

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 523**

51 Int. Cl.:

C07D 498/04 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.01.2014 PCT/US2014/010577**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2014 WO14110065**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2014 E 14701636 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2943498**

54 Título: **Compuestos de (tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-ilo de doble actividad como agonistas inversos de H1/antagonistas de 5-HT2A**

30 Prioridad:

14.01.2013 US 201361752203 P

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

22.12.2017

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US**

72 Inventor/es:

GALLAGHER, PETER THADDEUS

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 647 523 T3

Aviso:En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos de (tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-ilo de doble actividad como agonistas inversos de H1/antagonistas de 5-HT_{2A}

5 La histamina juega un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos a través de su interacción con al menos cuatro receptores acoplados a proteína G diferentes, los receptores H1-H4. En el CNS, los receptores H1 juegan un papel clave en el ciclo de regulación del sueño y se sabe que los antagonistas/agonistas inversos H1 inducen somnolencia.

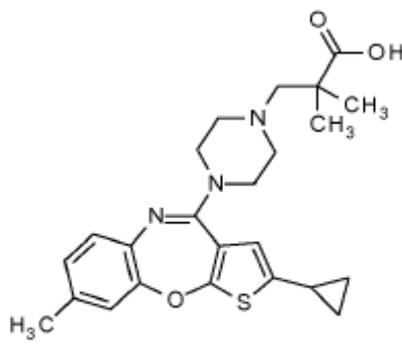
10 Igualmente, la serotonina juega un papel importante en una variedad de procesos fisiológicos a través de su interacción con al menos catorce receptores acoplados a proteínas G diferentes. La modulación de los receptores 5-HT_{2A} en el CNS juega un papel clave en el ciclo de regulación del sueño y los antagonistas 5-HT_{2A} han demostrado mejorar el sueño de onda lenta y el mantenimiento del sueño en pacientes con insomnio.

15 Los compuestos que tienen actividad antagonista o agonista inverso de H1 o 5-HT_{2A} se han usado en el tratamiento del insomnio (por ejemplo, doxepina y trazodona, respectivamente) y han mostrado efectos farmacológicos significativos en estudios de sueño animal. Sin embargo, no hay antagonista/agonista inverso de H1/5-HT_{2A} de doble actividad actualmente disponibles comercialmente.

El documento WO 2007/022068 describe ciertos compuestos (tieno[2,3-b][1,5]benzodiazepina-4-il)piperazin-1-ilo y (tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepina-4-il)piperazin-1-ilo sustituidos para tratar trastornos del sueño.

20 La presente invención proporciona el ácido 3-[4-(2-ciclopropil-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetil-propanoico y sales farmacéuticamente aceptables del mismo, que tienen una alta potencia agonista inversa para el receptor H1, alta potencia antagonista para el receptor 5-HT_{2A}, y buena selectividad para estos receptores, particularmente frente a otros receptores de histamina, receptores de serotonina y otros receptores relevantes fisiológicamente, particularmente frente al receptor 5-HT_{2C}, el receptor GABA_A, los receptores muscarínicos, los receptores dopaminérgicos, los receptores adrenérgicos y el canal hERG. Estos compuestos también demuestran a través de modelos animales que pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos del sueño 25 caracterizados por un mal mantenimiento del sueño. Como tal, se cree que los compuestos son útiles para el tratamiento de trastornos del sueño caracterizados por una pobre latencia del sueño o un mal mantenimiento del sueño o ambos, tales como el tratamiento del insomnio, como por ejemplo el insomnio primario crónico o transitorio, o el insomnio secundario crónico o transitorio, o ambos. Ejemplos de insomnio secundario incluyen, pero no se limitan a insomnio asociado a trastornos depresivos (por ejemplo, trastorno depresivo mayor, distimia y/o ciclotimia), insomnio asociado con trastornos de ansiedad (por ejemplo, trastorno de ansiedad generalizada y/o fobia social), insomnio asociado con dolor (por ejemplo, fibromialgia, dolor crónico de huesos o articulaciones, tal como asociado con artritis inflamatoria u osteoartritis, o dolor neuropático diabético), insomnio asociado a reacciones alérgicas (por ejemplo, asma alérgica, prurito, rinitis, congestión, etc.), insomnio asociado a trastornos pulmonares o de las vías respiratorias (por ejemplo, a apnea obstructiva del sueño, enfermedad reactiva de las vías respiratorias, etc.), 30 insomnio asociado a trastornos psiquiátricos, demencia y/o enfermedades neurodegenerativas y/o insomnio asociado con trastornos del sueño con ritmo circadiano (por ejemplo, trastorno del sueño de trabajo por turnos, trastorno de desfase horario, trastorno de la fase del sueño retrasada, trastorno de fase del sueño avanzada y síndrome de la estela del sueño de no-24 horas, etc.)

La presente invención proporciona un compuesto de fórmula I



I

40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Es decir, ácido 3-[4-(2-ciclopropil-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetil-propanoico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En otro aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Además, este aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica para tratar el insomnio, como por ejemplo el insomnio caracterizado por una latencia prolongada del sueño o un mal mantenimiento del sueño o ambos, como por ejemplo el insomnio primario, el desfase horario, trastorno del sueño por turnos de trabajo, trastorno de la fase del sueño retrasada, trastorno de la fase del sueño avanzada, y/o trastornos de estela del sueño de no-24 horas, que comprenden un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más excipientes, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

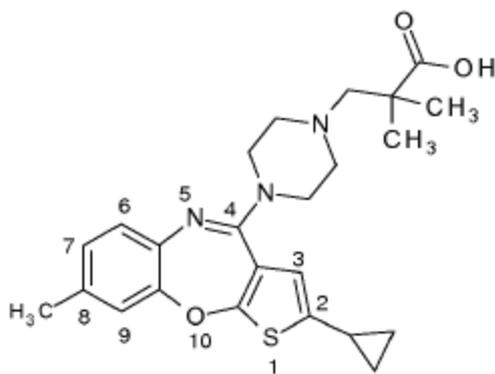
Una realización adicional de este aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con al menos un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos.

La presente invención también proporciona un procedimiento para tratar el insomnio, como por ejemplo el insomnio, caracterizado por una latencia prolongada del sueño o un mal mantenimiento del sueño o ambos, como por ejemplo insomnio primario, desfase horario, trastorno del sueño por turnos de trabajo, trastorno de la fase del sueño retrasada, trastorno de la fase del sueño avanzada, y/o trastornos de estela del sueño de no-24 horas, en un mamífero que comprende administrar a un mamífero en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización particular de estos procedimientos de tratamiento, el mamífero es un ser humano.

Esta invención también proporciona un compuesto de fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para uso en terapia. Dentro de este aspecto, la invención proporciona un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento del insomnio. En otras realizaciones, el insomnio se caracteriza por una latencia prolongada del sueño o un mal mantenimiento del sueño o ambos, como por ejemplo insomnio primario, desfase horario, trastorno del sueño por turnos de trabajo, trastorno de la fase del sueño retrasada, trastorno de la fase del sueño avanzada, y/o trastornos de estela del sueño de no-24 horas. Una realización particular de este aspecto de la invención, los usos son en mamíferos, en particular seres humanos.

Otro aspecto de esta invención proporciona el uso de un compuesto de fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del insomnio, como por ejemplo insomnio primario caracterizado por latencia prolongada del sueño o un mal mantenimiento del sueño o ambos, como por ejemplo el insomnio primario, el desfase horario, el trastorno del sueño por turnos de trabajo, trastorno de la fase del sueño retrasada, trastorno de la fase del sueño avanzada, y/o trastornos de estela del sueño de no-24 horas.

Para mayor claridad, se utilizará la siguiente numeración de la estructura de anillo tricíclica en toda la aplicación:



El compuesto de esta invención tiene unidades estructurales básicas y ácidas, y de acuerdo con lo anterior reacciona con un número de ácidos orgánicos e inorgánicos y bases para formar sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la presente invención se contemplan dentro del alcance de la presente solicitud. El término "sal farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento, se refiere a cualquier sal de un compuesto de la invención que sea sustancialmente no tóxica para los organismos vivos. Tales sales incluyen las enumeradas en Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 - 19 (1977), que son conocidas para el experto en el arte.

Las abreviaturas usadas en este documento se definen de la siguiente manera:

"Salmuera" significa solución acuosa saturada de NaCl.

"DMEM" significa medio de Eagle mínimo de Dulbecco.

"DMSO" significa dimetilsulfóxido.

"EDTA" significa ácido etilendiaminotetraacético.

"Equiv" significa equivalente(s).

5 "FBS" significa suero fetal bovino.

"HEPES" significa ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico.

"HPLC" significa cromatografía líquida de alta resolución.

"hr." significa hora u horas.

"IC₅₀" significa la concentración a la que se alcanza el 50 % de la inhibición máxima.

10 "LC-MS" significa HPLC-espectrometría de masas.

"MeOH" significa metanol.

"min." significa minuto o minutos.

"MS" significa espectrometría de masas.

"MS (ES+)" significa espectrometría de masas usando ionización por electroaspiración.

15 "RMN" significa resonancia magnética nuclear.

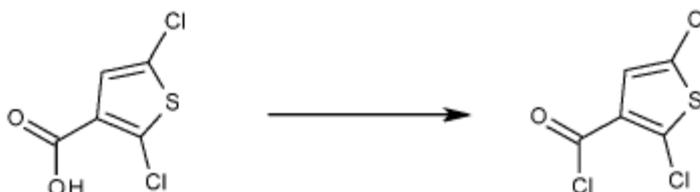
"RO" significa la ocupación del receptor.

"THF" significa tetrahidrofurano.

Química General

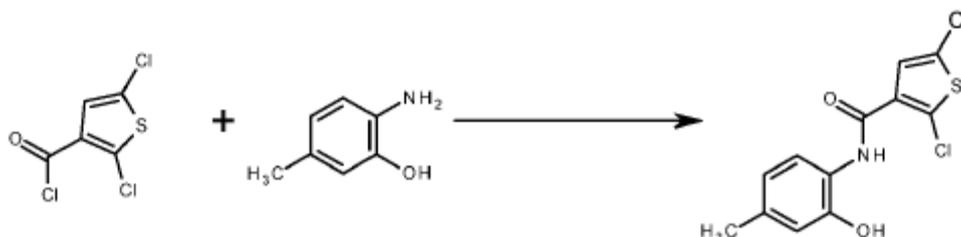
El compuesto de la presente invención se puede preparar de acuerdo con los siguientes ejemplos de síntesis.

20 Preparación 1. Cloruro de 2,5-diclorotiofeno-3-carbonilo



25 A una suspensión del ácido 2,5-dicloro-tiofeno-3-carboxílico (49,7 g, 252,23 mmol, 1,00 equiv.) en diclorometano (500 ml), se le adiciona dimetilformamida (0,5 ml, 6,47 mmol) seguido de una solución de cloruro de oxalilo 2 M en diclorometano (138,73 ml, 277,45 mmol, 1,1 equiv.) durante 1,5 hr. (ventilar el gas desarrollado a través de una solución cáustica). Se agita la solución transparente resultante a temperatura ambiente durante 1 hr. hasta que la evolución del gas haya cesado y la reacción haya terminado con LCMS (inactivar una muestra en NH₃ 7 M/MeOH para el control de la reacción) MS (m/z): = 195,9, 197,9 (M+H)⁺ para la amida primaria correspondiente. Evaporar a sequedad para dar el compuesto intermedio base como un aceite de color marrón (55 g, 252 mmol, cuantitativo).

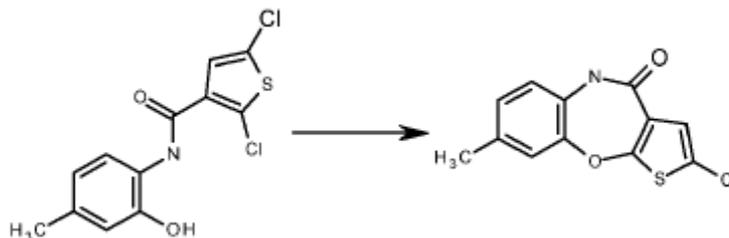
Preparación 2. 2,5-dicloro-N-(2-hidroxi-4-metil-fenil)tiofeno-3-carboxamida



30

5 A una solución de 6-amino-m-cresol (34,14 g, 277,20 mmol, 1,1 equiv.) en THF (450 ml), se le adiciona piridina (40,76 ml, 504,00 mmol, 2 equiv), seguido de una solución de cloruro de 2,5-diclorotiofeno-3-carbonilo (54,30 g, 252 mmol, 1,00 equiv.) en THF (250 ml) durante 30 minutos, usando un baño de hielo para mantener una temperatura de 15-20°C. Se agita la mezcla espesa resultante a temperatura ambiente durante 1 hr. para dar el consumo completo del aminofenol por LCMS. Se vierte sobre una mezcla de HCl acuoso 2 M (500 ml) y hielo (250 ml) con agitación. Recoger el sólido de color beige resultante por filtración, lavar bien con agua y secar al aire. MS (m/z): = 301,84, 303,94 (M+H)⁺. Secar en una estufa de vacío a 40°C sobre P₂O₅ durante la noche para dar el compuesto intermedio base (84,5 g, se asume cuantitativo).

Preparación 3. 2-cloro-8-metil-5H-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-ona



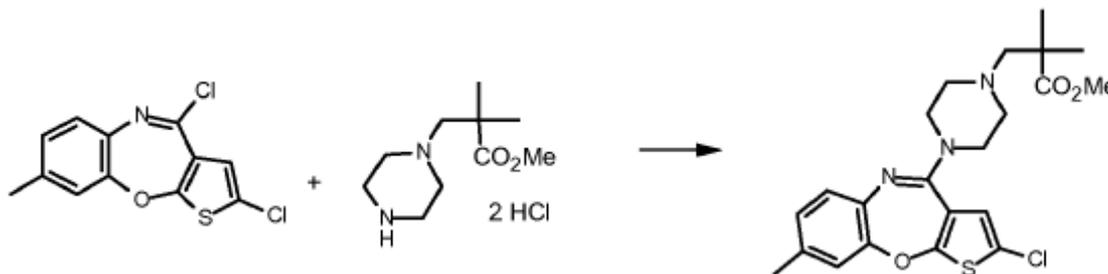
10 A una suspensión bien agitada de 2,5-dicloro-N-(2-hidroxi-4-metilfenil)tiofeno-3-carboxamida (76,15 g; 252 mmol, 1,00 equiv.) en dimetil sulfóxido (450 ml), se le adicionan carbonato de potasio (38,31 g, 277,20 mmol, 1,1 equiv.) y se calienta la mezcla a 100-110°C durante 4,5 hr. para dar una conversión esencialmente completa por LCMS. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se adiciona lentamente a dos vasos de precipitados separados que contienen ácido clorhídrico acuoso 1M (500 ml), observando la evolución del gas. Se agita a temperatura ambiente durante 0,5 hr. y se recoge el sólido de color gris oscuro resultante por filtración. Lavar secuencialmente con agua, seguido de una pequeña cantidad de etanol, seguido de una pequeña cantidad de éter dietílico. Secar en una estufa de vacío a 45°C, durante la noche para dar el compuesto intermedio base (58,5 g, 87 %). MS (m/z): = 265,99 (M+H)⁺.

Preparación 4. 2,4-dicloro-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepina



20 Cargar un matraz de fondo redondo de 1 L con metoxibenceno (225 ml, 5V), 2-cloro-8-metil-5H-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-ona (45 g; 169,4 mmol, 1 equiv) y N, N-dimetilanilina (47,2 g, 389,5 mmol, 2,3 equiv). Se calienta a 60°C y se adiciona cloruro de fosforilo (85,7 g, 558,9 mmol, 3,3 equiv.) gota a gota durante 0,5 hr. Calentar hasta 100°C y agitar durante 2 hr. hasta completarse por análisis de TLC. Enfriar a 40-60°C y evaporar para obtener el compuesto intermedio base como un sólido de color marrón oscuro (123,1 g, 433,2 mmol, rendimiento 256 % sin corregir por ensayo). MS (m/z): 283,8 (M+H).

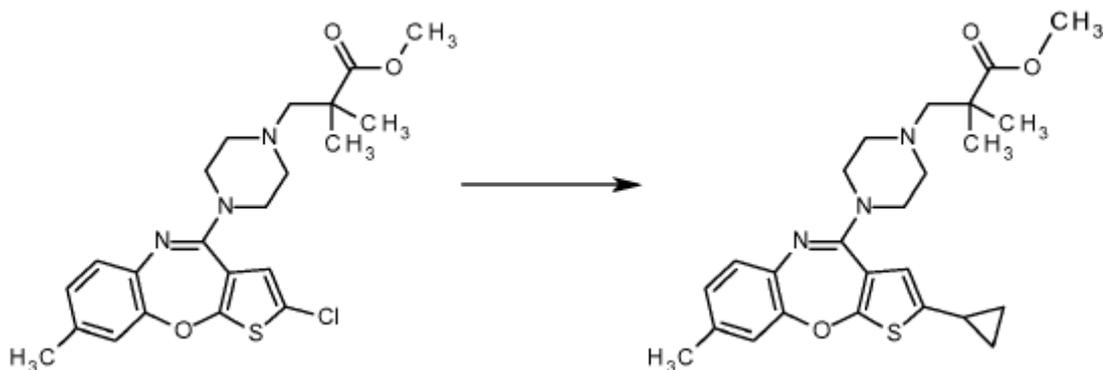
Preparación 5. 3-[4-(2-cloro-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetil-propanoato de metilo



30 Cargar un matraz de fondo redondo de 1 l con 2,4-dicloro-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepina (121,1 g, 169,4 mmol, 1,0 equiv.), seguido de acetonitrilo 600 ml, 12,5 V), luego carbonato de potasio (119,4 g, 863,9 mmol) en una porción. Se agita durante 10-20 min. y luego se adiciona diclorhidrato de 2,2-dimetil-3- (piperazin-1-il) propanoato de metilo (55,54 g, 203,3 mmol, 1,2 equiv.) en una porción. Calentar a 80°C y agitar durante 30 hr. Se concentra la mezcla a sequedad bajo vacío, después se carga acetato de etilo (1920 ml, 40 V) y agua (1920 ml, 40 V) en la mezcla. Se agita, se filtra y después se separa la fase acuosa y se extrae con acetato de etilo (960 ml, 20 V). Se

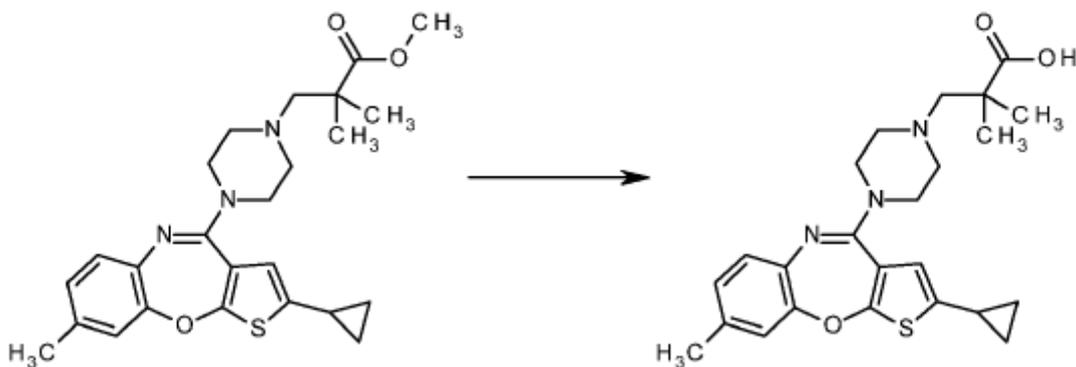
combinan las fases orgánicas y se lavan con agua (960 ml X 2) y salmuera (200 ml, 4 V). Concentrar y purificar por columna de gel de sílice (éter de petróleo/acetato de etilo (0 a 10 %)) para obtener el compuesto intermedio base como un sólido de color amarillo (55,4 g, 123,7 mmol, 95,8 % de pureza, 73,0 % de rendimiento no corregido por ensayo). MS (m/z): 448,2 (M+H). ¹H RMN (400MHz, CDCl₃): δ 7,03 (d, J=8,8 Hz, 1H), 6,91 (d, J=1,6 Hz, 1H), 6,81 (s, 1H), 6,50 (s, 1H), 3,67(s, 3H), 3,47 (t, J=4,4 Hz, 4H), 2,58-2,54 (q, 6H), 2,28 (s, 3H), 1,19 (s, 6H).

Preparación 6. 3-[4-(2-ciclopropil-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo



10 Se desgasifica una mezcla de 3-[4-(2-cloro-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo (30,00 g, 66,97 mmol), ácido ciclopropilborónico (7,48 g, 87,06 mmol), fosfato de potasio tribásico n-hidrato (49,75 g, 234,38 mmol), tetrafluoroborato de triciclohexilfosfina (2,47 g, 6,7 mmol), agua (13,39 ml, 13,39 g, 743,4 mmol) y tolueno (267,87 ml, 233,36 g, 2,53 mol) con nitrógeno, durante 10 min. Se adiciona acetato de paladio (II) (0,751 g, 3,35 mmol) y se agita a 100 °C, durante la noche. Se deja enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se adiciona agua y se extrae la mezcla de reacción con acetato de etilo. Se seca el extracto de acetato de etilo (Na₂SO₄), se concentra y se somete a cromatografía sobre sílice (ISCO) y se eluye con gradiente de acetato de etilo/isohexano (0 %:100 % a 20 %:80 %). Se recogen las fracciones que contienen el producto y se concentra. Se somete a una cromatografía adicional utilizando cromatografía de fluido supercrítico (CO₂) con etanol al 25 % y dimetilamina al 0,2 %. Recoger las fracciones que contienen el producto, concentrar y secar el sólido resultante a vacío durante 6 hr. a 40 °C para dar 3-[4-(2-ciclopropil-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo (23,73 g, 82,93 %) MS (m/z): 454,25 (M+H). ¹H RMN (300,11 MHz, CDCl₃): 6,98 (d, J= 7,9 Hz, 1H), 6,88 (dd, J= 1,4, 8,0 Hz, 1H), 6,81 (d, J= 1,5 Hz, 1H), 6,29 (d, J= 0,9 Hz, 1H), 3,67 (s, 3H), 3,50-3,47 (m, 4H), 2,58-2,54 (m, 6H), 2,27 (s, 3H), 1,94-1,89 (m, 1H), 1,58 (s, 1H), 1,19 (s, 6H), 0,94-0,87 (m, 1H), 0,65-0,59 (m, 1H).

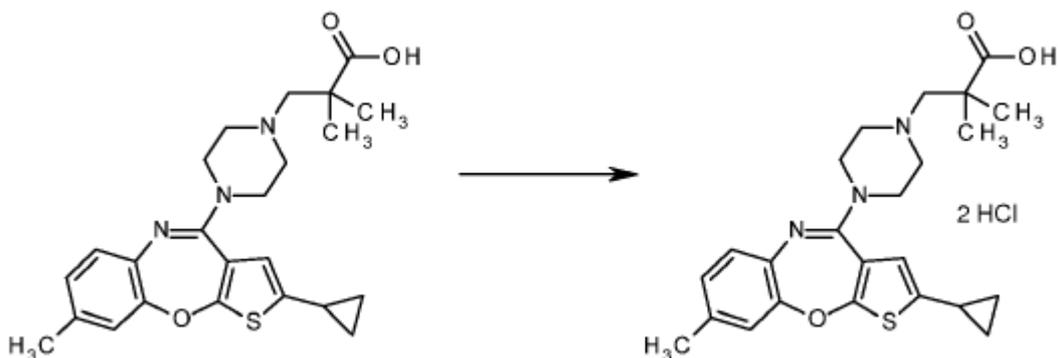
25 **Ejemplo 1.** Ácido 3-[4-(2-ciclopropil-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico



30 Se adiciona hidróxido de sodio (9,27 g, 231,68 mmol) a una lechada de 3-[4-(2-ciclopropil-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoato de metilo (35,03 g, 77,23 mmol) en agua (210,18 ml) y alcohol isopropílico (210,18 ml) y se calienta a 85 °C, durante 45 min. Se enfría a temperatura ambiente y se neutraliza con ácido clorhídrico 2M a pH 6-6,5. Se concentra la mezcla para eliminar el alcohol isopropílico y se aísla el precipitado resultante por filtración y se lava sobre el sinterizado. Se seca el sólido aislado al vacío a 40 °C, durante la noche para dar el ácido 3-[4-(2-ciclopropil-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetilpropanoico (32,6 g, 95,12 % de rendimiento). MS (m/z): 440,1 (M+H). ¹H RMN (300,11 MHz, CDCl₃): 7,03 (d,

J= 7,9 Hz, 1H), 6,92 (dd, J= 1,3, 8,1 Hz, 1H), 6,84 (d, J= 1,3 Hz, 1H), 6,32 (d, J= 0,9 Hz, H), 3,70 (s, 4H), 2,88 (t, J= 4,6 Hz, 4H), 2,62 (s, 2H), 2,30 (s, 3H), 1,97-1,91 (m, 1H), 1,28 (s, 6H), 0,98-0,91 (m, 2H), 0,67-0,62 (m, 2H).

Ejemplo 2. Diclorhidrato del ácido 3-[4-(2-ciclopropil-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetil-propanoico



Se adiciona ácido clorhídrico 2 M (0,119 ml, 0,24 mmol) a una suspensión del ácido 3-[4-(2-ciclopropil-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetil-propanoico (0,0497 g, 0,11 mmol) en acetonitrilo (1 ml) y agua (1 ml) y se liofiliza para dar diclorhidrato del ácido 3-[4-(2-ciclopropil-8-metil-tieno[2,3-b][1,5]benzoxazepin-4-il)piperazin-1-il]-2,2-dimetil-propanoico (0,058 g, 100 %). MS (m/z): 440,2 (M+H).

- 10 Los datos de literatura (Morairty SR, Hedley L, Flores J, Martin R, Kilduff TS. (2008) Selective 5-HT_{2A} and 5-HT₆ receptor antagonists promote sleep in rats. *Sleep* 31, 34-44.; y Barbier, A.J., and Bradbury, M.J., *Histaminergic Control of Sleep-Wake Cycles: Recent Therapeutic Advances for Sleep and Wake Disorders, CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, vol 6, pg. 31-43 (2007)) y los datos generados en los estudios clínicos en animales apoyan el papel de doble actividad de los agonistas inversos de H1/antagonistas de 5-HT_{2A} en el tratamiento del insomnio y
- 15 en el tratamiento sintomático de insomnio asociado con otros trastornos tales como trastornos depresivos, trastornos de ansiedad, dolor, alergias, trastornos pulmonares o de las vías respiratorias, trastornos psiquiátricos, demencia y/o enfermedades neurodegenerativas y/o trastornos del sueño con ritmo circadiano. Específicamente, se encuentra que ciertos agonistas inversos de doble actividad de H1/antagonistas de 5-HT_{2A} son efectivos en aumentar el tiempo total de sueño usando roedores controlados por EEG sin hipoactividad desproporcionada o clínicamente relevante,
- 20 disminución del sueño REM, o hipersomnolencia.

Para demostrar adicionalmente las características de los presentes compuestos, se pueden llevar a cabo en los siguientes ensayos in vitro e in vivo:

Ensayos de unión y actividad in vitro:

Ensayo de unión competitiva de H1

- 25 Los experimentos de unión a [³H]-pirilamina se llevan a cabo en un formato de 96 pocillos de SPA (ensayo de proximidad de centelleo). Las membranas usadas en este ensayo se preparan a partir de células HEK-293 que expresan de manera estable el receptor H1 recombinante (humano). La incubación se inicia por la adición de una mezcla de perlas SPA WGA PVT (1 mg/pocillo, Perkin Elmer (MA, EE.UU.) RPNQ0001) y 3 µg de membranas a solución reguladora de ensayo (Tris 67 mM, pH 7,6) que contiene [³H]-Pirilamina 3,5 nM y concentraciones variables del compuesto de ensayo (curvas de respuesta de concentración de 10 puntos). La unión no específica se determina
- 30 en presencia de triprolidina 10 µM. Las muestras se incuban durante 4 hr. a temperatura ambiente (22°C) y luego se lee en un Microbeta® Trilux.

Ensayo de unión competitiva de 5-HT_{2A}

- 35 Los experimentos de unión de [³H]-ketanserina se llevan a cabo en el formato de 96 pocillos de SPA. Las membranas usadas en este ensayo se preparan a partir de células AV-12 que expresan de forma estable el receptor 5-HT_{2A} recombinante (humano). La incubación se inicia mediante la adición de una mezcla de perlas de WGA YSI SPA (1 mg/pocillo, Perkin Elmer (MA, EE.UU.), RPNQ0011) y 2 µg de membranas a solución reguladora de ensayo (Tris 67 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,6) que contiene 3,1 nM [³H]-ketanserina y concentraciones variables del compuesto de ensayo (curvas de respuesta de concentración de 10 puntos). La unión no específica se determina
- 40 en presencia de 1-(1-naftil) piperazina 20 µM. Las muestras se incuban durante 4 hr. a temperatura ambiente (22°C) y luego se lee en un Microbeta® Trilux.

Ensayo de unión competitiva de 5-HT_{2C}

Los experimentos de unión [¹²⁵I]-(\pm) DOI se llevan a cabo en el formato de 96 pocillos de SPA. Las membranas usadas en este ensayo se preparan a partir de células AV-12 que expresan de forma estable el receptor 5-HT_{2C} recombinante (humano). La incubación se inicia mediante la adición de una mezcla de perlas SPA WGA PVT (0,5 mg/pocillo, Perkin Elmer (MA, EE.UU.), RPNQ0001) y 2,5 μ g de membranas a solución reguladora de ensayo (Tris-HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 0,5 mM, pargilina 10 μ M, ácido ascórbico al 0,1 %, pH 7,4) que contenía [¹²⁵I] - (\pm) DOI 0,2 nM y concentraciones variables del compuesto de ensayo (curvas de respuesta a la concentración de 10 puntos). La unión no específica se determina en presencia de 1-(1-naftil) piperazina 20 μ M. Las muestras se incuban durante 4 hr. a temperatura ambiente (22°C) y luego se lee en un Microbeta® Trilux.

Análisis de datos de unión

Las curvas se evalúan usando una ecuación no lineal logística de 4 parámetros para obtener la concentración del competidor que causa la inhibición del 50 % de la unión del radioligando (IC₅₀). Las constantes de disociación de equilibrio (K_i) se calculan de acuerdo con la ecuación $K_i = IC_{50} / (1 + L / K_d)$, en la que L es igual a la concentración de radioligando utilizada en el experimento y K_d es igual a la constante de disociación de equilibrio del radioligando para el receptor, determinada a partir de análisis de saturación estándar o experimentos de competición homóloga. Los valores reportados para K_i, en la que n valores están indicados, se muestran como media geométrica \pm el error estándar de la media (SEM), con el número de determinaciones de repeticiones indicadas por n. Las medias geométricas se calculan mediante la ecuación $GeoMean = 10^{(Promedio(\log K_i 1 + \log K_i 2 + \dots + \log K_i n) / \sqrt{n})}$.

Antagonismo de GABA_A utilizando receptores nativos en cultivos neuronales primarios

La actividad de los compuestos en los receptores nativos de GABA_A se evalúa controlando los flujos de calcio usando un sistema de FLIPR® de 96 pocillos (lector de placas de imágenes fluorométricas (FLIPR®, Molecular Devices). En pocas palabras, las neuronas embrionarias corticales se disocian de los embriones de rata E18 y se siembran en placas a una densidad óptima en placas FLIPR® de 96 pocillos recubiertas con poli-D-lisina de fondo transparente, de paredes negras. Después de cargar las células con un colorante sensible al calcio (Fluo4-AM, Molecular Devices), las células se bañan en una solución que contiene bajo cloruro (cloruro sustituido por gluconato). En estas condiciones la activación de los receptores GABA_A causa una entrada de iones de cloruro (en la dirección del gradiente químico), lo que da lugar a la despolarización de la membrana y consecuentemente a la activación de canales de calcio dependientes del voltaje (VGCCs). La entrada de calcio a través de VGCC se registra y analiza fuera de línea usando el sistema FLIPR®. Para una validación farmacológica del ensayo, se registran las curvas de respuesta de concentración (CRC) para el agonista estándar (GABA) y antagonista estándar (Gabazine). Cualquier efecto se determina en modo CRC frente a una concentración fija de agonista GABA a 10 μ M (equivalente a una respuesta de GABA EC₉₀).

Procedimientos:

Los efectos antagonistas de los compuestos se cuantifican utilizando curvas de respuesta a dosis de 10 puntos comparando las respuestas fluorescentes máximas con el agonista GABA en presencia y ausencia del compuesto. La ventana de ensayo se define como la respuesta máxima obtenida por GABA a su concentración de EC₉₀ predeterminada menos la respuesta obtenida por una concentración totalmente inhibitoria de gabazina (50 μ M). Los efectos antagonistas se calculan como un porcentaje de la ventana de ensayo. Todos los datos se calculan como valores IC₅₀ relativos utilizando un programa de ajuste de curva logística de cuatro parámetros (Prism Graphpad® 3.01). Las potencias antagonistas para todos los compuestos se comparan con gabazina con tres repeticiones en cada ensayo realizado.

Además, los compuestos de la invención se pueden ensayar en ensayos de unión y ensayos de actividad funcional por procedimientos bien conocidos para otros receptores fisiológicamente importantes tales como, pero no limitando a, el canal hERG, otros receptores de serotonina (específicamente 5-HT_{1B} y receptores 5-HT_{1D}, la falta de actividad agonista en receptores 5-HT_{2B}, receptores 5-HT_{2C}, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇), receptores dopaminérgicos (específicamente D1, D2 y D3), receptores GABA_A, receptores adrenérgicos y transportadores de monoamina.

El compuesto del ejemplo 2 se ensaya esencialmente como se ha descrito anteriormente y se ha encontrado que tiene perfiles de actividad como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Datos de selectividad

	Ejemplo 2
H1 K _i (nM)	43,2
5-HT _{2A} K _i (nM)	10,2
5-HT _{2B} K _i (nM)	118
Agonista de 5-HT _{2B} EC ₅₀ (nM)	> 10000

Antagonista de 5-HT _{2B} K _b (nM)	93,4
5-HT _{2C} K _i (nM)	493
GABA _A IC ₅₀ (μM)	> 100
Canal hERG (μM)	53 % de inhibición a 10 μM
Dopamina D ₁ K _i (nM)	996
Dopamina D ₂ K _i (nM)	2320
Dopamina D ₃ K _i (nM)	> 6280
5-HT _{1D} K _i (nM)	> 3980
5-HT ₅ K _i (nM)	3480
5-HT ₆ K _i (nM)	>5830
5-HT ₇ K _i (nM)	>2060
Alfa _{1A} Adrenérgico K _i (nM)	4620
Alfa _{1B} Adrenérgico K _i (nM)	> 15500
Alfa _{2A} Adrenérgico K _i (nM)	5920
Alfa _{2B} Adrenérgico K _i (nM)	1060
Alfa _{2C} Adrenérgico K _i (nM)	1380
Transportador de serotonina K _i (nM)	> 478
Transportador de norepinefrina K _i (nM)	> 671
Transportador de dopamina K _i (nM)	> 867

Por lo tanto, se espera que las dosis fisiológicamente relevantes de los compuestos de la invención proporcionen una inhibición sustancial de los receptores H1 y 5-HT_{2A} in vivo, mientras que no interactúan sustancialmente con otros receptores fisiológicamente relevantes, y se espera de este modo que proporcionen la farmacología deseada mientras que evitan los efectos no deseados asociados con la actividad fuera de destino. Tales efectos no deseados incluyen, pero no se limitan a lo siguiente: actividad antagonista de 5-HT_{2C} asociada con el aumento de peso emergente del tratamiento, actividad agonista de 5-HT_{2B} asociada con valvulopatía, modulación de canal hERG asociada con prolongación QT, y actividad antagonista de GABA_A asociada con actividad convulsiva. Además, la interferencia con la fisiología del sueño/vigilia se evita por la selectividad sobre los receptores de dopamina, otros receptores de serotonina, receptores adrenérgicos, y transportadores de monoamina.

Ocupación del receptor 5-HT_{2A}: Se ensaya la ocupación del receptor (RO) para demostrar actividad antagonista/agonista inversa en el receptor 5-HT_{2A} in vivo. En pocas palabras, ratas Sprague-Dawley macho (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) que pesan aproximadamente 230-280 gramos se dan acceso ad lib a comida y agua hasta el comienzo de las 3 hr. del protocolo experimental. 1 mg/kg de ketanserina (antagonista no selectivo de 5-HT_{2A}) se usa como control positivo para establecer la validez del ensayo. Los compuestos de ensayo o el control se administran por sonda oral en un vehículo compuesto por 20 % de hidroxipropil betaciclodextrina. MDL 100907 ((R)-(+)-α-(2,3-Dimetoxifenil)-1-[2-(4-fluorofenil)etil]-4-piperidinametanol), un antagonista selectivo de 5-HT_{2A}, se utiliza como trazador. Se suspende MDL 100907 en agua con 5 μl de ácido láctico diluido (1 mg/ml), se diluye a 6 μg/ml con solución salina, y se administra en un volumen de 1 ml/kg por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola para producir una dosis de marcador de 3 μg/kg. A las ratas se les administra el compuesto de ensayo, ketanserina o vehículo (N=4), seguido de 1 hr. después con una dosis intravenosa de marcador de 3 μg/kg de MDL 100907. Es en el momento de la administración del trazador que se considera que se mide RO. Quince minutos después de la administración del trazador, las ratas se sacrifican por dislocación cervical. Se recogen muestras de plasma y se extraen muestras de la corteza frontal y del cerebelo. El nivel de marcador MDL 100907 se mide en cada muestra cortical y cerebelosa. RO se calcula utilizando el procedimiento de proporción bien establecida que emplea una región de alta densidad de receptores representativa de la unión total (corteza frontal) normalizada por un área sin o con niveles muy bajos de receptor (cerebelo). Esta región, denominada región nula, representa la unión no específica de la sonda de ligando. La proporción de vehículos de los niveles de trazador en la corteza con

relación al cerebelo representa el 0 % de ocupación. Una proporción de 1 representa el 100 % de ocupación y se logra cuando se bloquea toda la unión específica al receptor 5-HT_{2A} del trazador MDL 100907. Las proporciones intermedias de trazador cortical a del cerebelo del grupo retratada de compuesto de ensayo se interpolan linealmente entre la proporción de niveles de trazador en los animales tratados con vehículo (0 % de ocupación) y una proporción de 1 (100 % de ocupación) para determinar el porcentaje de 5-HT_{2A} RO.

Análisis MDL 100907: Las muestras de corteza y cerebelo se pesan y se colocan en tubos cónicos de centrífuga sobre hielo. Se adicionan a cada tubo cuatro volúmenes (p/v) de acetonitrilo que contiene 0,1 % de ácido fórmico. Las muestras se homogeneizan a continuación y se centrifugan a 14.000 rpm (21.920 x g) durante 16 min. El sobrenadante se diluye adicionando 100 - 900 µl de agua estéril en viales de inyección de HPLC para análisis de LC/MS/MS. El análisis de MDL 100907 se lleva a cabo utilizando una HPLC Agilent modelo 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) y un espectrómetro de masas API 4000. La separación cromatográfica se realiza en una columna C18 de 2,1 x 50 mm (número de parte Agilent 971700-907) con una fase móvil que consiste en 60 % de acetonitrilo en agua con un contenido de ácido fórmico total de 0,1 %. La detección de MDL 100907 se lleva a cabo controlando el precursor para producir la transición del ion con una proporción masa a carga (m/z) de 374,2 a 123,0. Las normas se preparan adicionando cantidades conocidas de analito a muestras de tejido cerebral de ratas no tratadas y procesando como se ha descrito anteriormente.

Procedimientos estadísticos: Las curvas para cada estudio se ajustan a una función logística de 4 parámetros con el fondo fijado al 0 % utilizando JMP® versión 8.0 (SAS Institute Inc, Cary NC) y la ED₅₀ absoluta se calcula mediante el software. Los valores se indican como medias, errores estándar e intervalos de confianza del 95 %. El compuesto del ejemplo 2 se ensaya esencialmente como se ha descrito y se ha encontrado que alcanza una alta ocupación del receptor 5-HT_{2A} con una ED₅₀ de 0,41 mg/kg.

Inhibición de la actividad de sacudida de la cabeza inducida por DOI: La actividad antagonista del receptor 5-HT_{2A} in vivo del compuesto de la presente invención se demuestra además por su capacidad para bloquear la actividad de sacudida de la cabeza inducida por el agonista del receptor 5-HT_{2A} 2,5-dimetoxi-4-yodoanfetamina (DOI). (véase por ejemplo Bartoszyk GD, van Amsterdam C, Böttcher H, Seyfried CA. EMD 281014, a new selective serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist. Eur J Pharmacol. 2003 473: 229-230). En resumen, ratones C57BL/6J machos (20-25 g, Charles River) se alojan en condiciones habituales de alojamiento (32 ratones en una jaula grande IVC, 07,00 a 19,00 fase ligera, temperatura constante (19-23°C) y humedad (50 % +/- 10), ad lib alimentos y agua). Los ratones recibieron vehículo (0,25 % de metilcelulosa), DOI (3 mg/kg en solución salina) o compuesto de ensayo a 10 mg/kg de PO más DOI (3 mg/kg en solución salina). Los compuestos de ensayo se evalúan individualmente en grupos de cuatro por experimento con n=4 para cada compuesto, junto con vehículo y vehículo + DOI (n=8). Después de un tiempo de pretratamiento del compuesto de ensayo de 60 min., los ratones reciben ya sea vehículo (solución salina) o 3 mg/kg de DOI dosificados subcutáneamente, y luego se colocan en cámaras de observación transparente de perspex. Cinco min. después de la administración de DOI o del vehículo, el número de sacudidas de cabeza marcadas visualmente expuestas por cada ratón individual se cuenta durante 15 minutos. Los datos se analizan mediante un ANOVA y el test post-hoc de Dunnet. El compuesto del ejemplo 2 se ensaya esencialmente como se ha descrito y se ha encontrado que inhibe la respuesta de sacudida de cabeza inducida por 3mg/kg de DOI en un 100 % a 10 mg/kg.

Control del sueño y del comportamiento en ratas: El compuesto de la presente invención se ensaya en ratas por su capacidad para aumentar la cantidad de sueño o disminuir la interrupción del sueño o ambos sin efectos no deseados tales como la inhibición del sueño REM, el deterioro motor del despertar y/o insomnio de rebote. Los animales de ensayo son controlados continuamente por electroencefalogramas (EEG), electromiogramas (EMG) y movimiento para medir el sueño acumulativo noREM, el sueño total acumulado, la duración promedio del episodio de sueño, la duración del episodio de sueño más larga, el insomnio de rebote, inhibición del sueño REM y la intensidad de la actividad locomotora durante la vigilia. Los procedimientos para tales estudios son conocidos en la técnica (véanse por ejemplo los procedimientos descritos en Edgar DM, Seidel WF. Modafinil induces wakefulness without intensifying motor activity or subsequent rebound hypersomnolence in the rat. J Pharmacology & Experimental Therapeutics 1997; 283: 757-769; van Gelder RN, Edgar DM, Dement WC. Real-time automated sleep scoring: validation of a microcomputer-based system for mice. Sleep 1991, 14: 48-55; y Gross BA, Walsh CM, Turakhia AA, Booth V, Mashour GA, Poe GR. Open-source logic-based automated sleep scoring software using electrophysiological recordings in rats. J Neurosci Methods. 2009; 184(1):10-8). Los estudios se realizan de la siguiente manera:

Preparación de animales. Las ratas Wistar adultas macho (aproximadamente 270-300 g en el momento de la cirugía) se acomodan quirúrgicamente para el registro crónico de EEG, EMG y movimiento de la siguiente manera: Las ratas se preparan quirúrgicamente con un implante craneal compuesto de cuatro tornillos de acero inoxidable para registro de EEG (dos frontales [3,9 mm anterior de bregma y ± 2,0 mm mediolateralmente] y dos occipitales [6,4 mm posterior de bregma, ±5,5 mm mediolateralmente]) y con dos alambres de acero inoxidable recubiertos de teflón para registro de EMG (posicionados bajo los músculos trapezoides de la nuca). Todos los cables se sueldan a un conector en miniatura (Microtech, Boothwyn, PA) antes de la cirugía. El conjunto del implante se fija al cráneo por la combinación de los tornillos de registro de EEG de acero inoxidable, el cianoacrilato aplicado entre el conector del implante y el cráneo y el acrílico dental. La actividad locomotora se controla mediante un transmisor miniatura

(Minimitter PDT4000G, Philips Respironics, Bend, OR) colocado quirúrgicamente en el abdomen. Por lo menos se permiten 3 semanas para la recuperación.

Entorno de registro. Cada rata se aloja individualmente dentro de una jaula Microisolator modificada con un tubo de riego en la parte superior del filtro de policarbonato insertado para permitir un espacio de cabeza más vertical. Un cable flexible que limita mínimamente el movimiento está conectado en un extremo a un conmutador fijado a la parte superior de la jaula y en el otro extremo al implante craneal del animal. Cada jaula se encuentra dentro de compartimentos separados y ventilados de una cámara de registro de sueño-vigilia de acero inoxidable. Los alimentos y agua están disponibles ad libitum y la temperatura ambiente se mantiene a aproximadamente 23±1°C. Se mantiene durante todo el estudio un ciclo luz-oscuridad de 24 horas (LD 12:12) usando luz fluorescente. La humedad relativa promedia aproximadamente el 50 %. Los animales no se molestan por lo menos 30 hr. antes y después de cada tratamiento.

Diseño y dosificación del estudio. El vehículo (placebo, metilcelulosa 15 centipoise 0,25 % en agua) o uno de los niveles de dosis del compuesto de ensayo se administra oralmente a 1 ml/kg pseudoaleatoriamente de tal manera que ninguna rata recibe el mismo tratamiento dos veces y ninguna rata recibe más de dos de los 8 tratamientos en cualquier estudio. Cada rata se retira de su jaula durante aproximadamente un minuto para ser pesada y tratada. Por lo menos un período de 6 días "lavado" precede y siga cada tratamiento.

Recolección de datos. La discriminación por sueño y vigilia puede ser automatizada Van Gelder et al. 1991 (arriba); Edgar et al. 1997 (arriba); Winrow CJ, et al., Neuropharmacology 2010; 58(1):185-94.; y Gross et al., 2009 (arriba). EEG es amplificado y filtrado (X10.000, paso de banda 1-30 Hz), EMG es amplificado e integrado (paso de banda 10-100 Hz, integración RMS), y la actividad locomotora no específica (LMA) se controla simultáneamente. Los estados de excitación se clasifican en épocas de 10 segundos como sueño no REM, sueño REM, vigilia o vigilia teta-dominada. La actividad locomotora (LMA) se registra como recuento por minuto y se detecta por receptores de telemetría comercialmente disponibles (ER4000, Minimitter, Bend, OR).

Análisis estadístico. Todos los animales que tienen al menos un resultado se incluyen en los resultados del resumen (por ejemplo, se incluyen datos apropiados de un tratamiento animal para el cual se pueden usar datos de telemetría, pero no los datos de EEG). El período de observación posterior al tratamiento se divide en intervalos posteriores a la dosificación apropiados para cada resultado, en el que el tiempo de dosificación se define como el inicio de la Hora=0 y los resultados se resumen en el período de observación calculando ya sea el valor horario promedio o el valor acumulativo a través de cada período (véase la leyenda de la tabla 2 para la definición precisa de cada resultado). Los episodios de sueño se analizan en la escala logarítmica para estabilizar la variación, todas las otras variantes se analizan en la escala lineal. Cada resultado en cada período se analiza por análisis de covarianza usando el grupo de tratamiento y la fecha de tratamiento como factores y el correspondiente intervalo de pretratamiento, 24 h antes, como covariable. Las medias ajustadas y el cambio de los medios del vehículo y sus correspondientes errores estándar se resumen para cada grupo de tratamiento. Los resultados analizados en la escala logarítmica se transforman de nuevo para informar las medias geométricas y los resultados medios de la proporción con el vehículo.

El compuesto del ejemplo 2 se ensaya esencialmente como se describe. Se observa que el compuesto del ejemplo 2 aumenta significativamente el tiempo de sueño NREM acumulativo y el tiempo total de sueño acumulativo sin insomnio de rebote significativo, inhibición del sueño REM o inhibición de la intensidad locomotora (LMI) a 3 mg/kg. (Véanse el perfil de sueño y la intensidad de la actividad locomotora en la tabla 2.)

Tabla 2. Estadísticas de resultados: Abreviaturas: N=tamaño de la muestra; Media Aju.= valor medio del grupo ajustado con respecto a los controles del vehículo; SE=error estándar de la media; LCL=límite de confianza del 95 % inferior, NREM=no REM, esto es, todo el sueño distinto del sueño REM. El tamaño de muestra del grupo de vehículos de referencia paralelo fue N=27.

Tabla 2. Compuesto del ejemplo 2.						
Dosis (mg/kg de PO)	Variables de eficacia			Variables de efecto no deseadas		
	Sueño NREM acumulado			Insomnio de rebote		
	N	Media Aju.	SE	N	Media Aju.	LCL
10	7	26,9	5,5	7	3,3	-7,0
3	9	30,1	5,1	9	1,6	-7,8
1	13	31,0	4,6	13	-0,6	-9,1
0,5	11	30,6	4,7	11	-5,0	-13,9
0,25	11	19,1	4,8	11	2,2	-6,8

0,1	8	15,4	5,5	8	-0,027	-10,3
0,025	4	-2,3	7,0	4	0,40	-12,6
<u>Sueño total acumulado</u>				<u>Inhibición de REM</u>		
Dosis (mg/kg de PO)	N	Media Aju.	SE	N	Media Aju.	LCL
10	7	26,3	6,5	7	-7,3	-13,3
3	9	31,6	6,1	9	0,042	-5,5
1	13	33,2	5,4	13	1,2	-3,6
0,5	11	32,6	5,6	11	2,3	-2,9
0,25	11	23,0	5,7	11	2,8	-2,3
0,1	8	16,9	6,5	8	-0,71	-6,7
0,025	4	3,6	8,2	4	5,0	-2,6
<u>Episodio de sueño promedio</u>				<u>Intensidad de actividad locomotora</u>		
Dosis (mg/kg de PO)	N	Media Aju.	SE	N	Media Aju.	LCL
10	7	1,56	0,18	6	-0,89	-2,86
3	9	1,92	0,21	9	0,01	-1,69
1	13	1,60	0,16	11	-2,33	-3,96
0,5	11	1,59	0,16	10	-1,30	-2,96
0,25	11	1,34	0,14	8	-0,31	-2,11
0,1	8	1,19	0,14	7	0,41	-1,53
0,025	4	1,08	0,16	3	-1,40	-3,97
<u>Episodio de sueño más largo</u>						
Dosis (mg/kg de PO)	N	Media Aju.	SE			
10	7	2,12	0,29			
3	9	2,16	0,28			
1	13	2,16	0,25			
0,5	11	1,81	0,22			
0,25	11	1,55	0,18			
0,1	8	1,07	0,15			
0,025	4	1,26	0,23			

Definiciones y unidades - las medias son diferencias ajustadas de los controles del vehículo:

- Sueño acumulativo: durante las primeras 6 hr. después del tratamiento, en minutos ('Sueño total' indica sueño NREM + sueño REM).
- 5 • Episodio de sueño promedio: promedio de episodios de sueño por hora, durante las primeras 6 hr. después del tratamiento, expresado como aumento n veces sobre controles de vehículo.
- Episodio de sueño más largo: el episodio de sueño más largo en las primeras 6 hr. después del tratamiento, expresado como n veces mayor que los controles del vehículo.

- Insomnio de rebote: minutos acumulados de sueño NREM + REM durante las primeras 3 hr. del período de iluminación, esto es, 7^a, 8^a y 9^a horas después del tratamiento.

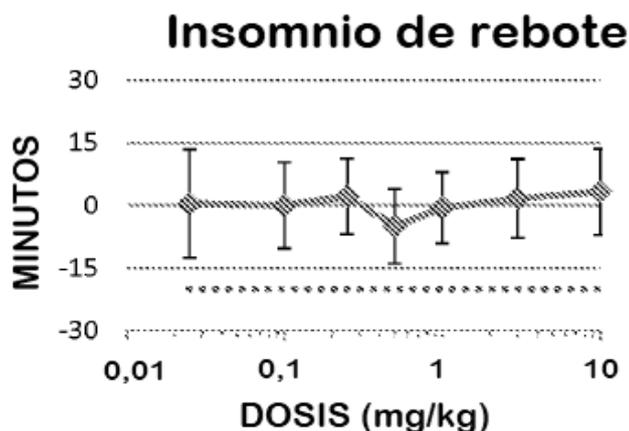
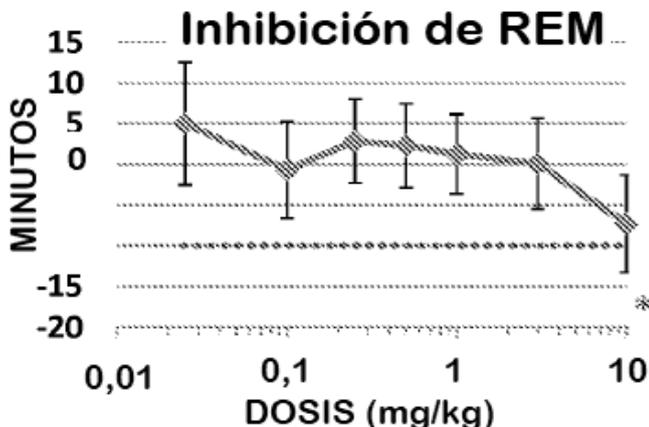
- Inhibición REM: minutos acumulados de sueño REM durante las primeras 12 horas. después del tratamiento.

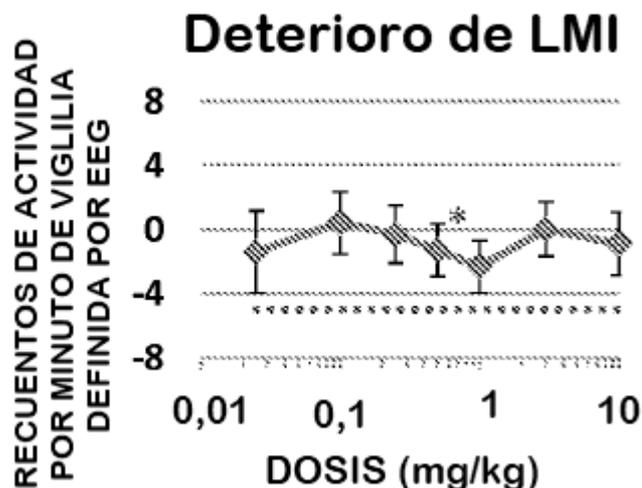
5 • Intensidad de actividad locomotora (LMA): expresada como recuentos de LMA por minuto de vigilia definida por EEG, promediada a lo largo de las primeras 6 hr. después del tratamiento.

10 Determinación de la eficacia. La eficacia umbral para cada una de las cuatro variables de eficacia se calcula trazando el incremento en cada variable con respecto a los controles del vehículo durante el período de 6 horas después del tratamiento contra log (dosis). El umbral de eficacia para cada variable es esa dosis, estimada por 4 parámetros paramétricos de regresión no lineal, que da el valor de umbral de eficacia definido; +30 min. de sueño no REM acumulado adicional, +25 min. del sueño total acumulado adicional, 1.75x aumento en la duración media del episodio de sueño, y 1.5x aumento en la duración más larga del episodio del sueño. Los valores finales se expresan en términos de concentración de base libre. Se ha encontrado que el compuesto del ejemplo 2 tiene dosis umbral eficaces como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3	Dosis estimada de eficacia (mg/kg)	Intervalo de confianza del 95 % (mg/kg)
Acumulación NREM=30 min.	0,78	no estimable*
Acumulación total de sueño=25 min.	0,19	0,09, 0,52
Episodio de sueño más largo (aumento de 1,75 veces)	0,33	0,18,0,67
Promedio de episodio del sueño (aumento de 1,5 veces)	0,33	0,10, 1,1 **

*n.e.=no estimable, estadísticamente, ** interpolado





Determinación de efectos no deseados. Cada variable de resultado de "efecto no deseado" (véase la tabla 2, leyenda para las definiciones), se representa en función de log (dosis). El valor de umbral para la inhibición del sueño REM se define como una reducción acumulativa del sueño REM de -10 min. El valor umbral para el insomnio de rebote se define como -20 min. El valor umbral para la LMI reducida se define como -5 recuentos de actividad locomotora por minuto de vigilia definida por EEG. Se define que un efecto no deseado significativo sucede cuando el límite de confianza inferior es inferior al valor umbral en cualquier dosis igual o inferior a 10 veces la dosis eficaz promedio, y una tendencia de respuesta a la dosis es evidente para dosis por encima de la dosis de eficacia del umbral. Para el compuesto del ejemplo 2, la inhibición del sueño REM supera el valor umbral a 10 mg/kg, pero esta dosis es más de 10 veces la dosis de eficacia más conservadora de 0,78 mg/kg (Tabla 3). Los valores negativos indican inhibición REM, insomnio rebote y LMI reducida. En los registros anteriores, un asterisco marca una significación estadística relativa al vehículo para la dosis dada, pero no indica necesariamente un efecto no deseado. Por lo tanto, se concluye que no se observan incidencias no deseadas de inhibición REM, insomnio de rebote o reducción de la LMI dentro de 10 veces la dosis de eficacia más conservadora.

Clarificación del plasma: Es importante en un compuesto útil para tratar trastornos del sueño tales como el insomnio que se limpie adecuadamente del cuerpo con una tasa favorable de eliminación para evitar efectos no deseados tales como somnolencia prolongada más allá del período de sueño deseado, somnolencia diurna, deterioro de la cognición después de despertar, etc. La presente invención proporciona compuestos con velocidades mejoradas de eliminación. La velocidad de eliminación se puede ensayar esencialmente como se describe a continuación.

Se obtienen ratas Sprague Dawley macho (rango de peso corporal de 250-320 g) con cánulas arteriales femorales permanentes de Charles River, Wilmington, MA 01887, USA. El compuesto de ensayo se administra intravenosamente en solución (1 ml/kg) en Captisol® al 20 % en solución reguladora de fosfato 22,5 mM, pH 2, a una concentración final de fármaco de 1,0 mg/ml (equivalentes de base libre). Las muestras de sangre se obtienen utilizando la cánula permanente en 24 horas. Las muestras de plasma se obtienen por centrifugación y se almacenan congeladas (-20°C), o en hielo seco, antes del análisis.

Perros Beagle machos (rango de peso corporal 10-12 kg) se obtienen de Marshall Bioresources, USA. El compuesto de ensayo se administra intravenosamente en solución (1 ml/kg) en Captisol® al 20 % en solución reguladora de fosfato 22,5 mM, pH 2, a una concentración final de fármaco de 1,0 mg/ml (equivalentes de base libre). Se obtienen muestras de sangre de la vena yugular durante 24 horas. Las muestras de plasma se obtienen por centrifugación y se almacenan congeladas (-20 °C) antes del análisis.

Las muestras de plasma congeladas se descongelan a temperatura ambiente para el bioanálisis de las concentraciones del compuesto de ensayo. Se adiciona un compuesto patrón interno relacionado en acetonitrilo/metanol (1: 1, v/v) a todas las muestras de plasma (1: 1, v/v). Las muestras se centrifugan para eliminar la proteína precipitada antes del análisis. Los sobrenadantes se analizan por inyección y elución de gradiente rápido en una columna Javelin Betasil C18 (cartucho de 20 x 2,1 mm, fase móvil A: Agua/NH₄HCO₃ 1 M, 2000:10 v/v, fase móvil B: MeOH/NH₄HCO₃ 1 M, 2000:10 v/v). Los analitos eluidos se detectan por análisis de LC-MS-MS utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 4000 de Sciex. Las concentraciones del compuesto se determinan a partir de patrones preparados y analizados en condiciones idénticas. La clarificación se calcula utilizando análisis no compartimental en Watson 7.4, Thermo Fisher Scientific, Inc.

$$\text{Clarificación} = \frac{\text{Dosis}}{\text{Área bajo la curva para concentración de plasma/tiempo}}$$

El compuesto del ejemplo 2 se lleva a cabo esencialmente como se ha descrito y se ha encontrado que tiene un perfil de separación favorable:

Ejemplo	Clarificación (ml/min./Kg) Perro
2	6,06 (+/- 0,90)

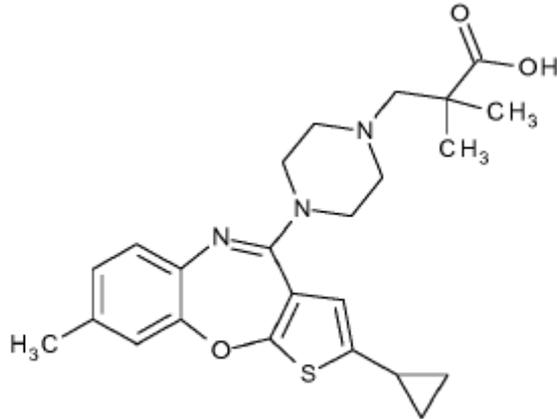
5 Si bien es posible administrar los compuestos como se emplean en los procedimientos de esta invención directamente sin ninguna formulación, los compuestos se administran usualmente en forma de composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como ingrediente activo y al menos un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones se pueden administrar por una variedad de vías incluyendo oral, sublingual, nasal, subcutánea, intravenosa e intramuscular. Tales composiciones farmacéuticas y procedimientos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (University of the Sciences in Philadelphia, ed., 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins Co., 2005).

15 Las composiciones se formulan preferiblemente en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosificación desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 60 mg, más usualmente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 30 mg, como por ejemplo entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg del ingrediente activo. El término "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosis unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con al menos un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable apropiado.

20 Los compuestos de fórmula I son generalmente eficaces sobre un amplio rango de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día normalmente caen dentro del intervalo desde aproximadamente 0,002 a aproximadamente 1,0 mg/kg, más usualmente desde aproximadamente 0,008 a 0,5 mg/kg, y como por ejemplo entre 0,015 y 0,15 mg/kg de peso corporal. En algunos casos, los niveles de dosificación por debajo del límite inferior del intervalo antes mencionado pueden ser más que adecuados, mientras que en otros casos se pueden emplear dosis aún mayores sin causar ningún efecto secundario dañino y, por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores no pretenden limitar el alcance de la invención en cualquier forma. Se entenderá que la cantidad del compuesto realmente administrado será determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la condición que se va a tratar, la vía de administración elegida, el compuesto o compuestos reales administrados, la edad, peso y respuesta del paciente individual, y la gravedad de los síntomas del paciente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula



;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 2. Un compuesto según la reivindicación 1, que es una sal de HCl.

3. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con al menos un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

4. Un compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en terapia.

10 5. Un compuesto según la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento del insomnio.

6. El compuesto para uso según la reivindicación 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el insomnio se **caracteriza por** dificultades en el inicio del sueño o el mantenimiento del sueño o ambos.

7. El compuesto para el uso según la reivindicación 5 o 6 en un ser humano.