

Drigard & Castro
Abogados

Apartado 3682

Cra. 7 16-56
Rovira - Colombia S.A.

65
77
RADIACION : 01003177 01003002
Fecha (USP): 2001-04-06 12:05:05
Trámite : 032 PATENTES D 1 REGISTRO/ 329 COMPLETA
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

astro.com.co

AS: 83.458

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

REF: Expediente No. 01 003.177 - Solicitud de Patente
a favor de BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY

Titulada: **METODO PARA ALIVIAR LA ANSIEDAD**

RAMIRO CASTRO DUQUE, vecino de Bogotá, portador de la tarjeta profesional No. 1003, obrando como apoderado de la sociedad BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY, según lo acredita el documento de poder protocolizado en esa División, me permito anexar al presente escrito los siguientes documentos:

1. Copias certificadas por la Oficina de Patentes de Estados Unidos de las dos primeras solicitudes presentadas para la misma invención, de las cuales REIVINDICAMOS PRIORIDAD, junto con sus correspondientes traducciones del portugués al castellano.

Del señor Jefe atentamente,



RAMIRO CASTRO DUQUE
C.C. No. 170.322 de Bogotá
Código 340
Cra 7a. No. 16-56 Piso 9

Santafé de Bogotá, Abril 6, 2001
CPB/hsr.

83458(1069)
66

WA 327386



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

October 17, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 09/588,221

FILING DATE: June 06, 2000



**By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**

H. Phillips
H. PHILLIPS
Certifying Officer

23
67

Docket Number CT 258425/6 (258335/6)

3c714 U.S. PTO
09/500221
06/06/00

Address to: Assistant Commissioner for Patents
Box Patent Application
Washington, DC 20231

UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL AND FEE SHEET

Transmitted herewith for filing under 37 CFR §1.53(b)(2) is a continuation-in-part of prior Application No. 09/484,161 filed January 18, 2000, which is a divisional application of Application No. 09/368,842, filed August 5, 1999.

Applicant (or Identifier): ROBERT F. MAYOL

Title: IMPROVED ANXIETY METHOD

Enclosed are:

1. ☒ Specification (Including Claims and Abstract) - 25 pages
 2. ☒ Drawings - 6 sheets (Informal)
 3. ☐ Declaration and Power of Attorney
 - a. ☒ Newly executed (original or copy)
 - b. ☐ Copy from a prior application (signed or with indication that original was signed)
 1. ☐ Deletion of Inventors
Signed statement attached deleting inventor(s) named in the prior application
 4. ☐ Incorporation By Reference
The entire disclosure of the prior application, from which a copy of the Declaration and Power of Attorney is supplied under Box 3b, is considered as being part of the disclosure of the accompanying application and is hereby incorporated by reference therein.
 5. ☐ Microfiche Computer Program (appendix)
 6. ☐ Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Submission
 - ☐ Computer Readable Copy
 - ☐ Paper Copy
 - ☐ Statement Verifying Identity of Above Copies
 7. ☐ Preliminary Amendment
 8. ☐ Assignment Papers (Cover Sheet & Document(s))
 9. ☐ English Translation of
 10. ☒ Information Disclosure Statement
 11. ☐ Certified Copy of Priority Document(s)
 12. ☒ Return Receipt Postcard
 13. ☐ Other:
- ☒ The right to elect an invention or species that is different from that elected in parent application in the event of a restriction or election of species requirement that is identical or substantially similar to that made in said parent application is hereby reserved.

09588221-060600

3c608 U.S. PTO
06/06/00

2K
68

Filing fee calculation:

- ☐ Before calculating the filing fee, please enter the enclosed Preliminary Amendment.
☐ Before calculating the filing fee, please cancel claims

Basic Filing Fee							\$	890
Multiple Dependent Claim Fee (\$ 280)							\$	
Foreign Language Surcharge (\$ 130)							\$	
	For	Number Filed		Number Extra		Rate		
Extra Claims	Total Claims	1	-20	0	x	\$ 18	=	\$
	Independent Claims	1	-3	0	x	\$ 78	=	\$
TOTAL FILING FEE							\$	890

- ☒ Please charge Deposit Account No. 02.3850 in the name of Bristol-Myers Squibb Company in the amount of \$890. An additional copy of this paper is enclosed. The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees under 37 CFR §1.16 and §1.17 which may be required in connection with this application, or credit any overpayment, to Deposit Account No. 02.3850 in the name of Bristol-Myers Squibb Company.

Please address all correspondence to:

Bristol-Myers Squibb Company
Patent Department
P.O. Box 5100
Wallingford, CT 06482-7680

Please direct all telephone calls to the undersigned at the number given below and all telefaxes to (203) 677-6900.

Respectfully submitted,

Date: *June 2, 2000*

Richard P. Ryan

Richard P. Ryan, Ph.D., J.D.
Attorney for Applicant
Reg. No. 30,491
Tel. No. (203) 677-6075

0588221-060600

75
69

CT 25348/S (MB338/S)

UNITED STATES PATENT APPLICATION OF

**Robert F. Mayol
58 Green Lane
Durham, CT 06422**

FOR

IMPROVED ANXIETY METHOD

009090-12288560

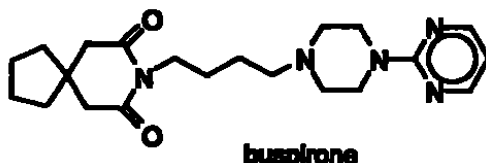
26
70**IMPROVED ANXIETY METHOD****Cross Reference to Related Applications**

This application is a continuation-in-part of application serial
5 number 09/484,161 filed January 18, 2000, which is a divisional
application of application number 09/368,842 filed August 5, 1999.

Background of the Invention

The present invention involves an improved process for the
alleviation of anxiety by treatment with an anxiolytically effective amount
10 of 8-hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-
dione. This compound was first disclosed by Jajoo, et al., Drug Metab.
and Disposition, 17/8, pp. 634-640, 1989, as being one of several
metabolites of the clinically useful anxiolytic drug, buspirone.
Confirmation of structure for this metabolite was achieved by comparison
15 with an authentic sample of the compound prepared synthetically. This
metabolite compound has been designated BMY 28674, and is also
known as BMY 28674.

The parent drug, buspirone, has the following chemical structure.



20 Buspirone, chemically: 8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]-butyl]-8-
azaspiro(4,5)-decane-7,9-dione, is a pharmaceutically active compound
which has been found to be effective for the treatment of anxiety
disorders and depression. It is accepted that buspirone exerts its effects
through the serotonin 1A (5-HT_{1A}) receptor. However, buspirone shows
25 a very high first pass metabolism and, in general, only about 4% of a
therapeutic dose of buspirone reaches the systemic circulation in non-
metabolized form after oral administration (Mayol, et al., Clin. Pharmacol.

22
71

Ther., 37, p. 210, 1985). Large differences in buspirone absorption between individuals have also been observed. This has been demonstrated by variations of the maximum plasma concentration of drug in individuals by up to 10-fold differences (Gammans, et al., American J. Med., 80, Suppl. 3B, pp. 41-51, 1986).

Synthesis of buspirone and related analogs and disclosure of their psychotropic properties are described by Wu, et al., in U.S. 3,717,634. The use of buspirone hydrochloride as a novel anti-anxiety agent for the treatment of neurotic patients is described by Casten, et al., in U.S. 4,182,763.

BMY 28674 was previously tested for anti-anxiety properties using laboratory methods specifically developed for the measurement of anti-anxiety properties in azapirone compounds such as buspirone, gepirone and structural analogs. No significant anti-anxiety activity was ever detected for BMY 28674 in this testing. No significant biological activity of any type has ever been disclosed for this compound. Indeed, with the exception of 1-pyrimidinylpiperazine (1-PP), no significant anti-anxiety activity has been disclosed for any of the known buspirone metabolites. See: Gammans, et al., JAMA, (March, 1986), Vol. 80, Supp. 3B, pp. 43-44. As a consequence, oral dosing of buspirone for treating anxiety has been believed to be optimized when done in a manner to maximize the concentration of unchanged drug at the expense of metabolites.

In U.S. 5,431,922 an extended-release formulation of buspirone was described as providing an improvement in oral administration of the drug on the basis that blood levels of unchanged buspirone were increased while metabolite levels were reduced as measured by the ratio of plasma levels of buspirone to the 1-PP metabolite. However, no efficacy data were ever disclosed for these formulations nor were they commercialized.

U.S. 5,633,009 disclosed and claimed a transdermal patch for delivering buspirone. The transdermal delivery, as expected, reliably gave higher buspirone blood levels (AUC) with much reduced metabolite

78
92

levels, as measured by 1-PP. A typical patch was designed to deliver 80 mg of buspirone per 24 hour period. Surprisingly, clinical studies conducted with this patch demonstrated an anxiolytic effect that was not distinguishable from placebo.

- 5 Most recently an improved method for oral administration of buspirone was claimed in U.S. 6,008,222 wherein the bioavailability of unchanged buspirone is increased and metabolite formation is decreased. The disclosed method involved co-administration of buspirone with the drug nefazodone, an inhibitor of cytochrome P4503A4 (CYP3A4). Based
10 on assessment of preliminary clinical data, no further development of this drug combination pharmaceutical formulation has been planned.

- In summary, while BMY 28674 has been found to be one of several human metabolites resulting from oral administration of the anxiolytic drug, buspirone, no useful biological activity has previously
15 been associated with the compound itself prior to the present invention. In particular, no anxiolytic activity was detected in previous testing. Dosing recommendations for buspirone have been made in accordance with the expectation that inhibition of buspirone's metabolism would generate a more robust antianxiety response. The clinical observation
20 that a certain percentage of anxious patients do not get relief from administration of buspirone has been ascribed to insufficient levels of parent drug being achieved in these non-responders. A second clinical observation regarding a seven to ten day lag period prior to observation of an anxiolytic effect has been attributed to a requirement for a change in receptor site dynamics as a result of chronic buspirone administration.
25 The unexpected discovery of the anxiolytic effects of BMY 28674 suggests other explanations for these observations.

Brief Description of the Drawings

- Figure 1. Effect of BMY 28674 on isolation-induced ultrasonic
30 vocalization and locomotor activity in the rat pup.

Figure 2. Effect of buspirone on isolation-induced ultrasonic vocalization and locomotor activity in the rat pup.

73

Figure 3. Human blood level concentrations of buspirone following oral dosing of buspirone in human subjects.

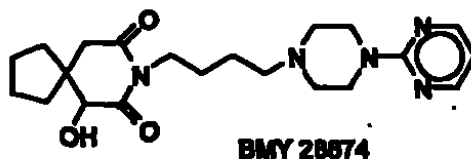
Figure 4. Human blood level concentrations of 1-PP following oral dosing of buspirone in human subjects.

5 Figure 5. Human blood level concentrations of BMY 28874 following oral dosing of buspirone in human subjects.

Figure 6. *In Vitro* metabolism study: Human Liver Microsomal (HLM) metabolism of buspirone to produce BMY 28874.

Summary and Detailed Description of the Invention

10 We have discovered that 6-hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione (I) is useful as an agent to treat anxiety and is referred to herein as BMY 28874. The compound has the following structural formula:

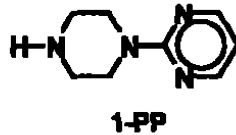


15

and is believed to be the active metabolite of buspirone.

As a result of previous in-house testing of the clinically useful anxiolytic agent buspirone, and several of its putative and actual metabolites, the prevailing view has been that the anxiolytic action was
20 mainly provided by buspirone itself with little, if any, contribution being made by buspirone metabolites. For example, systemic administration (I.V. and intragastric) of certain putative metabolites to rats resulted in little to no inhibition of dorsal raphe neuronal firing. In contrast, buspirone itself potently inhibits the firing of dorsal raphe neurons. See:
25 VanderMaelen, et al., Eur. J. Pharmacol., 129, pp. 123-30, 1988. While

one metabolite, the structural fragment 1-(2-pyrimidinyl)piperazine, also known as 1-PP,



did show weak inhibition of dorsal raphe firing as well as eliciting some
5 antianxiety activity in certain other preclinical tests (see: U.S. 4,409,223),
it also displayed anxiogenic properties in other behavioral testing
paradigms. See: Cervo, et al., Life Sciences, 43, pp. 2095-2102, 1988;
Martin, Psychopharmacology, 104, pp. 275-278, 1991. It is probable that
the biological effect of 1-PP is mediated through an alpha 2 adrenergic
10 mechanism as 1-PP does not demonstrate binding at the 5-HT1A
receptor. Presently, the clinical effect of 1-PP is unclear.

With general acceptance that the active anxiolytic agent is
buspirone itself, dosing instructions are currently provided in accordance
with maximizing blood levels of unchanged buspirone in anxious patients.
15 In patients where metabolism of buspirone is inhibited, either because of
the patient's hepatic enzymatic activity levels or because of ingestion of
substances that have inhibitory effects on hepatic metabolism, particularly
CYP3A4; patients are being advised to reduce the amount of buspirone
being taken. It is interesting that no specific correlation of adverse effects
20 with higher buspirone blood levels has been established. With discovery
of the instant active metabolite, the direction of such dosing instructions
should be changed to conditions favoring enzymatic production of BMY
28674. In effect, the dose of buspirone should be increased, not
decreased, in patients characterized by inhibited buspirone metabolism.

25 Another widely accepted hypothesis deals with buspirone not
providing relief from anxiety in a certain percentage of patients. This lack
of effect has been ascribed to insufficient blood levels of unchanged
buspirone being achieved in non-responders even though buspirone
blood levels are very low in all patients. Scientific confirmation of this
30 explanation for treatment failure is lacking. An alternate explanation
emerges in light of the discovery of the active metabolite BMY 28674 and

21
75

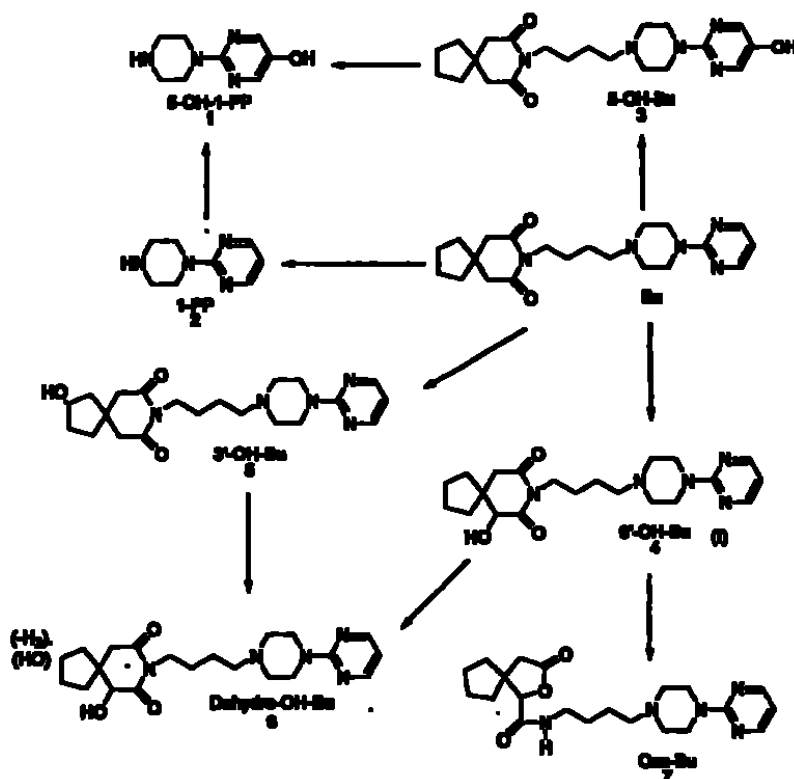
5 its anxiolytic effect. A more likely explanation for treatment failure in
certain patients concerns the relationship of anxiolytic efficacy to blood
levels of BMY 28674. Non-responders are seen as those patients whose
metabolic conversion of buspirone to BMY 28674 is insufficient to achieve
10 efficacious levels of BMY 28674. Relating to this explanation is the
observation of the wide variability of buspirone blood levels seen both
within the same patient and between patients following oral
administration. This variability can be a result of known variations that
occur in activity levels of human hepatic metabolism during the course of
15 daily living. However, since blood levels of buspirone itself are very low,
the differences in buspirone blood levels are generally small in
comparison to the differences in blood levels seen for the more abundant
metabolites.

15 Similarly, the time lag observed for onset of anxiolytic action
following initiation of buspirone treatment can involve the time required for
metabolite accumulation as well as re-regulation of receptor site
dynamics. In general, the dependence of anxiolytic action on appearance
of the metabolite BMY 28674 correlates well with clinical observations
made with respect to oral administration of buspirone to anxious patients.

20 On the basis of the accepted rationale that intact buspirone
provided the useful antianxiety activity seen clinically, a transdermal patch
delivery system for buspirone was developed (see: U.S. 5,633,009). A
buspirone transdermal patch was predicted to be a superior treatment for
anxiety since transdermal drug delivery resulted in minimized metabolism
25 of buspirone, thereby giving significantly larger amounts of parent drug
with much reduced levels of metabolites. Surprisingly, little to no
anxiolytic activity was seen clinically with use of the buspirone
transdermal patch. This unexpected result has led to reevaluation of
buspirone metabolites and the discovery of BMY 28674's potent
30 antianxiety action.

The following metabolic scheme (Scheme 1) for buspirone is taken
from Jajoo, et al., Xenobiotica, 1990, Vol. 20, No. 8, pp. 779-786, "In vitro
metabolism of the antianxiety drug buspirone as a predictor of its
metabolism in vivo."

Scheme for metabolism of buspirone by rat liver microsomes and hepatocytes



10

The new work began by evaluation of relevant receptor binding of buspirone metabolites. Accordingly, the *in vitro* activity of buspirone (Bu; MJ 9022) and its metabolites 1-PP (BMJ 13653), 3'-OH-buspirone (BMJ 14295), 5-OH-buspirone (BMJ 14131), and 6'-OH-buspirone (BMJ 28674); were evaluated for activity at the human 5-HT_{1A} receptor. Results of these experiments are found in Table 1.

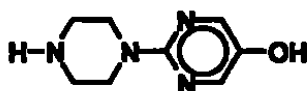
0958821-060600

Table 1

Compound	IC ₅₀ [nM]	STDEV	K _i value	N
8-OH-DPAT (reference)	2.5	0.9	1	8
Buspirone (MJ 9022)	30	18	15	8
6-OH-buspirone (BMY 28674)	114	85	57	7
5-OH-buspirone (BMY 14131)	928	176	464	7
3-OH-buspirone (BMY 14295)	652	402	326	7
1-PP (BMY 13653)	>1000	-	-	3

As can be seen, Table 1 summarizes the new *in vitro* action of MJ 9022 (buspirone) and its metabolites BMY 13653 (1-PP), BMY 14131 (5-OH-buspirone), BMY 14295 (3-OH-buspirone), and BMY 28674 (6-OH-buspirone) at the human serotonin 1A (5-HT_{1A}) receptor. Buspirone demonstrates a high affinity for the human 5-HT_{1A} receptor (K_i=15 nM). BMY 28674 has a binding affinity that approaches that of buspirone (K_i=57 nM). The other metabolites tested have relatively weak affinity for human 5-HT_{1A} receptor compared to buspirone.

BMY 28674 appears to be the active metabolite of buspirone. Not only is it the second most abundant metabolite obtained in the metabolism studies from human urine (5-hydroxy-1PP being most



5-hydroxy-1-PP

abundant); but more importantly, human blood levels of BMY 28674 are about 40 times greater than those of buspirone and several-fold greater than those of 1-PP. Also of significance is the fact that the skeletal structure of buspirone remains intact in BMY 28674. In addition, binding data at the 5-HT_{1A} receptor indicates that BMY 28674 has a binding affinity closer to that of buspirone in contrast to other metabolites which demonstrate only weaker interaction at the 5-HT_{1A} site. The 5-HT_{1A} receptor is currently accepted as the serotonergic receptor intimately involved in regulation of anxiety. The present research focus has been

8x
76

on buspirone metabolites that maintain the buspirone skeletal structure and that have no more than one hydrophilic hydroxy group incorporated into the molecule. The presence of more than one hydrophilic hydroxy group is likely to reduce the distribution and transport of those poly-
5 hydroxylated metabolic products into the CNS regions of the body thereby making requisite receptor interactions unlikely to occur in target regions.

Earlier in-house functional testing of BMY 28674 utilized an *in vivo* test method based on modification of the Vogel Conflict test, a simple reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents (see: Vogel, et
10 al., Psychopharmacologia, (Berl.) 21, pp. 1-7, 1971). However, BMY 28674 did not elicit an anti-anxiety response in the Vogel test. No useful anti-anxiety activity has been ascribed to BMY 28674 previously.

Ultrasonic vocalizations emitted by rat pups following isolation from their mother and littermates and subjected to a variety of environmental
15 stimuli (e.g., cold temperature) has proven to be a sensitive method for assessing potential anxiolytic and anxiogenic compounds (Winslow and Insel, 1991, Psychopharmacology, 105:513-520). Psychoactive compounds purported to be anxiolytic suppress the frequency of ultrasonic calls whereas, calls are increased by drugs with anxiogenic
20 properties. More importantly, the Isolation-Induced ultrasonic vocalization paradigm appears to be most sensitive for detecting anxiolytic properties across a broad spectrum of drug classes such as benzodiazepines, 5-HT reuptake inhibitors, 5-HT_{1A} agonists as well as NMDA antagonists. In the present investigation, the 6-hydroxylated metabolite of buspirone,
25 BMY 28674, which has affinity for the human 5-HT_{1A} receptor ($K_i=57$ nM) was assessed for potential anxiolytic activity using 9-11 day old rat pups that had been separated from their mother and littermates and placed on a cold (18-20 °C) plate to elicit distress-induced ultrasonic vocalizations. See Figure 1. Figure 2 shows the results obtained for buspirone in this
30 test method.

Administration of BMY 28674 (0.03-1 mg/kg, sc; Figure 1) 30 min prior to test produced a dose-dependent suppression of rat pup ultrasonic vocalization on the cold plate [$F(4,45)=19.27$, $p=0.0001$]. The dose of BMY 28674 predicted to reduce the number of calls by 50% (ID_{50}) was

0.13 mg/kg. Locomotor activity was also significantly impaired following
BMY 28674 [$F(4,45)=5.85$, $p=0.007$]. However, the ID_{50} dose (0.41
mg/kg) of BMY 28674 estimated to reduce locomotor activity was
approximately 3-fold greater than the ID_{50} dose (0.13 mg/kg) observed for
5 suppressing ultrasonic calls suggesting that like buspirone, the anxiolytic
properties of BMY 28674 occurs at lower doses.

Administration of buspirone (0.03-1 mg/kg, sc; Figure 2) 30 min
prior to test produced a dose-dependent suppression of rat pup ultrasonic
vocalization on the cold plate [$F(4,42)=15.44$, $p=0.0001$]. The dose of
10 buspirone predicted to reduce the number of calls by 50% (ID_{50}) was
0.10 mg/kg. Locomotor activity was also impaired [$F(4,42)=4.343$,
 $p=0.005$] at approximately 5-fold greater doses than those suppressing
ultrasonic calls.

The present results demonstrate that, like buspirone, the
15 metabolite BMY 28674 elicits anxiolytic-like activity in the rat pup
isolation-induced ultrasonic vocalization model of anxiety. The anxiolytic
activity associated with BMY 28674 (and buspirone) occurred at much
lower doses than those required to suppress motor activity. In summary,
the foregoing *in vitro* and *in vivo* tests demonstrate positive anti-anxiety
20 test results for both buspirone and BMY 28674; however, buspirone blood
level concentrations are minute following oral administration to human
subjects. Prior to the present work, no information regarding clinical
blood level concentrations of BMY 28674 existed.

Human pharmacokinetic studies have been undertaken and have
25 yielded surprising results further supporting the role of BMY 28674 as the
active anxiolytic metabolite.

Human subjects ($n=13$) were administered buspirone orally for 25
days with total daily doses ranging from 10 mg to 60 mg. The dosing
schedule was divided into five 5-day dose intervals with BID dosing being
30 increased in each interval. Pharmacokinetic measurements were made
on day 5 of each interval and these data were used to assess the
pharmacokinetics of buspirone, 1-PP, and BMY 28674. The human
dosing schedule is shown below. --- --

Dosing Interval	Buspirone BID Dose (mg)	PK Measurement (Study Day)
1	5	5
2	7.5	10
3	15	15
4	20	20
5	30	25

These multiple doses of oral buspirone at the five dose levels were found to be safe and generally well tolerated in the healthy adults participating in the 25-day study.

5 Figures 3, 4 and 5 show mean blood level concentrations of buspirone, 1-PP, and BMY 28674, respectively, over a 12-hour dosing period on the last day of each dosing interval. Buspirone levels (Figure 3) are in general very low (about 1-2 ng/mL at the higher doses) and drop to less than 1 ng/mL levels two hours post-dose. In contrast, 1-PP levels
10 (Figure 4) and BMY 28674 levels (Figure 5) are much higher and are sustained compared to buspirone. BMY 28674 has several-fold higher concentrations than 1-PP and about 30 to 40-fold higher concentrations than buspirone.

Thus far, studies indicate that after oral administration of
15 buspirone, it is blood levels of the metabolite, BMY 28674, that are meaningful compared to the negligible blood levels of buspirone that are seen. Although buspirone itself has been demonstrated to have anxiolytic properties in test models such as the rat pup USV model described herein, the low blood level concentrations seen in humans leads to the
20 conclusion that it is the abundant metabolite BMY 28674 that mediates the antianxiety effect seen clinically. Prior to this present evaluation of buspirone metabolites, the relative abundance of BMY 28674 in humans following oral administration of buspirone was not known.

While it is evident that BMY 28674 can itself be administered to
25 achieve an anxiolytic effect, oral administration of its precursor, buspirone, done under appropriate conditions can also offer an improved

82
81

method of introducing BMY 28674 into the system of an anxious patient. To gain better definition of these conditions, *in vitro* metabolism experiments were performed to study the Human Liver Microsomal (HLM) metabolism of buspirone. Multiple donor preparations of HLM were
5 chosen based upon their CYP3A4 enzyme activities. HLM preparations were purchased from Gentest Corporation (Woburn, MA: Catalog #'s, H023, H056, H070, H093 and H112), who characterized the HLM preparations utilizing standard procedures. In addition to measuring the loss of parent compound in the incubations, the metabolite, BMY 28674,
10 levels were also measured.

The first set of experiments measured the correlation seen in Figure 6 between the specific activity of CYP3A4 in HLM preparations and the metabolism of buspirone and the production of the metabolite. A single concentration of ^{14}C -buspirone ($10\ \mu\text{M}$) was incubated with five
15 HLM preparations from five donor livers. Incubations were performed for 15 minutes with $0.5\ \text{mg/ml}$ microsomal protein and utilized an NADPH generating system. ^{14}C -buspirone and BMY 28674 levels in the incubation samples were determined by reverse-phase HPLC, utilizing online radioactivity detection and comparison to authentic standards.
20 Quantitative recovery of ^{14}C was obtained. The ratio of BMY 28674 to buspirone concentration versus CYP3A4 specific activity as measured in HLM preparations from five donor livers is shown in Figure 6 (mean of two separate determinations). These results show that the ratio of BMY 28674 to buspirone increases as the CYP3A4 specific activity increases
25 in HLM. The change in ratio as CYP3A4 activity increases is noted by both an increase in BMY 28674 levels, and a decrease in buspirone concentrations (results not shown).

A second set of incubations was performed to determine the potential of a CYP3A4 inhibitor to alter the ratio of BMY 28674 to
30 buspirone in HLM incubations. A single concentration of ^{14}C -buspirone ($10\ \mu\text{M}$) was incubated with pooled HLM (pooled by combining equal volumes from the five donor livers described above). Ketoconazole, a well-characterized CYP3A4 inhibitor, was added to the incubations at various concentrations. All other incubation conditions, as well as the
35 analysis of the samples, was as described above. In the absence of

82

ketoconazole, following the 15-minute incubation of buspirone with the pooled HLM, the ratio of BMY 28674 to buspirone was 0.42 (Table 2). No effect on buspirone metabolism was noted at ketoconazole concentrations up to 0.125 μ M. At 0.25 μ M ketoconazole, the ratio of 6'-hydroxy-buspirone to buspirone decreased to 0.32. At the higher ketoconazole concentrations of 1.25 μ M and 2.5 μ M, the ratio of BMY 28674 to buspirone decreased further to 0.06 and 0.01, respectively. These results show that when ketoconazole is co-incubated with buspirone in pooled HLM, the ratio of BMY 28674 to buspirone decreases as the concentration of the CYP3A4 inhibitor ketoconazole increases. The change in ratio as ketoconazole concentration increases is noted by both a decrease in BMY 28674 levels and an increase in unchanged buspirone concentrations.

Table 2
Inhibition of the Metabolism of Buspirone by Ketoconazole

[ketoconazole]	[buspirone]	[BMY 28674]	[BMY 28674/ buspirone]
(μ M)	(Relative CPM)		(Ratio)
0	20054	8400	0.42
0.025	18845	7884	0.42
0.125	19848	8201	0.42
0.25	21957	7052	0.32
1.25	38117	2111	0.06
2.5	43712	576	0.01

In summary, these *in vitro* experiments show the dependence of both the metabolism of buspirone and the appearance of the metabolite BMY 28674 on the CYP3A4 activity in human liver.

It is an objective of this invention to provide an improved method of eliciting an anxiolytic response in anxious patients. This objective is met by providing anxiolytic-effective blood levels of BMY 28674 in anxious patients. The most apparent means to achieve this would be by systemic administration of BMY 28674 itself to the patient. Therefore, one aspect of the present invention concerns the process for ameliorating an anxiety

~~89~~
83

state in a mammal in need of such treatment by systemic administration of an effective antianxiety dose of BMY 28674.

An effective dose should, in general, provide minimum blood level concentrations (CMIN) of BMY 28674 that are at least 1 to 2 ng/mL.

5 Generally the point of measurement for CMIN levels is 12 hours post-dose; i.e., just before the next BID dose. BMY 28674 can be administered by a variety of routes including, but not limited to, oral; sublingual; buccal; transnasal; or parenteral, e.g. intramuscular, intravenous, subcutaneous, etc.

10 Therapeutically, BMY 28674 can be given by one of these routes as a formulation comprised of an effective anxiolytic amount of BMY 28674, or one of its pharmaceutically acceptable acid addition salts or a hydrate, in a pharmaceutically acceptable carrier. Pharmaceutical compositions which provide from about 5 to 50 mg of the active ingredient
15 per unit dose are preferred and can be conventionally prepared as aqueous solutions and aqueous or oily suspensions. BMY 28674 can also be given orally when compounded in an oral dosing formulation such as a tablet, lozenge, capsule, syrup, elixir, aqueous solution or suspension.

20 The pharmaceutically acceptable acid addition salts of BMY 28674 are also considered useful as anxiolytic agents. By definition, these are those salts in which the anion does not contribute significantly to toxicity or pharmacological activity of the base form of BMY 28674.

25 Acid addition salts are obtained either by reaction of BMY 28674 with an organic or inorganic acid, preferably by contact in solution, or by any of the standard methods detailed in the literature and available to any practitioner skilled in the art. Examples of useful organic acids are carboxylic acids such as maleic acid, acetic acid, tartaric acid, propionic acid, fumaric acid, lactic acid, succinic acid, pantoic acid, and the like;
30 useful inorganic acids are hydrohalide acids such as HCl, HBr, HI; sulfuric acid; phosphoric acid; and the like.

80
84

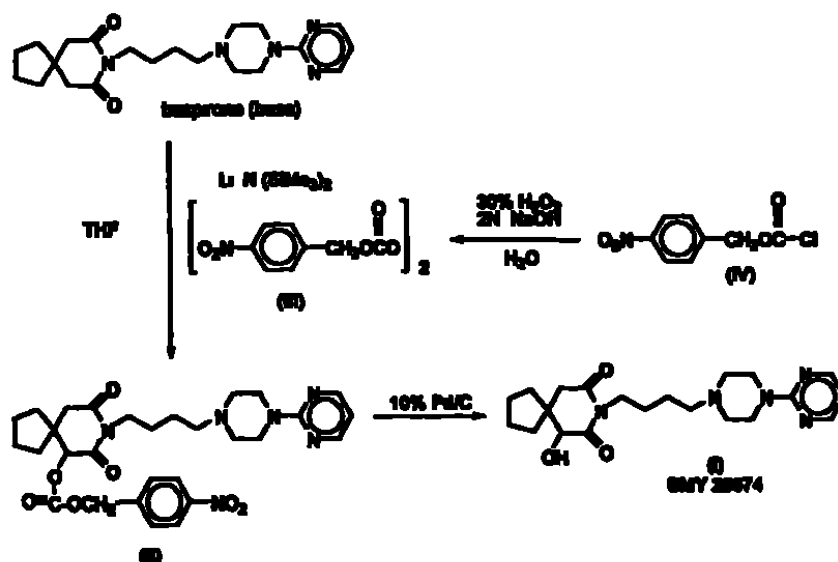
Preferred oral compositions are in the form of tablets or capsules and in addition to BMY 28674 may contain conventional excipients such as binding agents (e.g., syrup, acacia, gelatin, sorbitol, tragacanth, or polyvinyl pyrrolidone), fillers (e.g., lactose, sugar, maize-starch, calcium phosphate, sorbitol or glycine), lubricants (e.g., magnesium stearate, talc, polyethyleneglycol or silica), disintegrants (e.g., starch), and wetting agents (e.g., sodium lauryl sulfate). Solutions or suspensions of BMY 28674 with conventional pharmaceutical vehicles are employed for parenteral compositions such as an aqueous solution for intravenous injection or an oily suspension for intramuscular injection. Such compositions having the desired clarity, stability and adaptability for parenteral use are obtained by dissolving from 0.1% to 10% by weight of the active ingredient (BMY 28674 or a pharmaceutically acceptable acid addition salt or hydrate thereof) in water or a vehicle consisting of a polyhydric aliphatic alcohol such as glycerine, propylene glycol, and polyethylene glycols or mixtures thereof. The polyethylene glycols consist of a mixture of non-volatile, normally liquid, polyethylene glycols which are soluble in both water and organic liquids and which have molecular weights from about 200 to 1500.

BMY 28674 may be synthesized by methods readily available in the chemical literature and known to one skilled in synthetic organic chemistry. One method of preparation utilizes buspirone as a starting material and the process is shown in Scheme 2.

85

Scheme 2

Preparation of BMY 28674



5 This method of preparation is provided as a helpful example and illustrates a convenient synthesis of BMY 28674.

It should also be appreciated that BMY 28674 can be obtained by enzymatic (human or rat liver microsomes) conversion of buspirone *in vitro*. (See: Jajoo, et al., Xenobiotica, 1990, Vol. 20, No. 8, pp. 779-786.)

10 Systemic administration may also be realized by a second method of achieving effective anxiolytic blood levels of BMY 28674 which is to orally administer a precursor form of BMY 28674. Such prodrug forms would be administered in dosage amounts that would produce effective anxiolytic effects without causing harmful or untoward side-effects. That is, systemic administration of BMY 28674 may be accomplished by oral
15 administration of a precursor or prodrug form of BMY 28674, e.g. buspirone, to mammals.

However, this method of systemic introduction of BMY 28674 improves upon and differs from the known standard method of oral administration of buspirone. The prodrug buspirone is utilized in an
20 improved method of effecting anxiolysis in the present invention. Thus,

92
86

another aspect of this invention is directed to ameliorating anxiety in a mammal by an improved method of oral administration of buspirone. The improvement involves the oral administration of buspirone in such a manner that the metabolic production of BMY 28674 is favored, thereby providing anxiolytic-effective amounts of BMY 28674 in the patient. This is in contradiction to currently accepted methods of administration that are directed to maximizing blood levels of unchanged buspirone. As an example, dosing guidance in the past has taught that if buspirone is administered under conditions favoring inhibition of its metabolism, i.e. where higher levels of unchanged buspirone and lower levels of metabolite will result, the dose of buspirone should be reduced. The improved method is directly counter to the past method of orally administering buspirone. Instead of reducing the dose of buspirone when its metabolism is inhibited, the dose of buspirone should be increased in order to achieve appropriate levels of BMY 28674. There has been no specific correlation of serious adverse effects to increased amounts of buspirone being ingested.

In summary, the second aspect of the current invention concerns an improved process of ameliorating an undesirable anxiety state in a mammal by oral administration of buspirone, or a pharmaceutically acceptable acid addition salt thereof, in a manner favoring metabolic production of BMY 28674 in the mammal. In general, the amount of buspirone to be given is a dose that results in a minimum blood concentration (CMIN) of 1 to 2 ng/mL of BMY 28674. CMIN determinations in patients are usually made 12 hours after a drug dose and just prior to the next dose.

An example of one factor affecting metabolic production of BMY 28674 is the effect of food on oral dosing of buspirone. According to the package insert for BUSPAR® (buspirone HCl oral tablets), the implicit suggestion is made that buspirone be taken with food to increase the plasma concentration of unchanged buspirone.

A second example of a dosing modification taught in the BUSPAR® package insert is the recommendation of lowering the buspirone dosage when given in combination with an inhibitor of CYP3A4.

26
89

For purposes of the improved method of ameliorating an undesirable anxiety state by oral administration of buspirone, the foregoing examples teach away from the improved method of the current invention. Instead of dosing buspirone at mealtimes, the dosing should occur about two hours or more before or after a meal. Similarly, in the case of decreased functioning of cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), the dose of buspirone should be increased and not decreased, as taught by the BUSPAR® package insert.

Other dosing modifications envisioned for the improved anxiolytic method involving systemic introduction of BMY 28674 by oral administration of buspirone comprise the following.

- Administer oral buspirone in coincidence with diurnal periods of maximal CYP3A4 activity in the mammal.
- Discontinue concomitant medications or foodstuffs that inhibit CYP3A4 activity.
- Increase the dose of buspirone to adjust for decreased CYP3A4 activity when discontinuance of concomitant medication that inhibits the cytochrome activity is medically impractical.

In sum, oral administration of buspirone to an anxious patient is modified in manner and degree, in accordance with good medical practice, so that the metabolic production of BMY 28674 is favored. In keeping with good clinical practice, it is preferable to administer BMY 28674, or a precursor form, at concentration levels that will produce effective anxiolytic effects without causing harmful or untoward side-effects.

Description of Specific Embodiments

The compound whose use constitutes this invention and its method of preparation will appear more fully in light of the following examples

88

which are given for the purpose of illustration only and are not to be construed as limiting the invention in sphere or scope.

Example 1: Preparation of BMY 28674 (I)

A. Di-4-nitrobenzyl peroxydicarbonate (III)

- 5 Di-4-nitrobenzyl peroxydicarbonate was prepared using a modification of the literature procedure¹. Thus, to an ice-cold solution of 4-nitrobenzyl chloroformate (10.11 g, 4.7 mmol) in acetone (20 mL) was added dropwise over 30 min an ice-cold mixture of 30% H₂O₂ (2.7 mL, 24 mmol) and 2.35 N NaOH (20 mL, 47 mmol). The mixture was
- 10 vigorously stirred for 15 min and then it was filtered and the filter-cake was washed with water and then with hexane. The resulting damp solid was taken up in dichloromethane, the solution was dried (Na₂SO₄) and then it was diluted with an equal volume of hexane. Concentration of this solution at 20 °C on a rotary evaporator gave a crystalline precipitate
- 15 which was filtered, washed with hexane and dried *in vacuo* to give compound III (6.82 g, 74%) as pale yellow microcrystals, mp 104 °C (dec).

- Di-4-nitrobenzyl peroxydicarbonate was found to be a relatively stable material which decomposed as its melting point with slow gas evolution. In comparison, dibenzyl peroxydicarbonate² decomposed with a sudden vigorous expulsion of material from the melting point capillary.
- 20

B. 6-(4-Nitrobenzyl peroxydicarbonatyl)-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione (II)

- To a solution of 8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione (busprone: 10 g, 28 mmole) in dry THF (250 mL) was added LiN (Me₂Si)₂ (28.5 mL of a 1 M THF solution) at -78 °C and stirred for 3 h and then a solution of di-4-nitrobenzyl peroxydicarbonate (11.2 g) in dry THF (150 mL) was added dropwise over 1 h. Stirring was continued at -78 °C for 1 h.
- 25

¹ F. Strain, et al.; J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1254

² Cf. M.P. Gore, J.C. Vederas, J. Org. Chem., 1986, 51, 3700

95
89

The cooling bath was removed and the reaction solution was poured into a mixture of H₂O and EtOAc. The organic phase was separated and washed with H₂O and then brine. The organic base was dried and then evaporated to a viscous oil. Flash chromatography of this oil, eluting the silica column with MeCN-EtOAc (1:2) gave crude product which was washed with acetone, to remove unreacted buspirone, leaving 6.23 g of a white solid (48%) product (II).

C. 6-Hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione (I; BMY 28674)

A mixture of II (4.0 g; 6.9 mmole) and 10% Pd/C (about 1 g) in MeOH (100 mL) was hydrogenated in a Parr shaker at 40-45 psi for 1 h. The hydrogenation mixture was filtered through a Celite pad which was then washed with EtOAc. The filtrate was evaporated to a gum which was purified by flash chromatography through a silica gel column eluting with EtOAc to give 0.41 g of an off-white solid (I).

Anal. Calcd. for C₂₁H₂₁N₅O₃: C, 62.82; H, 7.78; N, 17.44.

Found: C, 62.84; H, 7.81; N, 17.33.

Example 2: 5-HT_{1A} Receptor Binding Assay

Membranes are prepared for binding using the human 5-HT_{1A} receptor expressed in HEK293 cells. Cells are collected and ruptured using a dounce homogenizer. The cells are spun at 18000xg for 10 minutes and the pellet is resuspended in assay buffer, frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C until the day of the assay.

A total of 30 ug protein is used per well. The assay is carried out in 96-deep-well plates. The assay buffer is 50 mM HEPES containing 2.5 mM MgCl₂ and 2 mM EGTA. The membrane preparation is incubated at 25 °C for 60 minutes with 0.1 nM to 1000 nM test compound and 1 nM 3H-8-OH-DPAT. 10 mM serotonin serves as blocking agent to determine non-specific binding. The reaction is terminated by the addition of 1 ml of ice cold 50 mM HEPES buffer and rapid filtration through a Brandel Cell

9/6
90

Harvester using Whatman GF/B filters. The filter pads are counted in an LKB Trilux liquid scintillation counter. IC_{50} values are determined using non-linear regression by Excel-fit.

Example 3: Rat Pup Isolation-Induced Ultrasonic Vocalization Test

- 5 Harlan Sprague-Dawley rat pups (male and female) were housed in polycarbonate cages with the dam until 9-11 days old. Thirty minutes before testing, pups were removed from the dam, placed into a new cage with a small amount of home bedding and brought into the lab and placed under a light to maintain body temperature at 37 °C. Pups were then
- 10 weighed, sexed, marked and returned to the litter group until behavioral assessment. Testing took place in a Plexiglas recording chamber that contained a metal plate maintained at (18-20 °C) with a 5x5 cm grid drawn on the plate. A microphone was suspended 10 cm above the plate to record ultrasonic vocalizations. Ultrasonic calls were recorded using
- 15 the Noldus UltraVox system providing on-line analysis of the frequency and duration of calls. The number of grid cells entered by the pup was also collected by visual scoring. Pups that failed to emit at least 60 calls during a 5-minute pretest session were excluded from pharmacological assessment. Immediately following the collection of the baseline
- 20 measures, pups were injected with vehicle or drug subcutaneously at the nape of the neck and returned to its littermates. Thirty minutes later, pups were retested on each of the dependent measures (vocalization and grid cell crossings) to assess drug effects. Unless otherwise specified, each pup was used only once. Baseline differences and percent change from
- 25 baseline for the frequency of ultrasonic vocalizations and grid cell crossings were analyzed using a one-way ANOVA. Bonferroni/Dunn post hoc comparisons were performed to assess the acute drug effects with vehicle control. Log-probit analysis was used to estimate the dose (milligrams per kilogram) of each agonist predicted to inhibit isolation-
- 30 induced ultrasonic vocalizations by 50% (ID_{50}). All comparisons were made with an experimental type I error rate (α) set at 0.05.

Doses for each drug were administered in an irregular order across several litters. BMY 28674 and buspirone were dissolved in physiological saline (0.9% NaCl; vehicle). All injections were administered

72
91

subcutaneously in a volume of 10 ml/kg. Doses of the drugs refer to the weight of the salt.

Example 4: In Vitro Metabolism Studies: Buspirone Conversion to BMY 28674

- 5
- 5 donor preparations of HLM were chosen based upon their CYP3A4 Cytochrome P450 enzyme activities.
 - ^{14}C -buspirone (10 μM) was incubated with five HLM preparations from five donor livers (15 minutes with 0.5 mg/ml microsomal protein).
- 10
- ^{14}C -buspirone and BMY 28674 levels in the incubation samples were determined by reverse-phase HPLC, utilizing on-line radioactivity detection and comparison to authentic standards.
 - A second set of incubations was performed to determine the potential of ketoconazole (a CYP3A4 inhibitor) to alter the ratio of BMY 28674 to BUSPAR[®] in HLM incubations.
- 15
- ^{14}C -buspirone (10 μM) was incubated with pooled HLM (15 minutes with 0.5 mg/ml microsomal protein).

09588221-060600

~~8~~
↑

Claims

1. A process for ameliorating an undesirable anxiety state in a mammal comprising systemic administration to the mammal of an effective but non-toxic anxiolytic dose of 6-hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione or a pharmaceutically acceptable acid addition salt or hydrate thereof.

009090-12288560

99
93

Abstract

6-Hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione and its pharmaceutically acceptable salts and hydrates are useful in the alleviation of anxiety.

009090-122 8560

108
9d

DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY FOR PATENT APPLICATION

As the below-named inventor I hereby declare that:

My residence post office address and citizenship is as stated below next to my name.

I believe that I am the original, first and joint inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought, on the invention entitled

IMPROVED ANXIETY METHOD

the specification of which

 X is attached hereto
 was filed on as
Application Serial No

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

And I hereby appoint Aldo A. Algieri, Reg. No. 31,697 Samuel J DuBoff, Reg. No. 25,969 Shah R. Makupna, Reg. No 41,174, David M. Morse, Reg. No 25,742, and Richard P Ryan, Reg. No. 30,491 Post Office Box 5100 Wallingford, CT 06492-7660- all of Bristol Myers Squibb Company my agents and/or attorneys to prosecute this application and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith. Please address correspondence concerning this application to: David M. Morse, Bristol-Myers Squibb Company P.O Box 5100 Wallingford, CT 06492 7660.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to the examination of this application in accordance with Title 37 Code of Federal Regulations, Section 1.56(a)

I hereby claim foreign priority benefits under Title 35 United States Code, Section 119 of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate listed below and have also identified below any foreign application for patent or inventor's certificate having a filing date before that of the application on which priority is claimed.

Prior Foreign Application(s)

			Priority Claimed
<u>None</u> (Number)	<u> </u> (Country)	<u> </u> (Day/Month/Yr Filed)	YES/NO

10,
95

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, Section 120, of a United States application(s) listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, Section 112, I acknowledge the duty to disclose material information as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, Section 1.56(a), which occurred between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application:

<u>09/368,842</u>	<u>8/5/1999</u>	<u>pending</u>
(Application	(Filing Date)	(Status)
Serial No.)		(patented, pending, abandoned)

<u>09/484,161</u>	<u>1/18/2000</u>	<u>pending</u>
(Application	(Filing Date)	(Status)
Serial No.)		(patented, pending, abandoned)

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Full name of first inventor: Robert F. Mayol

Inventor's signature: Robert F. Mayol Date: 6/2/2000

Residence: Durham, CT

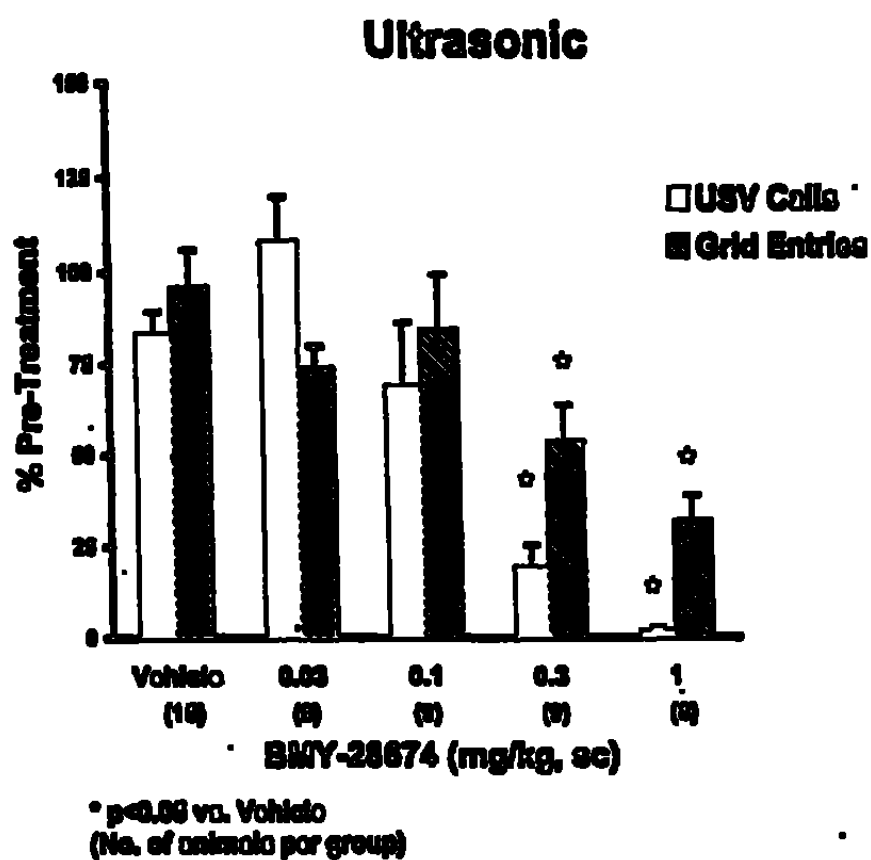
Citizenship: U.S.A. Occupation: Chemist

Post Office Address: 56 Green Lane
Durham, CT 06422

009090-12288560

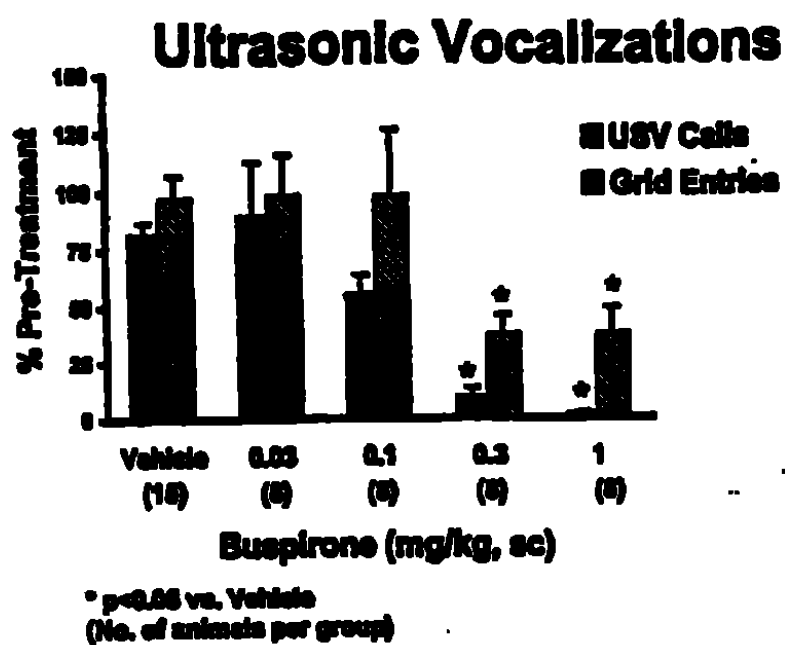
102
96

Figure 1. Effect of BMX-28674 on isolation-induced ultrasonic vocalization and locomotor activity in the rat pup.



4/10/93
97

Figure 2. Effect of buspirone on isolation-induced ultrasonic vocalization and locomotor activity in the rat pup



009090-12288560

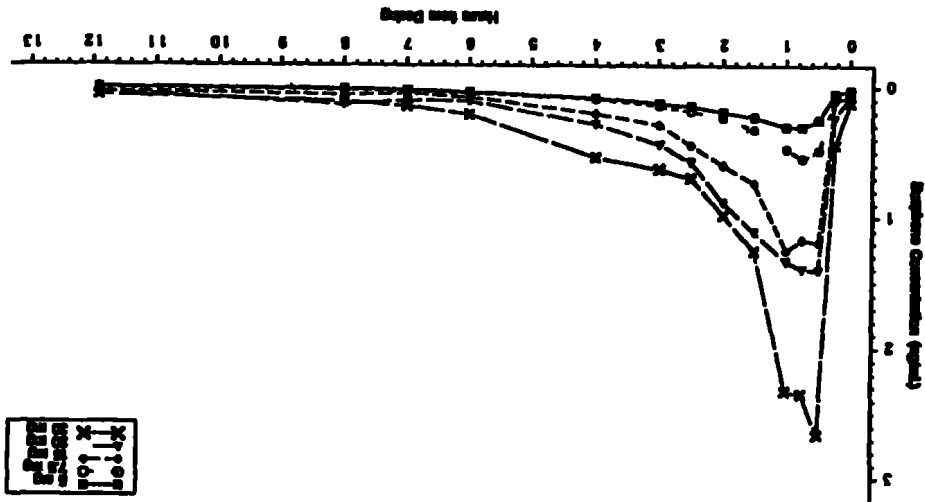
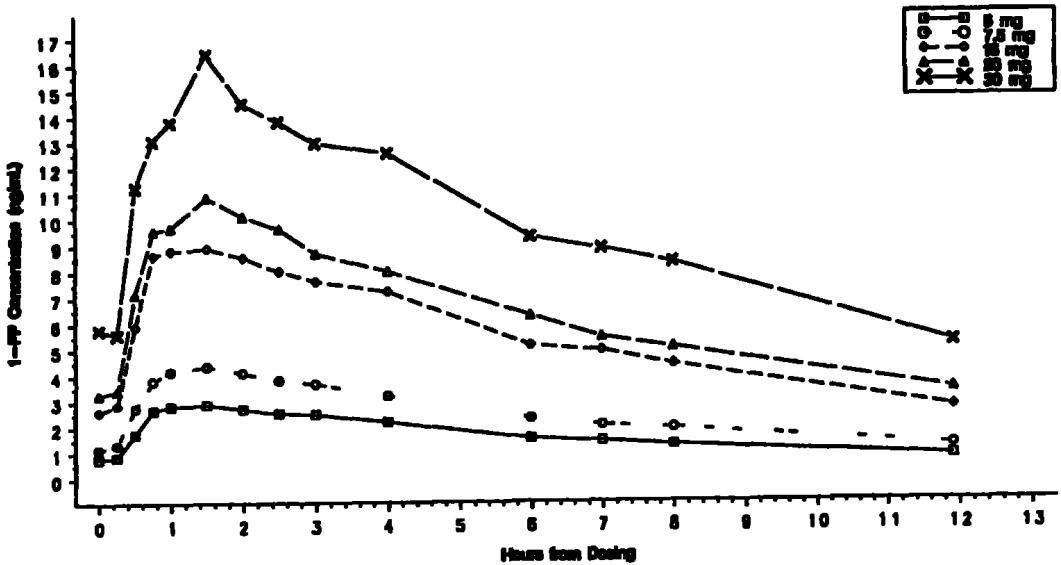


FIGURE 3 HUMAN BLOOD LEVEL CONCENTRATIONS OF BUSPIRONE AT END OF 6-DAY BUSPIRONE DOSING INTERVALS ON A BID REGIMEN

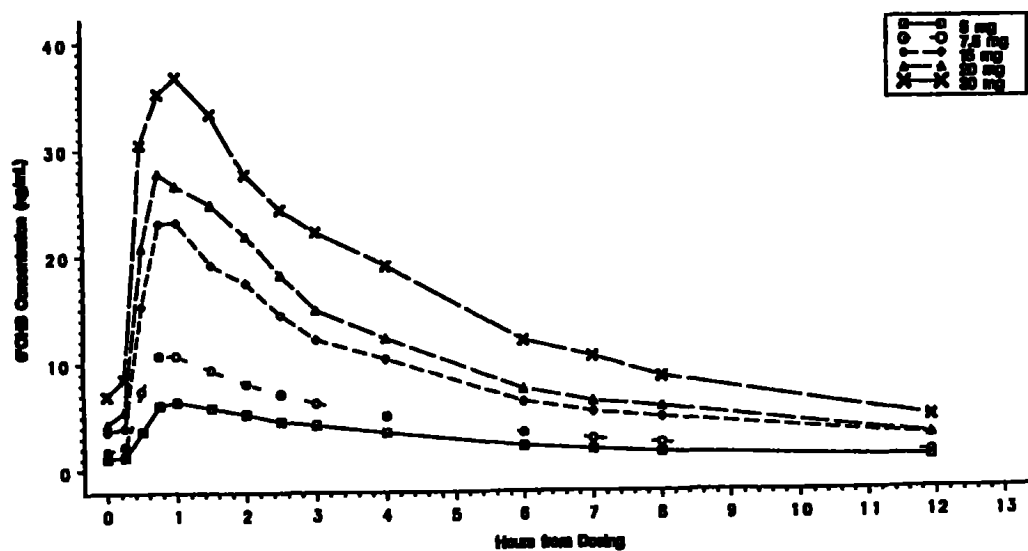
104

FIGURE 4. HUMAN BLOOD LEVEL CONCENTRATIONS OF 1-PP AT END OF 5-DAY BUSPIRONE DOSING INTERVALS ON A BID REGIMEN



09588221 060600

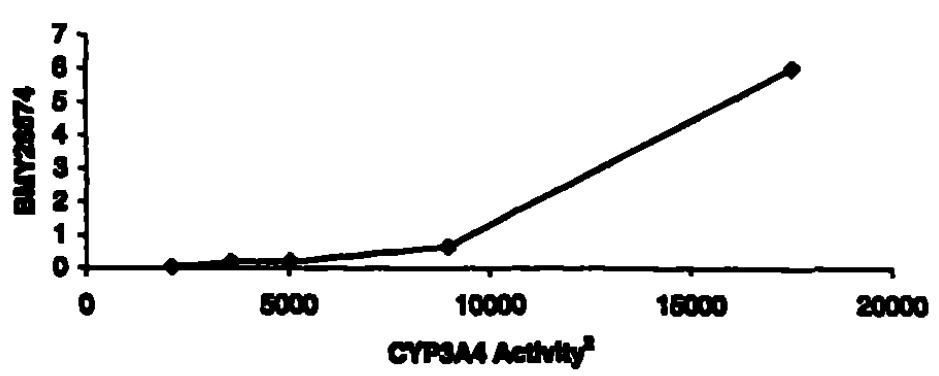
FIGURE 6 HUMAN BLOOD LEVEL CONCENTRATIONS OF BMY 28674 AT END OF 6-DAY BUSPIRONE DOSING INTERVALS ON A BID REGIMEN



09589221 060600

10/1/02

6
**FIGURE 6. *In Vitro* Metabolism Study- HLM
Metabolism of Buspirone to BMY28674¹**



¹ mean of two determinations

² pmole 6-beta-OH-testosterone / minute / mg microsomal protein

009090 T2288560

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
A QUIENES PUEDA LLEGAR LA PRESENTE:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Octubre 17, 2000

LA PRESENTE ES PARA CERTIFICAR QUE ANEXA A LA MISMA SE ENCUENTRA UNA COPIA AUTENTICA DE LOS REGISTROS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS, DE LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE ABAJO IDENTIFICADA, QUE CUMPLE CON LOS REQUISITOS PARA QUE SE LE CONCEDA UNA FECHA DE PRESENTACION CONFORME A LA 35 USC 111.

NUMERO DE SOLICITUD: 09/588,221

FECHA DE PRESENTACION: Junio 06, 2000

(SELLO)

**Por Autoridad del
COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS**

**(Rúbrica)
H. PHILLIPS
Oficial de Certificaciones**

**TRANSMISION DE LA SOLICITUD DE PATENTE DE UTILIDAD Y H JA
DE TASA**

Transmitida junto con esta para la presentación bajo el 37 CFR
§1.53(b) (2) está una **continuación en parte** de la solicitud anterior
No. 09/484,161 presentada en Enero 18, 2000, la cual es una solicitud
divisional de la Solicitud No. 09/368,842, presentada en Agosto 5,
1999.

Solicitante (o medio de identificación): ROBERTO F. MAYOL

Título: METODO MEJORADO PARA ALIVIAR
LA ANSIEDAD

Ajuntas están:

1. ☒ Especificación (Incluyendo Reivindicaciones y Resumen)-25
páginas
 2. ☒ Dibujos - 6 hojas (informal)
 3. Declaración y Poder de Autoridad
 - a. ☒ Nuevamente realizada (original o copia)
 - b. ☐ Copia de una solicitud anterior (firmada o con la
indicación de que la original fue firmada)
 - i. ☐ Supresión de Inventores
Declaración firmada unida que suprime los inventores
nombrados en la solicitud previa
 4. ☐ Incorporación para Referencia
La total descripción de la solicitud previa, de la cual una
copia de la Declaración y Poder de Autoridad se proporciona
bajo el Cuadro 3B, se considera como parte de la descripción de
la solicitud acompañante y es por lo tanto incorporada para
referencia en esta.
 5. ☐ Programa de Computadora de Microficha (accesorio)
 6. Sumisión de Secuencia de Amino Acido y/o Nucleotido
 - ☐ Copia de Leible por Computadora
 - ☐ Copia de Papel
 - ☐ Identidad de Verificación de Declaración de Copias anteriores
 7. ☐ Enmienda Preliminar
 8. ☐ Papeles de Asignación (Hoja de Cubierta & Documento(s))
 9. ☐ Traducción al Inglés de
 10. ☒ Declaración de Descripción de la Información
 11. ☐ Copia Certificada de los Documentos de prioridad
 12. ☒ Retorno de la Tarjeta Postal recibida
 13. ☐ Otros:
- ☒ Se reserva por lo tanto, el derecho a elegir una invención o especies que es
diferente de la que se elige en la presente solicitud en el evento de una
restricción o elección de especies requiere que sea idéntica o substancialmente
similar a la hecha en dicha presente solicitud

Presentación del cálculo de tasa:

- ☐ Antes de calcular la tasa de presentación, por favor introducir la Enmienda Preliminar anexada
- ☐ Antes de calcular la tasa de presentación, por favor cancelar las reivindicaciones

104

Presentación de Tasa Básica							\$ 690
Tasa de Reivindicación Dependiente Múltiple (\$260)							\$
Sobretasa de Lengua Extranjera (\$130)							\$
	Para	Número Presentadas		Números extras		Precio	\$
Reivindicaciones Extras	Reivindicaciones Totales	1	-20	0	X	\$ 18	= \$
		1	-3	0	X	\$ 78	= \$ 690
TASA DE PRESENTACION TOTAL							

- ☒ Por favor cargar el Depósito a la Cuenta No. 02.3850 con el nombre de Bristol-Myers Squibb Company con la cantidad de \$690. Una copia adicional de este papel es anexada. El comisionado está por lo tanto autorizado a cargar cualquiera de las tasas adicionales bajo el 37 CFR \$1.16 y \$1.17 el cual puede ser requerido en conjunto con esta solicitud, o crédito de cualquier pago, a la Cuenta de Depósito No. 02.3850 con el nombre de Bristol-Myers Squibb Company.

Por favor dirigir toda la correspondencia a:

Bristol-Myers Squibb Company
Departamento de Patentes
P.O. Box 5100
Wallingford, CT 06492-7660

Por favor dirigir todas las llamadas telefónicas al abajo firmante al número dado posteriormente y todos los telefaxes al (203) 677-6900.

Respetuosamente suyo,

Fecha: Junio 2, 2000

(rúbrica)

Richard P. Ryan, Ph.D., J.D.
Apoderado para Solicitante
Reg. No. 30,491
Tel. No. (203) 677-6075

SOLICITUD DE PATENTE DE LOS ESTADOS UNIDOS

Robert F. Mayol
56 Green Lane
Durham, CT 06422

PARA

METODO MEJORADO PARA ALIVIAR LA ANSIEDAD

MÉTODO MEJORADO PARA ALIVIAR LA ANSIEDAD
REFERENCIA CRUZADA A 8 LICITUDES RELACIONADAS

113-
106

Esta solicitud es una continuación en
5 parte de la solicitud con No. de serie 09/484,161
presentada el 18 de enero del 2000, que es una
solicitud divisional de la solicitud No. 09/368,842
presentada al 5 de Agosto de 1999.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

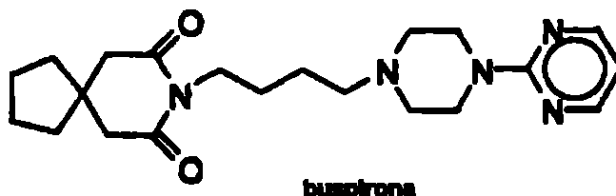
10

La presente invención involucra un proceso
mejorado para el alivio de la ansiedad mediante el
tratamiento con una cantidad ansiolíticamente efectiva
de 6-hidroxi-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-
15 butil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona. Este compuesto fue
por vez primera descrito por Jajoo, et al., Drug Metab.
and Disposition, 17/6 pp. 634-640, 1989, como uno de
varios metabolitos del fármaco ansiolítico,
clínicamente útil, la buspirona. La confirmación de la
20 estructura de este metabolito se consiguió mediante la
comparación con una muestra auténtica del compuesto
preparado sintéticamente. Este compuesto metabolito ha
sido designado BMY 28674, y también es conocido como
BMY 28674.

25

El fármaco original, la buspirona, tiene
la siguiente estructura química.

167



buspirona

5

La buspirona, químicamente: 8-[4-[4-(2-pirimidinil)1-piperazinil]butil-8-azaspiro(4,5)-decan-7,9-diona, es un compuesto farmacéuticamente activo, el cual, según se ha encontrado, es efectivo para el tratamiento de trastornos de ansiedad y de la depresión. Es aceptado que la buspirona ejerce sus efectos a través del receptor de la serotonina 1A(5-HT1A). Sin embargo, la buspirona muestra un metabolismo de primer paso muy elevado, y en general, únicamente aproximadamente el 4% de una dosis terapéutica de buspirona llega a la circulación sistémica, en forma no metabolizada, después de la administración oral (Mayol, et al., Clin. Pharmacol. Ther., 37, p. 210, 1985). También se han observado grandes diferencias en la absorción de la buspirona, entre individuos. Esto ha sido demostrado por las variaciones de la concentración plasmática máxima del fármaco, en individuos, por diferencias de hasta 10 veces

(Gammans, et al., American J. Med., 80, Suppl. 3B, pp. 41-51, 1986).

La síntesis de la buspirona y análogos relacionados, y la descripción de sus
5 propiedades psicotrópicas son descritas por Wu, et al., en la patente norteamericana 3,717,634. El uso del clorhidrato de buspirona, como un agente novedoso contra la ansiedad, para el
tratamiento de pacientes neuróticos, es descrito
10 por Casten, et al., en la patente norteamericana 4,182,763.

Previamente se analizaron las propiedades contra la ansiedad del BMY 28674, usando métodos de laboratorio desarrollados
15 específicamente para la medición de las propiedades contra la ansiedad, en compuestos de azapirona, tales como la buspirona, gepirona y análogos estructurales. En este análisis nunca se detectó actividad significativa alguna contra
20 la ansiedad, para el BMY 28674. Para este compuesto nunca se ha descrito actividad biológica alguna significativa de cualquier tipo. En efecto, con la excepción de la 1-pirimidinilpiperazina (1-PP), no se ha descrito
25 actividad significativa alguna contra la

46
109

ansiedad, para alguno de los metabolitos de buspirona conocidos. Ver: Gammans, et al., JAMA, (Marzo de 1986), Vol.. 80, Supp. 3B, pp. 43-44. Como una consecuencia, se ha creído que la dosificación oral de buspirona para el tratamiento de la ansiedad, se optimiza cuando se realiza en una manera tal que maximice la concentración del fármaco sin cambios, a expensas de los metabolitos.

10 En la patente norteamericana 5,431,922 se describió una formulación de liberación prolongada, de buspirona para proporcionar una mejora en la administración oral del fármaco, en base a que los niveles sanguíneos de la buspirona sin cambios se incrementaron, mientras que los niveles del metabolito se redujeron, cuando se midió la relación de los niveles plasmáticos de buspirona respecto al metabolito 1-PP. Sin embargo nunca se describieron datos de eficacia para estas formulaciones y tampoco se comercializaron.

20 La patente norteamericana 5,633,009 describió y reivindicó un parche transdérmico para suministrar buspirona. El suministro transdérmico, como se esperó, dio confiablemente

mayores niveles sanguíneos de buspirona (área bajo la curva (abc)) con niveles del metabolito mucho más reducidos, al medirlos por el 1-PP. Se diseñó un parche típico para suministrar 60 mg de buspirona por un período de 24 horas. De manera sorprendente, estudios clínicos realizados con este parche demostraron un efecto ansiolítico que no pudo distinguirse del placebo.

10 Más recientemente, un método mejorado para la administración oral de buspirona fue reivindicado en la patente norteamericana 6,008,222 en donde se incrementa la biodisponibilidad de la buspirona sin cambios, y
15 se reduce la formación del metabolito. El método descrito involucra la administración conjunta de buspirona, con el fármaco nefazodona, un inhibidor del citocromo P4503A4 (CYP3A4).. En base a la evaluación de datos clínicos
20 preliminares, no se ha planeado un desarrollo ulterior de esta formulación farmacéutica de combinación de fármacos.

En resumen, aunque se ha descubierto que el BMY 28674 es uno de varios metabolitos
25 humanos que resultan de la administración oral

del fármaco ansiolítico, la buspirona, no se ha asociado previamente actividad biológica útil, con el compuesto mismo, antes de la presente invención. En particular, en análisis previos no se detectó actividad ansiolítica. Se han realizado recomendaciones de dosificación para la buspirona, de acuerdo con la expectativa de que la inhibición del metabolismo de la buspirona generaría una respuesta en contra de la ansiedad, más robusta. La observación clínica de que cierto porcentaje de pacientes con ansiedad no obtienen alivio con la administración de buspirona, ha sido atribuida a los niveles insuficientes del fármaco original, que se consiguen en estos no respondedores. Una segunda observación clínica respecto a un período de demora de siete a diez días, antes de la observación de un efecto ansiolítico, ha sido atribuido a la necesidad de un cambio en la dinámica del sitio del receptor, como un resultado de la administración crónica de buspirona. El descubrimiento inesperado de los efectos ansiolíticos del BMY 28674, sugiere otras explicaciones para estas observaciones.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Efecto del BMY 28674 en la vocalización ultrasónica inducida por aislamiento y en la actividad locomotora, en la cría de rata.

Figura 2. Efecto de la buspirona en la vocalización ultrasónica inducida por aislamiento y en la actividad locomotora, en la cría de rata.

Figura 3. Concentraciones de buspirona a nivel sanguíneo humano, seguido de la dosificación oral de buspirona en sujetos humanos.

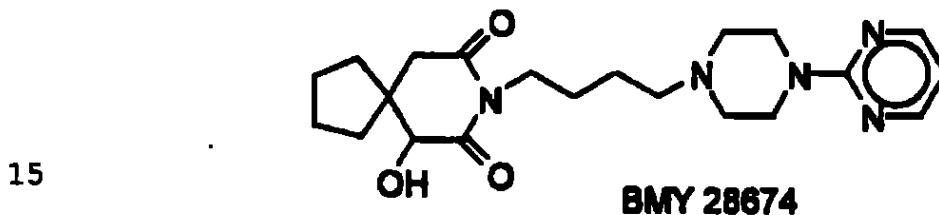
Figura 4. Concentraciones de 1-PP a nivel sanguíneo humano, seguido de la dosificación oral de buspirona en sujetos humanos.

Figura 5. Concentraciones de BMY 28674 a nivel sanguíneo humano, seguido de la dosificación oral de buspirona en sujetos humanos.

Figura 6. Estudio del metabolismo *In Vitro*: Metabolismo Microsómico en Hígado Humano (HLM) de la buspirona, para producir BMY 28674.

BREVE DESCRIPCION Y DESCRIPCION DETALLADA DE LA
INVENCION

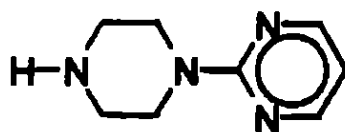
Se ha descubierto en la presente, que la
5 6-hidroxi-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-
butil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona (I) es útil
como un agente para tratar la ansiedad y en la
presente se hace referencia al mismo como BMY
28674. El compuesto tiene la siguiente fórmula
10 estructural:



y se cree que es el metabolito activo de la
20 buspirona.

Como un resultado del análisis previo
con instalaciones y recursos propios, del agente
ansiolítico clínicamente útil, la buspirona y
varios de sus metabolitos reales y putativos, la
25 visión prevaleciente ha sido que la acción

ansiolítica era proporcionada principalmente por la buspirona misma con una pequeña, si la hay, contribución hecha por los metabolitos de la buspirona. Por ejemplo, la administración 5 sistémica (intravenosa e intragástrica) de ciertos metabolitos putativos, a ratas, dio por resultado una poca o ninguna inhibición del disparo de impulsos neuronales en el raqué dorsal. En contraste, la buspirona misma inhibe 10 potencialmente el disparo de impulsos en las neuronas del raqué dorsal. Ver: VanderMaelen, et al., Eur. J. Pharmacol., 129, pp. 123-130, 1986. Aunque un metabolito, el fragmento estructural 1-(2-pirimidinil)piperazina, también conocido 15 como 1-PP,



1-PP

exhibió una inhibición débil del disparo de impulsos en el raqué dorsal, a la vez que produjo 25 cierta actividad en contra de la ansiedad en

ciertos otros análisis preclínicos (Ver: Patente Norteamericana 4,409,223), también exhibió propiedades ansiogénicas en otros paradigmas de análisis de comportamiento. Ver: Cervo, et al.,
5 Life Sciences, 43, pp. 2095-2102, 1988; Martin, Psychopharmacology, 104, pp. 275-278, 1991. Es probable que el efecto biológico del 1-PP sea mediado a través de un mecanismo alfa 2 adrenérgico ya que el 1-PP no demuestra
10 enlazamiento al receptor 5-HT1A. Actualmente, el efecto clínico del 1-PP no esta claro.

Con la aceptación general de que el agente ansiolítico activo es la buspirona misma, comúnmente se proporcionan instrucciones de
15 dosificación de acuerdo con la obtención máxima de niveles sanguíneos de buspirona sin cambios, en pacientes con ansiedad. En pacientes en donde se inhibe el metabolismo de la buspirona, ya sea debido a los niveles de actividad enzimática,
20 hepática, en el paciente, o debido a la ingestión de sustancias que tengan efectos inhibitorios en el metabolismo hepático, particularmente el CYP3A4; se recomienda a los pacientes reducir la cantidad de buspirona
25 tomada. Es interesante que no se ha establecido

una correlación específica de los efectos adversos relacionada con mayores niveles sanguíneos de buspirona. Con el descubrimiento del metabolito activo de la presente, la
5 dirección de esas instrucciones de dosificación deberían cambiarse a condiciones que favorezcan la producción enzimática de BMY 28674. En efecto, la dosis de buspirona debería incrementarse, no reducirse, en pacientes
10 caracterizados por un metabolismo inhibido de la buspirona.

Otra hipótesis ampliamente aceptada se refiere a que la buspirona no proporciona alivio de la ansiedad en cierto porcentaje de
15 pacientes. Esta falta de efecto ha sido atribuida al hecho de que en los no respondedores se consiguen niveles sanguíneos insuficientes de buspirona sin cambios, aunque los niveles sanguíneos de buspirona sean muy
20 bajos en todos los pacientes. Se carece de la confirmación científica de esta explicación de la falla del tratamiento. Una explicación alternativa surge a la luz del descubrimiento del metabolito activo BMY 28674 y su efecto
25 ansiolítico. Una explicación más probable para

428
117

la falla del tratamiento en ciertos pacientes, concierne a la relación de la eficacia ansiolítica respecto a los niveles sanguíneos de BMY 28674. Los no respondedores son vistos como
5 aquellos pacientes cuya conversión metabólica de buspirona a BMY 28674 es insuficiente para conseguir niveles eficaces de BMY 28674. Con relación a esta explicación se encuentra la observación de una amplia variabilidad de los
10 niveles sanguíneos de la buspirona, observados tanto dentro del mismo paciente como entre pacientes, siguiendo la administración oral. Esta variabilidad puede ser un resultado de variaciones conocidas que ocurren en los niveles
15 de actividad del metabolismo hepático humano durante el transcurso de la vida diaria. Sin embargo, dado que los niveles sanguíneos de buspirona misma son muy bajos, las diferencias en los niveles sanguíneos de buspirona
20 son generalmente pequeñas en comparación con las diferencias en los niveles sanguíneos observados para los metabolitos más abundantes.

De manera similar, la demora de tiempo
25 observada para el inicio de la acción

ansiolítica después del inicio del tratamiento con buspirona, puede involucrar el tiempo requerido para la acumulación del metabolito así como para la re-regulación de la dinámica del sitio del receptor. En general, la dependencia de la acción ansiolítica en la aparición del metabolito BMY 28674 se correlaciona bien con las observaciones clínicas realizadas con respecto a la administración oral de buspirona a pacientes con ansiedad.

En base a los razonamientos aceptados de que la buspirona intacta proporcionaba la actividad útil contra la ansiedad, observada clínicamente, se desarrolló un sistema de suministro a base de parche transdérmico, para la buspirona (ver la patente norteamericana 5,633,009). Se predijo que un parche transdérmico de buspirona era un tratamiento superior para la ansiedad dado que el suministro transdérmico del fármaco dio por resultado un metabolismo minimizado de la buspirona, proporcionando por lo tanto cantidades significativamente mayores del fármaco original, con niveles de metabolitos mucho más reducidos. De manera sorprendente, clínicamente se observó

poca o ninguna actividad ansiolítica con el uso del parche transdérmico de buspirona. Este resultado inesperado ha conducido a la reevaluación de los metabolitos de la buspirona y al descubrimiento de la potente acción en contra de la ansiedad del BMY 28674.

El siguiente esquema metabólico (Esquema 1) para la buspirona se tomó de Jajoo, et al., Xenobiotica, 1990, Vol. 20, No. 8, pp. 779-786, "In vitro metabolism of the antianxiety drug buspirone as a predictor of its metabolism in vivo".

15

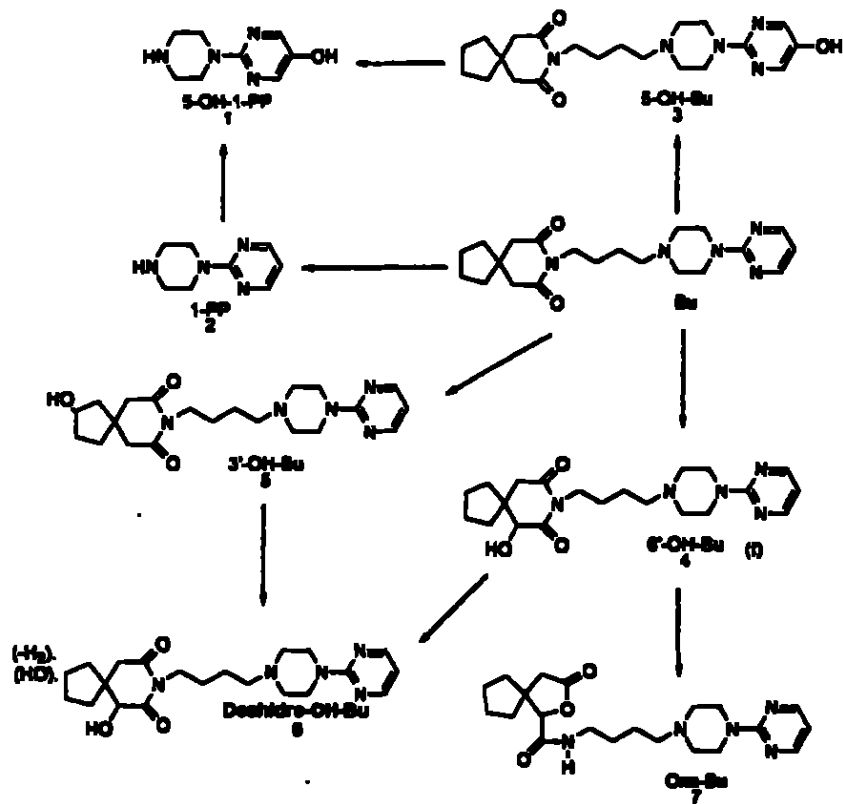
Esquema 1

Esquema para el metabolismo de la buspirona por los microsomas y hepatocitos del hígado de rata

25

5

10



El nuevo trabajo inició con la
 15 evaluación del enlazamiento relevante al
 receptor, de los metabolitos de bupirona. Por
 consiguiente, la actividad *in vitro* de la
 bupirona (Bu; MJ 9022) y sus metabolitos 1-PP
 (BMJ 13653), 3'-OH-bupirona (BMJ 14295), 5-OH-
 20 bupirona (BMJ 14131) y 6'-OH-bupirona (BMJ
 28674); se evaluaron respecto a la actividad en
 el receptor 5-HT_{1A} humano. Los resultados de
 esos experimentos se encuentran en la Tabla 1.

25

Tabla 1

Compuesto	IC ₅₀ [nM]	STDEV	valor K _i	N
8-OH-DPAT (referencia)	2.5	0.9	1	8
Buspirona (MJ 9022)	30	18	15	8
6-OH-buspirona (BMY 28674)	114	85	57	7
5-OH-buspirona (BMY 14131)	928	176	464	7
3-OH-buspirona (BMY 14295)	652	402	326	7
1-PP (BMY 13653)	>1000	-	-	3

5

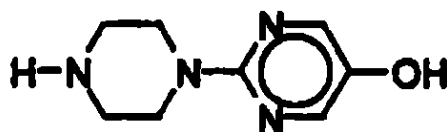
Como puede observarse, la Tabla 1 resume la nueva acción *in vitro* del MJ 9022 (buspirona) y sus metabolitos BMY 13653 (1-PP), BMY 14131 (5-OH-buspirona), BMY 14295 (3-OH-buspirona) y

10 BMY 28674 (6-OH-buspirona) en el receptor de la serotonina 1A humana (5-HT_{1A}). La buspirona presenta una gran afinidad por el receptor de la 5-HT_{1A} humano (K_i=15nM). El BMY 28674 tiene una afinidad de enlazamiento que se aproxima a la de

la buspirona ($K_i=57$ nM). Los otros metabolitos analizados tienen una afinidad relativamente débil por el receptor 5-HT_{1A} humano comparado con la buspirona.

5 El BMY 28674 parece ser el metabolito activo de la buspirona. No únicamente es el segundo metabolito más abundante obtenido en estudios del metabolismo a partir de orina humana (siendo el 5-hidroxi-1PP

10



5-hidroxi-1PP

15

el más abundante); sino que, de manera importante, los niveles sanguíneos humanos del BMY 28674 son aproximadamente 40 veces mayores que los de la buspirona y varias veces mayores que los del 1-PP. También es significativo el hecho de que la estructura esquelética de la buspirona permanece intacta en el BMY 28674. Además, los datos de enlazamiento en el receptor 5-HT_{1A} indican que el BMY 28674 tiene una

20

25

436
123

afinidad de enlazamiento más cercana a la de la buspirona, en contraste con los otros metabolitos, lo cual demuestra únicamente una interacción más débil en el sitio del 5-HT_{1A}. El receptor 5-HT_{1A} es aceptado comúnmente como el receptor serotoninérgico involucrado íntimamente en la regulación de la ansiedad. El enfoque de la presente investigación ha sido en los metabolitos de buspirona que mantienen la estructura del esqueleto de buspirona y que no tienen más de un grupo hidroxil hidrofílico incorporado en la molécula. Es probable que la presencia de más de un grupo hidroxil hidrofílico reduzca la distribución y transporte de esos productos metabólicos polihidroxilados en las regiones del Sistema Nervioso Central del cuerpo, por lo tanto haciendo que las interacciones necesarias de los receptores probablemente no ocurran en las regiones objetivo.

Los primeros análisis funcionales, con instalaciones y recursos propios, del BMV 28674, utilizaron un método de análisis *in vivo* en base a la modificación del análisis de Conflicto de Vogel, un simple procedimiento de conflicto,

13/
124

confiable, para analizar agentes en contra de la
ansiedad (ver: Vogel, et al.,
Psychopharmacologia, (Berl.) 21, pp. 1-7, 1971).

Sin embargo, el BMY 28674 no produjo una
5 respuesta contra la ansiedad, en el análisis de
Vogel. Previamente no se ha atribuido al BMY
28674 actividad útil contra la ansiedad.

Las vocalizaciones ultrasónicas emitidas
por crías de ratas, después del aislamiento de
10 su madre y de sus compañeros de camada, y
sometidos a una variedad de estímulos
ambientales (por ejemplo, temperatura fría) ha
probado ser un método sensible para la
evaluación de compuestos ansiolíticos y
15 ansiogénicos potenciales (Winslow and Insel,
1991, Psychopharmacology, 105:513-520). Los
compuestos psicoactivos que se supone que son
ansiolíticos, suprimen la frecuencia de las
llamadas ultrasónicas, mientras que las llamadas
20 se incrementan con fármacos que tengan
propiedades ansiogénicas. De manera más
importante, el paradigma de la vocalización
ultrasónica inducida por el aislamiento, parece
ser el más sensible para detectar propiedades
25 ansiolíticas a través de un amplio espectro de

clases de fármacos, tales como las benzodiazepinas, los inhibidores de la recaptación del 5-HT, los agonistas del 5-HT_{1A} así como los antagonistas NMDA. En la presente
5 investigación, el metabolito 6-hidroxilado de la buspirona, BMY 28674, que tiene afinidad por el receptor 5-HT_{1A} humano ($K_i=57$ nM) se evaluó respecto a su actividad ansiolítica potencial usando crías de rata de 9 a 11 días de edad que
10 habían sido separadas de su madre y compañeros y puestos en una placa fría (18-20°C) para producir vocalizaciones ultrasónicas inducidas por la aflicción. Ver la figura 1. La figura 2 muestra los resultados obtenidos por la
15 buspirona en este método de análisis.

La administración de BMY 28674 (0.03-1 mg/kg, subcutáneamente; figura 1) 30 minutos antes del análisis, produjo una eliminación dependiente de la dosis, de la vocalización
20 ultrasónica de las crías de rata sobre la placa fría [$F(4,45)=19.27, p=0.0001$]. La dosis de BMY 28674 predicha para reducir el número de llamadas en un 50% (ID_{50}) fue de 0.13 mg/kg. La actividad locomotora también se deterioró
25 significativamente seguido de BMY 28674

153
126

[F(4,45)=5.85, p=0.007]. Sin embargo, la dosis ID₅₀ (0.41 mg/kg) de BMY 28674 estimada para reducir la actividad locomotora fue de aproximadamente 3 veces mayor que la dosis ID₅₀ 5 (0.13 mg/kg) observada para eliminar las llamadas ultrasónicas, sugiriendo que, al igual que la buspirona, las propiedades ansiolíticas del BMY 28674 ocurren a menores dosis.

La administración de buspirona (0.03-1 10 mg/kg, subcutáneamente; Figura 2) 30 minutos antes del análisis, produjo una eliminación dependiente de la dosis de la vocalización ultrasónica de las crías de rata sobre la placa fría [F(4,42)=15.44, p=0.0001]. La dosis de 15 buspirona predicha para reducir el número de llamadas en un 50% (ID₅₀) fue de 0.10 mg/kg. La actividad locomotora se vio también deteriorada [F(4,42)=4.343, p=0.005] aproximadamente a dosis 5 veces mayores que aquellas que eliminan las 20 llamadas ultrasónicas.

Los presentes resultados demuestran que, al igual que la buspirona, el metabolito BMY 28674 produce una actividad similar a la ansiolítica en el modelo de ansiedad con 25 vocalización ultrasónica inducida por el

aislamiento de crías de rata. La actividad ansiolítica asociada con el BMY 28674 (y la buspirona) ocurrió a dosis mucho menores que las requeridas para eliminar la actividad motora. En
5 resumen, los análisis *in vitro* e *in vivo*, precedentes, demuestran resultados del análisis en contra de la ansiedad, positivos, tanto para la buspirona como para el BMY 28674; sin embargo, las concentraciones a nivel sanguíneo
10 de buspirona son pequeñísimas seguidas a la administración oral a sujetos humanos. Antes del presente trabajo no existía información concerniente a las concentraciones a nivel sanguíneo, clínicas, de BMY 28674.

15 Se han realizado estudios farmacocinéticos en humanos y han producido resultados sorprendentes que respaldan además el papel del BMY 28674 como el metabolito ansiolítico activo.

20 Se administró buspirona, oralmente, durante 25 días, a sujetos humanos (n=13) con dosis diarias totales que variaban de 10 mg a 60 mg. El esquema de dosificación se dividió en intervalos de dosificación de 5 días,
25 incrementando la dosificación BID en cada

intervalo. Se realizaron mediciones farmacocinéticas en el día 5 de cada intervalo y estos datos se usaron para evaluar la farmacocinética de la buspirona, del 1-PP, y del 5 BMY 28674. El esquema de dosificación en humanos se presenta a continuación.

Intervalo de dosificación	Dosis BID (mg) de buspirona	Medición de PK (día de estudio)
1	5	5
2	7.5	10
3	15	15
4	20	20
5	30	25

10

Se encontró que estas dosis múltiples de buspirona oral a los niveles de 5 dosis eran seguras y en general bien toleradas por los adultos saludables que participaron en el estudio de 25 días.

15

Las figuras 3, 4 y 5 muestran concentraciones promedio del nivel sanguíneo, de

buspirona, 1-PP y BMY 28674, respectivamente, a través de un período de dosificación de 12 horas en el último día de cada intervalo de dosificación. Los niveles de buspirona (figura 3) son en general muy bajos (de aproximadamente 1-2 ng/mL a las dosis mayores) y descienden hasta niveles de menos de 1 ng/mL dos horas después de la dosis. En contraste, los niveles de 1-PP (figura 4) y los niveles de BMY 28674 (figura 5) son mucho mayores y son sostenidos en comparación a los de buspirona. El BMY 28674 tiene concentraciones varias veces mayores que el 1-PP y concentraciones de aproximadamente 30 a 40 veces mayores que la buspirona.

Hasta ahora, los estudios indican que después de la administración oral de buspirona, existen niveles sanguíneos del metabolito, el BMY 28674, que son significativos comparados con los niveles sanguíneos despreciables de buspirona que se observan. Aunque se ha demostrado que la buspirona misma tiene propiedades ansiolíticas, en modelos de análisis tales como el modelo VUS en cría de rata descrito en la presente, las bajas concentraciones a nivel sanguíneo, observadas en

humanos, conducen a la conclusión de que es el abundante metabolito BMY 28674 el que media el efecto contra la ansiedad observado clínicamente. Antes de esta presente evaluación de los metabolitos de la buspirona, la relativa abundancia del BMY 28674 en humanos después de la administración oral de buspirona, no era conocida.

Aunque es evidente que el BMY 28674 puede como tal administrarse para conseguir un efecto ansiolítico, la administración oral de su precursor, la buspirona, realizada bajo condiciones apropiadas, puede ofrecer también un método mejorado para introducir el BMY 28674 al sistema de un paciente con ansiedad. Para obtener una mejor definición de estas condiciones, se realizaron experimentos del metabolismo *in vitro* para estudiar el metabolismo Microsómico del Hígado Humano (HLM), de la buspirona. Se seleccionaron preparaciones de HLM de múltiples donadores, seleccionadas en base a sus actividades enzimáticas del CYP3A4. Las preparaciones HLM se compraron a Gentest Corporation (Woburn, MA: Catalog #'s H023, H056, H070, H093 and H112), quienes caracterizaron las

preparaciones HLM utilizando procedimientos estándares. Además de la medición de la pérdida del compuesto original en las incubaciones, también se midieron los niveles del metabolito

5 BMY 28674.

El primer conjunto de experimentos midió la correlación observada en la figura 6 entre la actividad específica del CYP3A4 en preparaciones HLM y el metabolismo de la buspirona y la

10 producción del metabolito. Una sola concentración de buspirona- C^{14} 10 μ M) se incubó con 5 preparaciones HLM de hígados de cinco donadores. Las incubaciones se realizaron por 15 minutos con 0.5 mg/ml de proteína microsómica y

15 se utilizaron como un sistema generador NADPH. Los niveles de buspirona- C^{14} y BMY 28674, en las muestras de incubación, fueron determinados mediante HPLC de fase inversa, utilizando detección de radiactividad en línea y por

20 comparación con estándares auténticos. Se obtuvo la recuperación cuantitativa de C^{14} . La relación de la concentración de BMY 28674 respecto a buspirona, contra la actividad específica del CYP3A4 medida en preparaciones HLM de hígados de

25 cinco donadores, se presenta en la figura 6

B9
132

(media de dos determinaciones separadas). Estos resultados muestran que la relación de BMV 28674 a buspirona, se incrementa a medida que se incrementa la actividad específica del CYP3A4 en 5 HLM. El cambio en la relación a medida que se incrementa la actividad del CYP3A4, se observa tanto como un incremento en los niveles de BMV 28674 como por una disminución en las concentraciones de buspirona (no se muestran los 10 resultados).

Se realizó un segundo conjunto de incubaciones para determinar el potencial de un inhibidor del CYP3A4 para alterar la relación de BMV 28674 a buspirona en incubaciones de HLM. 15 Una sola concentración de buspirona- C^{14} (10 μ M) se incubó con HLM de fondo (reunida a través de la combinación de volúmenes iguales de los hígados de cinco donadores, descrito anteriormente). A las incubaciones se adicionó, 20 a diferentes concentraciones, cetoconazol, un inhibidor del CYP3A4 bien caracterizado. Todas las otras condiciones de incubación, así como el análisis de las muestras, fueron como se describieron anteriormente. En la ausencia de 25 cetoconazol, después de la incubación de

buspirona por 15 minutos, con el HLM recolectado, la proporción de BMY 28674 respecto a la buspirona, fue de 0.42 (Tabla 2). No se observó efecto alguno en el metabolismo de la buspirona, a concentraciones de cetoconazol de hasta 0.125 μM . A 0.25 μM de cetoconazol, la proporción de 6' hidroxibuspirona respecto a la buspirona, se redujo hasta 0.32. A las mayores concentraciones de cetoconazol, de 1.25 μM y 2.5 μM , la proporción de BMY 28674 respecto a la buspirona se redujo adicionalmente hasta 0.06 y 0.01, respectivamente. Estos resultados muestran que cuando el cetoconazol se incubaba conjuntamente con la buspirona, en HLM recolectado, la proporción de BMY 28674 respecto a buspirona, disminuye a medida que la concentración del inhibidor del CYP3A4, el cetoconazol, se incrementa. El cambio en la proporción cuando se incrementa la concentración de cetoconazol, se observa tanto por una reducción en los niveles de BMY 28674 como un incremento en las concentraciones de buspirona sin cambios.

141
134

Tabla 2

Inhibición del Metabolismo de la
Buspirona por el Cetoconazol

5

[cetoconazol]	[buspirona]	[BMY 28674]	[BMY 28674/ buspirona]
(μ M)	(CPM relativa)		(Proporción)
0	20054	8400	0.42
0.025	18645	7884	0.42
0.125	19648	8201	0.42
0.25	21957	7052	0.32
1.25	36117	2111	0.06
2.5	43712	576	0.01

En resumen, estos experimentos *in vitro*
10 muestran la dependencia tanto del metabolismo de
la buspirona como de la aparición del metabolito
BMY 28674 en la actividad del CYP3A4 en el
hígado humano.

Un objeto de esta invención es
15 proporcionar un método mejorado para producir
una respuesta ansiolítica en pacientes con

ansiedad. Este objeto se consigue proporcionando niveles sanguíneos, efectivos contra la ansiedad, de BMY 28674 en pacientes con ansiedad. El medio más evidente para conseguir esto sería a través de la administración sistémica del BMY 28674 como tal, al paciente. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención concierne al proceso para mejorar un estado de ansiedad en un mamífero que necesite de ese tratamiento, a través de la administración sistémica de una dosis de BMY 28674, efectiva contra la ansiedad.

Una dosis efectiva deberá, en general, proporcionar concentraciones mínimas a nivel sanguíneo (CMIN) de BMY 28674, que sean al menos de 1 a 2 ng/mL. Generalmente, el punto de medición para los niveles CMIN es a las 12 horas después de la dosis; es decir, justo antes de la próxima dosis BID. El BMY 28674 se puede administrar a través de una variedad de rutas que incluyen, aunque no se limitan a, la oral; sublingual; bucal; transnasal; o parenteral, por ejemplo intramuscular, intravenosa, subcutánea, etc.

Terapéuticamente, el BMY 28674 puede

43
135

proporcionarse por una de estas rutas, como una formulación compuesta de una cantidad de BMY 28674 efectiva contra la ansiedad o una de sus sales de adición de ácido o un hidrato, 5 farmacéuticamente aceptables, en un portador farmacéuticamente aceptable. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que proporcionan desde aproximadamente 5 a 50 mg del ingrediente activo por dosis unitaria y se pueden preparar 10 convencionalmente como soluciones acuosas y como suspensiones acuosas o aceitosas. El BMY 28674 puede darse también oralmente cuando se compone en una formulación para dosificación oral, tal como una tableta, píldora, cápsula, jarabe, 15 elixir, solución acuosa o suspensión.

Las sales de adición de ácido, farmacéuticamente aceptables, del BMY 28674, también se consideran también útiles como agentes ansiolíticos. Por definición, estas son 20 aquellas sales en las que el anión no contribuye significativamente a la toxicidad o actividad farmacológica de la forma básica del BMY 28674.

Las sales de adición de ácido se obtienen, ya sea por reacción del BMY 28674 con 25 un ácido orgánico o inorgánico, preferentemente

✓
137

por contacto en solución, o a través de cualesquiera de los métodos estándares detallados en la literatura y disponibles para cualquier experimentado en la técnica. Ejemplos

5 de ácidos orgánicos útiles son los ácidos carboxílicos tales como el ácido maleico, ácido acético, ácido tartárico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido isetiónico, ácido succínico, ácido pamoico y similares; los ácidos

10 inorgánicos útiles son los ácidos hidrácidos tales como el HCl, HBr, HI; ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y similares.

Las composiciones orales preferidas se encuentran en la forma de tabletas o cápsulas y

15 además del BMY 28674 puede contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes (por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona), materiales de relleno (por ejemplo, lactosa,

20 azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice), desintegrantes (por ejemplo, almidón) y agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato

25 de sodio). Las soluciones o suspensiones de BMY

28674 con los vehículos farmacéuticos convencionales, se emplean para composiciones parenterales tales como una solución acuosa para inyección intravenosa o una suspensión aceitosa para inyección intramuscular. Esas composiciones que tienen la claridad, estabilidad y adaptabilidad deseadas para el uso parenteral, se obtienen disolviendo de 0.1% a 10% en peso del ingrediente activo (BMY 28674 o una sal de adición de ácido o hidrato, farmacéuticamente aceptable, del mismo) en agua o un vehículo que consista de un alcohol alifático polihídrico tal como la glicerina, propilenglicol y polietilenglicoles o mezclas de los mismos. Los polietilenglicoles consisten de una mezcla de polietilenglicoles, normalmente líquidos, no volátiles, que son solubles tanto en agua como en líquidos orgánicos y que tienen pesos moleculares desde aproximadamente 200 hasta 1500.

El BMY 28674 se puede sintetizar mediante métodos fácilmente disponibles en la literatura química y conocidos por los experimentados en la química de síntesis orgánica. Un método de preparación utiliza la

186
139

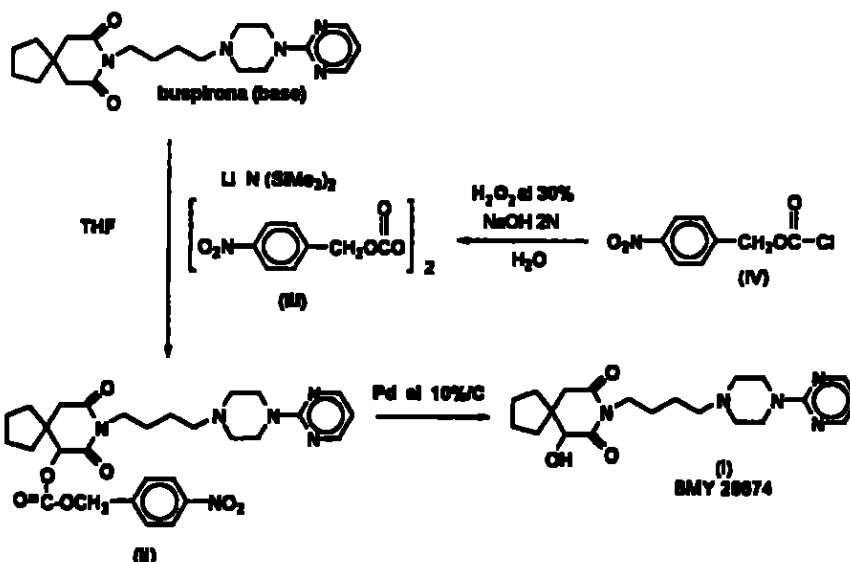
buspirona como un material de partida y el proceso se muestra en el Esquema 2.

5

Esquema 2

Preparación del BMY 28674

10



15

20 Este método de preparación se proporciona como un ejemplo auxiliar e ilustra una síntesis conveniente del BMY 28674.

Deberá apreciarse también que el BMY 28674 se puede obtener mediante la conversión
25 enzimática (microsomas del hígado de humano o

142
140

rata) de la buspirona, *in vitro*. (Ver: Jajoo, et al., Xenobiotica, 1990, Vol. 20, No. 8, pp. 779-786).

La administración sistémica puede
5 también conseguirse a través de un segundo
método para conseguir niveles sanguíneos
efectivos contra la ansiedad, de BMY 28674, el
cual consiste en administrar oralmente una forma
precursora del BMY 28674. Esas formas de
10 profármaco se administrarían en cantidades de
dosificación que produzcan efectos ansiolíticos
efectivos sin causar efectos secundarios dañinos
o adversos. Es decir, la administración
sistémica del BMY 28674 puede conseguirse
15 mediante la administración oral de un precursor
o forma de profármaco del BMY 28674, por ejemplo
la buspirona, a mamíferos.

Sin embargo, este método de introducción
sistémica del BMY 28674 es mejor y difiere del
20 método estándar conocido de administración oral
de la buspirona. El profármaco de buspirona se
utiliza en un método mejorado para efectuar la
ansiólisis en la presente invención. De esta
manera, otro aspecto de esta invención esta
25 enfocado a aliviar la ansiedad en un mamífero, a

través de un método mejorado de administración oral de buspirona. La mejora involucra la administración oral de buspirona en una manera tal que la producción metabólica del BMY 28674 sea favorecida, proporcionando por lo tanto al paciente, cantidades de BMY 28674 efectivas contra la ansiedad. Esto está en contradicción con los métodos de administración comúnmente aceptados, que están enfocados a maximizar los niveles sanguíneos de buspirona sin cambios. Como un ejemplo, la guía de dosificación ha descrito en el pasado que si la buspirona se administra bajo condiciones que favorezcan la inhibición de su metabolismo, es decir, en donde resultarán mayores niveles de buspirona sin cambios y menores niveles del metabolito, deberá reducirse la dosis de buspirona. El método mejorado está directamente en contra al método del pasado de administrar oralmente la buspirona. En lugar de reducir la dosis de buspirona cuando se inhibe su metabolismo, la dosis de buspirona deberá incrementarse para conseguir niveles apropiados del BMY 28674. No existe correlación específica de efectos adversos serios con cantidades crecientes de la

buspirona ingerida.

En resumen, el segundo aspecto de la presente invención concierne a un proceso mejorado para aliviar un estado de ansiedad indeseable, en un mamífero, mediante la administración oral de buspirona, o de una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable de la misma, en una manera que favorezca la producción metabólica de BMY 28674 en el mamífero. En general, la cantidad de buspirona, que se va a proporcionar, es una dosis que da por resultado una concentración sanguínea mínima (CMIN) de 1 a 2 ng/mL de BMY 28674. Las determinaciones de CMIN en pacientes son realizadas usualmente dos horas después de una dosis del fármaco y justo antes de la próxima dosis.

Un ejemplo de un factor que afecta la producción metabólica del BMY 28674, es el efecto del alimento en la dosificación oral de buspirona. De acuerdo con el instructivo de uso para el BUSPAR^(R) (tabletas orales de Clorhidrato de buspirona), se hace la sugerencia implícita de que se tome la buspirona con alimentos, para incrementar la concentración plasmática de

buspirona sin cambios.

Un segundo ejemplo de una modificación de dosificación descrita en el instructivo de uso del BUSPAR^(R) es la recomendación de
5 disminuir la dosificación de buspirona cuando se administre en combinación con un inhibidor del CYP3A4.

Para propósitos del método mejorado para aliviar un estado de ansiedad indeseable,
10 mediante la administración oral de buspirona, los ejemplos precedentes hacen descripciones apartadas del método mejorado de la presente invención. En lugar de dosificar buspirona en las comidas, la dosificación deberá ocurrir
15 aproximadamente dos horas o más, antes o después de una comida. De manera similar, en el caso de un funcionamiento reducido del citocromo P450 3A4 (CYP3A4), la dosis de buspirona deberá incrementarse y no reducirse, tal como los
20 describe el instructivo de uso del BUSPAR^(R).

Otras modificaciones de la dosificación, contempladas por el método ansiolítico mejorado, involucran la introducción sistémica del BMV 28674 a través de la administración oral de
25 buspirona, y comprenden las siguientes.

TS
144

- Administrar buspirona oral coincidiendo con períodos diurnos de la actividad máxima del CYP3A4 en el mamífero.

- Descontinuar los medicamentos o
5 productos alimenticios, concomitantes, que inhiban la actividad del CYP3A4.

- Incrementar la dosis de buspirona para ajustar la actividad reducida del CYP3A4, cuando la suspensión del medicamento concomitante que
10 inhiba la actividad del citocromo sea médicamente impráctica.

En resumen, la administración oral de buspirona a un paciente con ansiedad, se
15 modifica en cierta manera y hasta cierto punto, de conformidad con la buena práctica médica, de manera tal que se favorezca la producción metabólica del BMY 28674. Manteniendo la buena práctica clínica, es preferente administrar el
20 BMY 28674, o una forma precursora, a niveles de concentraciones que produzcan efectos ansiolíticos efectivos sin causar efectos secundarios dañinos o adversos.

182
145DESCRIPCION DE MODALIDADES ESPECIFICAS

El compuesto cuyo uso constituye esta invención, y su método de preparación, serán evidentes de manera más completa a la luz de los siguientes ejemplos que se presentan con el propósito de ilustración únicamente y no deben considerarse como limitantes de la invención en su esfera de aplicación o alcance.

10

Ejemplo 1: Preparación del BMY 28674 (I)A. Peroxidicarbonato de di-4-nitrobencilo (III)

15 Se preparó peroxidicarbonato de di-4-nitrobencilo, usando una modificación del procedimiento de la literatura¹. De esta manera, a una solución enfriada con hielo de cloroformiato de 4-nitrobencilo (10.11 gramos, 20 4.7 milimoles) en acetona (20 mL) se adicionó por goteo durante 30 min una mezcla enfriada con hielo de H₂O₂ al 30% (2.7 mL, 24 mmol) y NaOH 2.35 N (20 mL, 47 mmol). La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 minutos y luego se 25 filtró y la torta del filtro se lavó con agua y

luego con hexano. El sólido mojado resultante se recogió en diclorometano, la solución se secó (Na_2SO_4) y luego se diluyó con un volumen igual de hexano. La concentración de esta solución, a 5 20 °C, en un evaporador giratorio, dio un precipitado cristalino que se filtró, se lavó con hexano y se secó in vacuo para dar el compuesto III (6.82 gramos, 74%) como microcristales de color amarillo pálido, punto 10 de fusión de 104 °C (con descomposición).

Se encontró que el peroxidicarbonato de di-4-nitrobencilo era un material relativamente estable que se descomponía al alcanzar su punto de fusión, con lenta emanación de gas. En 15 comparación, el peroxidicarbonato de dibencilo² se descompuso con una vigorosa expulsión repentina de material, del capilar para punto de fusión.

20 B. 6-(4-Nitrobencil peroxidicarbonatil)-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-butil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona(II)

A una solución de 8-[4-[4-(2- 25 pirimidinil)-piperazinil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-

154
147

diona (buspirona: 10 gramos, 26 milimoles) en THF seco (250 mililitros) se adicionó $\text{LiN}(\text{Me}_3\text{Si})_2$ (28.5 mililitros de una solución 1 M de THF) a -78°C y se agitó durante 3 horas y luego se
5 adicionó una solución de peroxidicarbonato de di-4-nitrobencilo (11.2 gramos) en THF seco (150 mililitros), gota a gota, durante 1 hora. Se continuó la agitación a -78°C por una hora.

El baño de enfriamiento se retiró y la
10 solución de reacción se vertió en una mezcla de H_2O y EtOAc. La fase orgánica se separó y se lavó con H_2O y luego con salmuera. La base orgánica se secó y luego se evaporó hasta producir un aceite viscoso. La cromatografía
15 instantánea de este aceite, eluyendo la columna de sílice con MeCN-EtOAc (1:2) dio el producto crudo el cual se lavó con acetona, para eliminar la buspirona que no había reaccionado, dejando 6.23 gramos de un sólido blanco (46%) del
20 producto (II).

¹ F. Strain, et al., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1254

² Cj. M.P. Gore, J.C. Vederas, J. Org. Chem.,
25 1986, 51, 3700

C. 6-Hidroxi-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-butilo]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona
(I; BMY 28674)

5 Se hidrogenó una mezcla de II (4.0 gramos; 6.9 milimoles) y Pd al 10%/C (aproximadamente 1 gramo) en MeOH (100 mililitros) en un agitador Parr a 2.81-3.16 kg/cm² (40-45 psi) durante 1 hora. La mezcla de
10 hidrogenación se filtró a través de una almohadilla de celita la cual se lavó luego con EtOAc. El filtrado se evaporó hasta producir una goma que se purificó mediante cromatografía instantánea a través de una columna de gel de
15 sílice eluyendo con EtOAc para dar 0.41 gramos de un sólido blanquecino (I).

Análisis calculado para C₂₁H₃₁N₅O₃:
C, 62.82; H, 7.78; N, 17.44.

Encontrado: C, 62.84; H, 7.81; N, 17.33

20

Ejemplo 2: Ensayo de Enlazamiento al Receptor 5-HT1A

25 Se preparan membranas para el enlazamiento, usando el receptor 5-HT1A humano

expresado en células HEK293. Las células se recolectaron y rompieron usando un homogeneizador Dounce. Las células se centrifugan a 18000xg durante 10 minutos y la
5 masa pelotiforme se vuelve a suspender en una solución reguladora para ensayo, se congela en nitrógeno líquido y se mantiene a -80 °C hasta el día del ensayo.

Se usa un total de 30 µgramos de
10 proteína por pozo. El análisis se lleva a cabo en placas de 96 pozos profundos. La solución reguladora para análisis es HEPES 50 mM que contiene MgCl₂ 2.5 mM y EGTA 2 mM. La preparación de membrana se incuba a 25°C durante
15 60 minutos con 0.1 nM a 1000 nM, del compuesto de análisis y 1 nM de 3H-8-OH-DPAT. La serotonina 10 mM sirve como agente bloqueador para determinar el enlazamiento no específico. La reacción se finaliza mediante la adición de 1
20 mililitro de solución reguladora de HEPES 50 mM enfriada con hielo y la filtración rápida a través de un Recolector de Células Brandel usando filtros Whatman GF/B. Las almohadillas del filtro se cuentan en un contador de
25 escintilación de líquidos LKB Trilux. Los

expresado en células HEK293. Las células se recolectaron y rompieron usando un homogeneizador Dounce. Las células se centrifugan a 18000xg durante 10 minutos y la
5 masa pelotiforme se vuelve a suspender en una solución reguladora para ensayo, se congela en nitrógeno líquido y se mantiene a -80 °C hasta el día del ensayo.

Se usa un total de 30 µgramos de
10 proteína por pozo. El análisis se lleva a cabo en placas de 96 pozos profundos. La solución reguladora para análisis es HEPES 50 mM que contiene MgCl₂ 2.5 mM y EGTA 2 mM. La preparación de membrana se incuba a 25°C durante
15 60 minutos con 0.1 nM a 1000 nM, del compuesto de análisis y 1 nM de 3H-8-OH-DPAT. La serotonina 10 mM sirve como agente bloqueador para determinar el enlazamiento no específico. La reacción se finaliza mediante la adición de 1
20 mililitro de solución reguladora de HEPES 50 mM enfriada con hielo y la filtración rápida a través de un Recolector de Células Brandel usando filtros Whatman GF/B. Las almohadillas del filtro se cuentan en un contador de
25 escintilación de líquidos LKB Trilux. Los

187
150

valores IC₅₀ se determinan usando regresión no lineal mediante el ajuste con Excel.

5 Ejemplo 3: Análisis de la Vocalización
Ultrasónica Inducida por el Aislamiento de Crías
de Rata

Crías de rata Harlan Sprague-Dawley
10 (hembras y machos) se alojaron en jaulas de
policarbonato con la madre, hasta una edad de 9
a 11 días. Treinta minutos antes del análisis se
retiraron las crías de la madre, se colocaron en
una nueva jaula con una pequeña cantidad de
15 trapos caseros y se llevaron al laboratorio y se
pusieron bajo una luz para mantener la
temperatura corporal a 37°C. Luego se pesaron
las crías, se les determinó el sexo, se marcaron
y se regresaron al grupo de la camada hasta la
20 evaluación del comportamiento. El análisis se
llevó a cabo en una cámara de registro Plexiglas
que contenía una placa metálica mantenida a (18
a 20°C) con una cuadrícula de 5x5 centímetros
dibujada sobre la placa. Se suspendió un
25 micrófono 10 centímetros por encima de la placa

para registrar las vocalizaciones ultrasónicas. Las llamadas ultrasónicas se registraron usando el sistema UltraVox de Noldus proporcionando análisis en línea de la frecuencia y duración de las llamadas. El número de celdas de la cuadrícula por las que cruzaron las crías, se recavó también mediante puntuación visual. Las crías que fallaron en emitir al menos 60 llamadas durante una sesión de 5 minutos, previa al análisis, se excluyeron de la evaluación farmacológica. Inmediatamente después de la reunión de las mediciones de línea base se inyectaron las crías con el vehículo o fármaco, subcutáneamente, en el cogote del cuello y se regresaron a sus compañeros de camada. Treinta minutos después se volvieron a analizar las crías respecto a cada una de las mediciones dependientes (vocalización y cruces por celdas de la cuadrícula) para evaluar los efectos del fármaco. Al menos que se especifique de otra manera, cada cría se usó únicamente una vez. Las diferencias de línea base y el cambio porcentual respecto a la línea base, para la frecuencia de vocalizaciones ultrasónicas y los cruces por las celdas de la cuadrícula, se analizaron usando

ANOVA de una vía. Se realizaron comparaciones pos hoc de Bonferroni/Dunn para evaluar los efectos agudos del fármaco con el control del vehículo. Se usó el análisis Logaritmo próbit para estimar la dosis (miligramos por kilogramo) de cada agonista, predicha para inhibir las vocalizaciones ultrasónicas inducidas por el aislamiento, en un 50% (ID₅₀). Todas las comparaciones se realizaron con una tasa de error tipo I experimental (α) ajustado a 0.05.

Las dosis para cada fármaco se administraron en un orden irregular a través de varias camadas. El BMY 28674 y la buspirona se disolvieron en solución salina fisiológica (NaCl al 0.9%; vehículo). Todas las inyecciones se administraron subcutáneamente en un volumen de 10 ml/kg. Las dosis de los fármacos se refieren al peso de la sal.

20

Ejemplo 4: Estudios del Metabolismo In Vitro:
Conversión de la Buspirona en BMY 28674

• las preparaciones de HLM de 5 donadores se seleccionaron en base a sus

25

actividades de la enzima P450 en el citocromo CYP3A4.

• La buspirona- C^{14} (10 μ M) se incubó con preparaciones de HLM de hígados de cinco donadores (15 minutos con 0.5 mg/ml de proteína microsómica).

• Los niveles de buspirona- C^{14} y BMY 28674 en las muestras de incubación se determinaron mediante HPLC de fase inversa, utilizando detección de radiactividad en línea y por la comparación con estándares auténticos.

• Se realizó un segundo conjunto de incubaciones para determinar el potencial del cetoconazol (un inhibidor del CYP3A4) para alterar la proporción de BMY 28674 respecto al BUSPAR^(R) en incubaciones con HLM.

• La buspirona- C^{14} (10 μ M) se incubó con HLM reunido de varios donadores (15 minutos con 0.5 mg/ml de proteína microsómica).

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para aliviar un estado de
ansiedad, indeseable, en un mamífero, que
5 comprende la administración sistémica al
mamífero, de una dosis ansiolítica, efectiva
pero no tóxica, de 6-hidroxi-8-[4-[4-(2-
pirimidinil)-piperazinil]-butil]-8-
azaspiro[4.5]-7,9-diona o una sal de adición de
10 ácido o hidrato, farmacéuticamente aceptable, de
la misma.

15

20

25

155

RESUMEN DE LA INVENCION

La 6-hidroxi-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-
5 piperazinil]-butil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona y
sus sales e hidratos farmacéuticamente
aceptables, son útiles en el alivio de la
ansiedad.

10

15

20

25

163
156

DECLARACION Y PODER DEL ABOGADO PARA SOLICITUDES DE PATENTE

Como el inventor nombrado abajo, yo declaro que:
Mi residencia, dirección de oficina postal y ciudadanía son como se establece abajo enseguida a mi nombre.
Y yo creo que soy el original, primero y único inventor de la materia objeto la cual se reclama y para la cual se busca una patente en la invención titulada:

METODO MEJORADO PAR ALIVIAR LA ANSIEDAD

la especificación de la cual

☒ se anexa a la misma
☐ fue presentada en _____ como Solicitud SerieNo. _____,

Yo declaro que he revisado y entendido los contenidos de la especificación arriba identificada, incluyendo las reivindicaciones, como se enmendaron mediante cualquier enmienda referida arriba.

Y yo designo a Aldo A. Algieri, Reg. No. 31,697, Samuel J. DuBoff, Reg. No. 25,969, Shah R. Makujina, Reg. No. 41,174, David M. Morse, Reg. No. 25,742, y Richard P. Ryan, Reg. No. 30,491, Post Office Box 5100, Wallingford, CT 06492-7660; todos de Bristol-Myers Squibb Company, mis agentes y/o apoderados para continuar con esta solicitud y para negociar todos los negocios en la Oficina de Marcas y Patentes conectadas con esta. Por favor dirigir la correspondencia concerniente a esta solicitud a: David M. Morse, Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 5100, Wallingford, CT 06492-7660.

Yo conozco las obligaciones en relación a la descripción de la información que es material para el examen de esta solicitud de acuerdo con el Título 37 C.F.R. sección 1.56(a).

Yo reclamo los beneficios de la prioridad extranjera bajo el Título 35, U.S.C. sección 119, de cualquier solicitud(es) extranjera(s) para el certificado de inventor o patente dictado abajo y también identificado abajo para cualquier solicitud extranjera para certificado de inventor o patente tenga una fecha de presentación antes que la solicitud en la cual se reclama prioridad:

SOLICITUDES EXTRANJERAS ANTERIORES **Prioridad Reclamada**

<u>Ninguno</u> Número	<u>País</u>	<u>Día/MES/Año Presentado</u>	SI/NO
--------------------------	-------------	-------------------------------	-------

Yo reclamo mediante el beneficio del Título 35, U.S.C. sección 120 de todas las solicitudes de los Estados Unidos listadas abajo y, hasta también cualquier materia objeto de cada una de las reivindicaciones de esta solicitud que no este descrita en la solicitud de Estados Unidos previa de la manera provista por el primer párrafo del Título 35 U.S.C. sección 112, Yo reconozco la obligación de describir la información del material como se definió en el Título 37 C.F.R. sección 1.56(a) que ocurrió entre la fecha de presentación de la solicitud anterior y la fecha de presentación de la solicitud internacional del PCT o nacional de esta solicitud:

<u>09/368,842</u>	<u>8/5/1999</u>	<u>pendiente</u>
(Solicitud Serie No.)	(Fecha de presentación)	(Estado)
		pendiente, abandonada, patentada
<u>09/484,161</u>	<u>1/18/2000</u>	<u>pendiente</u>
(Solicitud Serie No.)	(Fecha de presentación)	(Estado)
		pendiente, abandonada, patentada

Yo declaro mediante esto que todas las declaraciones hechas aquí de mi propio conocimiento son verdaderas y que todas las declaraciones hechas sobre la información y creencias se cree que son verdaderas; y además de que estas declaraciones fueron hechas con el conocimiento que las declaraciones efectuadas en falsedad o similares son perseguibles mediante multas o prisión, o ambos, bajo la Sección 1001 del Título 18 del Código de los Estados Unidos y que tales declaraciones falsas por voluntad pueden poner en riesgo la validez de la solicitud o cualquier patente expedida en relación a la misma.

Nombre completo del primer inventor: Robert F. Mayol

Firma del Inventor: _____ Fecha: 6/2/2000

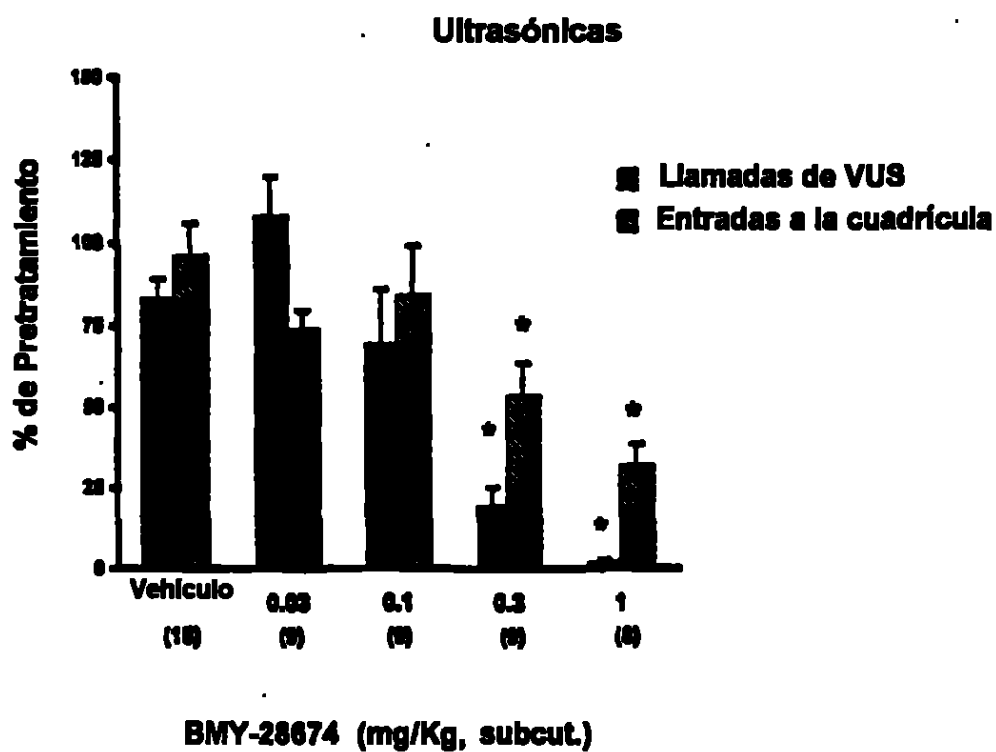
Residencia: Durham, CT

Ciudadanía: U.S.A Ocupación: Químico

Dirección de la Oficina Postal : 56 Green Lane
Durham, CT 06422

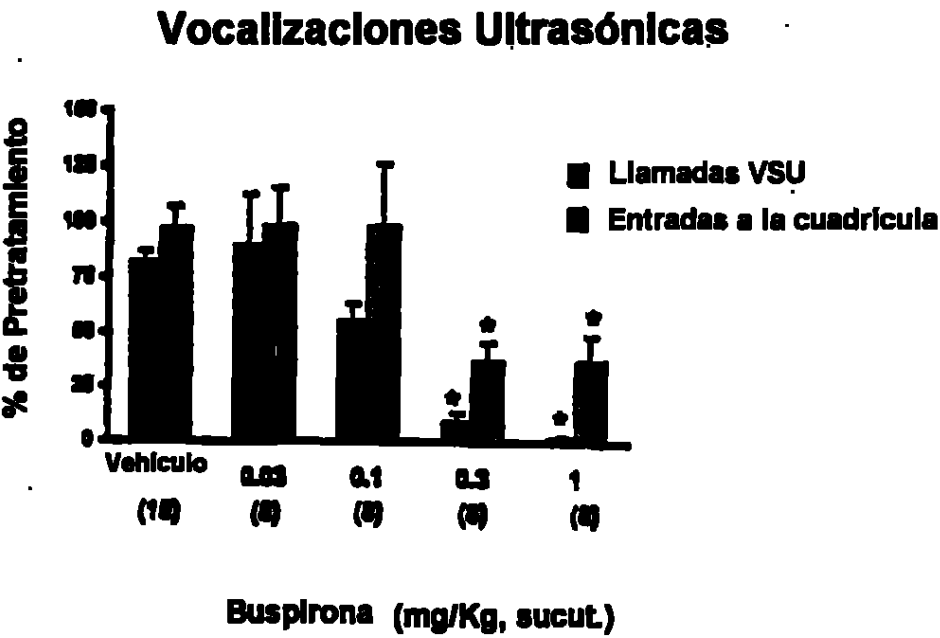
65
158

Figura 1
Efecto del BMY-28674 en la vocalización ultrasónica inducida
por el aislamiento y en la actividad locomotora, en la cría de rata.



* $p < 0.05$ versus Vehículo
(No. de animales por grupo)

Figura 2
Efecto de la Buspirona en la vocalización ultrasónica inducida por el aislamiento y en la actividad locomotora, en cría de rata



* $p < 0.05$ versus Vehículo
 (No. de animales por grupo)

FIGURA 3
CONCENTRACIONES DE BUSPIRONA A NIVEL SANGUÍNEO HUMANO, AL FINALIZAR LOS INTERVALOS DE
DOSIFICACIÓN DE BUSPIRONA DE 5 DÍAS EN UN RÉGIMEN DE PROPUESTAS

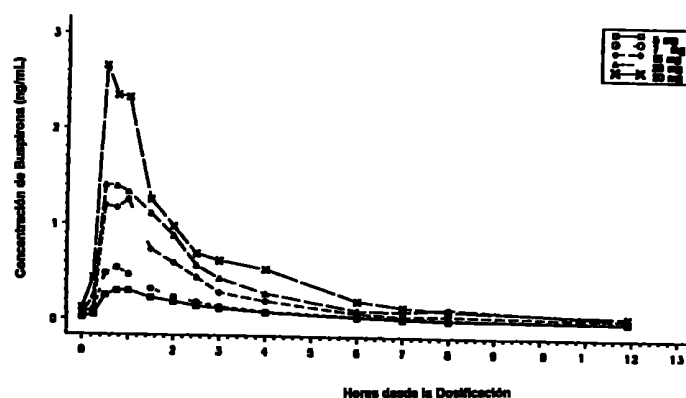
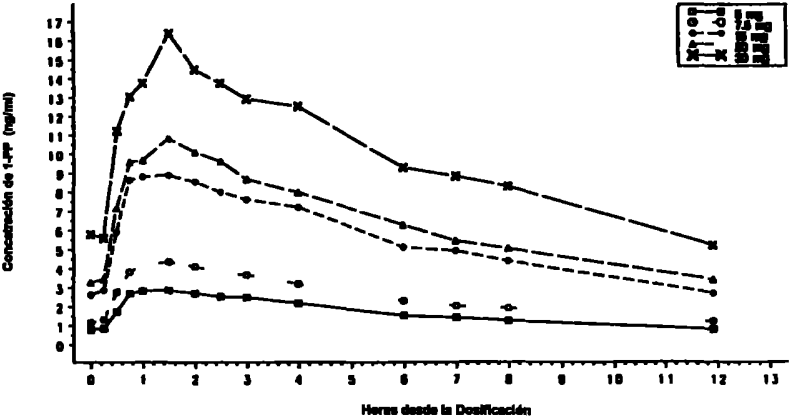


Figura 4 CONCENTRACIONES DE 1-PP A NIVEL SANGUÍNEO HUMANO AL FINALIZAR LOS INTERVALOS DE DOSIFICACIÓN DE BUSPIRONA DE 5 DÍAS EN UN RÉGIMEN DE PROPUESTAS



IGURA 6 CONCENTRACIONES DE BMY 28674 A NIVEL SANGUÍNEO HUMANO AL FINALIZAR LOS INTERVALOS DE DOSIFICACIÓN DE BUSPIRONA DE 6 DÍAS, EN UN RÉGIMEN DE DOSIFICACIÓN DE PROPUESTAS

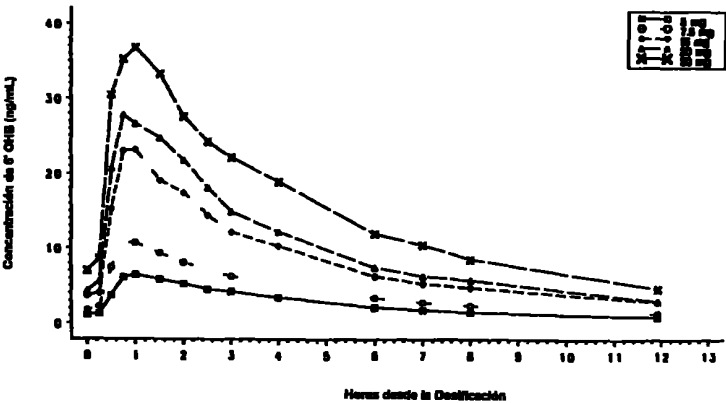
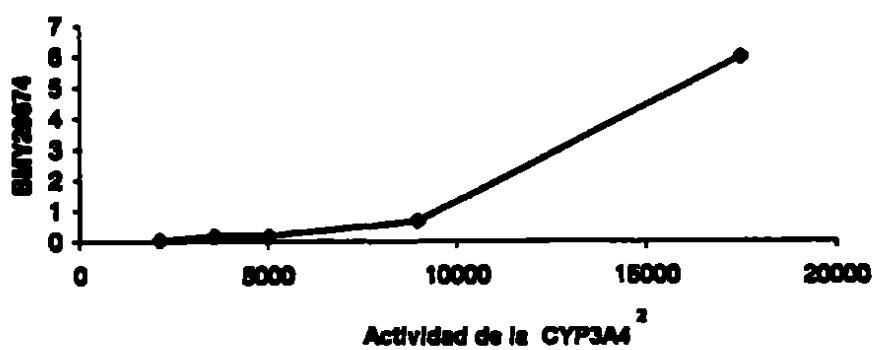


FIGURA 6
Estudio del Metabolismo In Vitro:
Metabolismo por HLM, de Buspirona en BMY28674¹



¹ media de dos determinaciones

² pmoles de 6-beta-OH-testosterona/minuta/mg de proteína microsómica

83458(12/2002)
16d

PA 327072



THE UNITED STATES OF AMERICA

TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE

United States Patent and Trademark Office

October 18, 2000

THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.

APPLICATION NUMBER: 09/484,161

FILING DATE: *January 18, 2000*



By Authority of the
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS

L. Edelen

L. EDELEN
Certifying Officer

1-19-00

15

UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL
(Large Entity)

(Only for new nonprovisional applications under 37 CFR 1.53(b))

Docket No.
CT2534ATotal Pages in this Submission
3**TO THE ASSISTANT COMMISSIONER FOR PATENTS**Box Patent Application
Washington, D.C. 20231

Transmitted herewith for filing under 35 U.S.C. 111(a) and 37 C.F.R. 1.53(b) is a new utility patent application for an invention entitled:

ANTIANXIETY AGENT

and invented by:

ROBERT F. MAYOL

If a **CONTINUATION APPLICATION**, check appropriate box and supply the requisite information:☐ Continuation ☒ Divisional ☐ Continuation-in-part (CIP) of prior application No.: 09/368,842

Which is a:

☐ Continuation ☐ Divisional ☐ Continuation-in-part (CIP) of prior application No.:

Which is a:

☐ Continuation ☐ Divisional ☐ Continuation-in-part (CIP) of prior application No.:

Enclosed are:

Application Elements☒ Filing fee as calculated and transmitted as described below2. ☒ Specification having 14 pages and including the following:

- a. ☒ Descriptive Title of the Invention
- b. ☒ Cross References to Related Applications (if applicable)
- c. ☐ Statement Regarding Federally-sponsored Research/Development (if applicable)
- d. ☐ Reference to Microfiche Appendix (if applicable)
- e. ☒ Background of the Invention
- f. ☒ Brief Summary of the Invention
- g. ☐ Brief Description of the Drawings (if drawings filed)
- h. ☒ Detailed Description
- i. ☒ Claim(s) as Classified Below
- j. ☒ Abstract of the Disclosure

166

UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL
(Large Entity)

(Only for new nonprovisional applications under 37 CFR 1.53(b))

Docket No.
CT2534A

Total Pages in this Submission
3

Application Elements (Continued)

3. ☐ Drawing(s) (when necessary as prescribed by 35 USC 113)

a. ☐ Formal Number of Sheets _____

b. ☐ Informal Number of Sheets _____

4. ☒ Oath or Declaration

a. ☐ Newly executed (original or copy) ☐ Unexecuted

b. ☒ Copy from a prior application (37 CFR 1.63(d)) (for continuation/divisional application only)

c. ☒ With Power of Attorney ☐ Without Power of Attorney

d. ☐ **DELETION OF INVENTOR(S)**

Signed statement attached deleting inventor(s) named in the prior application,
see 37 C.F.R. 1.63(d)(2) and 1.33(b).

5. ☒ Incorporation By Reference (usable if Box 4b is checked)

The entire disclosure of the prior application, from which a copy of the oath or declaration is supplied under Box 4b, is considered as being part of the disclosure of the accompanying application and is hereby incorporated by reference therein.

6. ☐ Computer Program in Microfiche (Appendix)

7. ☐ Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Submission (if applicable, all must be included)

a. ☐ Paper Copy

b. ☐ Computer Readable Copy (identical to computer copy)

c. ☐ Statement Verifying Identical Paper and Computer Readable Copy

Accompanying Application Parts

8. ☐ Assignment Papers (cover sheet & document(s))

9. ☐ 37 CFR 3.73(B) Statement (when there is an assignee)

10. ☐ English Translation Document (if applicable)

11. ☒ Information Disclosure Statement/PTO-1449 ☒ Copies of IDS Citations

12. ☒ Preliminary Amendment

13. ☒ Acknowledgment postcard

14. ☒ Certificate of Mailing

☐ First Class ☒ Express Mail (Specify Label No.): EL442237936US

167

UTILITY PATENT APPLICATION TRANSMITTAL (Large Entity) <i>(Only for new nonprovisional applications under 37 CFR 1.53(b))</i>	Docket No. CT2534A
	Total Pages in this Submission 3

Accompanying Application Parts (Continued)

15. ☐ Certified Copy of Priority Document(s) (if foreign priority is claimed)

16. ☒ Additional Enclosures (please identify below):

Petition to Make Special for Divisional Appln.

Fee Calculation and Transmittal

CLAIMS AS FILED

#For	#Filed	#Allowed	#Extra	Rate	Fee
Total Claims	1	- 20 =	0	x \$18.00	\$0.00
Indep. Claims		- 3 =	0	x \$78.00	\$0.00
Multiple Dependent Claims (check if applicable) ☐					\$0.00
BASIC FEE					\$890.00
OTHER FEE (specify purpose)					\$0.00
TOTAL FILING FEE					\$890.00

- ☐ A check in the amount of _____ to cover the filing fee is enclosed.
- ☒ The Commissioner is hereby authorized to charge and credit Deposit Account No. 023850 as described below. A duplicate copy of this sheet is enclosed.
- ☒ Charge the amount of \$890.00 as filing fee.
 - ☒ Credit any overpayment.
 - ☒ Charge any additional filing fees required under 37 C.F.R. 1.16 and 1.17.
 - ☐ Charge the issue fee set in 37 C.F.R. 1.16 at the mailing of the Notice of Allowance, pursuant to 37 C.F.R. 1.311(b).

Richard P. Ryan
Signature

Dated: 18 Jan. 2000

CC:

125
168

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicants: Robert F. Mayol
Serial No.: To be assigned
Filed: To be assigned
For: Antianxiety Agent

Art Unit: 1614
Examiner: S. Rose

Honorable Commissioner of
Patents and Trademarks
Washington, DC 20231

Dear Sir:

PRELIMINARY AMENDMENT

Please amend the subject application as follows:

Amend the specification on page 1 by inserting before the first line:

- CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

This is a division of copending application 09/368,842 filed 8/5/99. -

Please amend claim 1.

- 1. A process for ameliorating an undesirable anxiety state in a mammal comprising systemic administration to the mammal of an effective but non-toxic anxiolytic dose of 6-hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione or a pharmaceutically acceptable acid addition salt[, prodrug,] or hydrate thereof. -

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as Express Mail in an envelope addressed to: Assistant Commissioner of Patents, Washington, D.C. 20231 on the date indicated below.

BY:

Janet Audon
(Signature)

1/18/2000
(Date)

137
170

CT 2534A (MB33A)

UNITED STATES PATENT APPLICATION OF

Robert F. Mayol
56 Green Lane
Durham, CT 06422

FOR

ANTIANXIETY AGENT

00181131-011800

EXPRESS MAILING LABEL NO. EL442237936US

DATE OF DEPOSIT 1/18/2000

I HEREBY CERTIFY THAT THE ATTACHED CORRESPONDENCE
AND DOCUMENTS ARE BEING DEPOSITED WITH THE U.S.
POSTAL SERVICE "EXPRESS MAIL POST OFFICE TO
ADDRESSEES" SERVICE UNDER 37 CFR 1.10 ON THE DATE
INDICATED ABOVE AND IS ADDRESSED TO THE COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS, WASHINGTON, D.C. 20231.

James L. Luchini . 1/18/2000
(Signature) (Date)

~~178~~
171

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525

FOR

EXPRESS MAIL LABEL NO. EL16176708745

DATE OF DEPOSIT 8-5-99

I HEREBY CERTIFY THAT THE ATTACHED CORRESPONDENCE AND DOCUMENTS ARE BEING DEPOSITED WITH THE U.S. POSTAL SERVICE "EXPRESS MAIL POST OFFICE TO ADDRESSEE" SERVICE UNDER 37 CFR 1.10 ON THE DATE INDICATED ABOVE AND IS ADDRESSED TO THE COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS, WASHINGTON, D.C. 20231.

Janet Suda 8-5-99
(Signature) (Date)

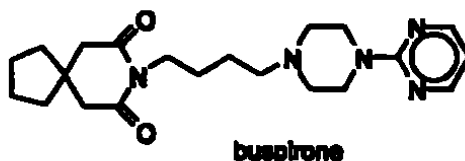
179
172

ANTIANXIETY AGENT

Background of the Invention

The present invention involves the alleviation of anxiety by treatment with 8-hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione. This compound was first disclosed by Jajoo, et al., Drug Metab. and Disposition, 17/6, pp. 634-640, 1989, as being one of several metabolites of the clinically useful anxiolytic drug, buspirone. Confirmation of structure for this metabolite was achieved by comparison with an authentic sample of the compound prepared synthetically. This metabolite compound has been designated BMY 28674, and is also known as 6'-hydroxy-buspirone.

The parent drug, buspirone, has the following chemical structure.



Buspirone, chemically: 8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)1-piperazinyl]butyl]-8-azaspiro(4,5)-decane-7,9-dione, is a pharmaceutically active compound which has been found to be effective for the treatment of anxiety disorders and depression. However, buspirone shows a very high first pass metabolism and only about 4% of a therapeutic dose will reach the systemic circulation unchanged after oral administration (Mayol, et al., Clin. Pharmacol. Ther., 37, p. 210, 1985). Great interindividual variations in buspirone absorption have also been observed as demonstrated by variations of the maximum plasma concentration of drug by up to 10-fold (Gammans, et al., American J. Med., 80, Suppl. 3B, pp. 41-51, 1986).

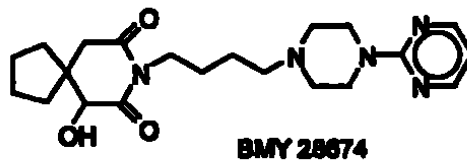
Synthesis of buspirone and related analogs and disclosure of their psychotropic properties are described by Wu, et al., in U.S. 3,717,834. The use of buspirone hydrochloride as a novel antianxiety agent for the treatment of neurotic patients is described by Casten, et al., in U.S. 4,162,763.

BMY 28674 was previously tested for antianxiety properties using a laboratory method specifically developed for the measurement of antianxiety properties in azapirone compounds such as buspirone, gepirone and structural analogs. No significant antianxiety activity was detected for BMY 28674 in this testing procedure. No significant biological activity has ever been disclosed for this compound.

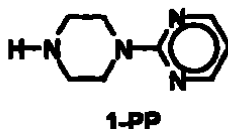
In summary, while BMY 28674 has been found to be one of many human metabolites following administration of the anxiolytic drug, buspirone, no useful biological activity has previously been associated with the compound itself prior to the present invention.

Summary and Detailed Description of the Invention

6-Hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione (I) has now been found to be useful as an agent to treat anxiety and is referred to herein as BMY 28674. The compound has the following structural formula:



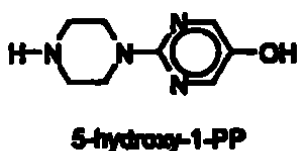
As a result of comparative in-house testing of the clinically useful anxiolytic agent buspirone, and several of its putative and actual metabolites, the prevailing view was that the anxiolytic action was mainly provided by buspirone itself with little, if any, contribution being made by buspirone metabolites. For example, systemic administration (I.V. and intragastric) of certain putative metabolites to rats resulted in little to no inhibition of dorsal raphe neuronal firing. In contrast, buspirone itself potently inhibits the firing of dorsal raphe neurons. See: VanderMaelen, et al., Eur. J. Pharmacol., 129, pp. 123-30, 1986. While one metabolite, the structural fragment 1-(2-pyrimidinyl)piperazine, also known as 1-PP

181
174

did show weak inhibition of dorsal raphe firing as well as some anxiolytic activity in certain other preclinical tests (see: U.S. 4,400,223), it also displayed anxiogenic properties in certain other behavioral testing paradigms. See: Cervo, et al., Life Sciences, 43, pp. 2095-2102, 1988; Martin, Psychopharmacology, 104, pp. 275-278, 1991. It is probable that the biological effect of 1-PP is mediated through an alpha 2 adrenergic mechanism as 1-PP does not demonstrate binding at the 5-HT1A receptor. Presently, the clinical effect of 1-PP is unclear.

On the basis of the accepted rationale that intact buspirone provided the useful anxiolytic activity seen clinically, a transdermal patch delivery system for buspirone was developed (see: U.S. 5,633,009). A buspirone transdermal patch was predicted to be a superior treatment for anxiety since transdermal drug delivery resulted in minimized metabolism of buspirone, thereby giving larger amounts of parent drug with much reduced levels of metabolites. Surprisingly, only weak anxiolytic activity was seen clinically with use of the buspirone transdermal patch. This unexpected result has led to reevaluation of BMY 28674.

BMY 28674 appears to be the active metabolite of buspirone. Not only is it the second most abundant metabolite obtained in the metabolism studies from human urine (5-hydroxy-1PP being most



abundant); but the skeletal structure of buspirone remains intact in BMY 28674. More importantly, binding data at the 5-HT1A receptor indicates that BMY 28674 has a binding affinity approaching that of buspirone itself. This is in contrast to other metabolites which

5

10

CONFIDENTIAL

Scheme 1

Scheme for metabolism of buspirone by rat liver microsomes and hepatocytes

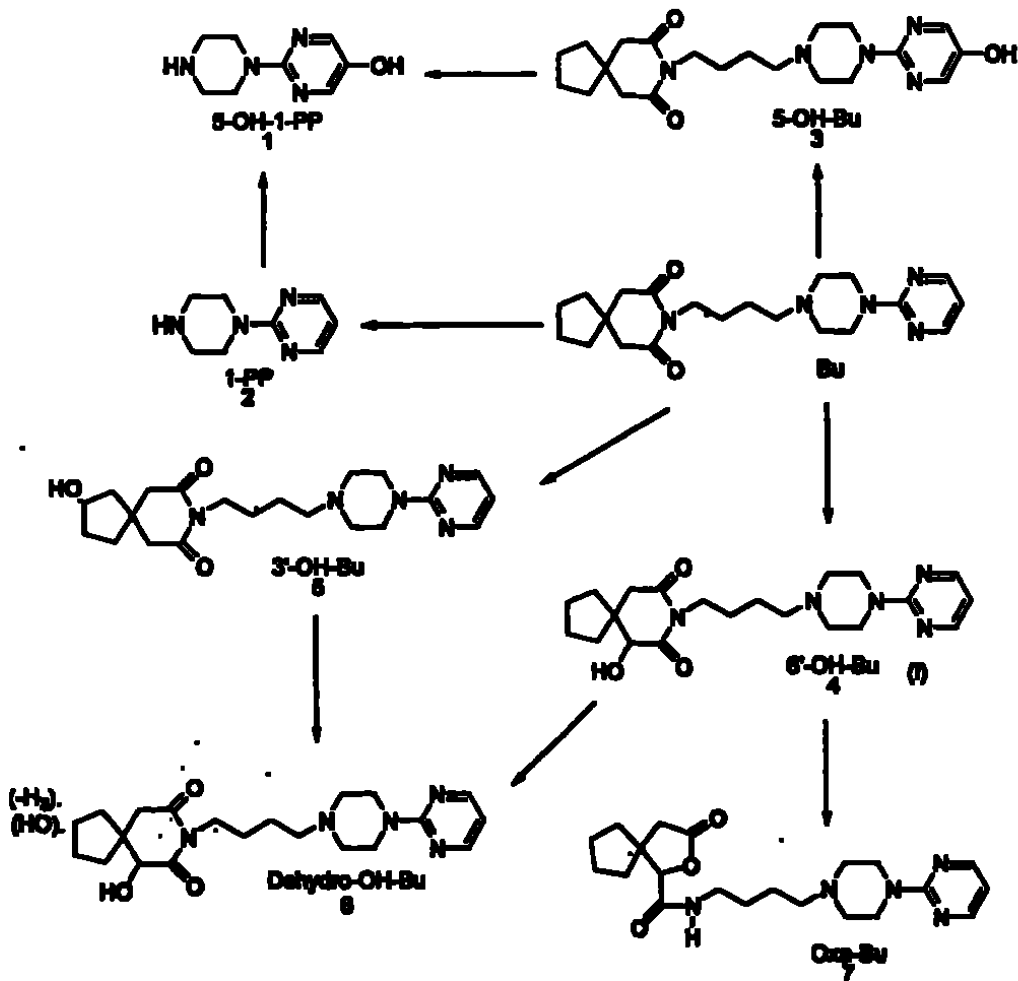


Table 1 presents the binding data for buspirone and the other mono-hydroxylated metabolites of interest. These data were obtained from HEK 293 cells transfected with the human 5-HT_{1A} receptor.

182
177

Table 1
5-HT_{1A} Binding Data

Compound	K _i values (± SEM)	IC ₅₀ (nM)*
serotonin (reference)	—	2
buspirone	15 (± 3.5)	30
6'-OH-buspirone (BMY 28674)	30 (± 4.8)	61
5-OH-buspirone	—	> 1000
3'-OH-buspirone	191 (± 48)	> 800
1-(2-pyrimidinyl)piperazine	—	> 1000

*average IC₅₀ value from 3 determinations

5 Earlier in-house testing of BMY 28674 utilized a test method based
on modification of the Vogel Conflict test, a simple reliable conflict
procedure for testing anti-anxiety agents (see: Vogel, et al.,
10 Psychopharmacologia, (Berl.) 21, pp. 1-7, 1971). Dosing was by the oral
route for this test method and it is likely that extensive first-pass
metabolism of oral BMY 28674 could account for the failure of the
compound to elicit an anxiolytic response in this paradigm.

15 The instant invention then concerns the process for ameliorating
an anxiety state in a mammal in need of such treatment which comprises
introduction to the system of the mammal of an effective anti-anxiety dose
of BMY 28674. An effective dose should, in general, be in the range of
from about 0.1 to 2 mg per kg of body weight. BMS 28674 can also be
administered via sublingual, buccal or transnasal routes, thereby
minimizing destructive first-pass metabolism. Systemic administration of
BMY 28674 may be by a parenteral route, e.g. intramuscular,
20 intravenous, subcutaneous, etc. Systemic administration may also be
achieved by oral administration of a prodrug, a precursor form of BMY
28674. In this case the precursor form minimizes destructive metabolism
of BMY 28674 but functions physiologically to release it into the
mammal's system. In accordance with good clinical practice, it is
25 preferable to administer BMY 28674, or a precursor form, at

185
178

concentration levels that will produce effective anxiolytic effects without causing harmful or untoward side-effects.

Therapeutically, BMY 28674 can be given in a parenteral formulation comprised of an effective anxiolytic amount of BMY 28674, or one of its pharmaceutically acceptable acid addition salts or a hydrate, in a pharmaceutically acceptable carrier. Pharmaceutical compositions which provide from about 5 to 50 mg of the active ingredient per unit dose are preferred and are conventionally prepared as aqueous solutions and aqueous or oily suspensions. BMY 28674 can also be given orally when compounded in a precursor or prodrug form in an oral dosing formulation such as a tablet, lozenge, capsule, syrup, elixir, aqueous solution or suspension.

The pharmaceutically acceptable acid addition salts of BMY 28674 are also considered useful as anxiolytic agents. By definition, these are those salts in which the anion does not contribute significantly to toxicity or pharmacological activity of the base form of BMY 28674.

Acid addition salts are obtained either by reaction of BMY 28674 with an organic or inorganic acid, preferably by contact in solution, or by any of the standard methods detailed in the literature and available to any practitioner skilled in the art. Examples of useful organic acids are carboxylic acids such as maleic acid, acetic acid, tartaric acid, propionic acid, fumaric acid, methiononic acid, succinic acid, pamolic acid, and the like; useful inorganic acids are hydrohalide acids such as HCl, HBr, HI; sulfuric acid; phosphoric acid; and the like.

Preferred oral compositions are in the form of tablets or capsules and in addition to a precursor form of BMY 28674 may contain conventional excipients such as binding agents (e.g., syrup, acacia, gelatin, sorbitol, tragacanth, or polyvinyl pyrrolidone), fillers (e.g., lactose, sugar, maize-starch, calcium phosphate, sorbitol or glycine), lubricants (e.g., magnesium stearate, talc, polyethyleneglycol or silica), disintegrants (e.g., starch), and wetting agents (e.g., sodium lauryl sulfate). Solutions or suspensions of BMY 28674 with conventional pharmaceutical vehicles are employed for parenteral compositions such

✓
179

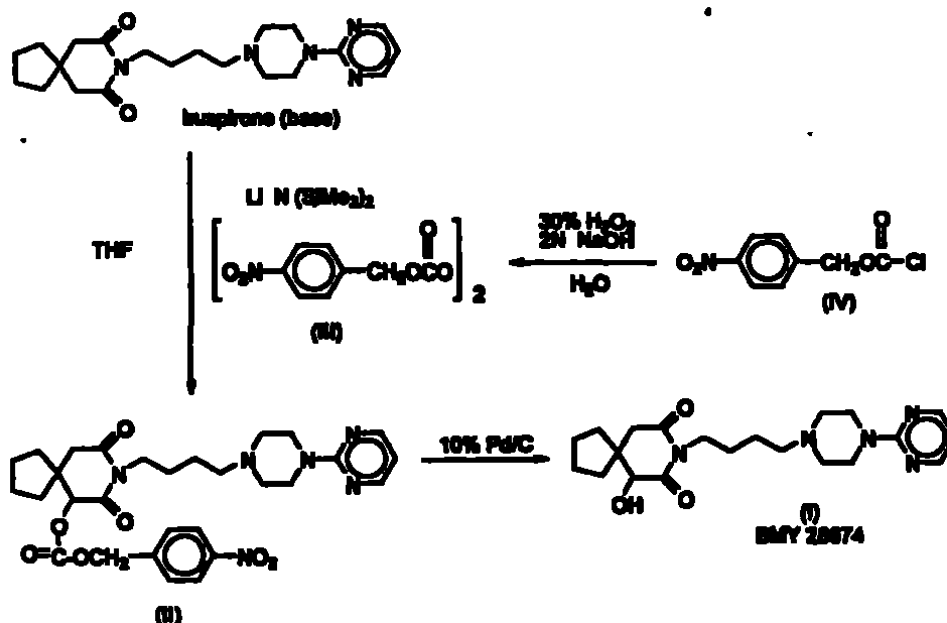
- as an aqueous solution for intravenous injection or an oily suspension for intramuscular injection. Such compositions having the desired clarity, stability and adaptability for parenteral use are obtained by dissolving from 0.1% to 10% by weight of the active ingredient (BMY 28674 or a pharmaceutically acceptable acid addition salt or hydrate thereof) in water or a vehicle consisting of a polyhydric aliphatic alcohol such as glycerine, propylene glycol, and polyethylene glycols or mixtures thereof. The polyethylene glycols consist of a mixture of non-volatile, normally liquid, polyethylene glycols which are soluble in both water and organic liquids and which have molecular weights from about 200 to 1500.

BMY 28674 may be synthesized by methods readily available in the chemical literature and known to one skilled in synthetic organic chemistry. One method of preparation utilizes bupirone as a starting material and the process is shown in Scheme 2.

15

Scheme 2

Preparation of BMY 28674



This method of preparation is provided as a helpful example and illustrates a convenient synthesis of BMY 28674.

182
180

It should also be appreciated that BMY 28674 can be obtained by enzymatic (human or rat liver microsomes) conversion of buspirone in vitro, which also results in the formation of inactive metabolites of buspirone. (See: Jajoo, et al., Xenobiotica, 1990, Vol. 20, No. 8, pp. 779-788.) Systemic administration may be accomplished by oral administration of a precursor or prodrug form of BMY 28674, e.g. buspirone, to mammals resulting in systemic introduction of BMY 28674.

Description of Specific Embodiments

The compound whose use constitutes this invention and its method of preparation will appear more fully in light of the following examples which are given for the purpose of illustration only and are not to be construed as limiting the invention in sphere or scope.

Example 1: Preparation of BMY 28674 (I)

A. Di-4-nitrobenzyl peroxydicarbonate (III)

Di-4-nitrobenzyl peroxydicarbonate was prepared using a modification of the literature procedure¹. Thus, to an ice-cold solution of 4-nitrobenzyl chloroformate (10.11 g, 4.7 mmol) in acetone (20 mL) was added dropwise over 30 min an ice-cold mixture of 30% H₂O₂ (2.7 mL, 24 mmol) and 2.35 N NaOH (20 mL, 47 mmol). The mixture was vigorously stirred for 15 min and then it was filtered and the filter-cake was washed with water and then with hexane. The resulting damp solid was taken up in dichloromethane, the solution was dried (Na₂SO₄) and then it was diluted with an equal volume of hexane. Concentration of this solution at 20 °C on a rotary evaporator gave a crystalline precipitate which was filtered, washed with hexane and dried in vacuo to give compound III (6.82 g, 74%) as pale yellow microcrystals, mp 104 °C (dec).

Di-4-nitrobenzyl peroxydicarbonate was found to be a relatively stable material which decomposed as its melting point with slow gas

¹ F. Strain, et al., J. Am. Chem. Soc., 1960, 72, 1254

evolution. In comparison, dibenzyl peroxydicarbonate² decomposed with a sudden vigorous expulsion of material from the melting point capillary.

B. 6-(4-Nitrobenzyl peroxydicarbonatyl)-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione (II)

5 To a solution of 8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione (buspirone: 10 g, 28 mmole) in dry THF (250 mL) was added LiN (Me₂Si)₂ (28.5 mL of a 1 M THF solution) at -78 °C and stirred for 3 h and then a solution of di-4-nitrobenzyl peroxydicarbonate (11.2 g) in dry THF (150 mL) was added dropwise over 1 h. Stirring was continued at
10 -78 °C for 1 h.

The cooling bath was removed and the reaction solution was poured into a mixture of H₂O and EtOAc. The organic phase was separated and washed with H₂O and then brine. The organic base was dried and then evaporated to a viscous oil. Flash chromatography of this
15 oil, eluting the silica column with MeCN-EtOAc (1:2) gave crude product which was washed with acetone, to remove unreacted buspirone, leaving 6.23 g of a white solid (46%) product (II).

C. 6-Hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione (I; BMY 28674)

20 A mixture of II (4.0 g; 6.9 mmole) and 10% Pd/C (about 1 g) in MeOH (100 mL) was hydrogenated in a Parr shaker at 40-45 psi for 1 h. The hydrogenation mixture was filtered through a Celite pad which was then washed with EtOAc. The filtrate was evaporated to a gum which was purified by flash chromatography through a silica gel column eluting
25 with EtOAc to give 0.41 g of an off-white solid (I).

Anal. Calcd. for C₂₁H₂₁N₅O₂: C, 62.82; H, 7.78; N, 17.44.

Found: C, 62.84; H, 7.81; N, 17.33.

² Cf. M.P. Gore, J.C. Vederas, J. Org. Chem., 1986, 51, 3700

This binding assay utilized HEK 293 cells that have been transfected with the human 5-HT_{1A} receptor. HEK 293 cells with the human 5-HT_{1A} receptor are incubated for 1 h at 25 °C in 50 mM HEPES buffer in the presence of 1 nM 3H-8-OH-DPAT and test compound. 10 μ M 5-HT serves to define non-specific binding. The assay is terminated by rapid filtration through Whatman GF/B filter pads using a Brandel cell harvester. Samples are counted in a Wallac micro-beta liquid scintillation counter.

Claims

1. A process for ameliorating an undesirable anxiety state in a mammal comprising systemic administration to the mammal of an effective but non-toxic anxiolytic dose of 6-hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione or a pharmaceutically acceptable acid addition salt, prodrug, or hydrate thereof.
- 5

00181351.011800

184

Abstract

8-Hydroxy-8-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-piperazinyl]-butyl]-8-azaspiro[4.5]-7,9-dione and its pharmaceutically acceptable salts and hydrates are useful in the alleviation of anxiety.

008710-13T121220

1492
185

DECLARATION AND POWER OF ATTORNEY FOR PATENT APPLICATION

As the below-named inventor, I hereby declare that:

My residence, post office address and citizenship is as stated below next to my name.

I believe that I am the original, first and joint inventor of the subject matter which is claimed and for which a patent is sought, on the invention entitled

ANTI-ANXIETY AGENT

the specification of which

 X is attached hereto
 was filed on as
Application Serial No. .

I hereby state that I have reviewed and understand the contents of the above-identified specification, including the claims, as amended by any amendment referred to above.

And I hereby appoint Aldo A. Algieri, Reg. No. 31,697, Samuel J. DuBoff, Reg. No. 25,969, David M. Morse, Reg. No. 25,742, and Richard P. Ryan, Reg. No. 30,491, Post Office Box 5100, Wallingford, CT 06492-7660; all of Bristol-Myers Squibb Company, my agents and/or attorneys to prosecute this application and to transact all business in the Patent and Trademark Office connected therewith. Please address correspondence concerning this application to: David M. Morse, Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 5100, Wallingford, CT 06492-7660.

I acknowledge the duty to disclose information which is material to the examination of this application in accordance with Title 37, Code of Federal Regulations, Section 1.56(a).

I hereby claim foreign priority benefits under Title 35, United States Code, Section 119, of any foreign application(s) for patent or inventor's certificate listed below and have also identified below any foreign application for patent or inventor's certificate having a filing date before that of the application on which priority is claimed:

Prior Foreign Application(s)

Prior Foreign Application(s)			Priority Claimed
<u>None</u> (Number)	<u> </u> (Country)	<u> </u> (Day/Month/Yr. Filed)	YES/NO

675
186

I hereby claim the benefit under Title 35, United States Code, Section 120, of a United States application(s) listed below and, insofar as the subject matter of each of the claims of this application is not disclosed in the prior United States application in the manner provided by the first paragraph of Title 35, United States Code, Section 112, I acknowledge the duty to disclose material information as defined in Title 37, Code of Federal Regulations, Section 1.56(a), which occurred between the filing date of the prior application and the national or PCT international filing date of this application:

(Application Serial No.)	(Filing Date)	(Status) (patented, pending, abandoned)
-----------------------------	---------------	--

(Application Serial No.)	(Filing Date)	(Status) (patented, pending, abandoned)
-----------------------------	---------------	--

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Full name of first inventor: Robert F. Mayol

Inventor's signature: Robert F. Mayol Date: Aug 5, 1999

Residence: Durham, CT

Citizenship: USA Occupation: Chemist

Post Office Address: 56 Green Lane
Durham, CT 06422

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
A QUIENES PUEDA LLEGAR LA PRESENTE:
DEPARTAMENTO DE COMERCIO DE LOS ESTADOS UNIDOS
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Octubre 18, 2000

LA PRESENTE ES PARA CERTIFICAR QUE ANEXA A LA MISMA, SE ENCUENTRA UNA COPIA AUTENTICA DE LOS REGISTROS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS, DE LOS DOCUMENTOS DE LA SOLICITUD DE PATENTE ABAJO IDENTIFICADA, QUE CUMPLE CON LOS REQUISITOS PARA QUE SE LE CONCEDA UNA FECHA DE PRESENTACION CONFORME A LA 35 USC 111.

NUMERO DE SOLICITUD: 09/484,161

FECHA DE PRESENTACION: Enero 18, 2000

(SELLO)

Por Autoridad del
COMISIONADO DE PATENTES Y MARCAS

(Rúbrica)
L. EDELEN
Oficial de Certificaciones

TRANSMISION DE LA SOLICITUD DE PATENTE DE UTILIDAD (Entidad Amplia) (Sólo para nuevas solicitudes no provisionales bajo 37 CFR 1.53(b))	Documento No. CT2534A
	Total de Páginas en esta Presentación 3

PARA EL COMISIONADO ASISTENTE PARA PATENTESBox Patent Application
Washington, D.C. 20231Transmitido con ésta para presentar bajo 35 U.S.C. 111(a) y 37 C.F.R. 1.53(b)
está una nueva solicitud de patente de utilidad para una invención titulada:**AGENTE ANTIANSIEDAD**

e inventado por:

ROBERTO F. MAYOLSi una SOLICITUD DE CONTINUACION, recuadro apropiado de verificación y suministro
de la información requerida:☐ Continuación ☒ Divisional ☐ Cont. en parte (CEP) de la solicitud previa No.: 09/368,842
la cual es una:☐ Continuación ☒ Divisional ☐ Cont. en parte (CEP) de la solicitud previa No.: _____
la cual es una:☐ Continuación ☒ Divisional ☐ Cont. en parte (CEP) de la solicitud previa No.: _____

Documentos adjuntos son:

Elementos de la Solicitud

1. ☒ Tasa de presentación que se calcula y se transmiten como se describe posteriormente
2. ☒ La especificación tiene 14 páginas e incluye lo siguiente:
 - a. ☒ Título Descriptivo de la Invención
 - b. ☒ Referencias Cruzadas a Solicitudes Relacionadas (si fuera aplicable)
 - c. ☐ Declaración Con Respecto al Desarrollo/Búsqueda Federalmente Avalada (Si fuera aplicable)
 - d. ☐ Referencia al Apéndice de Microfichas (si fuera aplicable)
 - e. ☒ Antecedentes de la Invención
 - f. ☒ Breve Descripción de la Invención
 - g. ☐ Breve Descripción de los Dibujos (si se presentan dibujos)
 - h. ☒ Descripción detallada
 - i. ☒ Reivindicación(es) como se Clasifican Posteriormente
 - j. ☒ Resumen de la Descripción

189

TRANSMISION DE LA SOLICITUD DE PATENTE DE UTILIDAD (Entidad Amplia) (Sólo para nuevas solicitudes no provisionales bajo 37 CFR 1.53(b))	Documento No. CT2534A
	Total de Páginas en esta Presentación 3

Elementos de la Solicitud (Continuación)

3. ☐ Dibujo(s) (cuando sea necesario como se prescribe por 35 USC 113)

a. ☐ Formal Número de Hojas _____
 b. ☐ Informal Número de Hojas _____

4. ☒ Juramento o Declaración

a. ☐ Ejecutada nuevamente (original o copia) ☐ No ejecutada
 b. ☒ Copia de una Solicitud Previa (37 CFR 1.63(d)) (para solicitud de continuación/divisional únicamente)
 c. ☒ Con Poder del Apoderado ☐ Sin Poder del Apoderado
 d. ☐ SUPRESION DEL(DE LOS) INVENTOR(ES)
 Declaración Señalada unida a la supresión del nombre del(de los) inventor(es) en la solicitud previa, véase 37 C.F.R. 1.63(d)(2) y 1.33(b).

5. ☐ Incorporación como Referencia (utilizable si el Recuadro 4b es verificado)
 La descripción completa de la solicitud previa, a partir de la cual una copia del juramento o declaración se provee bajo el Recuadro 4b, se considera que es parte de la descripción de la solicitud anexa y por lo cual se incorpora como referencia aquí.

6. ☐ Programa de Computadora en Microficha (Apéndice)

7. ☐ Secuencia de Aminoácido y/o Nucleótido Presentado (si fuera aplicable, todas deben ser incluidas)

a. ☐ Copia del documento
 b. ☐ Copia leíble por Computadora (idéntica a la copia de computadora)
 c. ☐ Documento Idéntico de Verificación de Declaración y Copia Leíble por Computadora

Partes de la Solicitud Anexas

8. ☐ Documentos de Cesión de Derechos (hoja de cubierta y documento(s))

9. ☐ 37 CFR 3.73(B) Declaración (cuando exista un apoderado)

10. ☐ Documento de Traducción de Inglés (si fuera aplicable)

11. ☒ Declaración de la Descripción de la Información/PTO-1449 ☒ Copias de Citaciones de IDS

12. ☒ Enmienda Preliminar

13. ☒ Tarjeta de Confirmación

14. ☒ Certificado de Envío

☐ Primera Clase ☒ Envío Express (Etiqueta de Especificación No.): EL44223793608

198
 190

TRANSMISION DE LA SOLICITUD DE PATENTE DE UTILIDAD (Entidad Amplia) (Sólo para nuevas solicitudes no provisionales bajo 37 CFR 1.53(b))					Documento No. CT2534A
					Total de Páginas en esta Presentación 3

Partes de la Solicitud Anexadas (Continuación)

15. ☐ Copia Certificada del(de los) Documento(s) de Prioridad (si la prioridad anterior se reivindica)

16. ☒ Documentos Adicionales (identidad complacida posterior):

Petición para Hacer Especial la Solicitud Divisional

Transmisión y Cálculo de Tasas

REIVINDICACIONES COMO SE PRESENTAN					
Por	#Archivado	#Permitido	#Extra	Precio	Tarifa
Total de Reivindicaciones	1	-20 -	0	X \$18.00	\$0.00
Reivindicaciones Independientes		- 3 -	0	X \$78.00	\$0.00
Reivindicaciones Dependientes Múltiples (verificar si es aplicables) ☐					\$0.00
TARIFA BASICA					\$690.00
OTRA TARIFA (propósito específico) _____					\$0.00
TARIFA DE PRESENTACION TOTAL					\$690.00

☐ Un cheque con la cantidad de _____ para cobrar la tarifa de presentación que está anuada.
☐ El comisionado está por lo tanto autorizado para cargar y dar crédito a la Cuenta de Depósito No. 02.3890 como se describió posteriormente. Un copia duplicada de esta hoja se anada.
☒ Cargar la cantidad de \$690.00 como tarifa de presentación
☒ Dar crédito a cualquier pago.
☒ Cargar cualquiera de las tarifas de presentación adicionales requeridas bajo el 37 C.F.R. 1.16 y 1.17.
☐ Cargar el conjunto de tarifas de emisión en el 37 C.F.R. 1.18 en el envío de la Noticia de Autorización, consiguiente a 37 C.F.R. 1.31(b).

Firma

Fecha: 18 Junio 2000

CC: _____

199
191

EN LA OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS

Solicitantes	Robert F Mayol	Unidad Art	1614
Serie No	A ser asignada	Examinador	S Rose
Presentado	A ser asignado		
Para	Agente antiansiedad		

Honorable Comisionado de
Marcas y Patentes
Washington DC 20231

Estimado señor

ENMIENDA PRELIMINAR

Por favor enmendar la solicitud objeto como sigue

Enmendar la especificación en la página 1 insertando antes de la primera línea

-REFERENCIA ENCONTRADA PARA LA SOLICITUD RELACIONADA

Esta es una división de la solicitud codependiente 09/368 842 presentada el 8/5/99 -

Por favor enmendar la reivindicación 1

-1 Un proceso para aliviar un estado de ansiedad indeseable en un mamífero que comprende la administración sistémica al mamífero de una dosis ansiolítica efectiva pero no tóxica de 6-hidroxi-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-butil]-8-azaspiro[4.5]-7.9-diona o una sal de adición de ácido[profármaco] o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma

CERTIFICADO DE ENVIO

Yo certifico por este medio que se ha depositado en el Servicio de Patentes de los Estados Unidos como Colección Exprimada un documento dirigido al Comisionado Asistido de Patentes en Washington DC 20231 en la fecha indicada por este documento

POR

(firma)

1718/200

(fecha)

200
192

CT 2534A

Enmienda Preliminar
USSN a ser designada
Página 2

OBSERVACIONES

La enmienda de la reivindicación se ha dado para borrar el tema reivindicado en la solicitud original pendiente USSN 09/368,842. Esta reivindicación enmendada elige el tema reivindicado no elegido de la solicitud original.

Respetuosamente suyo,

Robert F. Mayol

Fecha. 18 Junio 2000

(rúbrica)

Richard P. Ryan
Registro No. 30,491
Bristol-Myers Squibb Company
P.O. Box 5100
Wallingford, CT 06492-7660
Teléfono: (203) 677-6075
Fax: (203) 677-6900

SOLICITUD DE PATENTE DE LOS ESTADOS UNIDOS

Robert F. Mayol
56 Green Lane
Durham, CT 06422

PARA

AGENTE ANTIANSIEDAD

CORREO EXPRESS ETIQUETA DE ENVÍO NO. EL 442237936US
FECHA DE DEPÓSITO 1/18/2000
SE CERTIFICA AQUÍ QUE LA CORRESPONDENCIA Y DOCUMENTOS UNIDA A ESTA SE
DEPOSITARON CON EL SERVICIO POSTA U.S. "OFICINA POSTAL DE CORREO EXPRESS
A DOMICILIO" BAJO SERVICIO 37 C.F.R. §1.10 EN LA FECHA INDICADA ANTERIORMENTE
Y SE DIRIGE A COMISIONADO DE MARCAS Y PATENTES, WASHINGTON, D.C. 20231
1/18/2000
(Firma) (Fecha)

SOLICITUD DE PATENTE DE LOS ESTADOS UNIDOS

Robert F. Mayol
56 Green Lane
Durham, CT 06422

PARA

AGENTE ANTIANSIEDAD

CORREO EXPRESS ETIQUETA DE ENVÍO NO. EL 1688670881US

FECHA DE DEPÓSITO 8-5-92

SE CERTIFICA AQUÍ QUE LA CORRESPONDENCIA Y DOCUMENTOS UNIDA A ESTA SE
DEPOSITARON CON EL SERVICIO POSTA U.S. "OFICINA POSTAL DE CORREO EXPRESS
A DOMICILIO" BAJO SERVICIO 37 C.F.R. \$1.10 EN LA FECHA INDICADA ANTERIORMENTE
Y SE DIRIGE A COMISIONADO DE MARCAS Y PATENTES, WASHINGTON, D.C. 20231

(firma)

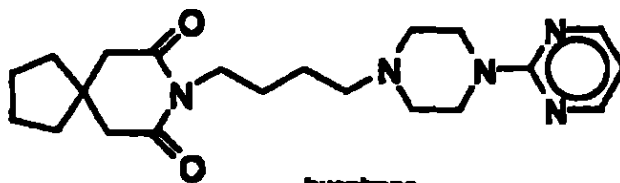
8-5-92
(Fecha)

AGENTE ANTIANSIEDAD

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La presente invención involucra el alivio
de la ansiedad mediante el tratamiento con 6-
hidroxi-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-
butil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona. Este compuesto
fue por vez primera descrito por Jajoo, et al.,
10 Drug Metab. and Disposition, 17/6, pp. 634-640,
1989, como uno de varios metabolitos del fármaco
ansiolítico, clínicamente útil, la buspirona. La
confirmación de la estructura de este metabolito
se consiguió mediante la comparación con una
15 muestra auténtica del compuesto preparado
sintéticamente. Este compuesto metabolito ha sido
designado BMY 28674, y también es conocido como
6'-hidroxi-buspirona.

 El fármaco original, la buspirona, tiene
20 la siguiente estructura química.



buspirona

206
196

La buspirona, químicamente: 8-[4-[4-(2-pirimidinil)1-piperazinil]butil-8-azaspiro(4,5)-decan-7,9-diona, es un compuesto farmacéuticamente activo, el cual se ha encontrado que es efectivo para el tratamiento de trastornos de ansiedad y de la depresión. Sin embargo, la buspirona muestra un metabolismo de primer paso muy elevado, y sólo aproximadamente el 4% de una dosis terapéutica llega a la circulación sistémica, en forma no metabolizada, después de la administración oral (Mayol, et al., Clin. Pharmacol. Ther., 37, p. 210, 1985). También se han observado grandes diferencias en la absorción de la buspirona, entre individuos como se demuestra por las variaciones de la concentración plasmática máxima del fármaco por hasta 10 veces (Gammans, et al., American J. Med., 80, Suppl. 3B, pp. 41-51, 1986).

La síntesis de la buspirona y análogos relacionados, y la descripción de sus propiedades psicotrópicas son descritas por Wu, et al., en la patente norteamericana 3,717,634. El uso del clorhidrato de buspirona, como un agente novedoso contra la ansiedad, para el tratamiento de pacientes neuróticos, es descrito por Casten, et al., en la patente norteamericana 4,182,763.

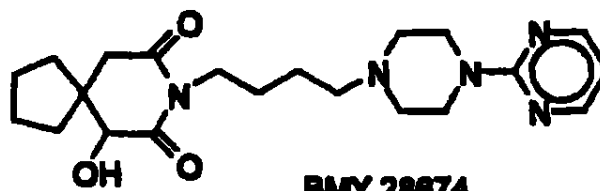
205
197

Previamente se analizaron las propiedades contra la ansiedad del BMY 28674, usando un método de laboratorio desarrollado específicamente para la medición de las propiedades contra la ansiedad, en compuestos de azapirona, tales como la buspirona, gepirona y análogos estructurales. En este procedimiento de prueba nunca se detectó actividad significativa alguna contra la ansiedad, para el BMY 28674. Para este compuesto nunca se ha descrito actividad biológica alguna significativa.

En resumen, aunque se ha descubierto que el BMY 28674 es uno de varios metabolitos humanos que resultan de la administración del fármaco ansiolítico, la buspirona, no se ha asociado previamente actividad biológica útil, con el compuesto mismo, antes de la presente invención.

DESCRIPCION BREVE Y DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha encontrado ahora que la 6-hidroxi-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-butil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona (I) es útil como un agente para tratar la ansiedad y en la presente se hace referencia al mismo como BMY 28674. El compuesto tiene la siguiente fórmula estructural:

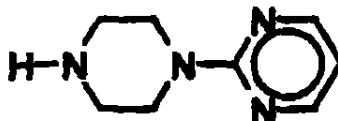
206
198

BMY 28674

I

Como un resultado del análisis comparativo, con instalaciones y recursos propios, del agente ansiolítico clínicamente útil, la buspirona, y varios de sus metabolitos reales y putativos, la visión prevaleciente ha sido que la acción ansiolítica era proporcionada principalmente por la buspirona misma con una pequeña, si la hay, contribución hecha por los metabolitos de la buspirona. Por ejemplo, la administración sistémica (intravenosa e intragástrica) de ciertos metabolitos putativos, a ratas, dio por resultado una poca o ninguna inhibición del disparo de impulsos neuronales en el rafe dorsal. En contraste, la buspirona misma inhibe potencialmente el disparo de impulsos en las neuronas del rafe dorsal. Ver: VanderMaelen, et al., Eur. J. Pharmacol., 129, pp. 123-130, 1986. Aunque un metabolito, el fragmento estructural 1-(2-pirimidinil)piperazina, también

conocido como 1-PP,



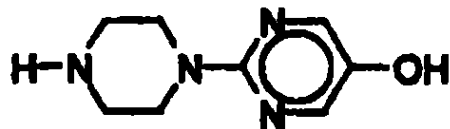
1-PP

exhibió una inhibición débil del disparo de impulsos en el rafe dorsal, a la vez que produjo cierta actividad en contra de la ansiedad en otros análisis preclínicos (véase: Patente Norteamericana 4,409,223), también exhibió propiedades ansiogénicas en otros paradigmas de análisis de comportamiento. Ver: Cervo, et al., 10 Life Sciences, 43, pp. 2095-2102, 1988; Martín, Psychopharmacology, 104, pp. 275-278, 1991. Es probable que el efecto biológico del 1-PP sea mediado a través de un mecanismo alfa 2 adrenérgico ya que el 1-PP no demuestra 15 enlazamiento al receptor 5-HT1A. Actualmente, el efecto clínico del 1-PP no está claro.

En la base de los razonamientos aceptados de que la buspirona intacta proporciona la actividad útil contra la ansiedad, observada 20 clínicamente, se desarrolló un sistema de

suministro por medio de un parche transdérmico, para la buspirona (véase la patente norteamericana 5,633,009). Se predijo que un parche transdérmico de buspirona era un tratamiento superior para la ansiedad dado que el suministro transdérmico del fármaco dio por resultado un metabolismo minimizado de la buspirona, proporcionando por lo tanto cantidades significativamente mayores del fármaco original, con niveles de metabolitos mucho más reducidos. De manera sorprendente, clínicamente se observó poca o ninguna actividad ansiolítica con el uso del parche transdérmico de buspirona. Este resultado inesperado ha conducido a la reevaluación del BMY 28674.

El BMY 28674 parece ser el metabolito activo de la buspirona. No únicamente es el segundo metabolito más abundante obtenido en los estudios del metabolismo a partir de orina humana (en donde el 5-hidroxi-1PP es el más



5-hidroxi-1PP

abundante); pero la estructura esquelética de la buspirona permanece intacta en el BMY 28674. En forma más importante, los datos de enlazamiento en el receptor 5-HT_{1A} indican que el BMY 28674 tiene una afinidad de enlazamiento más cercana a la de la buspirona misma. Esto está en contraste con los otros metabolitos, lo cual demuestra, en el mejor de los casos, únicamente una interacción más débil en el sitio del 5-HT_{1A}. El receptor 5-HT_{1A} es aceptado comúnmente como el receptor serotoninérgico involucrado íntimamente en la regulación de la ansiedad. El enfoque primario de la presente investigación ha sido en los metabolitos de buspirona que mantienen la estructura del esqueleto de buspirona y que no tienen más de un grupo hidroxil hidrofílico incorporado en la molécula. Es probable que la presencia de más de un grupo hidroxil hidrofílico reduzca la distribución de esos productos metabólicos en las regiones del Sistema Nervioso Central del cuerpo, por lo tanto haciendo que las interacciones necesarias de los receptores probablemente no ocurran en las regiones objetivo.

El siguiente esquema metabólico (Esquema 1) para la buspirona se tomó de Jajoo, et al.,

Xenobiotica, 1990, Vol. 20, No. 8, pp. 779-786,
 "In vitro metabolism of the antianxiety drug
 buspirona as a predictor of its metabolism in vivo".

5

Esquema 1

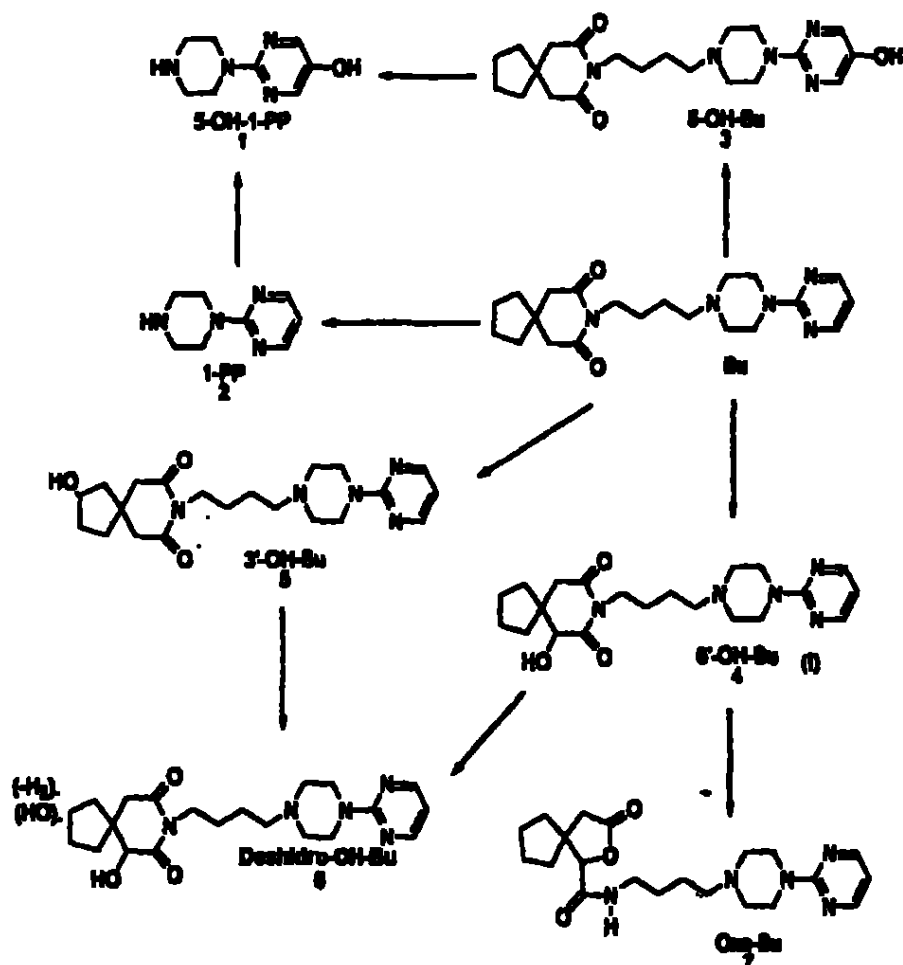
Esquema para el metabolismo de la buspirona por
 los microsomas y hepatocitos del hígado de rata

10

15

20

25



La Tabla 1 presenta los datos de enlace para buspirona y los otros metabolitos monohidroxilados de interés. Estos datos se obtuvieron de células HEK 293 transfectadas con el receptor humano 5-HT_{1A}.

Tabla 1
Datos de Enlazamiento de 5-HT_{1A}

Compuesto	valores K _i ($\pm$ SEM)	IC ₅₀ (nM) *
Serotonina (referencia)	---	2
Buspirona	15 ($\pm$ 3.5)	30
6'-OH-buspirona (BMY 28674)	30 ($\pm$ 4.8)	61
5-OH-buspirona	---	> 1000
3'-OH-buspirona	191 ($\pm$ 48)	> 800
1-(2-pirimidinil)piperazina	---	> 1000

10 *valor promedio IC₅₀ de 3 determinaciones

Al principio la prueba con instalaciones y recursos propios de BMY 28674 utiliza un método de prueba basado en la modificación de la prueba de Conflicto de Vogel, un procedimiento de conflicto fiable, simple, para el análisis de agentes contra

la ansiedad (ver: Vogel, et al.,
Psychopharmacologia, (Berl.) 21, pp. 1-7, 1971).

La dosificación fue por la vía oral para este
método de prueba y es probable que el metabolismo
5 del primer paso extensivo de BMY 28674 oral
podría estimar la falla del compuesto para
producir una respuesta ansiolítica en este
paradigma.

La presente invención se refiere entonces
10 al proceso para mejorar un estado de ansiedad en
un mamífero con necesidad de tal tratamiento, el
cual comprende introducir al sistema del mamífero
de una dosis de antiansiedad efectiva de BMY
28674. Una dosis efectiva debería, en general,
15 estar en el rango de aproximadamente 0.1 a 2 mg
por kg de peso corporal. El BMS 28674 también se
puede administrar vía sublingual, rutas bucal o
transnasal, por lo que se minimiza el metabolismo
del primero paso destructivo. La administración
20 sistémica de BMY 28674 puede ser una ruta
paréntérica, por ejemplo, intramuscular,
intravenosa, subcutánea, etc. La administración
sistémica también se puede lograr por la
administración oral de un profármaco, una forma
25 de precursor de BMY 28674. En este caso la forma

213
205

de precursor minimiza el metabolismo destructivo de BMY 28674 pero funciona fisiológicamente para liberarlo en el sistema del mamífero. De acuerdo con la buena práctica clínica, se prefiere
5 administrar BMY 28674, o una forma de precursor, a niveles de concentración que producirán efectos ansiolíticos efectivos sin causar daño o efectos colaterales desfavorables.

Terapéuticamente, el BMY 28674 se puede
10 proporcionar en una formulación parentérica comprendida de una cantidad ansiolítica efectiva de BMY 28674, o una de sus sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables o un hidrato, en un portador farmacéuticamente aceptable. Las
15 composiciones farmacéuticas las cuales proporcionan desde aproximadamente 5. a 50 mg del ingrediente activo por dosis unitaria son preferidas y se preparan convencionalmente como soluciones acuosas y suspensiones acuosas o
20 aceitosas. El BMY 28674 también se puede proporcionar oralmente cuando está compuesto de una forma de precursor o profármaco en una formulación de dosificación oral tal como una tableta, pastilla, cápsula, jarabe, elixir,
25 solución acuosa o suspensión.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables del BMY 28674 también son consideradas útiles como agentes ansiolíticos. Por definición, estas son aquellas sales en las
5 cuales el anión no contribuye significativamente a la toxicidad o actividad farmacológica de la forma de base de BMY 28674.

Las sales de adición de ácido se obtienen ya sea por la reacción de BMY 28674 con un ácido
10 orgánico o inorgánico, preferiblemente por el contacto en solución, o por cualquiera de los métodos estándares detallados en la literatura y disponibles para cualquier profesional experto en la técnica. Ejemplos de ácidos orgánicos útiles
15 son los ácidos carboxílicos tales como el ácido maleico, ácido acético, ácido tartárico, ácido propiónico, ácido fumárico, ácido isetiónico, ácido succínico, ácido pamoico y similares; los ácidos inorgánicos útiles son los ácidos
20 hidrácidos tales como el HCl, HBr, HI; ácido sulfúrico, ácido fosfórico, y similares.

Las composiciones orales preferidas se encuentran en la forma de tabletas o cápsulas y además una forma de precursor del BMY 28674 puede
25 contener excipientes convencionales tales como

215
207

agentes aglutinantes (por ejemplo, jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto, o polivinilpirrolidona), materiales de relleno (por ejemplo, lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato cálcico, sorbitol o glicina), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice), desintegrantes (por ejemplo, almidón), y agentes humectantes (por ejemplo, lauril sulfato de sodio). Las soluciones o suspensiones de BMY 28674 con los vehículos farmacéuticos convencionales, se emplean para composiciones parentéricas tales como una solución acuosa para inyección intravenosa o una suspensión aceitosa para inyección intramuscular. Esas composiciones que tienen la claridad, estabilidad y adaptabilidad deseadas para el uso parenteral, se obtienen disolviendo de 0.1% a 10% en peso del ingrediente activo (BMY 28674 o una sal de adición de ácido o hidrato, farmacéuticamente aceptable, del mismo) en agua o un vehículo que consista de un alcohol alifático polihídrico tal como la glicerina, propilenglicol y polietilenglicoles o mezclas de los mismos. Los polietilenglicoles consisten de una mezcla de polietilenglicoles, normalmente líquidos, no volátiles, que son

2/6
708

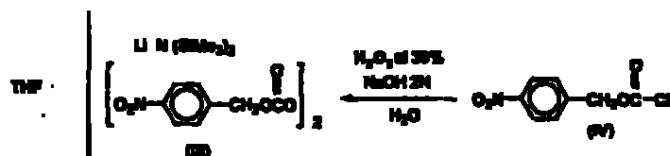
solubles tanto en agua como en líquidos orgánicos y que tienen pesos moleculares desde aproximadamente 200 hasta 1500.

El BMY 28674 se puede sintetizar mediante métodos fácilmente disponibles en la literatura química y conocidos por los experimentados en la química de síntesis orgánica. Un método de preparación utiliza la bupirone como un material de partida y el proceso se muestra en el Esquema 2.

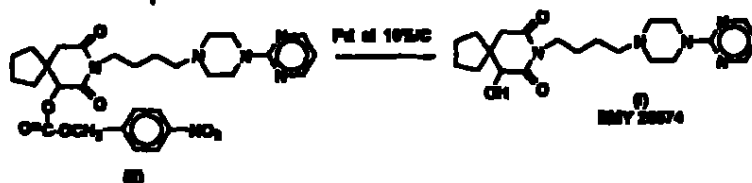
Esquema 2

Preparación del BMY 28674

15



20



Este método de preparación se proporciona como un ejemplo auxiliar e ilustra una síntesis

80
209

conveniente de BMY 28674.

Deberá apreciarse también que el BMY 28674 se puede obtener mediante la conversión enzimática (por los microsomas del hígado de humano o rata) de la buspirona, *in vitro*. (Ver: Jajoo, et al., Xenobiotica, 1990, Vol. 20, No. 8, pp. 779-786). La administración sistémica también puede conseguirse a través administración oral de una forma de precursor o profármaco del BMY 28674. Por ejemplo, la buspirona, a mamíferos resultando en la introducción sistémica de BMY 28674.

DESCRIPCION DE MODALIDADES ESPECIFICAS

El compuesto cuyo uso constituye esta invención, y su método de preparación, serán evidentes de manera más completa a la luz de los siguientes ejemplos que se presentan con el propósito de ilustración únicamente y no deben considerarse como limitantes de la invención en su esfera de aplicación o alcance.

Ejemplo 1: Preparación del BMY 28674 (I)

25

28
210

A. Peroxidicarbonato de di-4-nitrobencilo (III)

Se preparó peroxidicarbonato de di-4-nitrobencilo, usando una modificación del procedimiento de la literatura¹. De esta manera, a una solución enfriada con hielo de cloroformiato de 4-nitrobencilo (10.11 gramos, 4.7 milimoles) en acetona (20 mL) se adicionó, gota a gota, en 30 minutos, una mezcla enfriada con hielo de H₂O₂ al 30% (2.7 mililitros, 24 milimoles) y NaOH 2.35 N (20 mililitros, 47 milimoles). La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 minutos y luego se filtró y la torta del filtro se lavó con agua y luego con hexano. El sólido mojado resultante se recogió en diclorometano, la solución se secó (Na₂SO₄) y luego se diluyó con un volumen igual de hexano. La concentración de esta solución, a 20°C, en un evaporador giratorio, dio un precipitado cristalino que se filtró, se lavó con hexano y se secó *in vacuo* para dar el compuesto III (6.82 gramos, 74%) como microcristales de color amarillo pálido, punto de fusión de 104°C (con descomposición).

25 ¹ F. Strain, et al., J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1254

Se encontró que el peroxidicarbonato de di-4-nitrobencilo era un material relativamente estable que se descomponía al alcanzar su punto de fusión, con lenta emanación de gas. En comparación, el peroxidicarbonato de dibencilo² se descompuso con una vigorosa expulsión repentina de material, del capilar para punto de fusión.

B. 6-(4-Nitrobencil peroxidicarbonatil)-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-butil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona(II)

A una solución de 8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona (buspirona: 10 gramos, 26 milimoles) en THF seco (250 mililitros) se adicionó $\text{LiN}(\text{Me}_3\text{Si})_2$ (28.5 mililitros de una solución 1 M de THF) a -78°C y se agitó durante 3 horas y luego se adicionó una solución de peroxidicarbonato de di-4-nitrobencilo (11.2 gramos) en THF seco (150 mililitros), gota a gota, durante 1 hora. Se continuó la agitación a -78°C por una hora.

² Cf. M.P. Gore, J.C. Vederas, J. Org. Chem., 1986, 51, 3700

220
212

El baño de enfriamiento se retiró y la solución de reacción se vertió en una mezcla de H₂O y EtOAc. La fase orgánica se separó y se lavó con H₂O y luego con salmuera. La base orgánica se
5 secó y luego se evaporó hasta producir un aceite viscoso. La cromatografía instantánea de este aceite, eluyendo la columna de sílice con MeCN-EtOAc (1:2) dio el producto crudo el cual se lavó con acetona, para eliminar la buspirona que no
10 había reaccionado, dejando 6.23 gramos de un sólido blanco (46%) del producto (II).

C. 6-Hidroxi-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-butilo]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona (I;
15 BMV 28674)

Se hidrogenó una mezcla de II (4.0 gramos; 6.9 milimoles) y Pd al 10%/C (aproximadamente 1 gramo) en MeOH (100 mililitros) en un agitador
20 Parr a 2.81-3.16 kg/cm² (40-45 psi) durante 1 hora. La mezcla de hidrogenación se filtró a través de una almohadilla de celita la cual se lavó luego con EtOAc. El filtrado se evaporó hasta producir una goma que se purificó mediante
25 cromatografía instantánea a través de una columna

22,
813

de gel de sílice eluyendo con EtOAc para dar 0.41 gramos de un sólido blanquecino (I).

Análisis calculado para $C_{21}H_{31}N_3O_3$:
C, 62.82; H, 7.78; N, 17.44.

5 Encontrado: C, 62.84; H, 7.81; N, 17.33

Ejemplo 2: Ensayo de Enlazamiento al 5-HT1A

Este ensayo de enlazamiento usó células HEK 293
10 que han sido transfectadas con el receptor 5-HT1A humano. Las células HEK 293 con el receptor 5-HT1A humano son incubadas por 1 hora a 25°C en una solución reguladora de HEPES 50 mM en la presencia de 3H-8-OH-DPAT 1 nM y el compuesto de prueba. El
15 5-HT 10 uM sirve para definir el enlazamiento no específico. El ensayo se determinó por filtración rápida a través de almohadillas de filtro Whatman GF/B usando un recolector de células Brandel. Las muestras son contadas en un contador de
20 escintilación de líquidos micro-beta Wallac.

~~212~~
219REIVINDICACIONES

1. Un proceso para aliviar un estado de
ansiedad, indeseable, en un mamífero, que
5 comprende la administración sistémica al mamífero,
de una dosis ansiolítica, efectiva pero no tóxica,
de 6-hidroxi-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-piperazinil]-
butil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona o una sal de
adición de ácido o hidrato, farmacéuticamente
10 aceptable, de la misma.

15

20

25

~~215~~
215RESUMEN DE LA INVENCION

La 6-hidroxi-8-[4-[4-(2-pirimidinil)-
piperazinil]-butil]-8-azaspiro[4.5]-7,9-diona y
5 sus sales e hidratos farmacéuticamente aceptables,
son útiles en el alivio de la ansiedad.

10

15

20

25

DECLARACION Y PODER DEL ABOGADO PARA SOLICITUDES DE PATENTE

Como el inventor nombrado abajo, yo declaro que:

Mi residencia, dirección de oficina postal y ciudadanía son como se establece abajo enseguida a mi nombre.

Y yo creo que soy el original, primero y único inventor de la materia objeto la cual se reclama y para la cual se busca una patente en la invención titulada:

AGENTE ANTIANSIEDAD

la especificación de la cual

[x] se anexa a la misma

[] fue presentada en _____ como Solicitud SerieNo. _____

Yo declaro que he revisado y entendido los contenidos de la especificación arriba identificada, incluyendo las reivindicaciones, como se enmendaron mediante cualquier enmienda referida arriba.

Y yo designo a Aldo A. Algieri, Reg. No. 31,697, Samuel J. DuBoff, Reg. No. 25,969, David M. Morse, Reg. No. 25,742, y Richard P. Ryan, Reg. No. 30,491, Post Office Box 5100, Wallingford, CT 06492-7660; todos de Bristol-Myers Squibb Company, mis agentes y/o apoderados para continuar con esta solicitud y para negociar todos los negocios en la Oficina de Marcas y Patentes conectadas con esta. Por favor dirigir la correspondencia concerniente a esta solicitud a: David M. Morse, Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 5100, Wallingford, CT 06492-7660.

Yo conozco las obligaciones en relación a la descripción de la información que es material para el examen de esta solicitud de acuerdo con el Título 37 C.F.R. sección 1.56(a).

Yo reclamo los beneficios de la prioridad extranjera bajo el Título 35, U.S.C. sección 119, de cualquier solicitud(es) extranjera(s) para el certificado de inventor o patente dictado abajo y también identificado abajo para cualquier solicitud extranjera para certificado de inventor o patente tenga una fecha de presentación antes que la solicitud en la cual se reclama prioridad:

SOLICITUDES EXTRANJERAS ANTERIORES

Prioridad Reclamada

<u>Ninguno</u> Número	<u>País</u>	<u>Día/MES/Año Presentado</u>	<u>SI/NO</u>
--------------------------	-------------	-------------------------------	--------------

Yo reclamo mediante el beneficio del Título 35, U.S.C. sección 120 de todas las solicitudes de los Estados Unidos listadas abajo y, hasta también cualquier materia objeto de cada una de las reivindicaciones de esta solicitud que no este descrita en la solicitud de Estados Unidos previa de la manera provista por el primer párrafo del Título 35 U.S.C. sección 112, Yo reconozco la obligación de describir la información del material como se definió en el Título 37 C.F.R. sección 1.56(a) que ocurrió entre la fecha de presentación de la solicitud anterior y la fecha de presentación de la solicitud internacional del PCT o nacional de esta solicitud:

_____	_____	_____
(Solicitud Serie No.)	(Fecha de presentación)	(Estado)
		pendiente, abandonada, patentada

_____	_____	_____
(Solicitud Serie No.)	(Fecha de presentación)	(Estado)
		pendiente, abandonada, patentada

Yo declaro mediante esto que todas las declaraciones hechas aquí de mi propio conocimiento son verdaderas y que todas las declaraciones hechas sobre la información y creencias se cree que son verdaderas; y además de que estas declaraciones fueron hechas con el conocimiento que las declaraciones efectuadas en falsedad o similares son perseguibles mediante multas o prisión, o ambos, bajo la Sección 1001 del Título 18 del Código de los Estados Unidos y que tales declaraciones falsas por voluntad pueden poner en riesgo la validez de la solicitud o cualquier patente expedida en relación a la misma.

Nombre completo del primer inventor: Robert F. Mayol

Firma del inventor: _____ Fecha: Agosto 5, 1999

Residencia: Durham, CT

Ciudadanía: U.S.A Ocupación: Químico

Dirección de la Oficina Postal: 56 Green Lane
Durham, CT 06422