicación 7,
 40 en el que el Compuesto A reduce al menos un síntoma del abuso de cocaína en el paciente seleccionado de entre el consumo de cocaína recurrente que resulta en una falta de cumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o el hogar; el consumo de cocaína recurrente en situaciones en las que es físicamente peligroso; problemas legales recurrentes relacionados con la cocaína; y el uso continuado de cocaína a pesar de tener problemas sociales continuos o recurrentes o problemas interpersonales causados o exacerbados por los efectos de la cocaína;
 45 o en el que el Compuesto A reduce al menos un síntoma de dependencia de la cocaína en el paciente seleccionado de tolerancia; retirada; la cocaína se toma a menudo en cantidades mayores o durante un período más largo que el deseado; existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de cocaína; una gran cantidad de tiempo que se pasa en actividades para obtener la cocaína, utilizar la cocaína, o recuperarse de sus efectos; importantes actividades sociales, laborales o recreativas se abandonan o se reducen a causa del consumo de cocaína; y el consumo de cocaína se continúa a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos persistentes o recurrentes que es probable que hayan sido causados o exacerbados por la cocaína.
9. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 1 o la reivindicación 8, en el que el Compuesto
 50 A reduce al menos un síntoma del abuso de cocaína y dependencia seleccionada de trastorno de hiperactividad con déficit de atención; euforia; aumento de energía, entusiasmo y la sociabilidad; menos hambre y fatiga; un sentimiento marcado de fuerza física y mental; disminución de la sensación de dolor; bronquitis; dificultad para respirar; dolor de pecho;
 55 palpitaciones del corazón; arritmia; cardiomiopatía; ataque al corazón; pupilas dilatadas; náusea; vómitos; dolor de cabeza; vértigo; mareo; ansiedad; psicosis; confusión; irritación nasal; formación de costras nasales; hemorragias nasales recurrentes; congestión nasal; dolor facial; disforia; y ansia de cocaína.
10. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 8,
 60 en el que el Compuesto A aumenta al menos un síntoma subjetivo negativo del abuso de cocaína y dependencia; o en el que el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia de la cocaína seleccionado de fatiga, falta de placer, depresión, irritabilidad, trastornos del sueño, aumento del apetito, retraso psicomotor, agitación, sospecha extrema, y el deseo de cocaína.
11. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 6, en el que el Compuesto A mejora una
 65 puntuación del paciente en al menos uno de ADHD-I.V., HAM-D, HAM-A, BDI, escala apatía del inventario neuropsiquiátrico, y una escala de calificación de función cognitiva.

12. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 11, en la que la escala de calificación de la función cognitiva se selecciona de WAIS-R, WMS-R, RAVLT, Ensayos I-VII, RLCE, y TMT, Partes A y B.
- 5 13. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 6, en el que el Compuesto A reduce al menos una de la cantidad y la frecuencia de uso de la cocaína por el paciente.
14. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 6, en el que el Compuesto A promueve la remisión en el paciente.
- 10 15. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 14, en el que la remisión se caracteriza por al menos uno de remisión temprana completa, remisión parcial temprana, remisión completa sostenida y remisión parcial sostenida.
- 15 16. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 6, en el que el Compuesto A prolonga un periodo de remisión en el paciente.
17. Compuesto A para su uso como se reivindica en la reivindicación 6, en el que el método comprende además el tratamiento con al menos uno de manejo de contingencias y la terapia de comportamiento cognitivo.
- 20 18. Compuesto A para uso en un método de la reivindicación 1 o la reivindicación 4 o la reivindicación 6 en el que el método comprende co-administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos otro agente seleccionado de un inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina (SSRI), un inhibidor de la recaptación de serotonina (SNRI), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina (NRI), un inhibidor de la recaptación de norepinefrina, la dopamina (NDRI), un antagonista de 5-hidroxitriptamina_{1A} de serotonina (5HT_{1A}), un inhibidor de α -hidroxilasa de dopamina, un antagonista de receptor de adenosina, un antagonista del receptor A_{2A} de adenosina, un inhibidor de monoamina oxidasa (MAOI), un inhibidor de la monoamina oxidasa B, un bloqueador del canal de sodio, un bloqueador de los canales de calcio, un antagonista del receptor alfa adrenérgico central y periférico, un agonista adrenérgico alfa central, un antagonista del receptor adrenérgico beta central o periférico, un antagonista de receptor NK-1, un antagonista de factor liberador de corticotropina (CRF), un antidepresivo atípico/antipsicótico, un tricíclico, un anticonvulsivo, un antagonista de glutamato, un aminoácido butírico gamma (GABA), un inhibidor de enzima de metabolismo de GABA, un activador de síntesis de GABA, un agonista de dopamina D₂ parcial, un inhibidor de enzima de metabolismo de dopamina, un inhibidor de catecol-O-metiltransferasa, un antagonista del receptor opioide, un estabilizador del estado de ánimo, un agonista directo o indirecto de dopamina, un agonista de 5HT₁ parcial, un antagonista de serotonina 5HT₂, un opioide, un inhibidor de carboxilasa, un agonista opioide parcial, un agonista nicotínico parcial, y un inhalante.
- 25
- 30
- 35

Figura 1

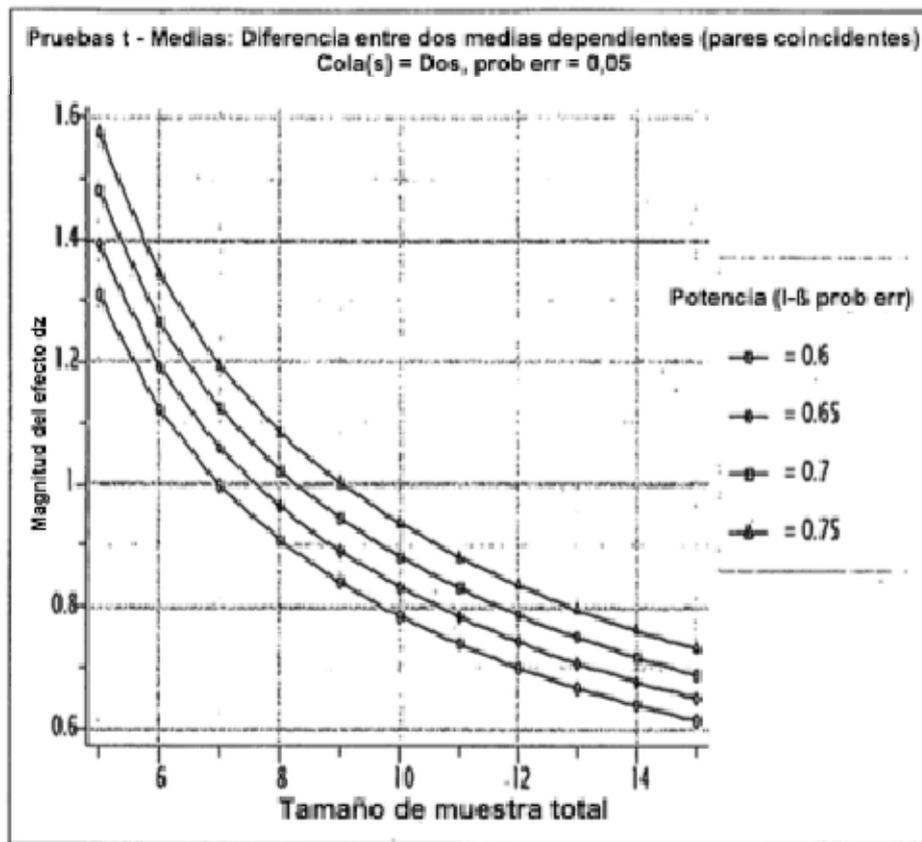


Figura 2

ENZIMA	ENSAYO
Hidroxilasa de tirosina	Liberación de [³ H ₂ O] asociada con conversión de L-[3,5- ³ H]-tirosina a DOPA
Sintetasa de acetilo CoA	Utilización de [³ H]-acético sodio acetato
Acilo-CoA, Aciltransferasa de colesterol	Formación de éster de colesterol de [1- ¹⁴ C]-palmitoilo-CoA y colesterol endógeno
Ca ²⁺ /Calmodulina-proteína quinasa II	Fosforilación [³² P] de BB40 (un sustrato de péptido sintético)
Ciclooxigenasa-I	Oxidación de ácido araquidónico seguido por cuantificación espectrofotométrica de malandialdehído
HMG-CoA reductasa	Formación de [¹⁴ C]-ácido mevalónico de [¹⁴ C]-HMG-CoA
Endopeptidasa neutral (humana)	Formación de 4-metoxi-2-naftilamina de glutarilo-ala-ala-fe-4-metoxi-2-naftilamida
Sintasa de óxido nítrico (constitutivo)	Conversión de [³ H]-arginina a [³ H]-citrulina
Sintasa de óxido nítrico (inducible)	Medición de productos de reacción iNOS (NO ₂ y NO ₃) en preparación de citosol de macrófagos de ratón inducidos por interferon-γ y lipopolisacárido
Fosfodiesterasa III (humana)	Conversión de [³ H]-AMPc a [³ H]-AMP que se convierte posteriormente a [³ H]-adenosina
Fosfolipasa A ₂	Formación de [¹⁴ C]-palmitato de [¹⁴ C]-3-fosfatidilcolina
Proteína quinasa C (no selectiva)	Fosforilación [³² P] de Histona H1

Figura 3

ENZIMA O RECEPTOR	CI ₅₀ (enzima) o pKi (receptor)
<u>Enzimas</u>	
Dopamina-β-hidroxilasa (bovina)	8,5 nM
Dopamina-β-hidroxilasa (humana)	9 nM
Acetilo CoA Sintetasa	< 10 μM
Acilo-CoA: Colesterol Aciltransferasa	< 10 μM
Ca ²⁺ /Calmodulina Proteína Quinasa II	< 10 μM
Ciclooxigenasa-I	< 10 μM
HMG-CoA Reductasa	< 10 μM
Endopeptidasa neutral (humana)	< 10 μM
Sintasa de óxido nítrico (constitutivo)	< 10 μM
Sintasa de óxido nítrico (inducible)	< 10 μM
Fosfodiesterasa III (humana)	< 10 μM
Fosfolipasa A ₂	< 10 μM
Proteína Quinasa (no selectiva)	< 10 μM
<u>Receptores</u>	
α _{1A} , α _{1B} adrenoreceptores	< 5
α _{2A} , α _{2B} adrenoreceptores	< 5
β ₁ , β ₂ adrenoreceptores	< 5
M ₁ receptores muscarínicos	< 5
D ₁ , D ₂ receptores de dopamina	< 5
receptores de μ-opioides	< 5
receptores de serotonina 5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} , 5-HT _{2C}	< 5

Figura 4

ENZIMA	N	CONCENTRACION DE NEPICASTATO (μM)	% INHIBICION DE ENZIMA	CI_{50} * (μM)
Hidroxilasa de tirosina	2	100	11	> 100
NO Sintasa (constitutiva)	2	10	6	> 10
NO Sintasa (inducible)	2	10	-1	> 10
Fosfoesterasa III	2	100	-9	> 100
Fosfolipasa A ₂	2	300	3	> 300
Endopeptidasa neutral (humana)	2	10	-12	> 10
Ca ²⁺ /quinasa de proteina dependiente de almodulina II	2	100	53	~ 100
Acetilo CoA sintetasa	2	100	-4	> 100
Acilo CoA-colesterol acilo transferasa	2	100	6	> 100
HMG-CoA reductasa	2	30	16	> 30
Quinasa de proteina (no selectiva)	2	300	39	> 300
Ciclooxigenasa-1	2	300	44	> 300

* Estimación aproximada de CI_{50}

Figura 5

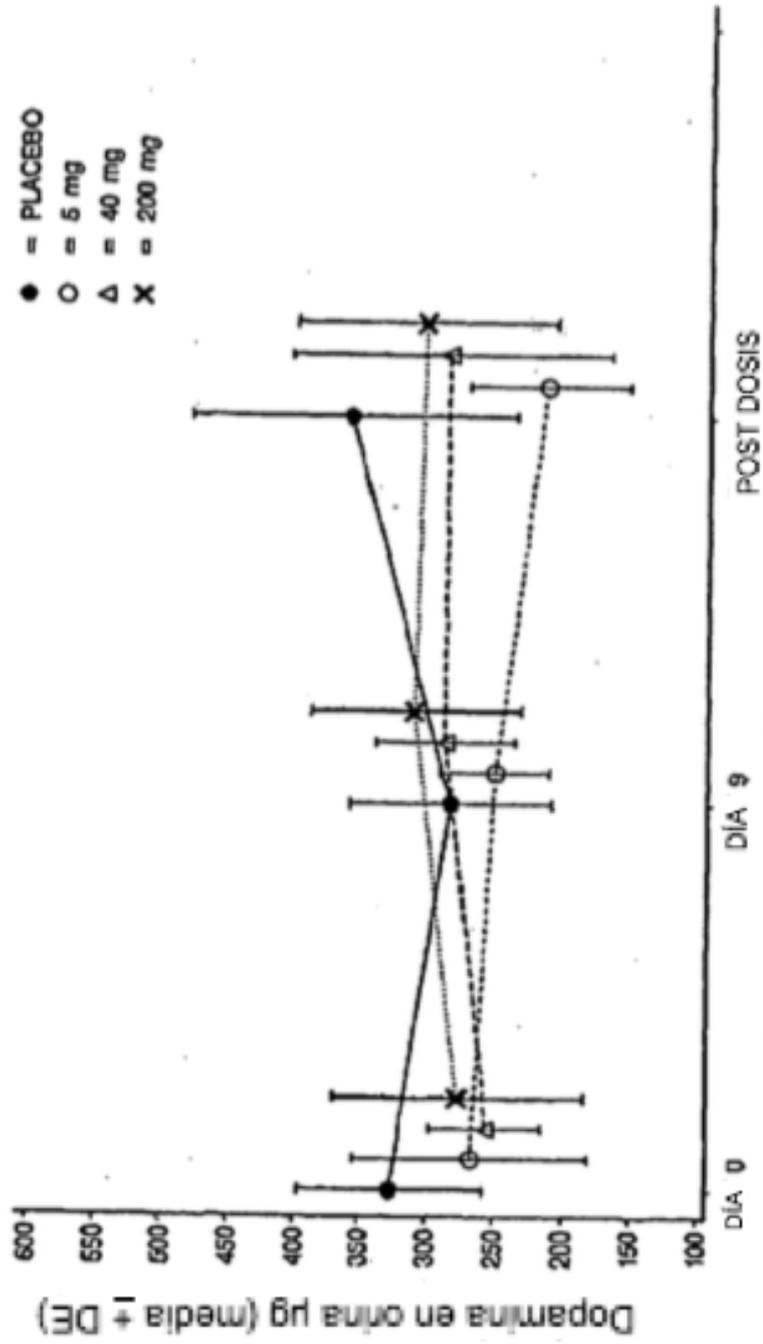


Figura 6

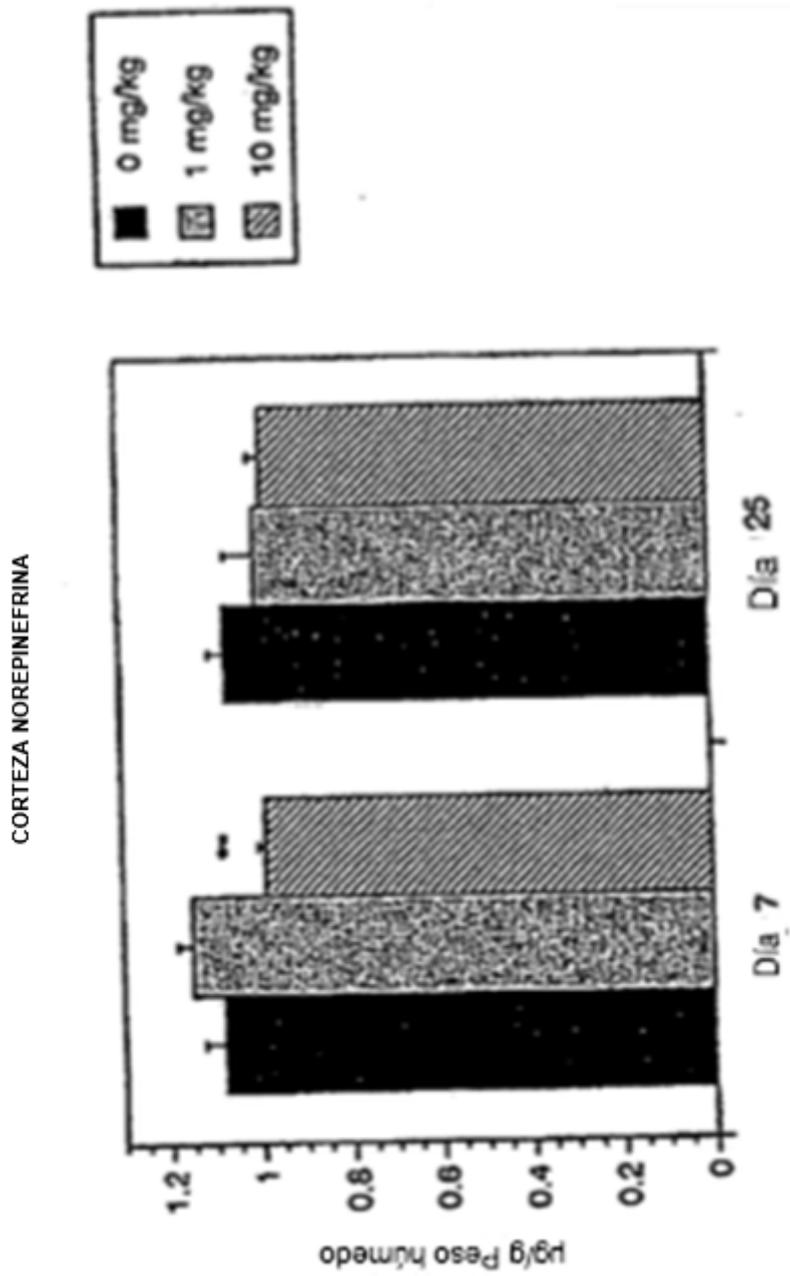


Figura 7

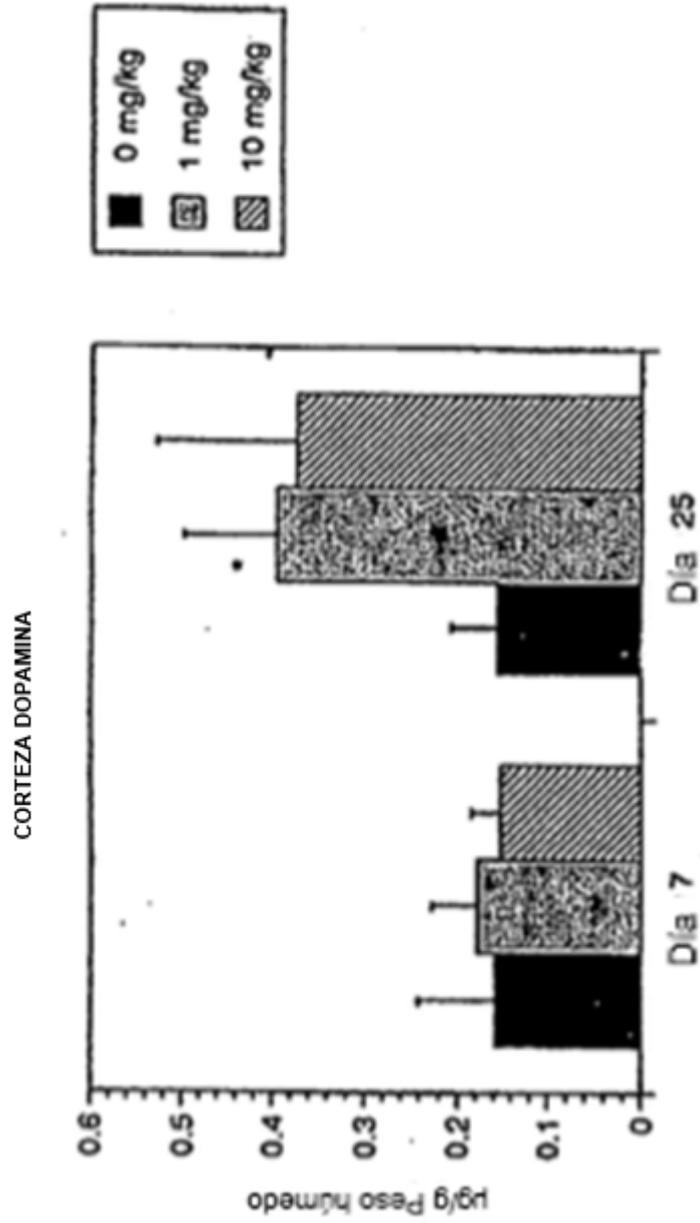


Figura 8

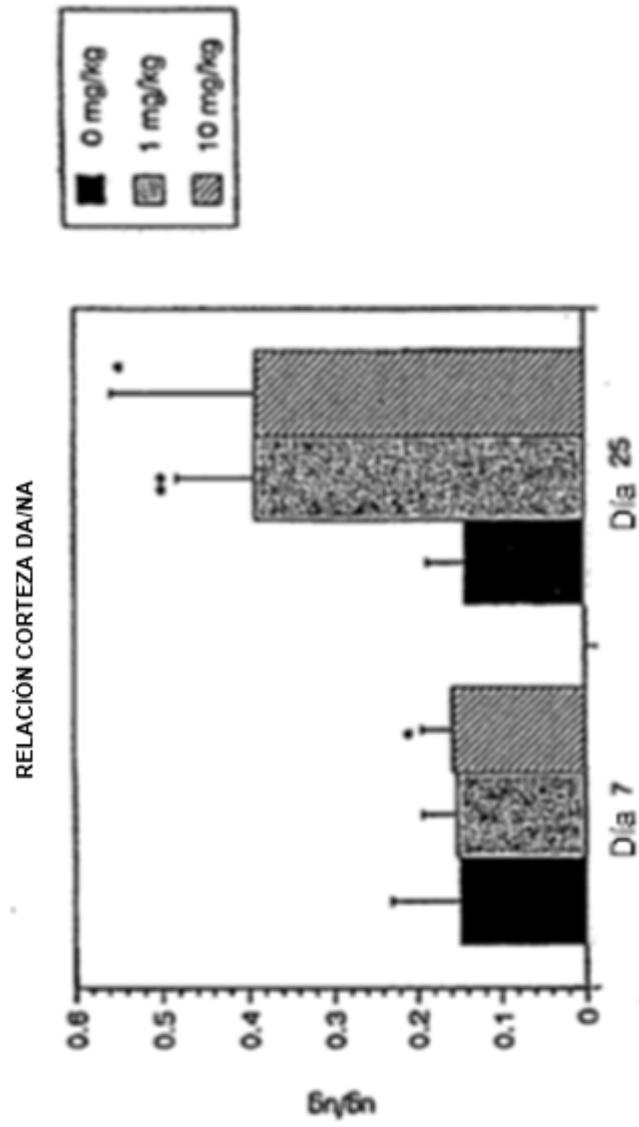


Figura 9

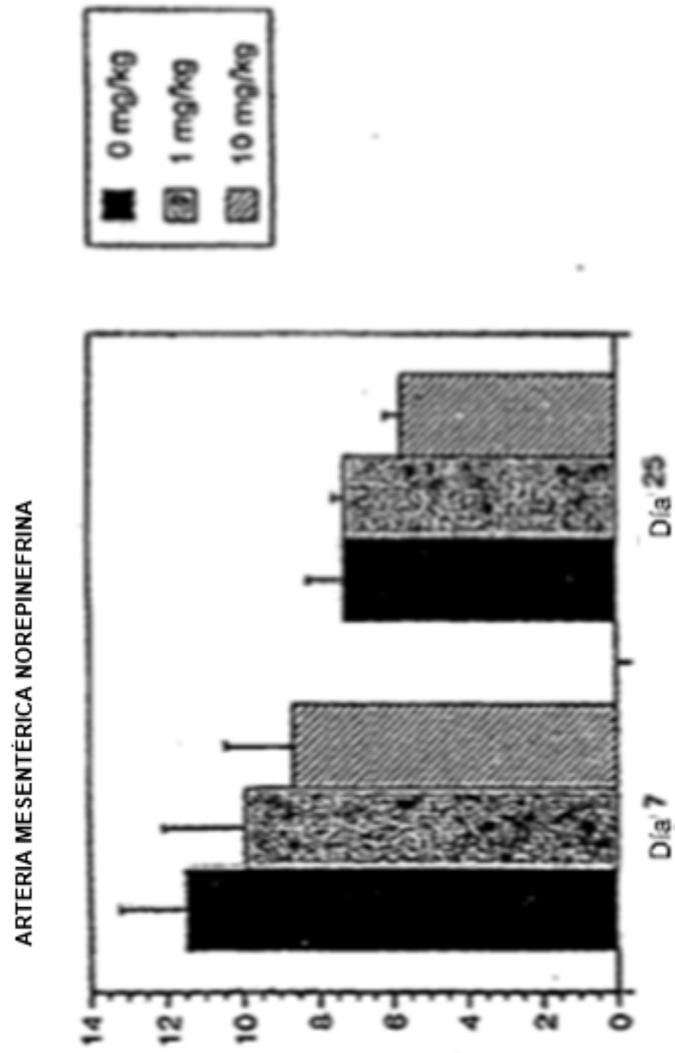


Figura 10

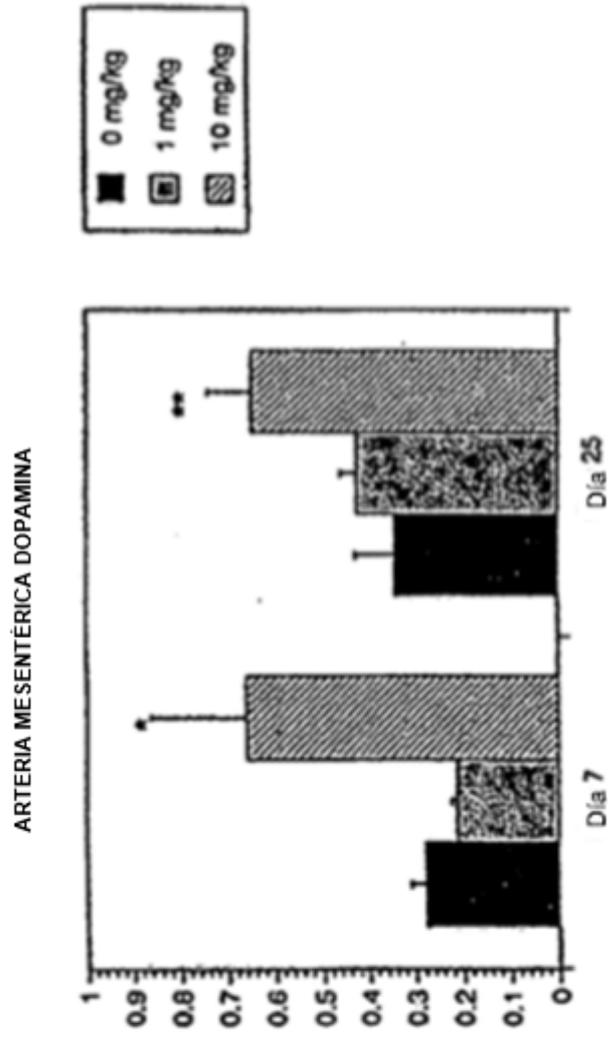


Figura 11

