

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 765 738**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

A61P 25/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2016 PCT/EP2016/076420**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2017 WO17076900**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2016 E 16793800 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3371188**

54 Título: **Compuesto de [1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-ilo**

30 Prioridad:

02.11.2015 EP 15192661
04.11.2015 EP 15192966

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.06.2020

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICA NV (100.0%)
Turnhoutseweg 30
2340 Beerse , BE

72 Inventor/es:

BUIJNSTERS, PETRUS JACOBUS JOHANNES ANTONIUS;
GIJSEN, HENRICUS JACOBUS MARIA;
DRINKENBURG, WILHELMUS, HELENA
IGNATIUS MARIA y
AHNAOU, ABDALLAH

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 765 738 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

Compuesto de [1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-7-ilo

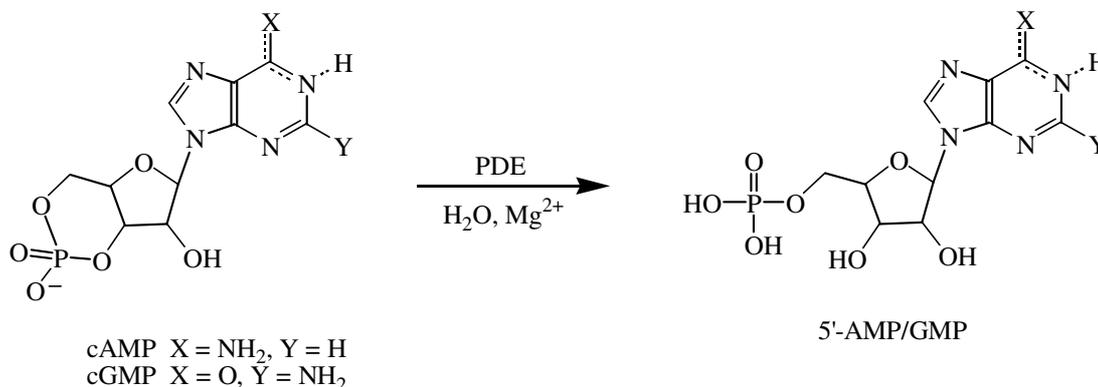
CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un nuevo derivado de [1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-ilo como inhibidor de fosfodiesterasa 2 (PDE2). La invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto, a procedimientos para preparar dicho compuesto y composiciones, y a dicho compuesto y composiciones para para uso en la prevención y tratamiento de trastornos en los que está implicada la PDE2, tales como trastornos neurológicos y psiquiátricos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las fosfodiesterasas (FDE) son una familia de enzimas que codifican 21 genes, y se subdividen en 11 familias diferentes según sus propiedades estructurales y funcionales. Estas enzimas inactivas metabólicamente desactivan los segundos mensajeros intracelulares más comunes, 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) y 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico (cGMP). Estos dos mensajeros regulan una amplia variedad de procesos biológicos que incluyen la producción y acción de mediadores proinflamatorios, el funcionamiento de los canales iónicos, la
15 contracción muscular, el aprendizaje, la diferenciación, apoptosis, lipogénesis, glicogenólisis y gluconeogénesis. Realizan esta función mediante la activación de la proteína cinasa A (PKA) y la proteína cinasa G (PKG), que a su vez fosforilan una amplia variedad de sustancias que incluyen los factores de transcripción y los canales iónicos que regulan innumerables respuestas fisiológicas. En las neuronas, esto incluye la activación de cinasas dependientes de cAMP y cGMP, y la subsecuente fosforilación de proteínas que intervienen en la regulación precisa de la transmisión
20 sináptica así como también en la diferenciación neuronal y la supervivencia. Las concentraciones intracelulares de cAMP y cGMP están reguladas de forma estricta por la tasa de biosíntesis por parte de las ciclasas y por la tasa de degradación por parte de las PDE. Las PDE son hidrolasas que desactivan cAMP y cGMP por hidrólisis catalítica del enlace 3'-éster para formar el 5'-monofosfato inactivo (Esquema A).

Esquema A



Sobre la base de la especificidad para el sustrato, las familias de PDE se pueden dividir en tres grupos: i) las PDE específicas para cAMP, que incluyen PDE4, 7 y 8; ii) las enzimas selectivas para cGMP PDE5, 6 y 9; y iii) las PDE con sustrato doble, PDE1, 2 y 3, así como también PDE10 y 11.

30 Además, las PDE se expresan de forma diferente por todo el organismo, incluido el sistema nervioso central. Por lo tanto, las isoenzimas PDE diferentes pueden desempeñar funciones fisiológicas diferentes. Los compuestos que inhiben de forma selectiva las isoenzimas o familias de PDE pueden presentar una actividad terapéutica particular, menos efectos secundarios o ambas cualidades.

35 La fosfodiesterasa 2A (PDE2A) inactiva los mecanismos de señalización intracelular dependientes de la señalización de nucleótidos cíclico mediada por AMPc y GMPC a través de su degradación (por hidrólisis de los segundos mensajeros biológicamente relevantes, AMPc y CMPC, en AMP y GMP que no son de señalamiento, respectivamente). Se sabe que estos sistemas de señalización desempeñan una función en la regulación de los genes que intervienen en la inducción de la plasticidad sináptica.

40 Por consiguiente, la inhibición farmacológica de PDE2 provoca niveles elevados de plasticidad sináptica (una correlación subyacente del aprendizaje y la memoria), lo cual sugiere que la modulación de PDE2A puede ser un blanco para aliviar las alteraciones cognitivas observadas en personas que padecen trastornos tales como, por ejemplo, esquizofrenia, mal de Alzheimer, mal de Parkinson y otros trastornos del SNC asociados con el deterioro cognitivo.

La fosfodiesterasa 2A (PDE2A) se expresa con mayor abundancia en el encéfalo en comparación con los tejidos

periféricos. La elevada expresión de PDE2 en el sistema límbico (isocorteza, hipocampo, amígdala cerebral, habénula, ganglios basales) sugiere que PDE2 puede modular la señalización neuronal que interviene en las emociones, la percepción, la concentración, el aprendizaje y la memoria. Además, la PDE2 se expresa en núcleo accumbens, el bulbo olfatorio, el tubérculo olfatorio y la amígdala cerebral, lo cual respalda la sugerencia de que la PDE2 también puede intervenir en la ansiedad y la depresión. (véase por ejemplo, Lakics, V. et al. (2010) Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacol.* 59, 367-374).

Además, se ha demostrado que los inhibidores de PDE2 son beneficiosos en la reducción de la ansiedad inducida por estrés oxidativo, lo cual sugiere que se pueden utilizar para tratar la ansiedad en los trastornos neuropsiquiátricos y neurodegenerativos asociados con el estrés oxidativo, tales como el mal de Alzheimer, mal de Parkinson y esclerosis múltiple.

Se ha demostrado que los inhibidores de PDE2 fomentan la potenciación a largo plazo de la transmisión sináptica, y mejoran la adquisición y la consolidación de la memoria en las pruebas de reconocimiento de objetos y reconocimiento social en ratas. Además, se ha demostrado que los inhibidores de PDE2 revierten el deterioro de la memoria a corto plazo inducida por MK-801 en la

prueba del laberinto en forma de T en ratones. También se ha demostrado que los inhibidores de PDE2 presentan actividad en la prueba de natación forzada y los modelos de caja iluminada/oscura; y presentan efectos similares a los ansiolíticos en las pruebas del laberinto elevado en forma de cruz, campo abierto y placa de agujeros; y previenen los cambios inducidos por estrés en la apoptosis y el comportamiento.

Así pues, los inhibidores de PDE2 pueden ser útiles en el tratamiento del deterioro de la memoria, trastornos conjuntivos, ansiedad, trastorno bipolar y depresión.

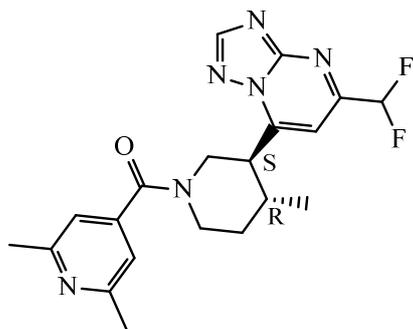
En WO2015/164508 (Dart Neuroscience, LLC) se divulgan compuestos sustituidos con [1,2,4]triazol[1,5-a]pirimidinilo como inhibidores de PDE2.

Todavía existe la necesidad de compuestos inhibidores de PDE2 con un equilibrio ventajoso de propiedades, tales como, por ejemplo, selectividad para PDE2, buena estabilidad química y compromiso de la diana ocupando PDE2 y aumentando los niveles de nucleótidos cíclicos en regiones cerebrales relevantes.

COMPENDIO DE LA INVENCION

Es el objeto de la presente invención proporcionar un nuevo inhibidor de PDE2 que pueda ser potencialmente útil en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad de la enzima PDE2.

Por lo tanto, la presente invención se refiere al compuesto 1



(1)

o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato de este.

En una realización particular, la sal farmacéuticamente aceptable es una sal clorhidrato, más en particular, la sal 2HCl.

Ilustrativo de la invención es una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y compuesto 1 anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo. Una ilustración de la invención es una composición farmacéutica preparada mezclando el compuesto 1 anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La ilustración de la invención es un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende mezclar el compuesto 1 anterior, o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se divulgan métodos para mejorar la plasticidad neuronal que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o composiciones farmacéuticas descritas anteriormente.

Los ejemplos de la divulgación son métodos para tratar un trastorno mediado por la enzima PDE2, que comprenden

administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o composiciones farmacéuticas descritas anteriormente.

5 Un ejemplo adicional de la divulgación son los métodos para inhibir la enzima PDE2, que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, o composiciones farmacéuticas descritas anteriormente.

Un ejemplo de la divulgación es un método para tratar un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastornos neurológicos y psiquiátricos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo, o composiciones farmacéuticas descritas anteriormente.

10 Un ejemplo de la divulgación es un método para tratar un trastorno seleccionado del grupo de trastornos neurológicos y psiquiátricos seleccionados de trastornos y afecciones psicóticas; trastornos de ansiedad; trastornos del movimiento; abuso de drogas; trastornos del estado de ánimo; trastornos neurodegenerativos; trastornos o afecciones que comprenden como síntoma una deficiencia de atención y/o cognición; accidente cerebrovascular; y trastornos autistas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo, o una sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo o composiciones farmacéuticas descritas anteriormente.

15 Un ejemplo de la divulgación es un método para tratar un trastorno seleccionado del grupo que consiste en trastornos neurológicos y psiquiátricos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo, o composiciones farmacéuticas descritas anteriormente.

20 Un ejemplo de la divulgación es un método para tratar un trastorno seleccionado del grupo de trastornos neurológicos y psiquiátricos seleccionados de trastornos y afecciones psicóticas; trastornos de ansiedad; trastornos del movimiento; abuso de drogas; trastornos del estado de ánimo; trastornos neurodegenerativos; trastornos o afecciones que comprenden como síntoma una deficiencia de atención y/o cognición; accidente cerebrovascular; y trastornos autistas, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1 o una sal o un solvato del mismo, o composiciones farmacéuticas descritas anteriormente.

También se ilustra en la invención el compuesto 1 o una sal o un solvato del mismo, o una composición farmacéutica descrita anteriormente, para su uso como un medicamento.

30 Otro ejemplo de la invención es el compuesto 1 o una sal o un solvato del mismo, o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, prevención, mejora, control o reducción del riesgo de diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos asociados con la disfunción de la fosfodiesterasa 2 en un mamífero, incluyendo un ser humano, cuyo tratamiento o prevención se ve afectado o facilitado por la inhibición de la fosfodiesterasa 2.

35 Un ejemplo de la invención es el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, prevención, mejora, control o reducción del riesgo de diversos trastornos seleccionados de trastornos y afecciones psicóticas; trastornos de ansiedad; trastornos del movimiento; abuso de drogas; trastornos del estado de ánimo; trastornos neurodegenerativos; trastornos o afecciones que comprenden como síntoma una deficiencia de atención y/o cognición; accidente cerebrovascular; y trastorno autista.

40 Un ejemplo de la divulgación es un método para tratar un trastorno seleccionado del grupo que consiste en la enfermedad de Alzheimer, deterioro cognitivo leve, senilidad, demencia con cuerpos de Lewy, síndrome de Down, demencia asociada con accidente cerebrovascular, demencia asociada con enfermedad de Parkinson, y la demencia asociada con beta-amiloide, preferiblemente enfermedad de Alzheimer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable de un solvato del mismo, o composiciones farmacéuticas descritas anteriormente.

45 Otro ejemplo de la invención es el compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo descrito anteriormente para su uso en el tratamiento de: (a) mal de Alzheimer, (b) deterioro cognitivo leve, (c) senilidad, (d) demencia, (e) demencia con cuerpos de Lewy, (f) síndrome de Down, (g) demencia asociada con el accidente cerebrovascular, (h) demencia asociada con el mal de Parkinson, (i) demencia asociada con beta-amiloides, (j) trastornos depresivos y (k) trastornos de ansiedad, en un sujeto que lo necesite.

50 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el efecto del compuesto 1 sobre los niveles de pGlu1 en el hipocampo de ratas Sprague Dawley (10 mg/kg y 40 mg/kg del Compuesto 1). Se muestran transferencias Western de ratas individuales (n = 5 por tratamiento) (Figura 1a). La cuantificación (pGlu1 normalizado frente a los niveles totales de Glu1) se muestra en la Figura 1b.

La Figura 2 muestra la ocupación de PDE2 por el compuesto 1.

La Figura 3 muestra el efecto del compuesto 1 en la transmisión sináptica basal en la sinapsis de fibra musgosa.

La Figura 4 muestra el efecto de respuesta a la dosis del compuesto 1 en la transmisión sináptica basal en la sinapsis de fibra musgosa.

- 5 Las Figuras 5a y 5b muestran el efecto del compuesto 1 sobre la inducción de HFS débil de potenciación a largo plazo (LTP) en la sinapsis de fibra musgosa.

La Figura 6 muestra el efecto de [CAS 1394033-54-5] 1 en la transmisión sináptica basal en la sinapsis de fibra musgosa.

La Figura 7 muestra la medición de los niveles de cGMP en CSF en perros Marshall Beagle.

- 10 La Figura 8a muestra la curva de entrada-salida para la pendiente del potencial postsináptico excitador de campo (fEPSP) registrado en la circunvolución dentada; registros de muestra que muestran respuestas medias de la pendiente del pico de población (PSA) a intervalos de 30 min; la Figura 8b muestra que la LTP inducida por estimulación de alta frecuencia (HFS) se potenció mediante el compuesto 1 en las sinapsis de la ruta de perforación en comparación con la condición del vehículo; la pendiente media de PSA normalizada antes y después de HFS se representa en función del tiempo; los gráficos de barras insertadas muestran los datos promedio en intervalos de 30 min antes y después del procedimiento de tetanización; la Figura 8c muestra aumentos duraderos en la pendiente fEPSP. * $p < 0.05$ compuesto 1 frente al vehículo en cada intervalo de tiempo de 30 min.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

DEFINICIONES

- 20 El término sujeto, tal como se utiliza en la presente, se refiere a un animal, preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano, que es o ha sido objeto de tratamiento, observación o experimento.

- La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una cantidad de compuesto o agente farmacéutico activo que estimula la respuesta biológica o medicinal en un sistema tisular, animal o humano, la cual un investigador, veterinario, médico u otro profesional sanitario desea obtener, que incluye el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se esté tratando.
- 25

Tal como se usa en la presente, se pretende que el término "composición" abarque un producto que comprende los componentes especificados en las cantidades especificadas, así como cualquier producto que resulte, directa o indirectamente, de combinaciones de los componentes especificados en las cantidades especificadas.

El término "huésped" se refiere a un mamífero, en particular a seres humanos, ratones, perros y ratas.

- 30 El término "célula" se refiere a una célula que expresa o incorpora la enzima PDE2.

El término "compuesto de la invención" como se usa en el presente documento, pretende incluir el compuesto 1, y las sales y solvatos del mismo.

- Tal como se utiliza en esta memoria, cualquier fórmula química con enlaces mostrados sólo como líneas continuas y no como enlaces en cuña o en cuña con trazo discontinuo, o indicado de otra manera como que tienen una configuración particular (por ejemplo *R*, *S*) alrededor de uno o más átomos, contempla cada estereoisómeros posible, o mezcla de dos o más estereoisómeros.
- 35

La configuración absoluta se especifica de acuerdo con el sistema de Cahn-Ingold-Prelog. La configuración en un átomo asimétrico es especificada por *R* o *S*.

- 40 Cuando se identifica un estereoisómero específico, esto quiere decir que dicho estereoisómero está sustancialmente exento, es decir, asociado con menos de un 50 %, preferentemente menos de un 20 %, más preferentemente menos de un 10 %, aún más preferentemente menos de un 5 %, en particular menos de un 2 % y aún más preferentemente menos de un 1 %, de los otros estereoisómeros.

Además, el compuesto de la presente invención puede formar solvatos con agua (es decir, hidratos) o disolventes orgánicos comunes, y dichos solvatos también están destinados a incluirse dentro del alcance de esta invención.

- 45 Para su uso en medicina, las sales del compuesto 1 se refieren a "sales farmacéuticamente aceptables" no tóxicas. Sin embargo, otras sales pueden ser útiles en la preparación del compuesto 1 o de sus sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto 1 incluyen sales de adición de ácidos que pueden formarse, por ejemplo, mezclando una solución del compuesto con una solución de un ácido farmacéuticamente aceptable tal como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido acético, ácido benzoico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido carbónico o ácido fosfórico. Los ácidos representativos que se
- 50

pueden usar en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, los siguientes: ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, aminoácidos acilados, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido L-aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 4-acetamidobenzoico,

5 ácido (+)-camfórico, ácido camforsulfónico, ácido cáprico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cinnámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galactárico, ácido gentísico, ácido glucoheptónico, ácido D-glucónico, ácido D-glucorónico, ácido L-glutámico, ácido beta-oxoglutámico, ácido glicólico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido (+)-L-láctico, ácido (±)-DL-láctico, ácido lactobiónico, ácido maleico, ácido (-)-L-málico, ácido malónico, ácido (±)-DL-mandélico, ácido metanosulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido naftaleno-1,5-disulfónico, ácido 1-hidroxí-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido nítrico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico, ácido fosfórico,

10 ácido L-piroglutámico, ácido salicílico, ácido 4-aminosalicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tánico, ácido (+)-L-tartárico, ácido tiocianico, ácido p-toluenosulfónico,

ácido trifluorometilsulfónico y ácido undecilénico.

15 FARMACOLOGÍA

El compuesto de acuerdo con la invención inhibe la actividad de la enzima PDE2, en particular PDE2A, y por lo tanto, eleva los niveles de cAMP o cGMP dentro de células que expresan PDE2. Por lo tanto, la inhibición de la actividad de la enzima PDE2 puede ser útil en el tratamiento de enfermedades provocadas por cantidades deficientes de cAMP o cGMP en las células. Los inhibidores de PDE2 también pueden ser beneficiosos en los casos en los que la cantidad de AMPc o GMPc por encima de los niveles normales resulta en un efecto terapéutico. Los inhibidores de PDE2 se pueden usar para tratar trastornos neurológicos y psiquiátricos.

20 Por lo tanto, la presente invención se refiere al compuesto 1 o a una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo de acuerdo con la presente invención, para su uso como medicamento también se divulga el uso del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo o una composición farmacéutica que comprende el compuesto 1 para la fabricación de un medicamento. La presente invención también se refiere al compuesto 1 o a una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo de acuerdo con la presente invención o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento o prevención de, en particular el tratamiento de, un trastorno en un mamífero. incluyendo un ser humano, cuyo tratamiento o prevención se ve afectada o facilitada por la inhibición de la enzima fosfodiesterasa 2. También se describe el uso del compuesto 1 o a una sal farmacéuticamente aceptable o solvato del mismo o una composición farmacéutica que comprende el compuesto 1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de, en particular el tratamiento de, un trastorno en un mamífero. incluyendo un ser humano, cuyo tratamiento o prevención se ve afectada o facilitada por la inhibición de la enzima fosfodiesterasa 2.

35 La presente invención también se refiere al compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo de acuerdo con la invención, o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento, prevención, mejora, control o reducción del riesgo de diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos asociados con la disfunción de la fosfodiesterasa 2 en un mamífero, incluyendo un ser humano, cuyo tratamiento o prevención se ve afectado o facilitado por la inhibición de la fosfodiesterasa 2.

40 También se describe el uso del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo o una composición farmacéutica que comprende el compuesto 1 para la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir, mejorar, controlar o reducir el riesgo de diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos asociados con la disfunción de la fosfodiesterasa 2 en un mamífero, incluido un ser humano, cuyo tratamiento o prevención se ve afectada o facilitada por la inhibición de la fosfodiesterasa 2.

45 En particular, las indicaciones que pueden tratarse con inhibidores de PDE2, ya sea solos o con otros fármacos, incluyen, a modo no taxativo, las enfermedades que se cree que son mediadas en parte por los ganglios basales, la corteza prefrontal y el hipocampo.

50 Estas indicaciones incluyen trastornos neurológicos y psiquiátricos seleccionados de trastornos y afecciones psicóticas; trastornos de ansiedad; trastornos del movimiento; abuso de drogas; trastornos del estado de ánimo; trastornos neurodegenerativos; trastornos o afecciones que comprenden como síntoma una deficiencia de atención y/o cognición; accidente cerebrovascular; y trastorno autista o autismo.

55 En particular, las afecciones y trastornos psicóticos asociados con disfunciones de PDE2 incluyen una o más de las siguientes afecciones o enfermedades: esquizofrenia, por ejemplo, de tipo paranoide, desorganizada, catatónica, indiferenciada o residual; trastorno esquizofreniforme; trastorno esquizoafectivo tal como del tipo delirante o depresivo; trastorno delirante; trastorno psicótico inducido por drogas/fármacos tal como la psicosis inducida por el alcohol, anfetamina, cannabis, cocaína, alucinógenos, inhaladores, opioides o fenciclidina; trastornos de la personalidad de tipo paranoide; y trastornos de la personalidad de tipo esquizoide.

En particular, los trastornos de ansiedad incluyen el trastorno de pánico; agorafobia; fobias específicas; fobia social; trastorno obsesivo-compulsivo; trastorno de estrés postraumático; trastorno de estrés agudo; y trastorno de ansiedad generalizada.

- 5 En particular, las disfunciones motoras incluyen la enfermedad de Huntington y la discinesia; el mal de Parkinson; el síndrome de la pierna inquieta y el temblor esencial. Además, también se pueden incluir el síndrome de Tourette y otros tics nerviosos.

- 10 En particular, el trastorno del sistema nervioso central es un trastorno relacionado con drogas/fármacos seleccionado del grupo constituido por el consumo excesivo de alcohol; alcoholismo; síndrome de abstinencia del alcohol; delirium trémens; trastorno psicótico inducido por el alcohol; adicción a las anfetaminas; síndrome de abstinencia de las anfetaminas; acción a la cocaína; síndrome de abstinencia de la cocaína; adicción a la nicotina; síndrome de abstinencia de la nicotina; adicción a los opioides y síndrome de abstinencia de los opioides.

- 15 En particular, los trastornos del estado de ánimo y los episodios afectivos incluyen trastornos bipolares, manías y depresión. Preferentemente, el trastorno del estado de ánimo se selecciona del grupo constituido por los trastornos bipolares (I y II); trastorno ciclotímico; depresión; trastorno distímico; trastorno depresivo mayor; depresión resistente al tratamiento; y trastorno del estado de ánimo inducido por drogas/fármacos.

En particular, los trastornos neurodegenerativos incluyen la enfermedad de Parkinson; enfermedad de Huntington; demencia tal como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer; demencia multiinfarto; demencia relacionada con el SIDA o demencia frontotemporal. La afección o trastorno neurodegenerativo comprende la alteración de las respuestas de las neuronas espinosas de tamaño medio estriatales.

- 20 En particular, los trastornos o condiciones que comprenden como un síntoma una deficiencia de atención y/o cognición incluyen demencia, tal como mal de Alzheimer; demencia por infarto múltiple; demencia debido a enfermedad de cuerpos de Lewy; demencia alcohólica o demencia persistente inducida por sustancias; demencia asociada con tumores intracraneales o traumatismo de cerebro; demencia asociada con la enfermedad de Huntington; demencia asociada con el mal de Parkinson; demencia relacionada con SIDA; demencia debida a la enfermedad de Pick; demencia debida a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; otras enfermedades incluyen delirio; trastorno amnésico; trastorno de estrés postraumático; accidente cerebrovascular; parálisis supranuclear progresiva; discapacidad intelectual; un trastorno del aprendizaje; trastorno de déficit atencional/hiperactividad (ADHD); trastorno cognitivo leve; síndrome de Asperger; deterioro cognitivo relacionado con la edad; y deterioro cognitivo relacionado con la percepción, concentración, aprendizaje o memoria.

- 30 En particular, los trastornos relacionados con la adquisición y consolidación de la memoria incluyen, trastornos de memoria, tales como pérdidas de memoria asociadas con la edad, deficiencia de memoria.

Preferentemente, el trastorno psicótico se selecciona el grupo constituido por esquizofrenia, trastorno delirante, trastorno esquizoafectivo, trastorno esquizofreniforme y trastorno psicótico inducido por drogas/fármacos.

- 35 fiscalizar preferentemente, en trastornos del sistema nervioso central es un trastorno de la personalidad seleccionado del grupo constituido por un trastorno de la personalidad obsesivo-compulsivo, y un trastorno esquizotípico, esquizoide.

Preferentemente, el trastorno del sistema nervioso central es un trastorno del estado de ánimo seleccionado del grupo constituido por los trastornos bipolares (I y II), trastorno ciclotímico, depresión, trastorno distímico, trastorno depresivo mayor, depresión resistente al tratamiento y trastorno del estado de ánimo inducido por drogas/fármacos.

- 40 Preferentemente, el trastorno del sistema nervioso central es el trastorno por déficit de atención con hiperactividad.

Preferentemente, el trastorno del sistema nervioso central es un trastorno cognitivo seleccionado del grupo constituido por delirio, delirio persistente inducido por drogas/fármacos, demencia debido a la enfermedad del VIH, demencia debida a la enfermedad de Huntington, demencia debida a el mal de Parkinson, demencia de tipo alzhéimer, demencia persistente inducida por drogas/fármacos y deterioro cognitivo leve.

- 45 Preferentemente, los trastornos tratados con los compuestos de fórmula (I) o uno de sus sales o solvatos farmacéuticamente aceptables de la presente invención se seleccionan entre esquizofrenia; trastorno obsesivo-compulsivo; trastorno de ansiedad generalizada; enfermedad de Huntington; discinesia; mal de Parkinson; depresión; trastornos bipolares; demencia tal como el mal de Alzheimer; trastorno por déficit de atención con hiperactividad; drogadicción; accidente cerebrovascular; y autismo.

- 50 Preferentemente, los trastornos tratados con los compuestos de fórmula (I) o uno de su solvatos o sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención son la esquizofrenia, incluidos sus síntomas positivos y negativos, y deterioros cognitivos, tales como el deterioro de la atención o la memoria.

Entre los trastornos mencionados anteriormente, es particularmente importante el tratamiento de la ansiedad, trastorno obsesivo-compulsivo, trastorno de estrés postraumático; trastorno de ansiedad generalizada, esquizofrenia,

depresión, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, mal de Alzheimer, demencia debida a la enfermedad de Huntington, demencia debida a el mal de Parkinson, demencia de tipo alzhéimer, demencia persistente inducida por drogas/fármacos y deterioro cognitivo leve.

5 Entre los trastornos mencionados anteriormente, es particularmente el tratamiento de la ansiedad, trastorno obsesivo-compulsivo, esquizofrenia, depresión, trastorno por déficit de atención con hiperactividad y el mal de Alzheimer.

10 Otros trastornos del sistema nervioso central incluyen el trastorno esquizoansioso y la ansiedad con depresión comórbida, en particular el trastorno depresivo mayor con un trastorno de ansiedad generalizada comórbido, trastorno de ansiedad social o trastorno de pánico; se sobreentiende que la ansiedad con depresión comórbida también se puede dominar utilizando las expresiones: depresión ansiosa, patología mixta de ansiedad-depresión, trastorno mixto ansioso-depresivo o trastorno depresivo mayor con síntomas de ansiedad, que se utilizan de forma indistinta en la presente.

15 En la actualidad, la cuarta edición del "Diagnostic & Statistical Manual of Mental Disorders" (DSM-IV) de la Asociación Psiquiátrica Estadounidense proporciona una herramienta de diagnóstico para la identificación de los trastornos descritos en la presente. El experto en la técnica se dará cuenta de que existen nomenclaturas, nosologías y sistemas de clasificación alternativos para los trastornos neurológicos y psiquiátricos descritos en la presente, y que estos evolucionan con los avances médicos y científicos. Por ejemplo, el "American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Quinta Edición. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013" (DSM-5™) utiliza términos tales como trastornos depresivos, en particular, trastorno depresivo mayor, trastorno depresivo persistente (distimia), trastorno depresivo inducido por medicamentos y sustancias; trastornos neurocognitivos (NCD) (tanto mayor como leve), en particular, trastornos neurocognitivos debido a mal de Alzheimer, NCD vascular (tal como NCD vascular presente con infartos múltiples, NCD debido a infección con VIH, NCD debido lesión cerebral traumática (TBI), NCD debido a mal de Parkinson, NCD debido a enfermedad de Huntington, NCD frontotemporal, NCD debido a una enfermedad por priones y NCD inducido por sustancias/medicamentos; trastornos del neurodesarrollo, en particular, incapacidad intelectual, trastorno de aprendizaje específico, trastorno motor del neurodesarrollo, trastorno de comunicación y déficit atencional/trastorno de hiperactividad (ADHD); trastornos relacionados con sustancias y trastornos adictivos, en particular, trastorno por uso de alcohol, trastorno por uso de anfetaminas, trastorno por uso de cannabis, trastorno por uso de cocaína, trastorno por el uso de otros alucinógenos, trastorno por el uso de tabaco, trastorno por el uso de opioides y trastorno por el uso de fenciclidina; espectro de la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos, en particular, esquizofrenia, trastorno esquizofreniforme, trastorno esquizoafectivo, trastorno delirante, trastorno psicótico breve, trastorno psicótico inducido por sustancias/medicamentos; trastornos de síntomas somáticos; trastorno de hipersomnolencia; y trastorno ciclotímico (que en el DSM-5™ se encuentra incluido dentro de la categoría de trastornos bipolares y trastornos relacionados). Dichos términos pueden ser utilizados por el experto en la técnica como una nomenclatura alternativa para algunas de las enfermedades o afecciones a las que se hace referencia en la presente. Un trastorno del neurodesarrollo adicional incluye el trastorno del espectro autista (ASD), que comprende de acuerdo con el DSM-5™ trastornos que se conocían anteriormente con los términos autismo infantil temprano, autismo de la infancia, autismo de Kanner, autismo de alto funcionamiento, autismo atípico, trastorno generalizado del desarrollo que se no especifique de otro modo, trastorno desintegrativo de la infancia y síndrome de Asperger.

40 Por lo tanto, la invención también se refiere al compuesto 1 o a una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo de acuerdo con la invención, para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente en el presente documento.

La invención también se refiere al compuesto 1 o a una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo de acuerdo con la invención, para su uso en el tratamiento de una cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente en el presente documento.

45 La invención también se refiere al compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo de acuerdo con la invención, para el tratamiento o prevención, en particular tratamiento, de una cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente en el presente documento.

50 También se divulga el uso del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una cualquiera de las afecciones de enfermedad mencionadas anteriormente en el presente documento.

También se divulga el uso del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una cualquiera de las afecciones de enfermedad mencionadas anteriormente en el presente documento.

55 El compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo de la presente invención se puede administrar a mamíferos, preferiblemente seres humanos, para el tratamiento o prevención de una cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente en el presente documento.

En vista de la utilidad del compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo, de acuerdo con la invención, se describe un método para tratar un trastorno o enfermedad mencionado anteriormente en el

presente documento, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento.

- 5 Dichos métodos comprenden la administración, es decir, la administración sistémica o tópica, preferiblemente administración oral, de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo para animales de sangre caliente, incluyendo los seres humanos.

También se describe un método para la prevención y/o tratamiento de una cualquiera de las enfermedades mencionadas anteriormente en el presente documento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo, a un paciente que lo necesite.

- 10 El inhibidor de la PDE2 que se describe en la presente se puede usar solo, en combinación o en combinación con otros agentes farmacéuticos tales como otros agentes usado en el tratamiento de psicosis, tales como esquizofrenia y trastorno bipolar, trastorno obsesivo-compulsivo, mal de Parkinson, deterioro cognitivo y/o pérdida de memoria, por ejemplo agonistas nicotínicos α -7, inhibidores de PDE4 (Rolipram, GEPR-7b, GSK356278, GSK256066, Apremilast, MK-0952, Roflumilast, AN2898, AN2728, Ariflo Cilomilast, Dotraverine, Ronomilast Elbimilast, Revamilast, Tetomilast, E6005, GDP-1116, HT0712, MK-0873), inhibidores de PDE5 (Sildenafil, Vardenafil, Tadalafil, Udenafil, Avanafil, Mirodenafil, Lodenafil, Dasantafil, PF-00489791), de PDE9 (PF-04447943), otros inhibidores de PDE2 (Bay 60-7550, PF-999, ND-7001), inhibidores de PDE10 (PF-02545920, AMG579), inhibidores de PDE2 y 10, bloqueantes de los canales de calcio, moduladores muscarínicos m1 y m2, moduladores del receptor de adenosina, ampaquinasa, moduladores de NMDA-R, moduladores de mGluR, moduladores de dopamina, moduladores de serotonina, moduladores de canabinoides, inhibidores de HDAC (Vorinostat SAHA, Panobinostat, Quisinostat, ácido valproico) e inhibidores de colinesterasa (por ejemplo, donepezilo, rivastigmina y galantamina). En dichas combinaciones, el compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato del mismo de la presente invención se puede utilizar en combinación con uno o más fármacos diferentes en el tratamiento, prevención, control, mejora o reducción del riesgo de enfermedades o afecciones para las que el compuesto 1 u otras drogas pueden ser útiles, donde la combinación de los fármacos en conjunto es más segura o más eficaz que cualquiera de los fármacos por sí solo.

- Un especialista en la técnica reconocerá que una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de PDE2 de la presente invención es la cantidad suficiente como para inhibir la enzima PDE2 y que esta cantidad varía, entre otros, dependiendo del tipo de enfermedad, la concentración del compuesto en la formulación terapéutica y la condición del paciente. En general, una cantidad del inhibidor de PDE2 a administrar como agente terapéutico para tratar enfermedades en las que la inhibición de la enzima PDE2 es beneficiosa, tal como los trastornos descritos en la presente, será determinada según cada caso por el médico tratante.

- En general, una dosis adecuada es aquella que resulta en una concentración de PDE2 en el sitio de tratamiento en el rango de 0.5 nM a 200 μ M, y más comúnmente de 5 nM a 50 μ M. Para obtener estas concentraciones de tratamiento, es probable que a un paciente que necesite tratamiento se le administren dosis comprendidas entre 0.001 mg/kg y 15 mg/kg de peso corporal, en particular entre 0.01 mg/kg y 2.50 mg/kg de peso corporal, en particular entre 0.01 y 1.5 mg/kg de peso corporal, en particular entre 0.1 mg/kg y 0.50 mg/kg de peso corporal. La cantidad de un compuesto de acuerdo con la presente invención, denominado también principio activo en la presente, que se requiere para conseguir un efecto terapéutico variará, por supuesto, en cada caso, dependiendo del compuesto particular, la vía de administración, la edad y el estado de salud del receptor, y el trastorno o enfermedad particular que se esté tratando.
- Un método de tratamiento también puede incluir administrar el principio activo en un régimen que comprenda entre una y cuatro tomas al día. En estos métodos de tratamiento, los compuestos de acuerdo con la invención se formulan preferentemente antes de la admisión. Tal como se describe a continuación en la presente, las formulaciones farmacéuticas adecuadas se preparan mediante procedimientos conocidos utilizando ingredientes conocidos y de los que se puede disponer fácilmente.

45 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

La presente invención también provee composiciones para prevenir o tratar enfermedades en las cuales es beneficiosa la inhibición de la PDE2, tales como los trastornos neurológicos y psiquiátricos. Dichas composiciones que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto 1 y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

- 50 Aunque es posible administrar el principio activo solo, es preferible presentarlo como una composición farmacéutica. Por consiguiente, la presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de acuerdo con la presente invención, junto con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptables. El portador o diluyente debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la composición y no nocivos para los receptores de los mismos.

- 55 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden preparar mediante cualesquiera métodos conocidos en el campo de la farmacia. Una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto particular, en forma de base o en forma de sal de adición, como principio activo se combina en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, que puede tomar una gran variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para su

administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran convenientemente en formas farmacéuticas unitarias adecuadas, preferentemente, para la administración sistémica tal como la administración oral, percutánea o parenteral; o la administración tópica tal como por inhalación, un spray nasal, colirio o mediante una crema, gel, champú o similar. Por ejemplo, en la preparación de composiciones en una forma farmacéutica oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparados líquidos orales tales como suspensiones, jarabes, elixires y soluciones; o portadores sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de polvos, pastillas, cápsulas y comprimidos. Debido a su fácil administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma farmacéutica unitaria oral más conveniente, en cuyo caso se emplean obviamente portadores farmacéuticos sólidos. Para las composiciones parenterales, el portador normalmente comprenderá agua esterilizada, al menos en gran parte, aunque puede incluir otros ingredientes, por ejemplo, para incrementar la solubilidad. Se pueden preparar soluciones inyectables, por ejemplo, en las que el portador comprenda solución salina, solución de glucosa o una mezcla de solución salina y de glucosa. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear portadores líquidos, agentes de suspensión y similares que sean adecuados. En las composiciones adecuadas para la administración percutánea, el portador comprende opcionalmente un agente potenciador de la penetración y/o un agente humectante adecuado, opcionalmente combinados con aditivos adecuados de cualquier naturaleza en proporciones minoritarias, donde los aditivos no provocan ningún efecto perjudicial significativo en la piel. Dichos aditivos pueden facilitar la administración a la piel y/o pueden ser útiles para preparar las composiciones deseadas. Estas composiciones se pueden administrar de varias formas, p. ej., como un parche transdérmico, como una unción dorsal puntual o como una pomada.

Es especialmente conveniente formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en formas farmacéuticas unitarias debido a su fácil administración y a la uniformidad de la dosificación. La expresión "forma farmacéutica unitaria", tal como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de principio activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, asociada con el portador farmacéutico requerido. Los ejemplos de tales formas farmacéuticas unitarias son comprimidos (incluidos los comprimidos recubiertos y ranurados), cápsulas, pastillas, sobres de polvos, obleas, soluciones o suspensiones inyectables, cucharaditas, cucharadas y similares, y múltiples segregados de estos.

Dependiendo del modo de administración, la composición farmacéutica comprenderá del 0.05 al 99% en peso, preferentemente del 0.1 al 70% en peso, más preferentemente del 0.1 al 50% en peso del ingrediente activo, y del 1 al 99.95% en peso, preferentemente del 30 al 99.9% en peso, más preferentemente del 50 al 99.9% en peso de un portador farmacéuticamente aceptable, basándose todos los porcentajes en el peso total de la composición.

Los presentes compuestos se pueden utilizar para la administración sistémica tal como la administración oral, percutánea o parenteral; o la administración tópica tal como por inhalación, un spray nasal, colirio o mediante una crema, gel, champú o similar. El compuesto preferiblemente se administra por vía oral.

La dosificación exacta y la frecuencia de administración dependen del compuesto particular de fórmula (I) utilizado, de la afección particular que esté siendo tratada, de la gravedad de la afección que esté siendo tratada, de la edad, peso, sexo, grado del trastorno y condición física general del paciente particular, así como de otra medicación que pueda estar tomando el individuo, como es bien conocidos por los expertos en la técnica. Además de ello, es evidente que dicha cantidad diaria eficaz se puede reducir o incrementar dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescribe los compuestos de la presente invención.

La cantidad de compuesto 1 que puede combinarse con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo de la enfermedad tratada, la especie de mamífero y el modo particular de administración. Sin embargo, como norma general, las dosis unitarias adecuadas para los compuestos de la presente invención pueden contener, por ejemplo, preferentemente entre 0.1 mg y aproximadamente 1000 mg del compuesto activo. Una dosis unitaria preferida es aquella comprendida entre 1 mg y aproximadamente 500 mg. Una dosis unitaria más preferida es aquella comprendida entre 1 mg y aproximadamente 300 mg. Una dosis unitaria aún más preferida es aquella comprendida entre 1 mg y aproximadamente 100 mg. Tales dosis unitarias se pueden administrar más de una vez al día, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 veces al día, pero preferentemente 1 o 2 veces al día, de forma que la dosis total para un adulto de 70 kg está comprendida en el rango de 0.001 a aproximadamente 15 mg por kg de peso del sujeto por administración. Una dosis preferida es aquella comprendida entre 0.01 y aproximadamente 1.5 mg por kg de peso del sujeto por administración, y dicha terapia se puede prolongar durante varias semanas o meses y, en algunos casos, años. Sin embargo, se sobreentenderá que el nivel posológico específico para cualquier paciente particular dependerá de varios factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del individuo que esté siendo tratado; el tiempo y la vía de administración; la tasa de excreción; otros fármacos que hayan sido administrados previamente; y la gravedad de la enfermedad particular que se esté tratando, como bien sabrán los expertos en la técnica.

Una dosis típica puede ser 1 mg a aproximadamente 100 mg de comprimido o 1 mg a aproximadamente 300 mg que se toman una vez al día, o múltiples veces al día, o una cápsula o comprimido de liberación única que se toma una vez al día y que contiene un contenido proporcionalmente más alto de principio activo. Puede obtenerse el

efecto de liberación prolongada mediante materiales encapsulantes que se disuelven a diferentes valores de pH, mediante cápsulas que se liberan lentamente mediante presión osmótica o mediante cualquier otro medio conocido de liberación controlada.

- 5 Puede ser necesario emplear dosis que no estén comprendidas en estos rangos en algunos casos como será evidente para los expertos en la técnica. Además, cabe destacar que el profesional sanitario o médico responsable del tratamiento sabrá cómo y cuándo comenzar, interrumpir, ajustar o finalizar la terapia teniendo en cuenta la respuesta del paciente individual.

En el caso de las composiciones, métodos y kits provistos precedentemente, un especialista en el arte comprenderá que el compuesto preferido para usar en cada uno es el compuesto indicado en la presente.

10 PARTE EXPERIMENTAL

- Como se usa en el presente documento, el término "ACN" significa acetonitrilo, "AcOH" significa ácido acético, "DMAP" 4-dimetilaminopiridina, "DSC" significa calorimetría diferencial de barrido, "LCMS" significa cromatografía líquida/espectrometría de masas, "HPLC" significa cromatografía líquida de alto rendimiento, "RP HPLC" significa cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, "ac." significa acuoso, "DCM" significa diclorometano, "DIPE" 15 significa éter diisopropílico, "DIPEA" significa diisopropiletilamina, "DMF" significa N,N-dimetilformamida, "EtOH" significa etanol, "Et₂O" significa éter dietílico, "EtOAc" significa acetato de etilo, "Et₃N" significa trietilamina, "HBTU" significa hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N'-tetrametiluronio, "THF" significa tetrahidrofurano, "min" significa minutos, "h" significa horas, MeOH "significa metanol," iPrOH" significa 2-propanol, "RM" significa mezcla de 20 reacción, "TA" significa temperatura ambiente, "OL" significa capa orgánica, "T_r" significa tiempo de retención (en minutos), "quant." significa cuantitativo, "sat." significa saturado, "sol." significa solución, "p.f." significa punto de fusión, "c.s." significa cantidad suficiente.

- La cromatografía de capa fina (TLC) se llevó a cabo en placas de gel de sílice 60 F254 (Merck) utilizando solventes de grado reactivo. La cromatografía en columna abierta se llevó a cabo en gel de sílice, con un tamaño de partícula de malla 230-400 y un tamaño de poro de 60 Å (Merck), mediante técnicas estándar. La cromatografía en columna ultrarrápida automatizada se realizó usando cartuchos listos para conectar de Merck, sobre gel de sílice irregular, tamaño de partícula 15-40 µm (columnas ultrarrápidas desechables de fase normal) en un sistema SPOT o LAFLASH de Armen Instrument.

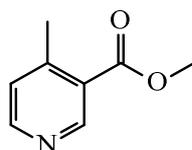
- La configuración estereoquímica absoluta para algunos de los compuestos se determinó usando dicroísmo circular vibracional (VCD). Se midió en un instrumento Bruker Equinox 55 dotado de un PMA 37, en una celda para líquidos de KBr usando CD₂Cl₂ como solvente (PEM: 1350 cm⁻¹, LIA: 1 mV, resolución: 4 cm⁻¹). Puede encontrarse una descripción acerca del uso de VCD para la determinación de la configuración absoluta en el documento de Dyatkin A.B. *et. al*, Chirality, 14:215-219 (2002).

- Cálculos Ab initio: Se realiza una búsqueda conformacional exhaustiva a nivel de mecánica molecular usando Macromodel para realizar un muestreo mixto torsional/de modo bajo con el campo de fuerza OPLS-2005. Los mínimos localizados se optimizaron utilizando Jaguar a nivel de B3LYP/6-31G** con un modelo de solvatación continuo de Poisson-Boltzmann para imitar un solvente de diclorometano. Todas las conformaciones dentro del intervalo de 10 kJ/mol se utilizaron para estimular el espectro de VCD e IR. Las fuerzas dipolo y rotacional se calcularon al mismo nivel de B3LYP/6-31G** utilizando Jaguar. Los espectros de VCD calculados, generados después llevar las frecuencias a escala con un factor de 0.97, convertir a la forma de banda Lorentziana y totalizar la contribución de cada constituyente suponiendo un conjunto de Boltzmann, se compararon visualmente con los espectros experimentales para asignar la estereoquímica correcta.

- Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren el alcance de la presente invención, pero sin limitar la misma. A menos que se indique lo contrario, todos los materiales de partida se adquirieron de proveedores comerciales y se utilizaron sin purificación adicional.

45 A. Síntesis de los intermediarios

Intermedio 1

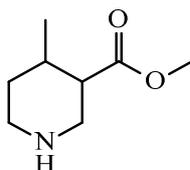


- Procedimiento a: Se añadió clorhidrato del ácido 4-metil-3-piridincarboxílico (1:1) (40 g, 230.4 mmol) a una mezcla a reflujo de ácido sulfúrico (20 ml) y MeOH (400 ml). La mezcla se dejó a reflujo durante la noche, luego se evaporó y la lechada resultante se agregó a una solución fría de NaHCO₃ (64 g) en agua (360 ml). El

producto se extrajo con DCM y la capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó, produciendo el intermedio 1 (28.70 g, 83%).

5 Procedimiento b: Se cargó un reactor de metal con 3-bromo-4-metil-piridina (200 g, 0.116 mol) y una mezcla de DMF/MeOH (1 l/1 l). A la misma se agregó Et_3N (400 g, 0.395 mol), acetato de paladio (II) (8 g, 0.036 mol) y 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (16 g, 0.029 mol). El reactor se cerró y se presurizó con CO gaseoso (3 MPa) y la mezcla de reacción se agitó y se calentó durante la noche a 140 °C. La RM se enfrió, se filtró y se concentró *in vacuo*. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna flash sobre gel de sílice (eluyente en gradiente: EtOAc/éter de petróleo de 1/1 a 1/0). Se recolectaron las fracciones de producto y el solvente se evaporó para dar el intermediario deseado 1 (90 g, 51%).

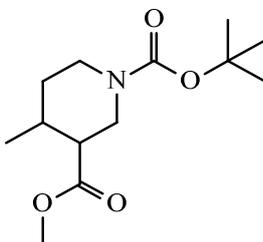
10 Intermedio 2



15 Procedimiento a: Se cargó un frasco de hidrogenación con AcOH (500 ml) y luego se agregó PtO_2 (15.02 g, 66.2 mmol). Se agregó el intermediario 1 (50 g, 330.8 mmol) y la mezcla se hidrogenó a 50 °C durante 7 días. La RM se filtró sobre dicalite® y el filtrado se evaporó para obtener el intermediario 2 (52 g), que se usó en el paso siguiente sin purificación adicional.

Procedimiento b: Se agregó óxido de platino (5 g, 0.022 mol) a una solución del intermediario 1 (90 g, 0.595 mol) y AcOH (1 l). La r.m. se agitó y se hidrogenó durante 5 días a 50°C bajo una presión de 3.5 kPa. La RM enfriada se concentró *en vacío* para dar el intermediario 2 como la sal de ácido acético (140 g, 97%, 90% de pureza determinada por $^1\text{H-NMR}$).

20 Intermedio 3



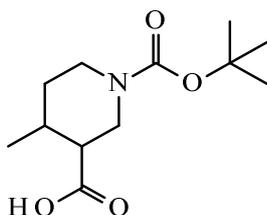
Procedimiento a: A una solución del intermediario 2 (52 g, 330.8 mmol) en DCM (869 ml), se agregaron DIPEA (85.5 g, 661.5 mmol) y DMAP (4.04 g, 33.08 mmol). Después,

25 se añadió dicarbonato de di-terc-butilo (72.19 g, 330.8 mmol) a esta solución en pequeñas porciones, y la reacción se agitó a TA durante 1 h. La RM se lavó con agua y salmuera y la capa orgánica se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (gel de silicio, eluyente: DCM, 1% de MeOH en DCM, 2%, 4%). Las fracciones deseadas se evaporaron para dar el intermediario 3 (64.1 g, 75%).

30 Procedimiento b: A una solución agitada y enfriada (0 °C) del intermediario 2 (140 g, 0.595 mol) en DCM (1.5 l) se agregó sucesivamente bicarbonato de di-ter-butilo (130 g, 0.596 mol), Et_3N (225 g, 1.74 mol) y DMAP (10 g, 0.082 mol) y se continuó agitando a RT durante 2 h. La mezcla de reacción se vertió sobre H_2O (500 ml) y se extrajo con DCM (2x 100 ml). Las capas orgánicas se separaron, se secaron (Na_2SO_4), y el solvente se evaporó para dar el intermediario crudo 3 (150 g, 90%, 90% de pureza determinada mediante $^1\text{H-NMR}$) que se usó como tal en el siguiente.

Intermedio 4

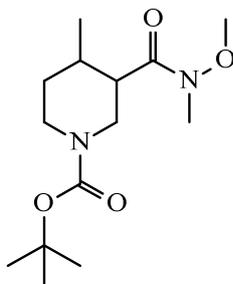
ES 2 765 738 T3



5 Procedimiento a: El intermediario 3 (64.1 g, 249.1 mmol) se agitó en MeOH (500 ml) a RT. Se agregó NaOH (2 M, 747.3 ml) y la mezcla se agitó durante 2 h a RT. La RM se acidificó con HCl 1 N y el producto se extrajo con Et₂O. La OL se lavó con salina y se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, para dar el intermediario 4 (59.70 g) como un sólido blanco.

10 Procedimiento b: A una solución agitada del intermediario 3 (150 g, 90% pura, 0.524 mol) en MeOH (0.9l) se agregó una solución de una solución 2 M de NaOH (1.8 mol). Después de 14 h a RT, la RM se extrajo con MTBE (2 x 0.8 l). La capa acuosa se acidificó con 10% de ácido cítrico y luego se extrajo con EtOAc (4 x 1 l). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron *en vacío* para dar el intermediario crudo 4 (142 g, 90% de pureza determinada mediante ¹H-NMR, 100%) que se usó como tal en el paso siguiente.

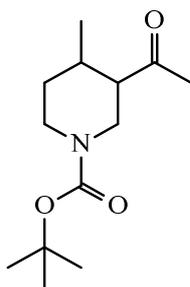
Intermedio 5



15 Procedimiento a: A una solución del intermediario 4 (59.7 g, 0.25 mol) en THF (800 ml), se agregó di-1H-imidazol-1-il-metanona (54 g, 0.33 mol) y la mezcla se agitó a RT durante 1 h. En otro frasco, a una suspensión de clorhidrato de N-metoxi-metanamina (1:1) (32.93 g, 0.34 mol) en ACN (500 ml), se agregó trimetilamina (35.75 g, 0.35 mol). Ambas mezclas se combinaron y se agitaron a 50 °C con monitoreo. El producto intermediario cristalizó fuera de la RM y no reaccionó con N-metoxi-metanamina para formar el producto deseado. Se agregó DCM hasta disolver el intermediario. La reacción se dejó con agitación durante 1 semana a 80 °C. Los disolventes se evaporaron. El residuo se disolvió en DCM y se lavó con agua, una solución de 20% de AcOH y finalmente con una solución saturada de NaHCO₃. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (gel de silicio, eluyente: 2% de MeOH en DCM, 4%). Las fracciones puras se evaporaron para dar el intermediario 5 (70 g, cuantitativo).

25 Procedimiento b: A una solución agitada y enfriada con hielo del intermedio 4 (140 g, 0.518 mol) en DCM (2 l) se le añadieron N,O-dimetilhidroxilamina (113 g, 1.16 mol) y Et₃N (113 g, 1.79 mol). Luego se agregó HATU (235 g, 0.618 mol) y se continuó agitando durante 14 h. El solvente se evaporó y se agregó una solución de NaHCO₃ (0.5 l) y luego se extrajo con DCM (3 x 1 l). Las capas orgánicas combinadas se separaron, se secaron sobre (Na₂SO₄), se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash sobre gel de silicio eluyendo con 1-10% de EtOAc en éter de petróleo para dar el intermediario 5 (152 g, 100%).

30 Intermedio 6



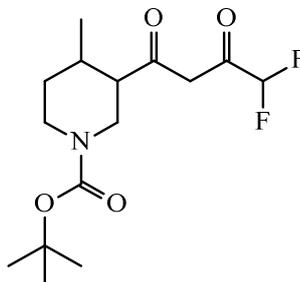
Procedimiento a: Se cargó el intermedio 5 (70 g, 244.4 mmol) en THF (250 ml) en un matraz en una atmósfera de N_2 y se enfrió a $-15\text{ }^\circ\text{C}$. Se añadió gota a gota bromuro de metilmagnesio (1.4 M en tolueno/THF 75/25, 206 ml), sin exceder la temperatura

- 5 $0\text{ }^\circ\text{C}$. Después de la adición, la RM se agitó a TA durante 1 h. Después, la RM se vertió sobre hielo con 20 ml de AcOH. El producto se extrajo con Et_2O y la capa orgánica se lavó con una solución al 5% de $NaHCO_3$. La capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se evaporó para dar el intermedio 6 (53.35 g, 90%).

Procedimiento b: A una solución agitada y enfriada ($0\text{ }^\circ\text{C}$) del intermedio 5 (150 g,

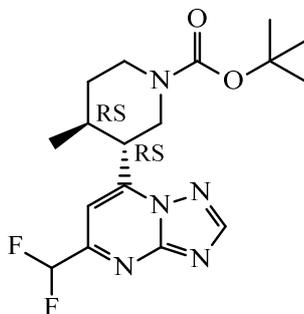
- 10 0.524 mol) en THF (2 l) se le añadió gota a gota una solución 3 M de bromuro de metilmagnesio en THF (0.75 l, 2.25 mol) y la agitación se continuó a TA durante 2 h. La mezcla de reacción se vertió sobre una solución acuosa de NH_4Cl y se extrajo con DCM. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre Na_2SO_4 , se filtraron y se concentraron al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía sobre gel de silicio eluyendo con 1-5% de EtOAc en éter de petróleo para dar el intermediario 6 (120 g, 95%).

Intermedio 7



- 15 El intermediario 6 (53.35 g, 0.22 mol) se agitó en tolueno (1500 ml) a $0\text{ }^\circ\text{C}$ bajo N_2 . Se añadió terc-butóxido potásico (34.14 g) a $0-5\text{ }^\circ\text{C}$, se añadió gota a gota éster etílico del ácido 2,2-difluoro-acético (33.01 g, 0.27 mol) a $0-5\text{ }^\circ\text{C}$. La RM se agitó a TA durante 2 h, después se lavó con H_2SO_4 al 10% en agua, y la capa orgánica se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se evaporó, produciendo el intermedio 7 (70.50 g, cuantitativo).

20 Intermedio 8



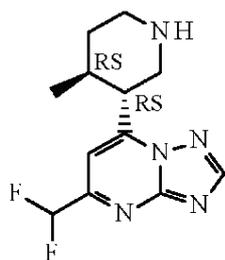
El intermedio 7 (70.5 g, 220.8 mmol), clorhidrato de 1H-1,2,4-triazol-5-amina (1:1) (53.22 g, 441.52 mmol) y DMF (1500 ml) se agitaron a $80\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. Se añadieron Et_3N

(20 g) y dicarbonato de di-terc-butilo (20 g). La mezcla se agitó durante

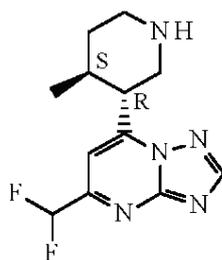
30 min, se evaporó y después se disolvió en EtOAc, se lavó con agua y salmuera. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. Se observaron cuatro isómeros. La primera fracción cristalizó a partir de Et₂O. Los cristales se separaron por filtración y se secaron, para dar el intermediario 8 (24.60 g, 30%). El licor madre dio una segunda fracción del compuesto. Los cristales se separaron por filtración y se secaron, para dar el intermediario 8 (2.53 g, 3%).

Nota: "RS" significa que el intermediario es una mezcla racémica de dos enantiómeros de configuración relativa *trans*.

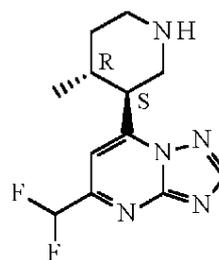
Intermediarios 9, 9a y 9b



Intermedio 9



Intermedio 9a



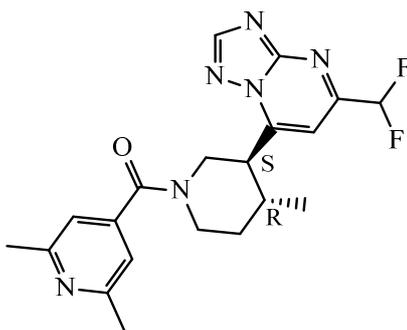
Intermedio 9b

A una solución del intermediario 8 (24.6 g, 67 mmol) en MeOH (350 ml), se agregó HCl-iPrOH (350 ml) y la RM se agitó durante 2 h a RT. La RM se evaporó y el producto se cristalizó a partir de EtOH. Los cristales se separaron por filtración y se secaron, dando 20.33 g de un crudo, al cual se agregaron agua, Na₂CO₃ y DCM. La capa orgánica se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó, produciendo 12.80 g del intermedio 9. Esta base libre se separó en los enantiómeros 9a y 9b mediante purificación por SFC Prep (Fase estacionaria: Chiralpak Diacel AD 30 x 250 mm; fase móvil: CO₂, ((MeOH - iPrOH 50/50) con 0.4% de iPrNH₂), para dar el intermedio 9a (5 g, 19%, R_t = 7.57 min) y el intermedio 9b (5.13 g, 19%, R_t = 9.36 min).

Los intermediarios 9a y 9b se aislaron como bases libres o, como alternativa, se disolvieron en MeOH, seguido por adición de HCl/i-PrOH y la mezcla se evaporó. Se cristalizaron sales clorhidrato (en cada caso, .HCl) a partir de ACN, se separaron por filtración y se secaron.

Síntesis B del compuesto final

Compuesto 1



Se agitó ácido 2,6-dimetilpiridin-4-carboxílico (1.84 g, 12.2 mmol) en DCM (100 ml), se añadieron DIPEA (6.31 g, 48.8 mmol) y HBTU (4.63 g, 12.2 mmol), la agitación se continuó durante 0.5 h a TA. Se añadió el intermedio 9b (3.26 g, 12.2 mmol) a la solución, y la agitación se continuó durante 5 h a TA. Se añadió una solución 1 N de NaOH y se agitó durante 5 min. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó. El producto se purificó mediante cromatografía en columna (gel de silicio, eluyente: MeOH al 1% en DCM, 2%, 4%). Las fracciones puras se evaporaron y el producto se cristalizó en DIPE, se eliminó por filtración y se secó, produciendo el compuesto 1 (3.85 g, 79%).

Un lote separado del compuesto se cristalizó como la sal HCl en Et₂O para producir el compuesto 1 como la sal clorhidrato (.2 HCl) (rendimiento: 175 mg, 70%, partiendo de

175 mg del intermedio 9b.HCl).

La estereoconfiguración del compuesto 1 se confirmó por dicroísmo vibracional circular (VCD).

PARTE ANALÍTICA

Puntos de fusión

Los valores son valores pico o rangos de fusión y se obtienen con incertidumbres experimentales que habitualmente se asocian con este método analítico.

5 DSC823e (indicado como DSC)

El punto de fusión se determinó con un equipo DSC823e (Mettler-Toledo). El punto de fusión se midió con un gradiente de temperatura de 10 °C/min. La temperatura máxima fue 300 °C.

Tabla 1

Nº de Co.	PF
1	149.31

Rotación óptica

10 La rotación óptica se midió en un polarímetro Perkin-Elmer 341 con una lámpara de sodio y se informó de la siguiente manera: $[\alpha]_D^T$ (λ , c g/100ml, disolvente, T°C).

$[\alpha]_D^T = (100\alpha) / (l \times c)$: donde l es la longitud del recorrido en dm y c es la concentración en g/100 ml para una muestra a una temperatura T (°C) y una longitud de onda λ (en nm). Si la longitud de onda de la luz utilizada es de 589 nm (la línea D del sodio), entonces podría utilizarse el símbolo D en su lugar. El signo de la rotación (+ o -) debería proporcionarse siempre. Cuando se utiliza esta ecuación, la concentración y el disolvente siempre se proporcionan entre paréntesis después de la rotación. La rotación se indica utilizando grados y no se proporcionan unidades de concentración (se asume que son g/100 ml).

15

Tabla 2

Nº de Co.	RO
1	+28.91° (589 nm, c 0.2975% p/v, DMF, 20 °C)

Métodos de SFC-MS

20 La medición de SFC se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía analítica de fluidos supercríticos (SFC) compuesto por una bomba binaria para suministrar dióxido de carbono (CO₂) y un modificador, un automuestreador, un horno para la columna, un detector de haz de diodos dotado de una celda de flujo de alta presión que resiste una presión de hasta 400 bar. Si se configura con un espectrómetro de masas (MS) el flujo desde la columna se lleva al (MS). Es parte del conocimiento de un experto en la materia ajustar los parámetros ajustables (por ejemplo, intervalo de barrido, tiempo de permanencia, etc.) con el fin de obtener iones que permitan la identificación del peso molecular (PM) monoisotópico nominal del compuesto. La adquisición de datos se realizó con el software adecuado.

25

Tabla 3a. Métodos de SFC-EM analíticos (Flujo expresado en ml/min; temperatura de la columna (T) en °C; tiempo de ejecución en minutos, contrapresión (BPR) en bares.

Método código	columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución ----- BPR
1	columna Daicel (AD, OD, OJ, AS, ID)-H -H (5.0 µm, 250 x 4.6 mm)	A: CO ₂ B: Los 5 solventes diferentes para B usados son: MeOH, EtOH, iPrOH, MeOH-iPrOH (50-50) y EtOH-iPrOH (50-50)	10%-55% de B en 4 min, 55-50% en 0.45 min retención 2.55 min	5 ----- 40	7 ----- 110

Tabla 3b. Datos analíticos de SFC – R_t significa tiempo de retención (en minutos), [M+H]⁺ significa la masa protonada

del compuesto, método se refiere al método utilizado para el análisis (SFC)MS de compuestos puros en cuanto a los enantiómeros.

Nº de Co.	T _R	[M+H] ⁺	Método	Orden de Elución de Isómeros
1	2.93	401	1	Solamente un enantiómero

Métodos de LC/MS

5 La medición de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) realizó utilizando una bomba de LC, una matriz de diodos (DAD) o un detector de UV y una columna, según se especifica en los métodos respectivos. Cuando fue necesario, se incluyeron detectores adicionales (véase la tabla de métodos más adelante).

10 El flujo procedente de la columna se introdujo en un espectrómetro de masas (MS), el cual se configuró con una fuente de iones a presión atmosférica. Es parte del conocimiento de un experto en la materia ajustar los parámetros ajustables (por ejemplo, intervalo de barrido, tiempo de permanencia, etc.) con el fin de obtener iones que permitan la identificación del peso molecular (PM) monoisotópico nominal del compuesto. La adquisición de datos se realizó con el software adecuado.

15 Los compuestos se describen según sus tiempos de retención (T_R) experimentales e iones. Si no se especifica de otro modo en la tabla de datos, el ion molecular descrito corresponde a [M+H]⁺ (molécula protonada) y/o [M-H]⁻ (molécula desprotonada). En caso de que el compuesto no se pudiera ionizar directamente, se especifica el tipo de aducto (es decir, [M+NH₄]⁺, [M+HCOO]⁻, etc.). Para moléculas con patrones isotópicos múltiples (Br, Cl), el valor indicado es el obtenido para la masa isotópica más baja. Todos los resultados se obtuvieron con las incertidumbres experimentales que se asocian habitualmente con el método utilizado.

20 En lo sucesivo en la presente, "SQD" significa detector de cuadrupolo único, "MSD" detector selectivo de masas, "TA" temperatura ambiente, "BEH" híbrido con puente de etilsiloxano/sílice, "DAD" detector de haz de diodos, "HSS" sílice de alta resistencia.

Tabla 4a. Códigos del método de LCMS (Flujo expresado en ml/min; temperatura de la columna (T) en °C; Tiempo de análisis en minutos)

Código del método	Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución (min)
Método A	Waters: Acquity® UPLC® - DAD-SQD	Waters: BEH C18 (1.7 µm, 2.1*50 mm)	A: CH ₃ COONH ₄ 10 mM en 95% de H ₂ O + 5% de CH ₃ CN B: CH ₃ CN	de 95% de A a 5% de A en 1.3 min, mantenido durante 0.7 min.	0.8 mL/min ----- 55 °C	2

Tabla 4b Datos de LCMS analíticos – R_t significa tiempo de retención (en minutos), [M+H]⁺ significa la masa protonada del compuesto, el método se refiere al método usado para el análisis de (LC)MS.

Nº de Co.	T _R	[M+H] ⁺	[M+H] ⁺	Método
1	0.76	401.2	399.2	Método A

25 Resonancia magnética nuclear (RMN)

El espectro de ¹H RMN se registró en un espectrómetro Bruker DPX-400 con secuencias de pulsos estándar, que funciona a 400 MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se indican en partes por millón.

Comp. N.º 1: ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6 , 120 °C) δ ppm 0.81 (d, $J=6.6$ Hz, 3 H) 1.43 (cd, $J=12.4$, 4.4 Hz, 1 H) 1.89 (dc a, $J=13.4$, 3.1 Hz, 1 H) 2.44 (s, 6 H) 2.49 - 2.53

(m, 1 H) 3.11 (t, $J=12.7$ Hz, 1 H) 3.35 (dd, $J=12.9$, 11.1 Hz, 1 H) 3.57 (td, $J=10.8$, 4.1 Hz, 1 H) 4.00 - 4.27 (m, 2 H) 6.98 (t, $J=54.2$ Hz, 1 H) 7.00 (s, 2 H) 7.53 (s, 1 H) 8.68 (s, 1 H)

5 EJEMPLOS FARMACOLÓGICOS

El compuesto proporcionado en la presente invención es un inhibidor de PDE2, particularmente de PDE2A. Los resultados del ensayo del compuesto 1 en varios ensayos farmacológicos se muestran a continuación.

ENSAYO DE PDE2A IN VITRO

10 La PDE2A recombinante humana (hPDE2A) se expresó en células Sf9 utilizando el constructo de baculovirus recombinante rPDE10A. Las células se recogieron después de 48 h de infección y la proteína hPDE2A se purificó mediante cromatografía de quelatos metálicos en Ni-sefarosa 6FF. Los compuestos evaluados se disolvieron y se diluyeron en 100% de DMSO hasta una concentración 100 veces superior a la concentración final en el ensayo. Las diluciones de los compuestos (0.4 μl) se añadieron en placas de 384 pocillos a 20 μl de tampón de incubación (Tris 50 mM pH 7.8, MgCl_2 8.3 mM,

15 EGTA 1.7 mM). Se añadieron 10 μL de la enzima hPDE2A en tampón de incubación y la reacción se inició añadiendo 10 μL de sustrato hasta una concentración final de 10 μM de cGMP y 0.01 μCi de ^3H -cGMP. La reacción se incubó durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después de incubar, la reacción se detuvo con 20 μL de solución de parada que consistía en 17.8 mg/mL de microesferas para el ensayo SPA (ensayo de centelleo por proximidad) de PDE suplementadas con ZnCl_2 200 mM. Después de sedimentar las microesferas durante 30 minutos, se midió la radioactividad en un contador de centelleo superior de Perkin Elmer y los resultados se expresaron como cpm. Para los blancos, la enzima se omitió de la reacción y se reemplazó con tampón de incubación. Los valores de control se obtuvieron mediante la adición de una concentración final de un 1% de DMSO en vez de compuesto. Una curva con el mejor ajuste se obtiene aplicando el método de la suma de mínimos cuadrados a la representación gráfica del % del valor de control al que se le ha sustraído el blanco frente a la concentración de compuesto, y el valor de la concentración inhibitoria máxima media (CI_{50}) se deriva de esta curva.

ENSAYO CON PDE3A IN VITRO

30 La PDE3A humana recombinante (hPDE3A) como un lisado de células de insecto parcialmente purificado fue suministrada por Scottish Biomedical, se clonó de cerebro humano y se expresó en células Sf9. Los compuestos evaluados se disolvieron y se diluyeron en 100% de DMSO hasta una concentración 100 veces superior a la concentración final en el ensayo. Las diluciones de los compuestos (0.4 μL) se añadieron en placas de 384 pocillos a 20 μL de tampón de incubación (Tris 50 mM, pH 7.8, MgCl_2 8.3 mM, EGTA 1.7 mM). Se añadieron 10 μl de la enzima hPDE3A en tampón de incubación y la reacción se inició añadiendo 10 μl de sustrato hasta una concentración final de

35 cAMP 0.4 μM y 2.4 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -cAMP. La placa se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. Después de incubar, la reacción se detuvo con 20 μL de solución de parada que consistía en 17.8 mg/mL de esferas PDE para el ensayo SPA (ensayo de centelleo por proximidad) suplementadas con ZnCl_2 200 mM. Después de sedimentar las microesferas durante 30 minutos, se midió la radioactividad en un contador de centelleo de mesada de Perkin Elmer y los resultados se expresaron como cpm. Para los blancos, la enzima se omitió de la reacción y se reemplazó con tampón de incubación. Los valores de control se obtuvieron mediante la adición de una concentración final de un 1% de DMSO en vez de compuesto. Una curva con el mejor ajuste se obtiene aplicando el método de la suma de mínimos cuadrados a la representación gráfica del % del valor de control al que se le ha sustraído el blanco frente a la concentración de compuesto, y el valor de la concentración inhibitoria máxima media (CI_{50}) se deriva de esta curva.

ENSAYO DE PDE10A IN VITRO

45 La PDE10A recombinante de rata (rPDE10A2) se expresó en células Sf9 utilizando el constructo de baculovirus recombinante rPDE10A. Las células se recogieron después de 48 h de infección y la proteína rPDE10A se purificó mediante cromatografía de quelatos metálicos en Ni-sefarosa 6FF. Los compuestos evaluados se disolvieron y se diluyeron en 100% de DMSO hasta una concentración 100 veces superior a la concentración final en el ensayo. Las diluciones de los compuestos (0.4 μl) se añadieron en placas de 384 pocillos a 20 μl de tampón de incubación (Tris 50 mM pH 7.8, MgCl_2 8.3 mM,

50 EGTA 1.7 mM). Se añadieron 10 μL de la enzima rPDE10A en tampón de incubación y la reacción se inició añadiendo 10 μL de sustrato hasta una concentración final de 60 nM de cAMP y 0.008 μCi de ^3H -cAMP. La reacción se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, la reacción se detuvo con 20 μl de solución de detención que consistía en 17.8 mg/ml de esferas de PDE SPA (ensayo de proximidad de centelleo). Después de sedimentar las microesferas durante 30 minutos, se midió la radioactividad en un contador de centelleo superior de Perkin Elmer y los resultados se expresaron como cpm. Para los blancos, la enzima se omitió de la reacción y se reemplazó con tampón de incubación. Los valores de control se obtuvieron mediante la adición de una concentración final de un 1% de DMSO en vez de compuesto. Una curva con el mejor ajuste se obtiene aplicando el método de la

suma de cuadrados mínimos a la representación gráfica del % del valor de control al que se le ha sustraído el blanco frente a la concentración de compuesto, y el valor de la concentración inhibitoria máxima media (Cl₅₀) se deriva de esta curva.

Tabla 5a.

Compuesto	Cl ₅₀ PDE2A (nM)
1	0.95
1. 2HCl	0.7

5 Tabla 5b pCl₅₀ corresponde a la Cl₅₀ -log expresada en mol/l.

Compuesto	pCl ₅₀ (PDE2A)	pCl ₅₀ PDE3B	pCl ₅₀ PDE10A2
1	9.07	5.21	7.06
1.2HCl	9.11	5.15	6.93

DETECCIÓN DE TRANSFERENCIA WESTERN DE LA FOSFORILACIÓN DE GLUR1

PDE2 se expresa principalmente en el hipocampo, la corteza y el cuerpo estriado y puede hidrolizar cAMP y cGMP. El tráfico de AMPA-R puede regularse mediante la activación de PKA (a través de cAMP) o cGKII (a través de cGMP). Fosforilación de la subunidad Glu1 de

10 AMPA-R se ha demostrado que es crítica para la expresión de LTD (disminución) y LTP (aumento) y la retención de recuerdos.

Métodos

15 El compuesto 1 (resuelto en el 10% de CD + 1 HCl) se administró p.o. (por vía oral) a ratas Sprague Dawley (180-200 g; 10 y 40 mg/kg) y 2 horas más tarde, los animales se sacrificaron mediante decapitación. El hipocampo se disecó y el tejido se congeló instantáneamente y se almacenó a

-80 °C.

20 Después de la descongelación, se realizó la lisis del tejido en el Reactivo de Extracción de Tejidos complementado con EDTA 5 mM y un cóctel inhibidor de proteasa y fosfatasa. Las muestras de proteínas se desnaturalizaron con tampón de muestra LDS y agente reductor (Life Technologies, Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos) y finalmente, se cargaron 50 µg de proteína y se sometieron a electroforesis usando un gel de poliacrilamida Bis-Tris al 10% (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 90-160 V. Las proteínas en los geles se electrotransfirieron a continuación a una membrana de nitrocelulosa Trans blot turbo de 0.2 µm (Bio-Rad), usando un sistema de transferencia Trans-blot Turbo (Bio-Rad). Las membranas se bloquearon durante 1 h a TA en Tween-20-solución salina tamponada con Tris (TBS-T: Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.05%) que contenía un 5% de leche desnatada seca (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, Estados Unidos), y se incubó con el anticuerpo primario durante una noche a 4 °C permitiendo una agitación suave (Total de Glu1 Abcam 31232, Ser845 pGlu1 Abcam 76321, ambas una dilución 1/1000). Las transferencias se lavaron cinco veces con tampón TBS-T y se incubaron con el anticuerpo secundario durante 1 h a TA (conjugado HRP anti-conejo de burro secundario, dilución 1/1000). La inmunotinción se reveló después del lavado con tampón TBST a través del sustrato de sensibilidad femto máxima SuperSignal West (Thermo Scientific, Cramlington, Reino Unido). Las señales se capturaron y se cuantificaron por quimioluminiscencia (G-box Syngene, Syngene, Cambridge, Reino Unido).

30 Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 1.

OCUPACIÓN DE PDE2 POR EL COMPUESTO 1

Métodos

35 La ocupación de PDE2A se evaluó mediante autorradiografía ex-vivo usando [³H]B-17a (como se describe en WO2013/000924) como radioligando (compuesto 12 en Buijnsters et al., (2014). Structure-Based Design of a Potent, Selective, and Brain Penetrating PDE2 Inhibitor with Demonstrated Target Engagement. ACS Med Chem Lett. 5(9):1049-53.)

40 Se trataron ratas Wistar macho (200-250 g) por administración oral de vehículo o dosis crecientes de [³H]B-17a y se sacrificaron una hora después. Los cerebros se retiraron inmediatamente del cráneo y se congeló rápidamente en 2-metilbutano enfriado sobre hielo seco (-40 °C). Se cortaron secciones del estriado de 20 µm de espesor usando un

micrótomo-crióstato Leica CM 3050 (van Hopplynus, Bélgica), se montó descongelado sobre portaobjetos para microscopio (SuperFrost Plus Slides, LaboNord, Francia) y se guardaron a -20 °C hasta el momento del uso.

5 Después del descongelamiento, se secaron secciones bajo un flujo de aire frío y se incubaron por un minuto con [³H]B-17a 30 nM en Tris-HCl (50 mM, pH 7.4) que contiene 0.3% de BSA. Se incubaron en paralelo secciones de cerebro de animales tratados con fármaco y tratados con vehículo. Se midió la unión no específica en secciones de cerebelo, un área del cerebro que no contiene a la enzima PDE2A. Después de la incubación, el exceso de [³H]B-17a se eliminó mediante lavado con solución amortiguadora helada 2 veces por 10 minutos, seguido por una inmersión rápida en agua destilada. Luego se secaron las secciones bajo un flujo de aire frío.

10 Se cargaron secciones cerebrales en un generador de imágenes β (Biospace, París) durante 4 horas y se cuantificó la radioactividad que surgía del área del cerebro delineada usando el programa de visión Beta (Biospace, París). La unión específica se determinó como la diferencia entre la unión total en el cuerpo estriado y la unión no específica en el cerebelo. El porcentaje de ocupación del receptor para el fármaco administrado al animal correspondía al 100% menos el porcentaje de receptores marcados en el animal tratado. Para la determinación de los valores de ED₅₀, se graficó el porcentaje de ocupación de receptores contra la dosis y se calculó la curva de dosis-efecto sigmoide log de mejor ajuste mediante un análisis de regresión no lineal, usando el programa GraphPad Prism. Los valores de ED₅₀ (la dosis de fármaco que produce el 50% de ocupación del receptor) con límites de confianza del 95% se calcularon a partir de las curvas de dosis-respuesta.

Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 2.

EFFECTO DEL COMPUESTO 1 SOBRE LA TRANSMISIÓN SINÁPTICA

20 Reactivos críticos

La solución amortiguadora para disección de sacarosa contenía (en mM) sacarosa (150), NaCl (40), KCl (4), NaH₂PO₄·H₂O (0.3), MgCl₂·6H₂O (7), NaHCO₃ (26), CaCl₂·2H₂O (0.5), D-glucosa (10), equilibrada con una mezcla de gases de 95% de O₂ y 5% de CO₂. El líquido cerebroespinal artificial (ACSF) usado durante el equilibrio y registro contenía (en mM): NaCl (124), KCl (2.7), NaH₂PO₄·H₂O (1.25), MgSO₄·7H₂O (1.3), NaHCO₃ (26), CaCl₂·2H₂O (2),

25 D-glucosa (10), ácido ascórbico (2), equilibrada con una mezcla de gases de 95% de O₂ y 5% de CO₂. Se preparó CNQX y ácido quinurénico en ACSF a una concentración de 50 μM y 1 mM, respectivamente. El compuesto 1 se preparó a partir de una solución madre (con DMSO) en ACSF y con una concentración final de DMSO que no excedía del 0.1%. Todos los reactivos eran de Sigma-Aldrich, a menos que se indique de otra manera.

Animales (especie, peso y género)

30 Los animales usados eran ratas Sprague-Dawley macho con un rango de pesos entre 145 y 200 g provistos por Charles River Germany.

Preparación de los cortes de hipocampo

35 Se obtuvieron cortes de cerebro horizontales (300 μm) del hipocampo medio a ventral de ratas Sprague-Dawley macho anestesiados con isoflurano de acuerdo con un protocolo estándar. Los cortes se realizaron usando un micrótomo tisular vibratorio (Leica VT1200S) en solución amortiguadora para disección de sacarosa fría (4°C) a una velocidad de 0.1 mm/s. Después de realizar los cortes, se colocaron para su equilibrio a 35 °C durante 20 min y luego se dejó que se recuperaran a RT durante por lo menos una hora en fluido cerebroespinal artificial (ACSF). Se prepararon tres a cuatro cortes a partir de un cerebro.

Sistema de prueba

40 Todos los datos se registraron con una configuración MEA disponible comercialmente de MultiChannel Systems MCS GmbH (Reutlingen, Alemania) compuesto por un generador de estímulos de 4 canales y un cabezal amplificador de 60 canales conectado a una tarjeta A/D de 60 canales. El software para la estimulación, los registros y el análisis son todos los que se encuentran disponibles comercialmente de Multi Channel Systems: MC Stim (release II 2.0.0) y MC Rack (release 3.8.1.0), respectivamente. Todos los experimentos se realizaron con una configuración tridimensional MEA (Ayanda Biosystems, S.A., CH-1015 Lausanne, Suiza) que consistía en 60 electrodos con forma de punta y de 60 μm de altura separados por 100 μm. Los electrodos MEA están fabricados de platino con 600 kΩ < impedancia <900 kΩ.

Diseño del experimento

50 El efecto del compuesto 1 en la transmisión sináptica se investigó mediante el registro de los potenciales de campo extracelulares en cortes de hipocampo. Está bien establecido que la transmisión sináptica a puede generar una deflexión del potencial de campo extracelular que refleja la actividad sináptica sincronizada en la población de neuronas que rodea al electrodo de registro.

Registros de los potenciales de campo extracelulares. Después de la recuperación, los cortes de cerebro se montaron

sobre un chip MEA bajo microscopio y se ubicaron los 60 electrodos de registro sobre la región de sinapsis de fibras musgosas [mossy] (Giro dentado - CA3) del hipocampo. Se profundieron de manera continua soluciones de ACSF a una velocidad de 2 ml/min. La temperatura de la cámara MEA se mantuvo a 32 ± 0.1 °C con un elemento Peltier ubicado en el cabezal del amplificador MEA. Todos los datos se registraron con una configuración MEA disponible comercialmente de MultiChannel Systems MCS GmbH (Reutlingen, Alemania). Se seleccionaron dos electrodos adyacentes del chip para estimular las fibras musgosas en la región hilar del giro dentado y el fEPSP se registró en el área de la zona terminal de la región CA3 del hipocampo. Los potenciales de campo extracelulares postsinápticos (fEPSP) se evocaron mediante estimulación de la entrada a la fibra musgosa con dos pulsos eléctricos consecutivos separados por 30 ms y se repitieron cada 60 s (amplitud de pulso de 100 μ s, y resistencia de estimulación de corriente (μ A) 40% de amplitud máxima relativa). Se condujeron experimentos control de manera simultánea en cortes asignados aleatoriamente a tratamiento con vehículo (DMSO). N representa el número de cortes y habitualmente se usaron 3-4 cortes por animal. Se registran las respuestas evocadas al nivel de neuronas postsinápticas (fEPSP) si satisfacen determinados criterios de calidad que incluyen: ubicación correcta, nivel basal estable (fluctuación de ± 10 % durante diez minutos consecutivos, amplitud >100 μ V. Se tomaron muestras de fEPSP de electrodos seleccionados a 5 kHz y se registraron en el disco duro de una PC para su análisis fuera de línea. En paralelo, se compilaban las amplitudes del fEPSP de electrodos seleccionados en línea (con el programa MC Rack) para monitorear y para seguir la calidad del experimento. Los datos se graficaron en un archivo de base de datos para el análisis fuera de línea.

Se evocó una potenciación débil a largo plazo (LTP) mediante un solo estímulo de alta frecuencia (HFS) para producir una potenciación menor que máxima del fEPSP.

Los resultados de este ensayo se muestran en las figuras 3 y 4 para el efecto del compuesto 1 en la transmisión sináptica basal y en la figura 5 para el efecto del compuesto 1 sobre la facilitación en la inducción de LTP con un protocolo débil de potenciación a largo plazo. Curiosamente, se obtuvieron resultados similares con otros inhibidores de PDE2 tales como 4-(1-azetidini)-7-metil-5-[1-metil-5-[5-(trifluorometil)-2-piridinil]-1H-pirazol-4-il]-imidazo[5,1-f][1,2,4]triazina [CAS 1394033-54-5] (documento WO2012114222, Pfizer) (véase la figura 6)

ESTUDIO DE DOSIS INDIVIDUALES DE PK/PD PDE2i EN PERROS

Para estos estudios se usaron perros Marshall Beagle machos y hembra (1-6 años): 2 machos y 2 hembras por grupo de tratamiento. Se tomaron muestras del fluido cerebroespinal (CSF) del ventrículo lateral mediante una cánula guía con aguja en animales conscientes instrumentados.

Se tomaron muestras basales de CSF y sangre 2 a 5 días antes de la dosificación. Los perros son ayunados durante la noche y a la mañana siguiente recibieron dosis con estómago vacío (por vía oral mediante gavaje). En puntos de tiempo predeterminados después de la dosificación se recolectó sangre y/o CSF para la medición de los niveles de compuesto y de GMPc. El análisis de GMPc se efectuó mediante LC-MS/MS: Se diluyeron 25 μ l de CSF con 125 μ l de CSF artificial (STIL (20 ng/ml)), se centrifugaron y se inyectaron 25 μ l. Los sistemas usados eran: un sistema Shimadzu SIL-30 UPLC (Hypercarb (columna 50 mm x 1 mm (3 μ m)), gradiente básico (carbonato de amonio 10 mM) acetonitrilo acuoso (5% a 98% en 5.5 minutos) a una velocidad de flujo de 250 μ l/min) y un sistema API Sciex 5500 equipado con una fuente ESI (transición MRM selectiva (m/z 346.1 \rightarrow 152.1 (75 mseg de tiempo de permanencia)). Los resultados de este estudio se resumen en la figura 7. Después de una dosis única del compuesto 1, se hicieron las siguientes observaciones: temblores leves a moderados en 3/8 animales a 0.5 mg/kg; sedación y/o temblores en 6 de 7 animales a 1 mg/kg (no se dosificó un animal debido a una reserva limitada del compuesto). La farmacocinética plasmática mostró una linealidad sin dosis. Hubo un aumento relacionado con la dosis de cGMP en el CSF. Datos individuales limitados en el grupo de vehículos de PDE2 H-2 (n = 2 a 1, 4 y 8 h) debido a errores analíticos.

PLASTICIDAD SINÁPTICA POTENCIADA POR LA INHIBICIÓN DE PDE2 EN RATAS ANESTESIADAS: ESTUDIO DE CASO PILOTO CON EL COMPUESTO 1

Introducción

La plasticidad sináptica es un mecanismo fundamental en muchas funciones neurobiológicas. La potenciación a largo plazo (LTP), una forma de un aumento altamente localizado de larga duración en la fuerza sináptica en el hipocampo, así como en la corteza, es un sustrato sináptico para la memoria y el aprendizaje (Cooke y Bliss, *Curr Opin Investig Drugs*. 2005;6(1):

25-34). El aumento y la disminución de la fuerza sináptica dependen de la actividad de las neuronas presináptica y postsináptica, de cómo funcionan las redes cerebrales para establecer la representación sensorial de múltiples elementos en la memoria y producir una respuesta motora adecuada. Las diferentes características de estas modificaciones sinápticas, en el cerebro intacto, son cruciales para la operación de diferentes tipos de red y operaciones de varios sistemas diferentes de circuitos cerebrales. Por ello, se espera que el LTP esté comprometido en los trastornos psiquiátricos y neurodegenerativos del envejecimiento, tal como el mal de Alzheimer (Bergado y Almaguer, *Neural Plast*. 2002;9(4):217-32; Rowan et al., *Biochem Soc Trans*. 2005; 33: 563-7 En animales, el procedimiento realizado bajo anestesia en regiones cerebrales altamente interconectadas intactas, proporciona una potente herramienta para investigar cambios duraderos en la conectividad y plasticidad eficaces en circuitos de

hipocampo-corteza después de una estimulación eléctrica tetánica con baja y alta frecuencia administrada en pulso único o pulso emparejado (Albensi et al., *Exp Neurol.* 2007; 204:1-13). Los estudios ayudan a ampliar la comprensión de los circuitos neuronales subyacentes al desarrollo de la fuerza sináptica deteriorada, es decir, determinar la ruta del circuito directo y el papel de la diana biológica específica albergada por conexiones de red interregionales específicas en la mediación del debilitamiento sináptico. El procedimiento permite ensayar agentes farmacológicos destinados a restaurar las formas patológicas de neuroplasticidad, por ejemplo, déficits inversos en LTP y conectividad de red mediante el aumento de la eficacia sináptica, que se espera que tenga efectos beneficiosos sobre la capacidad cognitiva y de aprendizaje relacionada (Cooke y Bliss, 2005; Albensi et al., 2007).

Las fosfodiesterasas (PDE) son una clase de enzimas responsables de la inactivación metabólica de los mensajeros secundarios adenosin monofosfato 3',5'-cíclico (AMPc) y guanosa monofosfato 3',5'-cíclico (GMPc) (Francis et al. *Physiol Rev.* 2011, 9: 651-90 Se clasificaron hasta 11 familias de PDE basado en sus características estructurales, enzimáticas y de distribución (Omori y Kotera *Circ Res.* 2007;100:309-27). El papel de las PDE en el aumento de la señalización de nucleótidos cíclicos hace que estas enzimas sean dianas atractivas para regular la excitabilidad y potenciar los efectos de la comunicación neuronal. En el cerebro, la PDE2 se expresa fundamentalmente en la corteza, el hipocampo y el cuerpo estriado, donde controla la hidrólisis de AMPc. En los últimos años, los grupos de investigación se han centrado en el desarrollo de inhibidores de PDE2 como una forma de modificar los segundos mensajeros intracelulares, cGMP y cAMP para ejercer acción sobre la plasticidad y los procesos cognitivos (Duinen et al., *Curr Pharm Des.* 2015;21:3813-28; Gomez y Breitenbucher, *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23: 6522-7; Xu et al., *Neurobiol Aging.* 2015; 36:955-70; Barco et al., *Expert Opin Ther Targets* 2003; 7: 101-114

En el presente estudio, se investigó si la inhibición de PDE2, usando el compuesto 1, conduce a alteraciones en la excitabilidad o en la capacidad de expresar potenciación sináptica en la circunvolución dentada de Sprague Dawley adultas anestesiadas.

Materiales y métodos

Animales

Los experimentos de la presente se condujeron estrictamente de acuerdo con los lineamientos de la Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care

Internacional (AAALAC), y con las European Communities Council Directive del 24 de noviembre, 1986 (86/609/EEC) y fueron aprobados por el comité de ética local. Las ratas Sprague Dawley, que pesan 170-200 g en el momento de la cirugía, se albergaron por grupos en jaulas ventiladas con ciclos de 12 h luz/oscuridad (luces encendidas a las 07:00 AM) después de su llegada a las instalaciones para animales mantenidas bajo condiciones ambientales controladas.

Cirugía y electrofisiología

Las ratas fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de uretano a razón de 1.5 g/kg de peso corporal. Los animales se colocaron en un marco estereotáxico para la inserción de los electrodos y se monitoreó constantemente su temperatura corporal mediante una sonda rectal y se mantuvieron a 37 °C con una almohadilla calentadora. Se proporcionó una administración suplementaria de uretano (0.2-0.5 g/kg) cuando fuera necesario para asegurar una anestesia completa. Se practicaron dos orificios pequeños (1 mm de diámetro) en el cráneo en la posición de las estructuras de hipocampo de la izquierda para los electrodos estimulantes y de registro. Un electrodo estimulador bipolar; un par de alambres recubiertos de poliimida de acero inoxidable trenzados con puntas separadas horizontalmente a 0.125 µm (MS303/13-B. *PlasticsOne*), se colocaron en la vía eficiente medial (mPP) (AP -7.5, ML -3.8, DV -2.5), y un electrodo de registro recubierto de acero inoxidable (MS303T-2-AIU, 0.008-0.005) está posicionado en el área de la circunvolución dentada (DG) del hipocampo dorsal (AP -2.8, ML -3.8, DV -3.8). La duramadre se a través por ambos orificios, y los electrodos estimuladores y de registros se hicieron descender muy lentamente (0.2 mm/min) a través de la corteza y las capas superiores del hipocampo en la mPP y el DG del hipocampo dorsal. Durante la cirugía, se intentó por todos los medios minimizar el sufrimiento de los animales.

La pendiente del potencial de campo excitatorio postsináptico (fEPSP) se usa como una medida de la transmisión sináptica excitatoria. Los impulsos de onda monofásicos individuales de 0.1 o 0.2 ms generados por una unidad de corriente constante (MC, Alemania) se aplicaron, por ejemplo, al mPP y las respuestas evocadas se generaron en la DG. Los potenciales de campo extracelulares se amplifican; se filtran por pasos de banda entre 1 Hz y 2 kHz, se digitalizan y se analizan usando software personalizado. Los electrodos se hicieron descender hasta observar un fEPSP deflector negativo con la respuesta máxima. Se permite un mínimo de 30 min para asegurar la estabilización de la excitabilidad antes de las mediciones. A continuación, se entregaron pulsos de corriente constante monofásicos con intensidades de estímulo de 50 a 500 µA para generar curvas de entrada/salida (I/O) y determinar las pendientes máximas de PSA y fEPSP, y luego la intensidad de estímulo que produjo el 50% de la respuesta máxima (es decir, pulso de ensayo) en experimentos posteriores.

Inducción de LTP: La estimulación de ensayo se aplicó luego cada 5 minutos antes y después de la estimulación tetánica. Las respuestas fueron evocadas por estimulación de alta frecuencia (10 trenes de estímulo de 20 impulsos de onda cuadrada, 0.2 ms de duración a 200 Hz, 5 ms de intervalo entre estímulos, con 2 segundos de intervalo entre trenes). Cinco respuestas evocadas se promediaron para cada punto de tiempo medido durante los experimentos,

media hora de registro inicial, inmediatamente antes de la aplicación del fármaco o estimulación tetánica (control para la inducción de LTP). La magnitud de la potenciación sináptica se expresa como el porcentaje de aumento en el pico de población de DG (PSA) de amplitud, así como la pendiente fEPSP en el intervalo de tiempo después de la estimulación tetánica en relación con las pendientes promediadas durante los 30 min estables del período farmacológico.

Las respuestas a la intensidad de pulso seleccionada se recogieron y se promediaron hasta 130 min después de la tetanización. La amplitud del pico de población se definió como el promedio de la amplitud desde el primer pico positivo (a) hasta el primer pico negativo (b) y la amplitud desde el pico negativo (b) al segundo pico positivo (c): $[(a - b)/(c - b)]/2$. Para la cuantificación de la pendiente de fEPSPs, solo se midió el componente muy temprano de la forma de onda ($\Delta V/\Delta t$) para evitar la contaminación por el pico de población.

Histología

Al final del estudio electrofisiológico, se proporcionó una estimulación eléctrica de 500 μ A durante 20 seg para producir una lesión en el extremo de la punta de los electrodos de estimulación y registro y los cerebros se cosecharon para la comprobación histológica de la ubicación de los electrodos. Se examinaron secciones de cerebro (20 mm) usando un microscopio óptico. Los animales con una ubicación incorrecta de electrodos fueron excluidos del estudio.

Fármaco

El compuesto 1 se disolvió en ciclodextrina al 10% (CD) + 1 HCl + NaCl para administración subcutánea (SC).

Estadística

Por cada animal, se promediaron las respuestas basales estables (pretétano) sobre un período de 30 min y la media se normalizó como el 100%, y los datos de respuestas de postétano se expresaron con relación al promedio basal. La comparación de los efectos del vehículo y el compuesto 1 después del tétanos se realizó en intervalos de 30 min usando un análisis de varianza de medidas repetidas de una vía (ANOVA) en rangos seguidos de comparaciones post hoc de Dunnett frente al valor inicial (valores del 100 %). Las diferencias entre los tratamientos en puntos de tiempo discretos se examinaron usando una prueba t de Student de dos colas. Todos los procedimientos estadísticos se realizaron con el software StatExact.

Resultados

La transmisión sináptica basal no se vio afectada por el compuesto 1 ya que no se encontraron cambios significativos entre el control tratado con vehículo durante el pretétano inicial (Figura 8b). Durante el paradigma de inducción de LTP, la administración subcutánea del compuesto 1 (40 mg/kg) mejoró una potenciación sináptica duradera (>2 h) (Figura 8b). A los 0-30 min después de la finalización de la tetanización, las pendientes de PSA fueron $164 \pm 13\%$ en comparación con el nivel del vehículo $124 \pm 5\%$, $p < 0.05$). A los 90-120 minutos después de la tetanización, la amplitud del APE fue aún mayor ($179 \pm 20\%$ en comparación con el nivel del vehículo $116 \pm 17\%$, $p < 0.05$). De forma similar, el análisis de las curvas de estímulo-respuesta reveló un aumento duradero significativo en la pendiente fEPSP en comparación con la condición del vehículo (90-120 min: $137 \pm 24\%$ en comparación con el nivel de vehículo $94 \pm 7\%$, $p < 0.05$) (Figura 8c).

En general, el compuesto 1 facilita la LTP in vivo, pero no afecta a la transmisión sináptica basal.

EJEMPLOS TEÓRICOS DE COMPOSICIÓN

"Principio activo" como se usa a lo largo de estos ejemplos se refiere al compuesto 1, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un solvato del mismo.

Ejemplos típicos de recetas para la formulación de la invención son como sigue:

1. Comprimidos

Compuesto 1	5 a 50 mg
Fosfato de dicalcio	20 mg
Lactosa	30 mg
Talco	10 mg
Estearato de magnesio	5 mg
Almidón de papa	hasta 200 mg

2. Suspensión

ES 2 765 738 T3

Se prepara una suspensión acuosa para la administración oral de manera que cada 1 mililitro contenga de 1 a 5 mg de uno del compuesto 1, 50 mg de carboximetilcelulosa sódica,

1 mg de benzoato de sodio, 500 mg de sorbitol y agua hasta 1 ml.

3. Inyectable

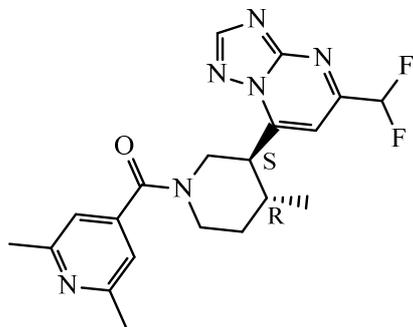
- 5 Se prepara una composición parenteral agitando el 1,5% en peso del compuesto 1 de la invención en propilenglicol al 10% en volumen en agua.

4. Pomada

	Compuesto 1	5 a 1000 mg
	Alcohol estearílico	3 g
10	Lanolina	5 g
	Petróleo blanco	15 g
	Agua	hasta 100 g

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula (1)



(1)

o una sal farmacéuticamente aceptable o un solvato de este.

5 2. La sal clorhidrato del compuesto de fórmula (1) de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, para su uso como un medicamento.

10 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, o una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno del sistema nervioso central seleccionado del grupo de trastornos y afecciones psicóticas; trastornos de ansiedad; trastornos del movimiento; abuso de drogas; trastornos del estado de ánimo; trastornos neurodegenerativos; trastornos o afecciones que comprenden como síntoma una deficiencia de atención y/o cognición; trastornos relacionados con la adquisición y consolidación de la memoria; accidente cerebrovascular; y trastorno autista.

15 6. Un compuesto o una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5, en donde

los trastornos psicóticos se seleccionan del grupo constituido por esquizofrenia; trastorno esquizofreniforme; trastorno esquizoafectivo; trastorno delirante; trastorno psicótico inducido por drogas/fármacos; trastornos de la personalidad de tipo paranoide; y trastornos de la personalidad de tipo esquizoide;

20 los trastornos de ansiedad se seleccionan del grupo constituido por trastorno de pánico; agorafobia; fobias específicas; fobia social; trastorno obsesivo-compulsivo; trastorno de estrés postraumático; trastorno de estrés agudo; y trastorno de ansiedad generalizada;

las disfunciones motoras se seleccionan del grupo constituido por la enfermedad de Huntington y discinesia; mal de Parkinson; síndrome de la pierna inquieta y temblor esencial; síndrome de Tourette y otros tics nerviosos;

25 los trastornos relacionados con drogas/fármacos se seleccionan del grupo constituido por el consumo excesivo de alcohol; alcoholismo; síndrome de abstinencia del alcohol; delirium trémens; trastorno psicótico inducido por el alcohol; adicción a las anfetaminas; síndrome de abstinencia de las anfetaminas; acción a la cocaína; síndrome de abstinencia de la cocaína; adicción a la nicotina; síndrome de abstinencia de la nicotina; adicción a los opioides y síndrome de abstinencia de los opioides;

30 los trastornos del estado de ánimo se seleccionan entre depresión; manías; trastorno bipolar I, trastorno bipolar II; trastorno ciclotímico; trastorno distímico; trastorno depresivo mayor; depresión resistente al tratamiento; y trastorno del estado de ánimo inducido por drogas/fármacos;

los trastornos neurodegenerativos se seleccionan del grupo constituido por el mal de Parkinson; enfermedad Huntington; demencia; mal de Alzheimer; demencia multiinfarto; demencia relacionada con el SIDA o demencia frontotemporal;

35 los trastornos o condiciones que comprenden como un síntoma una deficiencia de atención y/o cognición se seleccionan del grupo de demencia asociada con mal de Alzheimer; demencia por infarto múltiple; demencia debido a enfermedad de cuerpos de Lewy; demencia alcohólica o demencia persistente inducida por sustancias; demencia asociada con tumores intracraneales o traumatismo cerebral; demencia asociada con la enfermedad de Huntington; demencia asociada con el mal de Parkinson; demencia relacionada con SIDA; demencia debida a la enfermedad de Pick; demencia debida a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; delirio; trastorno amnésico; trastorno de estrés postraumático; accidente cerebrovascular; parálisis supranuclear progresiva; discapacidad intelectual; un trastorno del

aprendizaje; trastorno de déficit atencional/hiperactividad (ADHD); deterioro cognitivo leve; síndrome de Asperger; deterioro cognitivo relacionado con la edad; y deterioro cognitivo relacionado con la percepción, concentración, aprendizaje o memoria;

5 los trastornos relacionados con la adquisición y consolidación de la memoria se seleccionan entre trastornos de la memoria.

7. Un compuesto o una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde los trastornos o condiciones que comprenden como un síntoma una deficiencia de atención y/o cognición se seleccionan del grupo de demencia asociada con mal de Alzheimer; deterioro cognitivo leve; deterioro cognitivo relacionado con la edad; y deterioro cognitivo relacionado con la percepción, concentración, aprendizaje o memoria; y

10 los trastornos relacionados con la adquisición y consolidación de la memoria se seleccionan entre trastornos de la memoria.

8. Un compuesto o una composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en donde el trastorno o la condición que comprenden como un síntoma una deficiencia de atención y/o cognición es demencia asociada con mal de Alzheimer.

15 9. Un proceso para preparar una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 3, caracterizado por que un vehículo farmacéuticamente aceptable se mezcla íntimamente con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto como se define en la reivindicación 1 o 2.

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 en combinación con un agente farmacéutico adicional para su uso en el tratamiento o prevención de una afección como se cita en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.

20 11. Un producto que comprende

(a) un compuesto como se define en la reivindicación 1 o 2; y

(b) un agente farmacéutico adicional,

como un preparado combinado para el uso simultáneo, independiente o secuencial en el tratamiento o la prevención de una afección como las citadas en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.

25

Fig. 1a

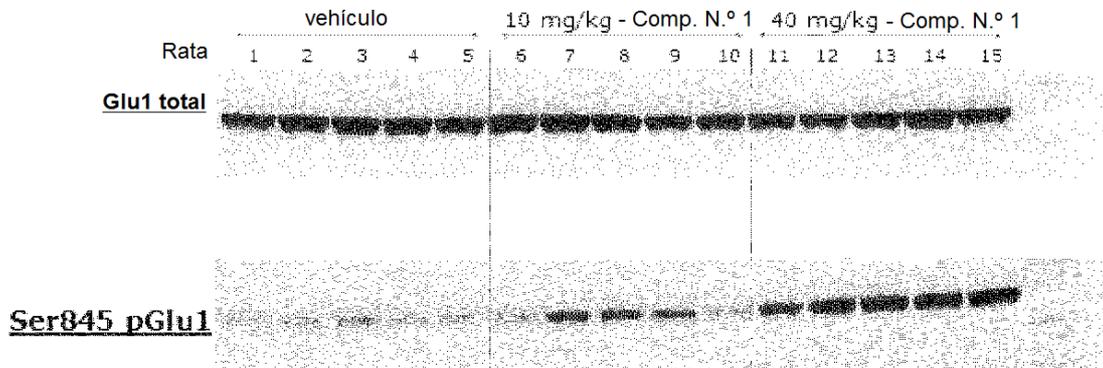


Fig. 1b

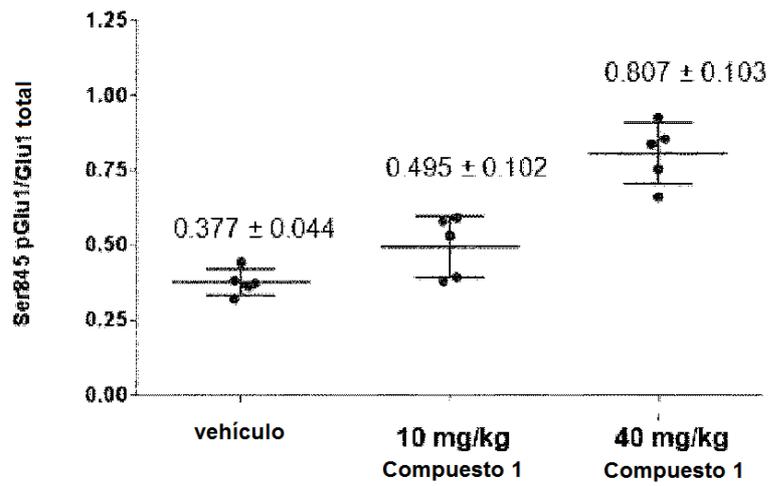


Fig. 2

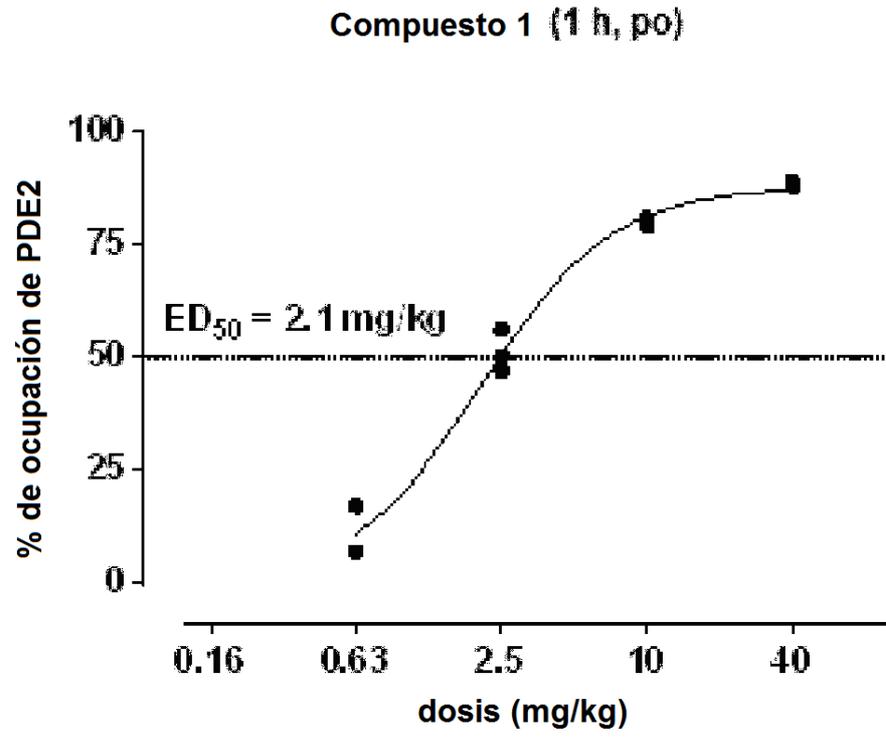


Fig. 3

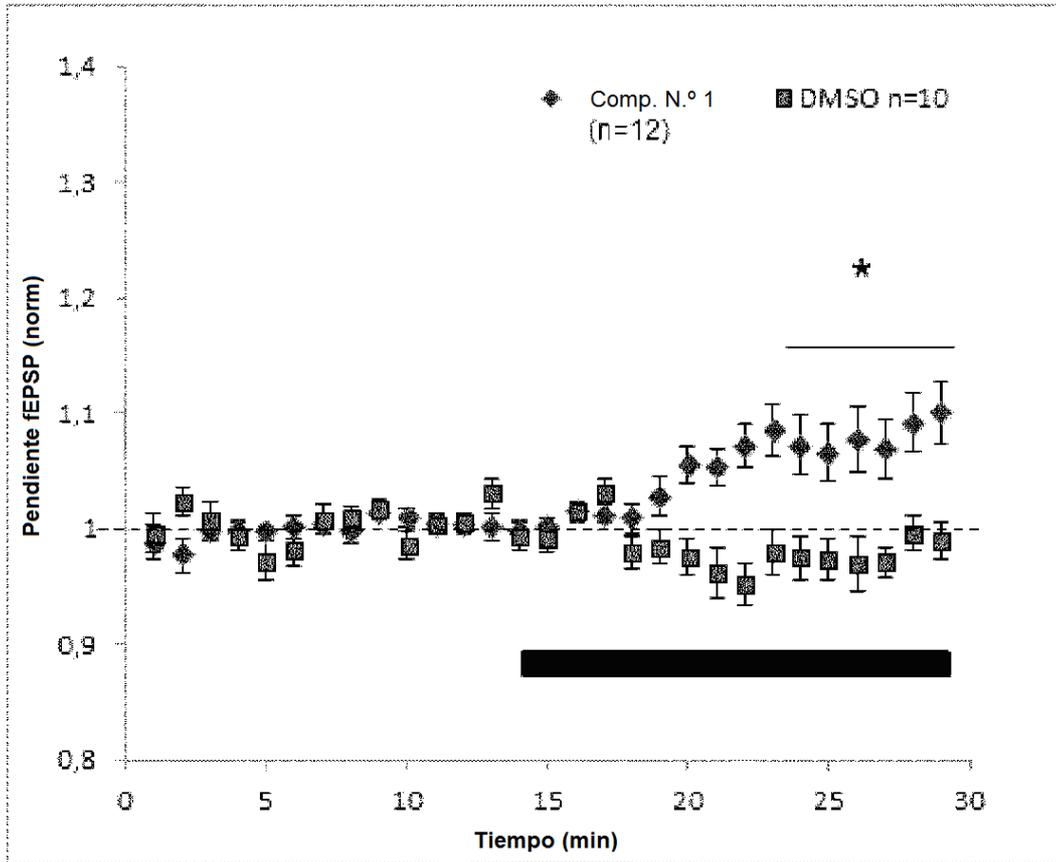
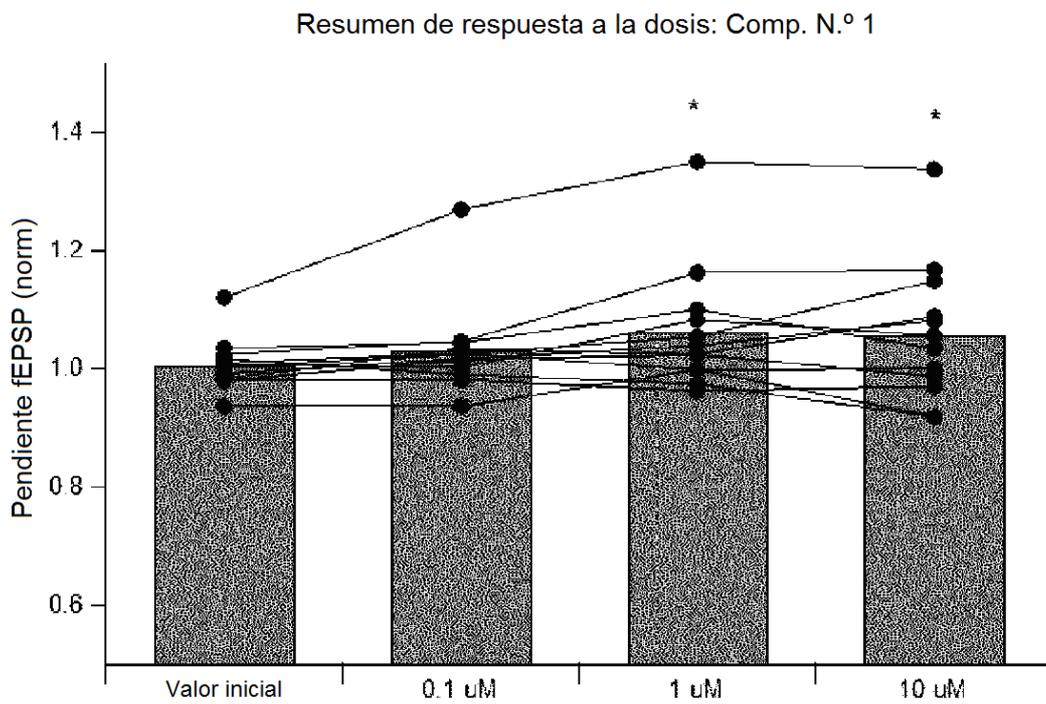
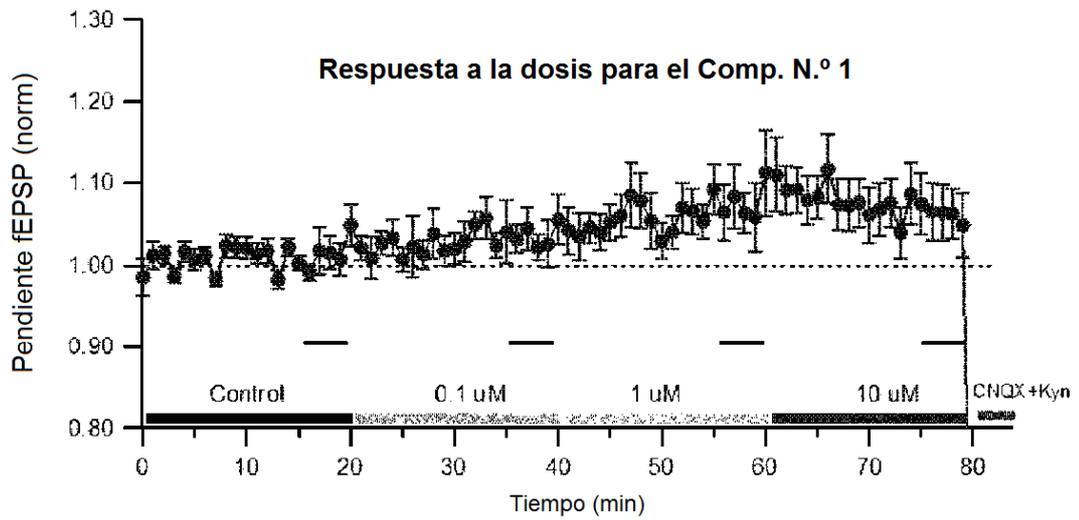


Fig. 4



(n = 12, ANOVA unidireccional, $F_{3,33}=5.4939$, $p=0.0036$)

Fig. 5a

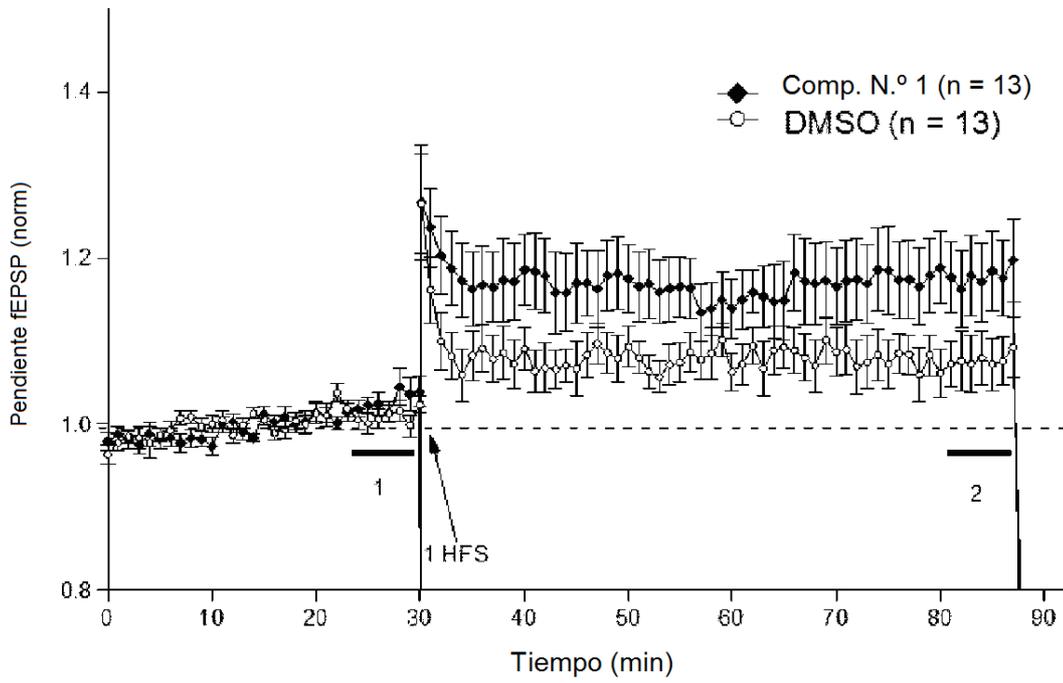


Fig. 5b₁

Control de vehículo (DMSO)

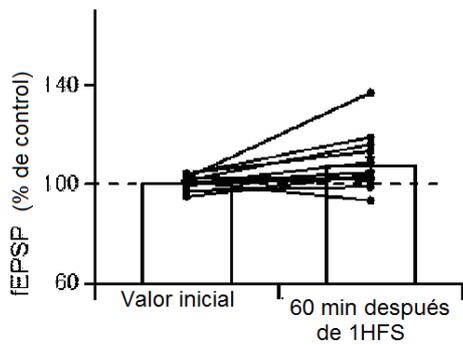
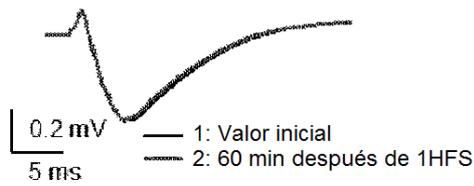


Fig. 5b₂

Comp. N.º 1

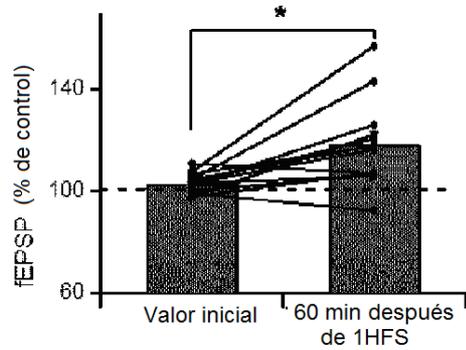
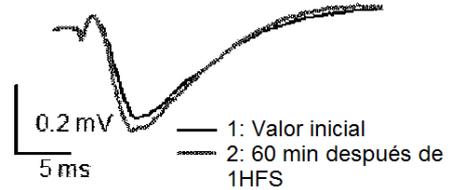


Fig. 6a

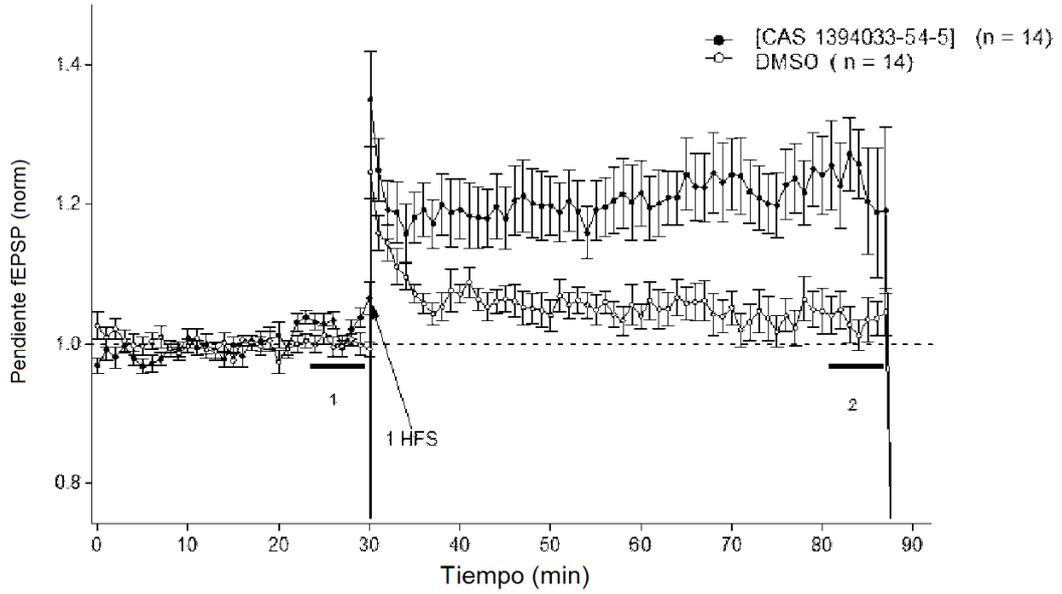


Fig. 6b₁

Fig. 6b₂

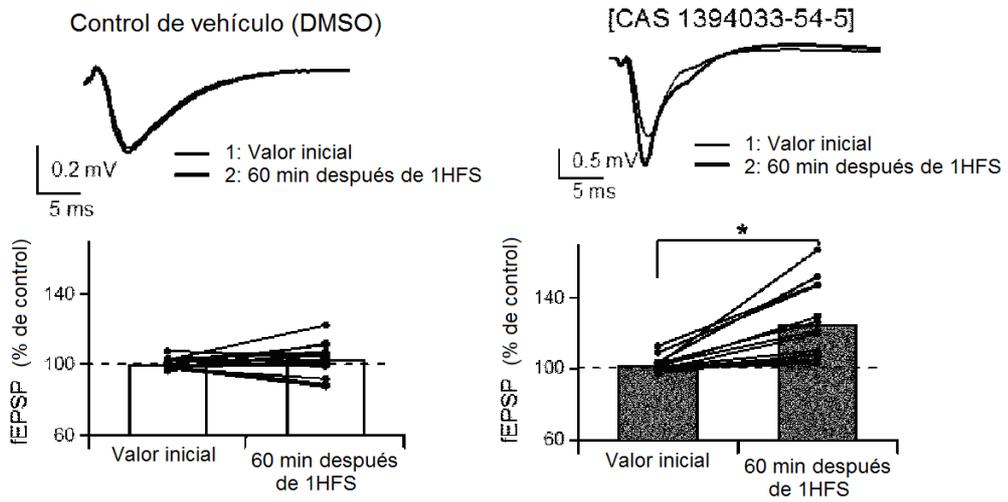


Fig. 7

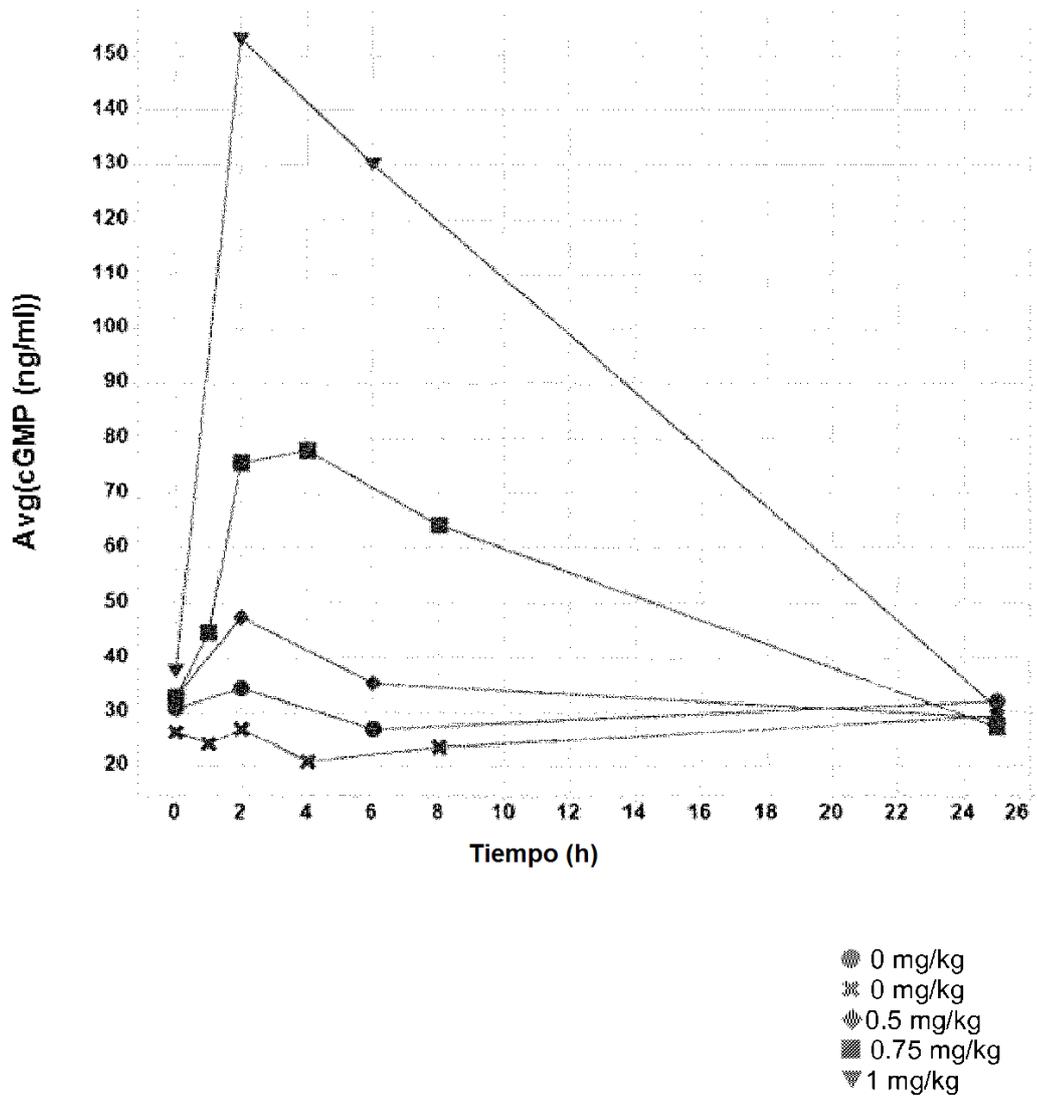


Fig. 8a

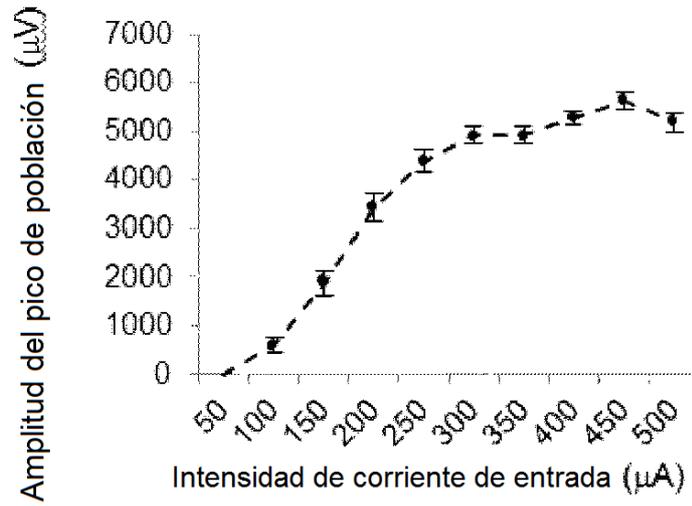


Fig. 8b

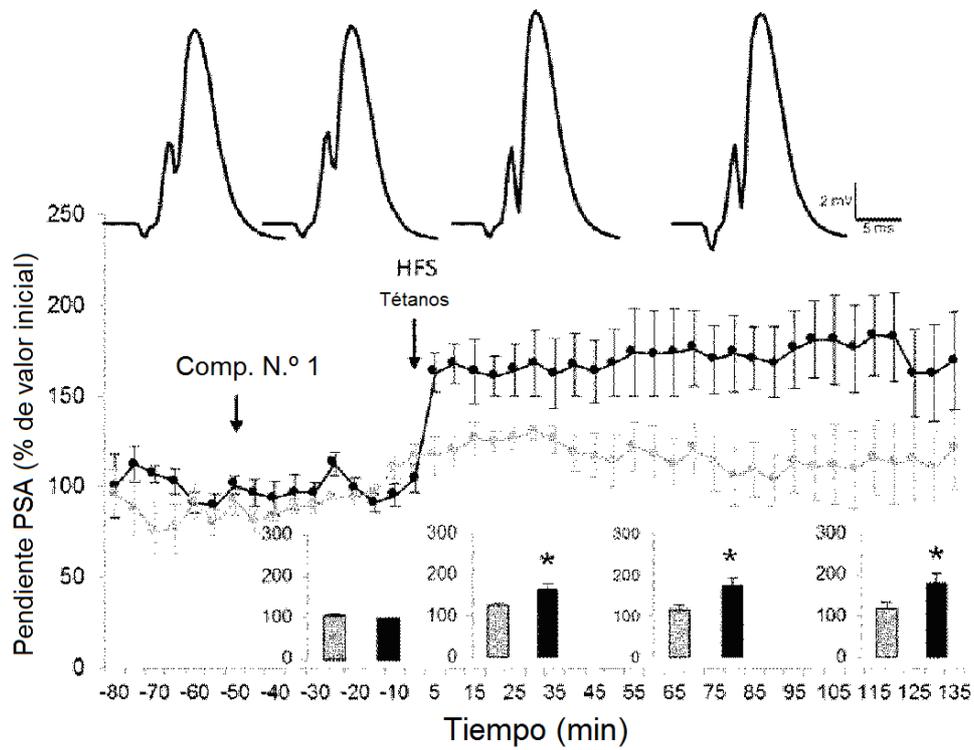


Fig. 8c

