

009



PCT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

10-23191

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "METODOS PARA EL TRATAMIENTO
DE DEPENDENCIA"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE SYNOSIA THERAPEUTICS, INC.

DOMICILIO SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA,
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

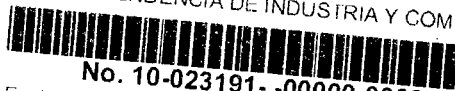
74. APODERADO HUMBERTO RUBIO CANACHO
COD. 4134

22. BOGOTÁ, D.C., 26 DE FEBRERO /2010

991

(FORMA P-10)

T. A. L. P. C.
06-03-2010



No. 10-023191-00000-0000

Fecha: 2010-02-26 13:13:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 163

PETITORIO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

Capítulo II

SOLICITANTE (71) Nombre y Dirección: **SYNOSIA THERAPEUTICS, INC.**
601 Gateway Boulevard, Suite 1200
South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de America
Lugar de constitución: **South San Francisco, California, Estados Unidos de America**

REPRESENTANTE (74) Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
O APODERADO Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. **17'192.062**
Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** T.P. **50.007 CSJ**

INVENTOR(ES) (72) Nombre y 1) **Tom WOIWODE**
Dirección: **c/o Synosia Therapeutics, Inc., 601 Gateway Boulevard, Suite 1200**
South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de America
2) **Mark MORAN**
c/o Synosia Therapeutics, Inc., 601 Gateway Boulevard, Suite 1200,
South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de America
3) **Lesley PICKFORD**
c/o Synosia Therapeutics, Inc., 601 Gateway Boulevard, Suite 1200,
South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de America

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2008/072357** Fecha **6 DE AGOSTO DE 2008**
Publicación Internacional No. **WO 2009/021055** Fecha **12 DE FEBRERO DE 2009**

TITULO (54) **"MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE DEPENDENCIA"**

Clasificación Internacional (51) **A 01 N 43/50, A61K 31/415** (Folios 164)

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de solicitud
SI ☒ NO	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	6 DE AGOSTO DE 2007	60/935,323
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	17 DE AGOSTO DE 2007	60/956,555
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	4 DE OCTUBRE DE 2007	60/960,591

Comprobante de pago No. **10-6,491** Fecha: **28 DE ENERO DE 2010**
10-6,497 **28 DE ENERO DE 2010**

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD: (51) INT. CL.:
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: (71) SOLICITANTE: **SYNOSIA THERAPEUTICS, INC.**
(30) PRIORIDAD: **ESTADOUNIDENSE**
(31) No. DE SOLICITUD: **60/935,323** (72) INVENTORES: **Tom WOIWODE**
60/956,555 **Mark MORAN**
60/960,591 **Lesley PICKFORD**
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: **6 DE AGOSTO DE 2007**
17 DE AGOSTO DE 2007
4 DE OCTUBRE DE 2007
(33) PAÍS: **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA** (74) APODERADO: **Humberto RUBIO CAMACHO**

Solicitud Internacional No. **PCT/US2008/072357** Fecha **6 DE AGOSTO DE 2008**
Publicación Internacional No. **WO 2009/021055** Fecha **12 DE FEBRERO DE 2009**

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: "MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE DEPENDENCIA"

RESUMEN:

Un método para tratar a un paciente que sufre de, o es susceptible a, al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de al menos una sustancia, estando dicho método caracterizado porque comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A.

ANEXOS

- X** Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- X** Comprobante de pago de la tasa por excedente de Reivindicaciones.
Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
Poderes, si fuere el caso.
Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
Declaraciones
- X** Copia de la publicación PCT
- X** Copia informe búsqueda internacional.
Copia de Opinión escrita
- X** Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
Copia del informe del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional (IPEA). (Incluye modificaciones)
Traducción de los anexos del examen preliminar internacional.
Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo PCT en Fase Nacional.
De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
Arte final 12 x 12
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
Otros

(11) Figura característica:

(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA



C.C. 17'192.062 de Bogotá

T.P. 50.007 Consejo Superior de
La Judicatura

PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.

SOLICITUD DE PATENTE FASE NACIONAL
PCT/US2008/072357

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 6.491
FECHA : ENERO 28 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-023191- -00000-0000

Fecha: 2010-02-26 13:13:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 163

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80848154	28/01/2010	8,736,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
TOTAL :			\$ 554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.**EXCEDENTE REIVINDICACIONES
PCT/US2008/072357

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 10 - 6.497
FECHA : ENERO 28 DE 2010

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-023191- -00000-0000

Fecha: 2010-02-26 13:13:17 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 163

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80848154	28/01/2010	8,736,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	1,040,000.00
		TOTAL :	\$ 1,040,000.00

SON: UN MILLON CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
12 February 2009 (12.02.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/021055 A1

(51) International Patent Classification:
A01N 43/50 (2006.01) A61K 31/415 (2006.01)

[US/US]; c/o Synosia Therapeutics, 601 Gateway Boulevard, Suite 1200, South San Francisco, CA 94080 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2008/072357

(74) Agents: BANAIT, Narinder, S.-et al.; Fenwick & West LLP, Silicon Valley Center, 801 California Street, Mountain View, CA 94041 (US).

(22) International Filing Date: 6 August 2008 (06.08.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/935,323 6 August 2007 (06.08.2007) US
60/956,555 17 August 2007 (17.08.2007) US
60/960,591 4 October 2007 (04.10.2007) US

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) Applicant (for all designated States except US): SYNOSIA THERAPEUTICS, INC. [US/US]; 601 Gateway Boulevard, Suite 1200, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WOIWODE, Tom [US/US]; c/o Synosia Therapeutics, Inc., 601 Gateway Boulevard, Suite 1200, South San Francisco, CA 94080 (US). MORAN, Mark [US/US]; c/o Synosia Therapeutics, Inc., 601 Gateway Boulevard, Suite 1200, South San Francisco, CA 94080 (US). PICKFORD, Lesley

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report

(54) Title: METHODS FOR TREATING DEPENDENCE

(57) Abstract: Provided are methods of treating patients suffering from or susceptible to at least one symptom of abuse of, dependence on, or withdrawal from at least one substance with Compound A. Also provided are methods of treating at least one phase of substance dependence on at least one substance in patients and certain methods of treating at least one phase of cocaine dependence in patients.

WO 2009/021055 A1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 08/72357

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01N 43/50; A61K 31/415 (2008.04) USPC - 514/396 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 514/396 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 514/235.8; 514/389; 514/417; 435/7.1; 548/542; 548/547 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST: DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; Google: Scholar/Patents: dopamine hydroxylase inhibitor addiction		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2003/0040015 A1 (KIM et al.) 27 February 2003 (23.02.2003) para [0004], [0008]	1-16, 18-50
Y	US 2006/0058336 A1 (NAKINISHI et al.) 16 March 2006 (16.03.2006) para [0004] [0012]-[0018], [0036], [0038], [0073]	1-16, 21-31, 36, 38, 45-48
Y	US 5,593,367 B1 (DEWEY et al.) 15 July 2003 (15.07.2003) col 5, ln 31-48; col 6, ln 33-47, ln 50-51, ln 57-67; col 9, 13-25; col 10, ln 8-15, ln 20-25; col 16, ln 50-56	10, 12, 14-16, 18-50
Y	US 5,958,896 A (RENSHAW et al) 28 September 1999 (28.09.1999) col 1, ln 30-37, col 2, ln 17-30; col 6, ln 49-67	43-44, 49
Y	NICH et al. Sex differences in cocaine-dependent individuals' response to disulfiram treatment. Addictive Behaviors, 2004, Vol 29, pp 1123-1128, pg 1127, para 2	13, 41
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 October 2008 (22.10.2008)		Date of mailing of the international search report 14 NOV 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/72357

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 17
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claim 17 is an incomplete claim, being indefinite, and therefore unsearchable.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

To: NARINDER S. BANAIT
FENWICK & WEST LLP
SILICON VALLEY CENTER
801 CALIFORNIA STREET
MOUNTAIN VIEW, CA 94041

Date of mailing
(day/month/year) **14 NOV 2008**

Applicant's or agent's file reference
14442 PCT

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US 08/72357

International filing date (day/month/year)
06 August 2008 (06.08.2008)

Priority date (day/month/year)
06 August 2007 (06.08.2007)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
IPC(8) - A01N 43/50; A61K 31/415 (2008.04)
USPC - 514/396

Applicant **SYNOSIA THERAPEUTICS, INC.**

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion
22 October 2008 (22.10.2008)

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (April 2007)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 08/72357

Box No. 1 Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a)).
3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material
☐ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
☐ on paper
☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
☐ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in electronic form
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 08/72357

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 17

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 17 are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

Claim 17 is an incomplete claim, being indefinite, and therefore unsearchable.

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 17

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 08/72357

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-16, 18-50	YES
	Claims	none	NO
Inventive step (IS)	Claims	none	YES
	Claims	1-16, 18-50	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-16, 18-50	YES
	Claims	none	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-9 and 11 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2006/0058336 A1 to NAKANISHI et al. (hereinafter "Nakanishi") in view of US 2003/0040015 A1 to KIM et al. (hereinafter "Kim").

As to Claim 1, Nakanishi discloses a method of treating a patient suffering from or susceptible to at least one symptom of abuse of, dependence on or withdrawal from at least one substance (para [0012]-[0018]). Nakanishi does not disclose the method comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008]; "nopicastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that compounds such as nopicastat would be effective treatments for drug addiction, because of its function as a dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor, responsible for blocking the DHB enzyme responsible for converting dopamine to norepinephrine (NE), and thus change the ratio of dopamine to NE, allowing for the modulation of drug addictive behavior.

As to Claim 2, Nakanishi further discloses the method of claim 1, wherein the at least one substance is selected from a drug of abuse and a medication (para [0004]).

As to Claim 3, Nakanishi further discloses the method of claim 2, wherein the drug of abuse is selected from a psychostimulant ("amphetamine") an opioid, a hallucinogen, a sedative, a hypnotic, an anxiolytic (para [0004]).

As to Claims 4-6, Nakanishi further discloses the method of claim 3, wherein the psycho-stimulant agent is betaphenylisopropyl-amine derivative selected from amphetamine, dextroamphetamine, and methamphetamine (para [0004]). Nakanishi does not disclose the psychostimulant agent is selected from ecstasy, phenmetrazine, methylphenidate, diethylpropion, pemoline, mazindol, (-) cathione, and fenfluramine. It would have been obvious to one skilled in the art that drugs such as ecstasy, phenmetrazine, methylphenidate, diethylpropion, pemoline, mazindol, (-) cathione, and fenfluramine are psychostimulant agents or drugs of abuse.

As to Claim 7, Nakanishi further discloses the method of claim 3, wherein the opioid is selected from heroin, methadone, hydrocodone, and oxycodone (para [0004]).

As to Claim 8, Nakanishi further discloses the method of claim 3, wherein the drug abuse is selected from a hallucinogen (para [0004]). Nakanishi does not specifically name psilocybin, a hallucinogenic mushroom, lysergic acid diethylamide (LSD), phencyclidine (PCP), and ketamine as hallucinogens. It would have been obvious to one skilled in the art that psilocybin, a hallucinogenic mushroom, lysergic acid diethylamide (LSD), phencyclidine (PCP), and ketamine can have hallucinogenic effects since they bind in the CNS and modulate various neurotransmitters that cause hallucinations.

As to Claim 9, Nakanishi further discloses the method of claim 3, wherein the drug abuse is selected from an inhalant and an organic solvent type (para [0004]). Nakanishi does not specifically name the inhalant or organic solvent as benzene, toluene, o-xylene, m-xylene, p-xylene, ethylbenzene, fluorobenzene, o-difluorobenzene, 1,3,5-trifluorobenzene, 1,2,4-trifluorobenzene, pentafluorotoluene, pentafluorobenzene, and perfluorobenzene. It would have been obvious to one skilled in the art that benzene, toluene, o-xylene, m-xylene, p-xylene, ethylbenzene, fluorobenzene, o-difluorobenzene, 1,3,5-trifluorobenzene, 1,2,4-trifluorobenzene, pentafluorotoluene, pentafluorobenzene, and perfluorobenzene are inhalants since direct ingestion orally, would be fatal and further these organic solvents, when inhaled, can bind in the CNS and modulate various neurotransmitters that can cause a euphoric effect.

As to Claim 11, Nakanishi further discloses the method of claim 2, wherein the drug of abuse is cocaine, alcohol, caffeine, opium, cannabinoid, cannabis, nicotine (para [0004]).

-----continued in Supplemental Box-----

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 08/72357

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Box No. V 2. Citations and explanations:

Claims 18-20, 32-35, 37, 39-40, 42 and 50 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Kim in view of US 6,593,367 B1 to DEWEY et al (hereinafter 'Dewey').

As to Claims 18 and 33, Dewey discloses a method of treating at least one phase of substance dependence on at least one substance in a patient, wherein the at least one phase of substance dependence is selected from acquisition, maintenance, extinction, and relapse (col 6, ln 33-47; col 5, ln 31-47) comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a compound. Dewey does not disclose the compound as being Compound A. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "necipacastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that compounds such as nepicastat would be effective treatments for drug addiction, because of its function as a dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor, responsible for blocking the DHB enzyme that is responsible for converting dopamine to norepinephrine (NE), and thus change the ratio of dopamine to NE, allowing for the treatment of a phase of drug addiction.

As to Claims 19-20 and 34-35, they would have been obvious for reasons as set forth in claim 18.

As to Claims 32 and 50, Dewey discloses the method of claims 18 and 33, wherein the method further comprises administering a therapeutically effective amount of one other agent selected from a GABA metabolism enzyme inhibitor (Col 9, 13-25). Dewey does not disclose the co-administration of the GABA agent with Compound A. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "necipacastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that by modulating more than one neurotransmitter, associated with drug addictive behavior, by the co-administration of both a DHB inhibitor and a GABA metabolism enzyme inhibitor, a synergistic effect could be achieved, leading to the reversal of several symptoms of drug-abuse or cocaine addiction and also, prevent, further craving for cocaine.

As to Claim 37, Dewey discloses the method of claim 33, wherein the compound reduces in the patient at least one symptom of abuse of, dependence on, or withdrawal from cocaine (col 10, ln 8-15; col 10, ln 20-25). Dewey does not disclose the compound as Compound A. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "necipacastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that compounds such as nepicastat would be effective treatments for cocaine abuse, because of its function as a dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor, responsible for blocking the DHB enzyme responsible for converting dopamine to norepinephrine (NE), and thus change the ratio of dopamine to NE, allowing for the modulation of drug addictive behavior.

As to Claims 39-40 and 42, Dewey discloses the method of claim 37, wherein the compound reduces at least one symptom of cocaine dependence in the patient selected from tolerance, withdrawal, anxiety, fatigue and craving for cocaine (col 6, ln 27-47; col 5, ln 31-47). Dewey does not disclose the compound as being Compound A. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "necipacastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that compounds such as nepicastat would be effective treatments for drug addiction, because of its function as a dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor, responsible for blocking the DHB enzyme that is responsible for converting dopamine to norepinephrine (NE), and thus change the ratio of dopamine to NE, allowing for the treatment of a symptom of drug addiction.

Claim 13 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Nakinishi in view of Kim and further in view of the article entitled "Sex differences in cocaine-dependent individuals. response to disulfiram treatment" by NICH et al (hereinafter 'Nich').

As to Claim 13, Nich further discloses the method of claim 11, wherein the drug of abuse is cocaine and the treatment increases at least one negative subjective symptom of cocaine abuse and dependence (pg 1127, para 2). It would have been obvious to one skilled in the art that the dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor, associated with the increase in a negative symptom of cocaine abuse as disclosed by Nich, would also occur, using other DHB inhibitors, such as Compound A, as disclosed by Kim.

Claims 10, 12, 14-16, 21-31, 36, 38 and 45-48 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Nakinishi in view of Kim and further in view of Dewey.

As to Claim 10, Dewey further discloses the method of claim 2, wherein the medication is selected from an analgesic (col 6, ln 50-51; col 6, ln 57-67). It would have been obvious to one skilled in the art that certain medications as disclosed by Dewey, can cause dependence due to their non-specific binding of CNS receptors located in the area of the brain closely associated with drug dependence.

As to Claims 12 and 14, Dewey further discloses the method of claim 11, wherein the drug of abuse is cocaine (col 16, ln 50-56) and the treatment causes a reduction of at least one symptom of cocaine abuse and dependence in the patient selected from euphoria; less hunger and fatigue; anxiety; dysphoria; and craving for cocaine (col 5, ln 40-48; col 6, ln 33-44). Dewey does not disclose the treatment of drug abuse as Compound A. Kim discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "necipacastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that compounds such as nepicastat would be effective treatments for drug abuse, because of its function as a dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor, responsible for blocking the DHB enzyme responsible for converting dopamine to norepinephrine (NE), and thus change the ratio of dopamine to NE, allowing for the modulation of drug addictive behavior, in further view of Nakinishi.

-----continued in next Supplemental Box-----

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 08/72357

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Prior Supplemental Box

As to Claim 15, Dewey discloses the method of claim 1, wherein the method further comprises administering a therapeutically effective amount of one other agent selected from a GABA metabolism enzyme inhibitor (col 9, 13-25). Dewey does not disclose the co-administration of the GABA agent with Compound A. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "nepicastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that by modulating more than one neurotransmitter, associated with drug addictive behavior, by the co-administration of both a DHB inhibitor and a GABA metabolism enzyme inhibitor, a synergistic effect could be achieved, leading to the reversal of several symptoms of drug abuse or cocaine addiction and also, prevent, further craving for cocaine.

As to Claim 16, it would have been obvious for reasons as set forth in claim 15, and further it would have been obvious to one skilled in the art that other drugs, known to modulate neurotransmitters associated with drug addiction, could also be co-administered with Compound A.

As to Claims 21 and 36, Nakanishi discloses the method of claim 18 and 33, wherein the treatment reduces the frequency of relapse in the patient (para [0073]). Nakanishi does not disclose the compound as being Compound A. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "nepicastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that compounds such as nepicastat would be effective treatments for the various phases of drug addiction, because of its function as a dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor that is responsible for blocking the DHB enzyme responsible for converting dopamine to norepinephrine (NE), and thus change the ratio of dopamine to NE, allowing for the prevention of relapse.

As to Claim 22, Nakanishi further discloses the method of claim 18, wherein the at least one substance is selected from a drug of abuse and a medication (para 0004)).

As to Claim 23, Nakanishi further discloses the method of claim 22, wherein the drug of abuse is selected from a psychostimulant ("amphetamine") an opioid, a hallucinogen, a sedative, a hypnotic, an anxiolytic (para [0004]).

As to Claims 24-26, Nakanishi further discloses the method of claim 23, wherein the psycho-stimulant agent is betaphenylisopropyl-amine derivative selected from amphetamine, dextroamphetamine, and methamphetamine (para [0004]). Nakanishi does not disclose the psychostimulant agent is selected from ecstasy, phenmetrazine, methylphenidate, diethylpropion, pemoline, mazindol, (-) cathione, and fenfluramine. It would have been obvious to one skilled in the art that drugs such as ecstasy, phenmetrazine, methylphenidate, diethylpropion, pemoline, mazindol, (-) cathione, and fenfluramine are psychostimulant agents or drugs of abuse.

As to Claim 27, Nakanishi further discloses the method of claim 23, wherein the opioid is selected from heroin, methadone, hydrocodone, and oxycodone (para [0004]).

As to Claim 28, Nakanishi further discloses the method of claim 23, wherein the drug abuse is selected from a hallucinogen (para [0004]). Nakanishi does not specifically name psilocybin, a hallucinogenic mushroom, lysergic acid diethylamide (LSD), phencyclidine (PCP), and ketamine as hallucinogens. It would have been obvious to one skilled in the art that psilocybin, a hallucinogenic mushroom, lysergic acid diethylamide (LSD), phencyclidine (PCP), and ketamine can have hallucinogenic effects since they bind in the CNS and modulate various neurotransmitters that cause hallucinations.

As to Claim 29, Nakanishi discloses the method of claim 23, wherein the drug abuse is selected from an inhalant and an organic solvent type (para [0004]). Nakanishi does not specifically name the inhalant or organic solvent as benzene, toluene, O-xylene, m-xylene, p-xylene, ethylbenzene, fluorobenzene, o-difluorobenzene, 1,3,5-trifluorobenzene, 1,2,4-trifluorobenzene, pentafluorotoluene, pentafluorobenzene, and perfluorobenzene. It would have been obvious to one skilled in the art that benzene, toluene, O-xylene, m-xylene, p-xylene, ethylbenzene, fluorobenzene, o-difluorobenzene, 1,3,5-trifluorobenzene, 1,2,4-trifluorobenzene, pentafluorotoluene, pentafluorobenzene, and perfluorobenzene were inhalants since direct ingestion orally, would be fatal and further these organic solvents, when inhaled, can bind in the CNS and modulate various neurotransmitters that can cause a euphoric effect.

As to Claim 30, Dewey further discloses the method of claim 22, wherein the medication is selected from an analgesic (col 6, in 50-51; col 6, in 57-67). It would have been obvious to one skilled in the art that certain medications as disclosed by Dewey, can cause dependence due to their non-specific binding of CNS receptors located in the area of the brain closely associated with drug dependence.

As to Claim 31 Dewey discloses the method of claim 22, wherein the drug of abuse is cocaine (col 16, in 50-56) and the treatment causes a reduction of at least one symptom of cocaine abuse and dependence in the patient selected from euphoria; less hunger and fatigue; anxiety; dysphoria; and craving for cocaine (col 5, in 40-48; col 6, in 33-44). Dewey does not disclose the treatment of drug abuse as Compound A. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "nepicastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that compounds such as nepicastat would be effective treatments for drug abuse, because of its function as a dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor, responsible for blocking the DHB enzyme responsible for converting dopamine to norepinephrine (NE), and thus change the ratio of dopamine to NE, allowing for the modulation of drug addictive behavior.

-----continued in next Supplemental Box-----

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 08/72357

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Prior Supplemental Box:

As to Claim 38, Nakanishi discloses the method of claim 37, wherein the compound reduces the frequency of relapse in the patient (para [0073]). Nakanishi does not disclose the compound as being Compound A and the situations that occur, in the patient's life as a result of recurrent cocaine use. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "nopicastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that compounds such as nopicastat would be effective treatments for the various phases of drug addiction, because of its function as a dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor that is responsible for blocking the DHB enzyme responsible for converting dopamine to norepinephrine (NE), and thus change the ratio of dopamine to NE, allowing for the prevention of relapse that can upset the patient's social, financial, professional and interpersonal relationships.

As to Claim 45, Nakanishi discloses the method of claim 33, wherein the treatment compound reduces at least one of the amount and frequency of cocaine use by the patient (para [0036], [0038]; "abstinence or withdrawal"). Nakanishi does not disclose the treatment compound as compound A. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "nopicastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that compounds such as nopicastat would be effective treatments for drug addiction, because of its function as a dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor, responsible for blocking the DHB enzyme that is responsible for converting dopamine to norepinephrine (NE), and thus change the ratio of dopamine to NE, allowing for the treatment of a phase of drug addiction wherein the patient no longer has a desire for the drug and the frequency and amount of the addictive drug is reduced.

As to Claims 46-48, Nakanishi discloses the method of claim 33 wherein the treatment compound promotes remission in the patient (para [0073], "relapse"). Nakanishi does not disclose the treatment compound as compound A. Kim further discloses the method of treating drug addiction comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of Compound A (para [0004], [0008], "nopicastat"). It would have been obvious to one skilled in the art that to delay relapse, is in effect, promoting a remission, wherein the time between doses of addictive drug is increased, as the patient remains in remission, i.e. no longer have a desire for the addictive drug, due to the biological actions of the treatment compound or Compound A.

Claim 41 lacks an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Kim in view of Dewey further in view of Nich.

As to Claim 41, Nich further discloses the method of claim 37, wherein the drug of abuse is cocaine and the treatment increases at least one negative subjective symptom of cocaine abuse and dependence (pg 1127, para 2). It would have been obvious to one skilled in the art that the dopamine beta hydroxylase (DHB) inhibitor, associated with the increase in a negative symptom of cocaine abuse as disclosed by Nich, would also occur, using other DHB inhibitors, such as Compound A, as disclosed by Kim.

Claims 43-44 and 49 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Kim in view of Dewey and further in view of US 5,958,896 A to RENSHAW et al. (hereinafter "Renshaw").

As to Claims 43-44, Renshaw discloses the method of claim 33, wherein the compound improves a score of the patient on a cognitive function rating scale such as CALCAP (col 6, ln 49-67). Renshaw does not disclose WAIS-R, WMS-R, RAVLT, Trials I-VII, RCFT, and TMT, Parts A and B as cognitive function rating scale. It would have been obvious to one skilled in the art that cognitive testing could be rated a various scales, depending on the cognitive tasks to be measured, and could include those of the claimed invention.

As to Claim 49, Renshaw further discloses the method of claim 33, wherein the method further comprises additional treatment other than treatment for the dependency (col 1, ln 30-37; col 2, ln 17-30). Renshaw does not specifically disclose contingency management or cognitive behavioral therapy as additional therapy. It would have been obvious to one skilled in the art that additional therapy for the cognitive disorder associated with cocaine abuse, would be treated more efficiently, if done so by specific treatment for improved cognition such as cognitive behavioral therapy in addition to the treatment for drug dependence.

Claims 1-50 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43bis.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE DEPENDENCIA

(de sustancias adictivas tales como drogas y/o medicamentos)

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

[001] Esta solicitud reivindica el beneficio y la prioridad bajo la norma 35 U.S.C. § 119(e) de las solicitudes de patente provisionales Estadounidenses Nos. 60/935,323, “Métodos para el tratamiento de dependencia usando Nepicastat”, presentada el 6 de agosto de 2007; 60/965.555, “Métodos para el tratamiento de dependencia usando Nepicastat”, presentada el 17 de agosto de 2007; y 60/969.591, “Métodos para el tratamiento de dependencia usando Nepicastat”, presentada el 4 de octubre de 2007, que son todas incorporadas a la presente, en su totalidad en carácter de referencia.

15 Campo de la invención

[002] Se proporcionan ciertos métodos para tratar pacientes que sufren de, o son susceptibles a, al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de al menos una sustancia de abuso (sustancia adictiva) con el compuesto A. También se proporcionan ciertos métodos para el tratamiento de al menos una fase de dependencia de al menos una sustancia en pacientes y ciertos métodos para el tratamiento de al menos una fase de dependencia de cocaína en pacientes.

Antecedentes de la Invención

25

[003] El abuso y la dependencia de sustancias se caracterizan por las ansias, la búsqueda y el uso sin límites de control del consumo de la sustancia adictiva. Estos comportamientos ocurren a pesar de problemas significativos relacionados con el uso de la sustancia adictiva y en detrimento de otros comportamientos. En 2004, aproximadamente 22,5 millones de estadounidenses de 12 años o mayores necesitaron tratamiento por el abuso de sustancias (alcohol o drogas ilícitas). La última estimación de los costes sociales sólo por abuso de drogas ilícitas es de 181 mil millones de dólares (2002).

[004] El problema del abuso y la dependencia de la cocaína es un problema médico, social y legal de gran preocupación. Según la Encuesta Nacional del año 2005 sobre el Uso de Drogas y Salud, aproximadamente un 13,9% de los estadounidenses de 12 años y más han probado cocaína al menos una vez en su vida y el 3,3% ha probado la cocaína crack al menos una vez en su vida. Más problemático, en 2005, 2,4 millones de personas

eran usuarios actuales de cocaína, lo que supera los 2,0 millones de usuarios durante el año 2004. Similarmente, el número de usuarios actuales de crack aumentó de 467.000 en 2004 a 682.000 en 2005. En 2004, la “Drug Abuse Warning Network” estimó que a nivel nacional había 940.953 visitas a consultorios de emergencias relacionadas con drogas, y en la mayoría de las mismas estaba implicada la cocaína.

[005] Es evidente que existe una necesidad de un enfoque de tratamiento ampliamente efectivo que incluye un componente de medicación que puede ser más eficaz que los actuales tratamientos conductuales tales como sólo la terapia cognitiva-conductual o el manejo de contingencias. Se han estudiado varios tratamientos en ensayos clínicos sin éxito notable. En particular, se han realizado numerosos ensayos clínicos aleatorios controlados con antidepresivos, incluyendo ensayos con desipramina, fluoxetina, bupropiona e imipramina. También se han completado ensayos clínicos con estabilizadores del estado emocional, incluyendo carbamazepina y litio, al igual que ensayos con fenitoína, agonistas directos o indirectos de dopamina, incluyendo bromocriptina, pergolida, amantadina, mazindol y metilfenidato. También se estudió una serie de otros agentes, incluyendo ritanserina, gepirona, nimodipina y naltrexona. Ninguno de estos compuestos mostró ser fiablemente eficaz. Se evaluaron varias medicaciones que actúan sobre los sistemas del GABA como tratamientos para la dependencia de la cocaína, incluyendo tiagabina, baclofeno y vigabatrina. Los resultados obtenidos con la tiagabina han sido equívocos, aquellos con baclofeno han sido ligeramente más alentadores, aunque no convincentes. Estudios de la vigabatrina han sido tal vez igualmente alentadores, aunque se basan principalmente en ensayos abiertos. Los resultados de estos esfuerzos de desarrollo han sido generalmente desalentadores.

[006] El inhibidor de dopamina- β -hidroxilasa (DBH) disulfiram es el tratamiento farmacológico más eficaz para la dependencia de la cocaína actualmente disponible. Desafortunadamente, el disulfiram inhibe varias enzimas en forma no específica, incluyendo aldehído de hidrogenasa y esterasas plasmáticas. El disulfiram y compuestos relacionados forman un quelato con cobre, el que es un co-factor necesario para una variedad de enzimas, incluyendo aldehído de hidrogenasa, esterasas plasmáticas y DBH. Al inhibir la aldehído de hidrogenasa, el disulfiram altera el metabolismo del alcohol (etanol), produciendo la reacción disulfiram-etanol. Esta reacción consiste de enrojecimiento, náuseas e hipotensión.

[007] La inhibición de esterasas plasmáticas lentifica la eliminación de la cocaína, lo que puede resultar en elevaciones de los niveles plasmáticos de la cocaína. En estudios de laboratorio que evalúan los efectos de la cocaína intranasal durante el tratamiento con disulfiram, este tratamiento aumentó marcadamente los niveles plasmáticos de cocaína. Sin embargo, los niveles de cocaína incrementados no se asociaron con alteraciones de

efectos fisiológicos o subjetivos de la cocaína. Se observaron incrementos de seis veces de los niveles plasmáticos de cocaína en un estudio controlado, y pueden producirse elevaciones mayores en el contexto de un uso ilícito no controlado. Un estudio subsecuente que utilizó la administración intravenosa de cocaína documentó que el

5 disulfiram lentificó la eliminación de la cocaína, presumiblemente por la inhibición de las esterasas plasmáticas. La absorción lenta que sigue a la administración intranasal explica los aumentos de las concentraciones plasmáticas observadas previamente.

[008] Varios estudios han demostrado la eficacia preliminar de disulfiram como tratamiento de la dependencia de la cocaína. En estudios de laboratorio en seres

10 humanos, el tratamiento con disulfiram redujo los efectos subjetivos positivos producidos por la cocaína. En los pacientes con comorbilidad entre dependencia de alcohol y cocaína se observaron mejores resultados cuando son tratados hasta 500 mg de disulfiram. Del mismo modo, pacientes dependientes de opiato y cocaína mantenidos con buprenorfina redujeron el consumo de cocaína durante el tratamiento con

15 disulfiram. Recientemente, los resultados de un ensayo clínico a gran escala sugirieron que la administración de 250 mg de disulfiram por día, en comparación con un placebo, estaba asociado con una reducción del consumo de cocaína, independientemente del modo de uso de alcohol o del tipo de psicoterapia proporcionada. En este estudio, a 112 voluntarios dependientes de cocaína se administraron aleatoriamente un placebo o

20 disulfiram y se les proporcionó uno de dos tipos de psicoterapia. El tratamiento con disulfiram se asoció con un consumo reducido de cocaína, documentado por la obtención de un menor número de muestras de orina cocaína-positivas en comparación con el tratamiento con placebos. El tamaño del efecto fue modesto y este resultado debe ser repetido.

25 [009] El disulfiram inhibe la DBH, la única enzima que interviene en la síntesis de la norepinefrina (NE). La DBH se expresa en neuronas noradrenergicas y se localiza dentro de las vesículas sinápticas y se libera conjuntamente con la NE. La DBH puede medirse en el plasma, y la concentración de DBH es altamente hereditaria y su variabilidad en actividad se explica principalmente por la variabilidad en el locus de la DBH. La

30 variante T (-1021C→T) está asociada con la transcripción disminuida del gen DBH y con una menor actividad de DBH. Este alelo es bastante común. Se informó que la frecuencia del alelo T es de 20% entre afroamericanos, 22% entre americanos procedentes del norte de Europa y 16% entre japoneses. Las frecuencias correspondientes del haplotipo para estas poblaciones son de 0,32, 0,34 y 0,09,

35 respectivamente.

[010] Varios informes indican que el disulfiram es más eficaz en pacientes con menor actividad DBH. Se ha demostrado que en sujetos con baja actividad de DBH, la

proporción de urinas cocaína-positivas disminuyó con el tiempo durante el tratamiento con 250 mg/día de disulfiram con respecto al placebo, pero aumentó significativamente con el tiempo durante el tratamiento con 62,5 mg y 125 mg de disulfiram/día ($p < 0,04$). En aquellos pacientes con alta actividad DBH, la proporción de urinas cocaína-positivas aumentó con el tiempo con 62,5 mg/día de disulfiram en relación con el placebo ($p=0,001$). De este modo, la eficacia del tratamiento con 250 mg/día de disulfiram parece estar limitada a aquellos pacientes con actividad DBH baja, lo que corresponde al genotipo C→T. Parece que dosis de disulfiram menores de 250 mg/día aumentan el consumo de cocaína, posiblemente por la reducción del aclaramiento de la cocaína por la inhibición de las esterasas plasmáticas, aumentando así los efectos eufóricos de la cocaína relacionados con el abuso.

[011] El disulfiram reduce el consumo de cocaína más efectivamente en pacientes con el genotipo C→T de DBH asociado con una menor actividad de DBH. Presumiblemente, el disulfiram inhibe DBH más completamente en aquellos pacientes con menor actividad de DBH, de modo que el disulfiram es más eficaz en aquellos pacientes con el genotipo C→T de menor actividad. La observación de que el disulfiram es más efectivo en pacientes con el genotipo C→T de DBH de baja actividad confirma que la inhibición de DBH es un mecanismo clave de acción al utilizar disulfiram como terapia para la dependencia de la cocaína.

[012] Mientras que el disulfiram proporciona una comprobación conceptual de que los inhibidores de DBH constituyen tratamientos prometedores para la dependencia de la cocaína, la utilidad del disulfiram de por sí como tratamiento para la dependencia de la cocaína se encuentra severamente limitada por sus interacciones con alcohol y cocaína.

Resumen de la Invención

[013] Se proporcionan métodos para tratar pacientes que sufren de, o son susceptibles a, al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de al menos una sustancia adictiva. Los métodos incluyen la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A.

[014] También se proporcionan métodos para tratar al menos una fase de dependencia de al menos una sustancia en un paciente, en los cuales la al menos una fase se selecciona entre adquisición, mantenimiento, extinción y recaída. Los métodos incluyen la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A.

[015] También se proporcionan métodos para tratar al menos una fase de dependencia de cocaína en un paciente, en los cuales la al menos una fase se selecciona entre adquisición, mantenimiento, extinción y recaída. Los métodos incluyen la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A.

Descripción de los dibujos

[016] La Fig. 1 muestra el tamaño del efecto logrado con tamaños de muestra de entre 5 y 15.

[017] La Fig. 2 muestra los detalles de los ensayos enzimáticos individuales.

5 [018] La Fig. 3 muestra una tabla con las afinidades (IC50 ó pKi) de nepicastat con DBH y un rango de enzimas y receptores seleccionados.

[019] La Fig. 4 muestra los efectos de nepicastat sobre el % de inhibición de la actividad enzimática.

10 [020] La Fig. 5 muestra los niveles de dopamina urinaria en voluntarios normales después de 24 horas de tratamiento con nepicastat.

[021] La Fig. 6 muestra los niveles de norepinefrina en la corteza de ratas SHR a las cuales se administró vehículo o dosis variadas de nepicastat.

[022] La Fig. 7 muestra los niveles de dopamina en la corteza de ratas SHR a las cuales se administró vehículo o dosis variadas de nepicastat.

15 [023] La Fig. 8 muestra la relación dopamina/norepinefrina en la corteza de ratas SHR a las cuales se administró vehículo o dosis variadas de nepicastat.

[024] La Fig. 9 muestra los niveles de norepinefrina en la arteria mesentérica de ratas SHR a las cuales se administró vehículo o dosis variadas de nepicastat.

20 [025] La Fig. 10 muestra los niveles de dopamina en la arteria mesentérica de ratas SHR a las cuales se administró vehículo o dosis variadas de nepicastat.

[026] La Fig. 11 muestra la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica de ratas SHR a las cuales se administró vehículo o dosis variadas de nepicastat.

Descripción detallada

25 [027] Según lo utilizado en la presente memoria descriptiva, las palabras y frases siguientes tienen generalmente los significados que se indican a continuación, salvo en la medida en que el contexto en que se usan indique lo contrario.

[028] Tal como se utiliza en ésta, la expresión "Compuesto A" incluye (S)-5-aminometil-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol, (R)-5-aminometil-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol, y mezclas de los mismos, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, tal como la sal de clorhidrato. En algunas realizaciones, se utiliza nepicastat ((S)-5-aminometil-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol clorhidrato).

35 [029] Según lo usado en ésta, la expresión "Compuesto B" se refiere a (R)-5-aminometil-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol, así como también a sus sales farmacéuticamente aceptables, tal como la sal de clorhidrato.

[030] La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” incluye, pero no se limita a, las sales de ácidos inorgánicos tales como clorhidrato, fosfato, difosfato, bromhidrato, sulfato, sulfinato, nitrato, y sales similares; como así también a sales de un ácido orgánico, tales como malato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, acetato, lactato, metansulfonato, p-toluensulfonato, 2-hidroxietilsulfonato, benzoato, salicilato, 5 estearato y alcanato tales como acetato, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n\text{-COOH}$ donde n es 0-4 y sales similares.

[031] Además, si un compuesto se obtiene en la forma de una sal de adición con un ácido, la base libre puede obtenerse tratando una solución de la sal de ácido con una base. Inversamente, si el producto es una base libre, puede producirse una sal de adición, particularmente una sal de adición farmacéuticamente aceptable, mediante la disolución de la base libre en un solvente orgánico adecuado y el tratamiento de la solución con un ácido, de acuerdo con procedimientos convencionales para la preparación de sales de adición ácidas a partir de compuestos alcalinos. Los entendidos en el arte conocerán 10 varios métodos sintéticos que pueden utilizarse para la preparación de sales de adición no tóxicas farmacéuticamente aceptables.

[032] El término “paciente”, tal como se usa en ésta, se refiere a un mamífero. En ciertas realizaciones, el término “paciente” se refiere a un humano.

[033] Los términos “administrar”, “administrando” o “administración”, según lo usado 20 en ésta, se refieren a la administración directa del Compuesto A o de una composición del mismo a un paciente.

[034] Los términos “tratar” o “tratando”, según lo usado en ésta, se refieren a mitigar, inhibir, prevenir, mejorar y/o aliviar parcialmente o completamente la enfermedad, o al menos un síntoma de la misma.

[035] Los términos “sufrir” o “sufrimiento”, según lo usado en ésta, se refieren a una o 25 más condiciones diagnosticadas en paciente o que podría tener el mismo.

[036] El término “susceptible”, según lo usado en ésta, se refiere a que el paciente tiene una probabilidad de ser afectado por al menos un síntoma de una enfermedad.

[037] Los entendidos en el arte apreciarán que el “abuso de sustancia” implica 30 frecuentemente síntomas de una “dependencia” física y/o psicológica. Además, cuando la sustancia de abuso se retira de un individuo dependiente, la persona desarrolla muchas veces ciertos síntomas que incluyen trastornos del sueño y el estado emocional y una intensa disposición al consumo de la sustancia de abuso, conocidos como “síndrome de abstinencia”. Los métodos descritos en ésta abarcan el tratamiento del abuso de la sustancia en sí, de la dependencia y también del síndrome de abstinencia.

[038] El término “abuso de sustancia”, según lo usado en ésta, puede definirse con referencia a los criterios establecidos en el manual “Diagnostic and Statistical Manual of

Mental Disorders”, 4ta. Edición, texto revisado (2000) (“DSM-IV TR”), que fue preparado por el grupo de trabajo de dicho manual de la “American Psychiatric Association”. Una característica del abuso de sustancia es un patrón de mala adaptación al uso de la misma que se manifiesta por consecuencias recurrentes y significativamente adversas con relación al uso repetido de la sustancia. Según lo indicado por el manual DSM-IV TR, el abuso de una sustancia se define como un patrón mal adaptativo del abuso de una sustancia que conduce a un trastorno o alteración clínicamente significativo, que se manifiesta por al menos uno de los síntomas siguientes, que se manifiestan durante un período de 12 meses: (1) el uso recurrente de la sustancia resulta en un incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o el hogar; (2) el uso recurrente de la sustancia en situaciones en las cuales dicho uso es físicamente peligroso; (3) problemas legales recurrentes relacionados con la sustancia; y (4) uso continuado de la sustancia a pesar de los problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes causados o exacerbados por los efectos de la sustancia. Además, el manual DSM-IV TR requiere que los síntomas de abuso de una sustancia nunca se superpongan a los criterios de dependencia de una sustancia. En algunas realizaciones, el tratamiento del abuso de sustancias con naltrexona reduce la cantidad o frecuencia del consumo de la sustancia en el paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento del abuso de una sustancia con el Compuesto A en un paciente reduce al menos un síntoma indicado por el DSM-IV TR para el abuso de dicha sustancia. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A en un paciente reduce al menos un síntoma de abuso de sustancia que incluye, a modo de ejemplo y sin limitación, euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, falta de juicio, compulsión, agresión, ira, ansias por el uso de la sustancia de abuso y trastornos del estado emocional. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce las ansias por el consumo de la sustancia inducida en un paciente por un suceso estresante.

[039] Según lo usado en ésta, la frase “reduce un síntoma” se refiere a la reducción de al menos una de la frecuencia y la amplitud de un síntoma o de una condición en un paciente. En ciertas realizaciones, el paciente entra en remisión y ya no experimenta los síntomas.

[040] Según lo usado en ésta, la frase “aumento de un síntoma” se refiere al aumento de al menos una de la frecuencia y amplitud de un síntoma de una condición en un paciente.

[041] El término “dependencia de sustancia”, según lo usado en ésta, puede definirse con referencia a los criterios establecidos en el manual DSM-IV TR. Los síntomas que indican la dependencia de una sustancia establecidos en el DSM-IV TR están definidos por un patrón de uso de la sustancia que conduce a un deterioro o alteración clínicamente significativo que se manifiesta por al menos tres síntomas seleccionados

del grupo siguiente, que ocurren en cualquier momento durante el mismo período de doce meses: (1) tolerancia definida por ya sea (a) la necesidad para aumentar sustancialmente las cantidades de la sustancia para lograr el efecto deseado; o (b) un efecto sustancialmente disminuido con el uso continuado de la misma cantidad de la sustancia; (2) el síndrome de abstinencia demostrado por ya sea (a) el síndrome de abstinencia característico para la sustancia específica; o (b) se toma la misma sustancia o una sustancia estrechamente relacionada para aliviar o evitar los síntomas de la abstinencia; (3) la sustancia se toma muchas veces en cantidades mayores o durante un período más prolongado que el previsto; (4) existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de interrumpir o controlar el uso de la sustancia; (5) se invierte una gran cantidad de tiempo en actividades para obtener la sustancia, usar la sustancia o recuperarse de sus efectos; (6) debido al uso de la sustancia se abandonan o se reducen importantes actividades sociales, laborales o recreativas; y (7) se continúa con el uso de la sustancia a pesar de tener conocimiento de un problema físico o psicológico, persistente o recurrente, que probablemente ha sido causado o exacerbado por la sustancia. La dependencia de una sustancia puede estar acompañada por una dependencia fisiológica, en cuyo caso existen síntomas que evidencian la tolerancia o abstinencia, o la dependencia de una sustancia existe sin dependencia fisiológica, en cuyo caso no existen síntomas de tolerancia o abstinencia. En algunas realizaciones, el tratamiento de la dependencia de la sustancia con el Compuesto A reduce la cantidad o la frecuencia del consumo de la sustancia en el paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de la dependencia de una sustancia con el Compuesto A en un paciente reduce al menos un síntoma indicado por el DSM-IV TR para la dependencia de dicha sustancia. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A en un paciente reduce al menos un síntoma de dependencia de sustancia que incluye, a modo de ejemplo y sin limitación, al menos uno de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, falta de juicio, compulsión, agresión, ira, ansias por el uso de la sustancia de abuso y trastornos del estado emocional. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce las ansias por el consumo de la sustancia inducida en un paciente por un suceso estresante.

[042] Según lo usado en ésta, “remisión” se refiere a un estado en el que la presencia de al menos un síntoma de abuso o dependencia de sustancia se ha reducido. En algunas realizaciones, el término remisión no se aplica si el paciente está en tratamiento con un agonista o se encuentra en un ambiente controlado donde se restringe el acceso a la sustancia relevante. En algunas realizaciones, la expresión “remisión” se refiere a un estado en el que no se produce la presencia de al menos un síntoma de abuso o dependencia de sustancia. En algunas realizaciones, el término “remisión” se refiere a un

estado en el que todos los síntomas de abuso o dependencia de la sustancia se han reducido en un paciente. En algunas realizaciones, remisión se refiere a un estado en el que no se producen síntomas de abuso o dependencia de una sustancia. En algunas realizaciones, remisión se refiere a un estado en el que no se produce ningún consumo de una sustancia.

[043] En algunas realizaciones, la remisión se caracteriza por al menos uno de los tipos siguientes: remisión completa temprana, remisión parcial temprana, remisión completa sostenida y remisión parcial sostenida, y el término sólo se aplica después de que ninguno de los síntomas de abuso y dependencia de una sustancia han estado presentes durante al menos un mes. La definición de estos cuatro tipos de remisión se basa en el intervalo de tiempo que ha transcurrido desde el cese de la dependencia (remisión temprana versus remisión sostenida) y en la presencia continuada de al menos un síntoma de dependencia o abuso de la sustancia (remisión parcial versus remisión completa).

[044] El calificativo “remisión completa temprana” se utiliza cuando durante al menos un mes, pero durante menos de doce meses, no se encontraron síntomas de dependencia de sustancia o abuso de sustancia.

[045] El calificativo “remisión parcial temprana” se utiliza cuando durante por lo menos un mes, pero menos de doce meses, se encontró al menos un síntoma de dependencia de sustancia o abuso de sustancia, pero no se cumplieron los criterios para dependencia de sustancia o abuso de sustancia.

[046] El término “remisión completa sostenida” se utiliza cuando no se cumplió ninguno de los síntomas de dependencia de sustancia o abuso de sustancia en cualquier momento durante un período de al menos doce meses.

[047] El término “remisión parcial sostenida” se utiliza cuando durante al menos doce meses se encontró al menos un síntoma de dependencia de sustancia o abuso de sustancia, pero no se cumplieron los criterios para dependencia de sustancia o abuso de sustancia.

[048] En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A promueve la remisión en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A prolonga un período de remisión en un paciente.

[049] La frase “prolongar un período de remisión” se refiere a aumentar el intervalo de tiempo durante el cual el paciente está en remisión. En algunas realizaciones, el final de la remisión en un paciente puede estar causado por un evento estresante. En algunas realizaciones, al final de la remisión se produce una recaída. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce la probabilidad de que la remisión terminará en un paciente después de un evento estresante. En algunas realizaciones, el tratamiento

con el Compuesto A promueve al menos uno de remisión parcial temprana, remisión completa sostenida, remisión parcial sostenida y remisión completa sostenida.

[050] “Abstinencia” se refiere a un conjunto de síntomas que surgen cuando se reduce, se retrasa o se detiene la administración de una sustancia relevante. Los síntomas de abstinencia específicos para una determinada sustancia pueden causar trastornos o alteraciones significativos en las áreas social, laboral o de otro tipo importante, por ejemplo. Estos síntomas no se deben a una condición médica general y no se explican mejor por otro trastorno mental. Generalmente, pero no necesariamente, la abstinencia se asocia con la dependencia de sustancias. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia en un paciente. En algunas realizaciones, los síntomas de abstinencia incluyen, como ejemplo y sin ninguna limitación, apatía, irritabilidad, imprudencia, falta de juicio, compulsión, agresión, ira, ansias por el consumo de la sustancia, trastornos del estado emocional y trastornos del sueño. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce las ansias por el consumo de la sustancia inducidas en un paciente por un suceso estresante.

[051] El término “dependencia de sustancia” puede caracterizarse por la presencia de al menos una de las condiciones siguientes caracterizadas en el manual DSM-IV TR: abuso de alcohol, dependencia de alcohol, intoxicación alcohólica, delirio por intoxicación alcohólica, síntoma de abstinencia de alcohol, delirio por abstinencia de alcohol, trastorno de ansiedad inducido por alcohol, trastorno del estado emocional inducido por alcohol, trastorno de amnesia persistente inducido por alcohol, demencia persistente inducida por alcohol, trastorno psicótico inducido por alcohol con delirio, trastorno psicótico inducido por alcohol con halucinaciones, disfunción sexual inducida por alcohol, trastorno de sueño inducido por alcohol, trastorno relacionado con alcohol no especificado de otro modo (NOS), abuso de anfetamina, dependencia de anfetamina, intoxicación con anfetamina, delirio por intoxicación con anfetamina, síndrome de abstinencia de anfetamina, trastorno de ansiedad inducido por anfetamina, trastorno de estado emocional inducido por anfetamina, trastorno psicótico inducido por anfetamina con delirios, trastorno psicótico inducido por anfetamina con halucinaciones, disfunción sexual inducida por anfetamina, trastorno del sueño inducido por anfetamina, trastorno relacionado con anfetamina no especificado de otro modo (NOS), abuso de cannabis, dependencia de cannabis, intoxicación por cannabis, intoxicación por cannabis con delirio, delirio por intoxicación por cannabis, trastorno de ansiedad inducido por cannabis, trastorno psicótico inducido por cannabis con delirio, trastorno psicótico inducido por cannabis con halucinaciones, trastorno relacionado con cannabis no especificado de otro modo (NOS), abuso de cocaína, dependencia de cocaína, intoxicación por cocaína, delirio por intoxicación con cocaína, abstinencia de cocaína,

trastorno de ansiedad inducido por cocaína, trastorno de estado emocional inducido por cocaína, trastorno psicótico inducido por cocaína con delirios, trastorno psicótico inducido por cocaína con halucinaciones, disfunción sexual inducida por cocaína, trastorno del sueño inducido por cocaína, trastorno relacionado con cocaína no especificado de otro modo, abuso de inhalantes, dependencia de inhalantes, intoxicación por inhalantes, delirio por intoxicación con inhalantes, trastorno de ansiedad inducido por inhalantes, trastorno de estado emocional inducido por inhalantes, demencia persistente inducida por inhalantes, trastorno psicótico inducido por inhalantes con delirios, trastorno psicótico inducido por inhalantes con halucinaciones, trastorno relacionado con inhalantes no especificado de otro modo, abuso de opioides, dependencia de opioides, intoxicación por opioides, delirio por intoxicación con opioides, abstinencia de opioides, trastorno del estado emocional inducido por opioides, trastorno psicótico inducido por opioides con delirios, trastorno psicótico inducido por opioides con halucinaciones, disfunción sexual inducida por opioides, trastorno del sueño inducido por opioides, trastorno relacionado con opioides no especificado de otro modo, abuso de fenilciclilina, dependencia de fenilciclilina, intoxicación por fenilciclilina, delirio por intoxicación con fenilciclilina, trastorno de ansiedad inducido por fenilciclilina, trastorno del estado emocional inducido por fenilciclilina, trastorno psicótico inducido por fenilciclilina con delirios, trastorno psicótico inducido por fenilciclilina con halucinaciones y trastorno relacionado con fenilciclilina no especificado de otro modo.

[052] Los términos “suspensión” y “abstinencia” pueden referirse, pero no se refieren necesariamente, a las condiciones siguientes caracterizadas en el manual DSM-IV TR: abstinencia de nicotina, trastorno relacionado con nicotina no especificado de otro modo, dependencia de nicotina con dependencia fisiológica, dependencia de nicotina sin dependencia fisiológica, dependencia de nicotina con remisión completa temprana, dependencia de nicotina con remisión parcial temprana, dependencia de nicotina con remisión completa sostenida, dependencia de nicotina con remisión parcial sostenida, dependencia de nicotina relacionada con terapia con agonistas, abstinencia de opioides, trastorno relacionado con opioides no especificado de otro modo, dependencia de opioides con dependencia fisiológica, dependencia de opioides sin dependencia fisiológica, dependencia de opioides con remisión completa temprana, dependencia de opioides con remisión parcial temprana, dependencia de opioides con remisión completa sostenida, dependencia de opioides con remisión parcial sostenida, dependencia de opioides relacionada con terapia con agonistas, y dependencia de opioides en un ambiente controlado, abstinencia de etanol, dependencia de etanol con dependencia fisiológica, dependencia de etanol sin dependencia fisiológica, dependencia de etanol

con remisión completa temprana, abstinencia de etanol con remisión parcial temprana, abstinencia de etanol con remisión completa sostenida, abstinencia de etanol con remisión parcial sostenida, abstinencia de etanol relacionada con terapia con agonistas, abstinencia de etanol en un ambiente controlado, abstinencia de anfetamina y
5 abstinencia de cocaína.

[053] Según lo usado en ésta, el término “relacionado con terapia con agonistas” se refiere a que el paciente está bajo tratamiento con un agonista para abuso, dependencia o abstinencia de una sustancia. El término “agonista” se refiere a un factor que incluye, pero no está limitado a, un compuesto químico, tal como una molécula pequeña o un
10 compuesto orgánico complejo o una proteína, que desencadena una respuesta en un paciente que es al menos una respuesta o respuesta parcial a la sustancia de la cual el paciente abusa, depende o se abstiene. Por ejemplo, en algunas realizaciones “dependencia de opioides relacionada con terapia con agonistas” se refiere a la dependencia de opioides relacionada con la terapia con metadona.

[054] Síntomas de abstinencia pueden surgir con la reducción de cualquiera de una variedad de sustancias. Por ejemplo, la discontinuación del uso de productos de tabaco, que contienen todos nicotina, resulta típicamente en la aparición de las condiciones de abstinencia de nicotina. Los individuos sufren muchas veces los síntomas de la abstinencia de nicotina como consecuencia del uso discontinuado de tabaco en cualquier
20 forma, incluyendo, pero no estando limitados a, fumar un cigarrillo, cigarro, tabaco de pipa, o la ingestión oral o intranasal de tabaco o tabaco de mascar. Tal tabaco oral o intranasal incluye, pero no está limitado a, rapé o tabaco de mascar. La suspensión del consumo de nicotina o la reducción en la cantidad de nicotina consumida es seguida a menudo dentro de 24 horas por síntomas que incluyen un estado emocional disfórico, deprimido, aturdimiento, insomnio, irritabilidad, frustración o ira, ansiedad, temblor nervioso, dificultad para concentrarse, inquietud, disminución de la frecuencia cardíaca, aumento del apetito o aumento de peso y el ansia por el tabaco o la nicotina. Estos
25 síntomas causan a menudo un trastorno o deterioro clínicamente significativo en las áreas de desempeño social, ocupacional y otras áreas importantes. Los métodos descritos en ésta pueden utilizarse para aliviar uno o más síntomas atribuidos a la abstinencia de nicotina cuando tales síntomas no se deben a una condición médica general y no se explican mejor por otro trastorno médico. El presente método también ayuda a aquellos que han sustituido, o sustituido parcialmente, el uso de tabaco por el uso de una terapia de reemplazo de nicotina. Por lo tanto, tales pacientes pueden ser asistidos para reducir y
30 aún eliminar completamente su dependencia de la nicotina en todas sus formas.

[055] La discontinuación o reducción de la administración de un opioide, típicamente auto-administrado, mediante inyección u oralmente, mediante fumar o ingestión

intranasal, resulta muchas veces en la presencia de una condición característica de abstinencia de opioide. Esta condición de abstinencia también puede ser precipitada mediante la administración de un antagonista de opioides tal como naloxona o naltrexona después del uso de un opioide. La abstinencia de opioides se caracteriza por

5 síntomas que son generalmente opuestos a los efectos de agonistas de opioides. Estos síntomas de abstinencia pueden incluir ansiedad, inquietud, dolores musculares, muchas veces en la espalda y las piernas, ansias por opioides, irritabilidad y sensibilidad aumentada al dolor, estado emocional disfórico, náuseas o vómitos, lagrimeo, rinorrea, dilatación papilar, piloerección, sudoración, diarrea, bostezos, fiebre e insomnio. Cuando

10 la dependencia es de opioides de corta duración, tal como la heroína, los síntomas de abstinencia se producen generalmente dentro de 6-24 horas después de la última dosis, mientras que con opioides de duración más prolongada, como la metadona, el inicio de los síntomas puede tardar 2-4 días. Estos síntomas causan a menudo un trastorno o deterioro clínicamente significativo en las áreas de desempeño social, ocupacional y

15 otras áreas importantes. Los métodos descritos en ésta pueden utilizarse para aliviar uno o más síntomas atribuidos a la abstinencia de opioides cuando tales síntomas no se deben a una condición médica general y no se explican mejor por otro trastorno médico.

[056] La discontinuación o reducción del uso de etanol (por ejemplo, el etanol que contienen las bebidas) resulta en el inicio de condiciones de abstinencia de etanol. Las

20 condiciones de abstinencia de etanol se caracterizan por síntomas que comienzan cuando la concentración en la sangre de etanol disminuye fuertemente, dentro de 4 a 12 horas después que el consumo de etanol haya sido interrumpido o reducido. Estos síntomas de abstinencia de etanol incluyen fuerte disposición al consumo de etanol, hiperactividad del sistema autónomo (tales como sudor o una frecuencia del pulso superior a 100);

25 temblor en las manos, insomnio, náuseas, vómitos, halucinaciones o ilusiones visuales, táctiles o auditivas transitorias, agitación psicomotora, ansiedad y ataques de grand mal. Estos síntomas causan a menudo un trastorno o deterioro clínicamente significativo en las áreas de desempeño social, ocupacional u otras áreas importantes. Los métodos descritos en ésta pueden utilizarse para aliviar uno o más síntomas atribuidos a la

30 abstinencia de etanol cuando tales síntomas no se deben a una condición médica general y no se explican mejor por otro trastorno médico.

[057] El abuso y la dependencia de cocaína pueden causar síntomas cognitivos, de comportamiento y fisiológicos. Los síntomas de abuso y dependencia de cocaína pueden incluir varios grados de trastorno por déficit de atención con hiperactividad y euforia;

35 aumento de energía, excitación y sociabilidad, disminución de hambre y fatiga, una marcada sensación de fortaleza física y mental; disforia; disminución de la sensación del olor y ansia de cocaína. Los efectos respiratorios incluyen síntomas tales como

- bronquitis, dificultad para respirar y dolor en el pecho, y los efectos cardiovasculares incluyen síntomas tales como palpitaciones del corazón, arritmia, cardiomiopatía y ataques cardíacos. Los síntomas también incluyen pupilas dilatadas, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, vértigo, ansiedad, mareo, psicosis y confusión. La administración de cocaína mediante inhalación o aspiración por la nariz puede resultar en efectos en el oído, la nariz y la garganta, incluyendo irritación de la nariz, costras nasales, emorragias nasales recurrentes, congestión nasal y dolor facial. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de cocaína en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento con nepicstat aumenta al menos un síntoma subjetivo negativo del abuso y dependencia de cocaína.
- [058]** Los síntomas de abstinencia de cocaína pueden incluir fatiga, falta de placer, depresión, irritabilidad, trastornos del sueño, aumento del apetito, retraso psicomotor, agitación, paranoia y ansia de cocaína. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia de cocaína.
- [059]** La dependencia de sustancias puede caracterizarse por las fases: adquisición, mantenimiento, extinción y recaída. Según lo usado en ésta, el término “adquisición” se refiere a una fase de la dependencia de sustancias en la que la dependencia de la sustancia se inicia y es adquirida por el paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A inhibe el desarrollo de la fase de adquisición en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de la fase de adquisición con el Compuesto A reduce al menos una de la cantidad o la frecuencia del consumo de la sustancia por el paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de la fase de adquisición con el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de la sustancia indicado por el DSM-IV en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A de la fase de adquisición reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de sustancia que incluye, a modo de ejemplo y sin limitación, al menos uno de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, falta de juicio, compulsión, agresión, ira, ansias por el uso de la sustancia de abuso o dependencia y trastornos del estado emocional. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce la disposición al consumo de la sustancia inducida en un paciente por un suceso estresante durante la fase de adquisición.
- [060]** “Mantenimiento” se refiere a una fase de dependencia de sustancias en la cual hay una administración o uso estable de la sustancia por un paciente. En algunas realizaciones, una variación del 10% en al menos una de la cantidad y frecuencia de uso de la sustancia por un paciente se considera un comportamiento estable. En algunas realizaciones, el tratamiento de la fase de mantenimiento con el Compuesto A reduce al menos una de la cantidad o la frecuencia del consumo de la sustancia en el paciente. En

algunas realizaciones, el tratamiento de la fase de mantenimiento con el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de la sustancia indicado por el DSM-IV en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A de la fase de mantenimiento reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de sustancia que incluye, a modo de ejemplo y sin limitación, al menos uno de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, falta de juicio, compulsión, agresión, ira, ansias por el uso de la sustancia de abuso o dependencia y trastornos del estado emocional. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce las ansias por el consumo de la sustancia inducida en un paciente por un suceso estresante durante la fase de mantenimiento.

[061] “Extinción” se refiere a una fase de dependencia de sustancias en la que la sustancia no se proporciona a un paciente o un paciente se abstiene del uso de la sustancia. En algunas realizaciones, la dependencia de la sustancia se extingue o se reduce en la fase de extinción. En algunas realizaciones, se produce al menos un síntoma de abstinencia en la fase de extinción. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A promueve el desarrollo de la fase de extinción en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento de la fase de extinción con el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de la sustancia indicado por el DSM-IV en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A durante la fase de extinción reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de sustancia que incluye, a modo de ejemplo y sin limitación, al menos uno de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, falta de juicio, compulsión, agresión, ira, ansias por el consumo de la sustancia de abuso o dependencia y trastornos del estado emocional. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce los síntomas de abstinencia en un paciente en la fase de extinción. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce la disposición al consumo de la sustancia inducida en un paciente por un suceso estresante durante la fase de extinción.

[062] “Recaída” se refiere a la recurrencia de al menos un síntoma de abuso o dependencia de sustancias después de un período de abstinencia en un paciente. En algunas realizaciones, la recaída se produce al final de la remisión. En algunas realizaciones, un paciente fue sometido a un entrenamiento de extinción antes de la recaída. En algunas realizaciones, la recaída se produce después del apremio (priming) con droga, estrés o exposición a un medioambiente relacionado con una señal o estímulo que se asoció previamente con el uso de sustancias. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce la frecuencia de las recaídas en un paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A de la fase de recaída reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de sustancia indicado por el DSM-IV en un

- paciente. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A de la fase de recaída reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de sustancia que incluye, a modo de ejemplo y sin limitación, al menos uno de euforia, apatía, irritabilidad, imprudencia, falta de juicio, compulsión, agresión, ira, disposición al uso de la sustancia
- 5 de abuso o dependencia y trastornos del estado emocional. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce los síntomas de abstinencia en un paciente durante la fase de recaída. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A reduce las ansias por el consumo de la sustancia inducida en un paciente por un suceso estresante durante la fase de recaída.
- 10 **[063]** El tratamiento de abuso, dependencia y abstinencia de sustancias puede llevarse a cabo en etapas. En algunas realizaciones, se prefiere un período inicial de abstinencia del consumo de sustancias previo a la inducción del tratamiento con el Compuesto A en un paciente. En algunas realizaciones, se administra una dosis inicial baja del Compuesto A a un paciente. En algunas realizaciones, la cantidad de Compuesto A administrada a un
- 15 paciente se aumenta en forma escalonada hasta observar una respuesta terapéutica deseada. En algunas realizaciones, la cantidad de Compuesto A se aumenta en forma escalonada para determinar la dosis óptima para tratar la condición y minimizar los síntomas, efectos secundarios y la disposición al consumo de la sustancia en un paciente.
- [064]** En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A promueve la
- 20 remisión. En otras realizaciones, la dosis del Compuesto A no se modifica o se disminuye después de alcanzar la remisión en un paciente.
- [065]** Se proporcionan métodos para tratar un paciente que sufre de, o es susceptible a, al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de al menos una sustancia adictiva. Los métodos incluyen la administración al paciente de una cantidad
- 25 terapéuticamente efectiva del Compuesto A. En algunas realizaciones, la al menos una sustancia se selecciona entre una droga de abuso y un medicamento. En algunas realizaciones, la droga de abuso se selecciona entre un agente psicoestimulante, un opioide, un alucinógeno, un inhalante, un sedante, un tranquilizante, un hipnótico, un ansiolítico y una sustancia ilícita. En algunas realizaciones, el agente psicoestimulante es
- 30 un derivado de beta-fenilisopropilamina. En algunas realizaciones, el derivado de beta-fenilisopropilamina se selecciona entre anfetamina, dextroanfetamina y metanfetamina. En algunas realizaciones, el agente psicoestimulante se selecciona entre éxtasis, fenmetrazina, metilfenidato, dietilpropiona, pemolina, mazindol, (-) cationa y fenfluramina. En algunas realizaciones, el opioide se selecciona entre Lortab, Tramadol,
- 35 heroína, metadona, hidrocodona y oxicodona. En algunas realizaciones, el alucinógeno se selecciona entre psilocibina, un hongo alucinógeno, dietilamida del ácido lisérgico (LSD), fenciclidina (PCP), y ketamina. En algunas realizaciones, el inhalante se

selecciona entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenceno, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno y perfluorobenceno. En algunas realizaciones, el medicamento se selecciona entre un anestésico, un analgésico, un agente

5 anticolinérgico, un antihistamínico, un relajante muscular, un medicamento anti-inflamatorio no esteroide, un medicamento de venta libre y un medicamento antidepresivo. En algunas realizaciones, la droga de abuso es cocaína, alcohol, cafeína, opio, cannabinoide, cannabis, benzodiacepina, carisprodol, tabaco, nicotina, Vicodin, Lorcet, Percocet, Percodan y Tilox. En algunas realizaciones, la droga de abuso es

10 cocaína y el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso y dependencia de la cocaína seleccionado entre trastorno por déficit de atención con hiperactividad, euforia, energía, excitación y sociabilidad aumentadas, menos hambre y fatiga, una marcada sensación de fortaleza física y mental, disminución de la sensación de dolor, bronquitis, dificultad para respirar, dolor de pecho, palpitaciones del corazón,

15 arritmia, cardiomiopatía, ataque cardíaco, pupilas dilatadas, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, vértigo, mareos, ansiedad, psicosis, confusión, irritación nasal, costras nasales, hemorragias nasales recurrentes, congestión nasal, dolor facial, disforia y ansia de cocaína. En algunas realizaciones, la droga de abuso es cocaína y el Compuesto A aumenta al menos un síntoma subjetivo negativo del abuso y dependencia de la cocaína.

20 En algunas realizaciones, la droga de abuso es cocaína y el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia de cocaína seleccionado entre fatiga, falta de placer, depresión, irritabilidad, trastornos del sueño, aumento del apetito, retraso psicomotor, agitación, paranoia y ansiedad para la cocaína. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A mejora un puntaje del paciente de al menos una de las escalas

25 siguientes: la escala de déficit de atención con hiperactividad IV (ADHD-IV), la escala de depresión de Hamilton (HAM-D), la escala de ansiedad de Hamilton (HAM-A), el Inventario de Depresión de Beck (BDI), la escala de la apatía del Inventario Neuropsiquiátrico y una escala de calificación de la función cognitiva. En algunas realizaciones, la escala de calificación de la función cognitiva se selecciona entre: la

30 escala revisada de inteligencia de adultos de Weschler (WAIS-R), la escala revisada de memoria de Wechsler (WMS-R), el ensayo de aprendizaje verbal auditivo de Rey (RAVLT, Ensayos I-VII), el ensayo de figura compleja de Rey (RCFT), y el ensayo del trazo (TMT, partes A y B). En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el

35 paciente al menos una de la cantidad y frecuencia del consumo de la sustancia por el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de al menos una sustancia. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso de

sustancias seleccionado entre: uso recurrente de una sustancia que resulta en el incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o el hogar, uso recurrente de una sustancia en situaciones en las que el uso sea físicamente peligroso, problemas legales relacionados con el uso recurrente de la sustancia y uso continuado de la sustancia a pesar de tener problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes causados o exacerbados por los efectos de la sustancia. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma de dependencia de sustancias en el paciente seleccionado entre tolerancia, abstinencia, ingestión abundante de la sustancia en cantidades mayores o durante un período más prolongado que los esperados; existe un deseo persistente y/o esfuerzos infructuosos para reducir o controlar el uso de la sustancia, se gasta una gran cantidad de tiempo en al menos una de las actividades para obtener la sustancia, consumir la sustancia y recuperarse de sus efectos; se abandona y/o reduce al menos una actividad de importancia social, laboral o recreativa debido al uso de la sustancia, y se sigue consumiendo la sustancia a pesar del conocimiento de tener un problema físico y/o psicológico persistente y/o recurrente probablemente causado o exacerbado por la sustancia. En algunas realizaciones, el Compuesto A promueve la remisión en el paciente. En algunas realizaciones, la remisión se caracteriza por al menos una entre remisión completa temprana, remisión parcial temprana, remisión completa sostenida y remisión parcial sostenida. En algunas realizaciones, el Compuesto A prolonga un período de remisión en el paciente. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además el tratamiento con al menos uno entre manejo de contingencias y terapia cognitiva conductual. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además la co-administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un otro agente seleccionado entre un inhibidor selectivo de reabsorción de serotonina (SSRI), un inhibidor de reabsorción de serotonina-norepinefrina (SNRI), un inhibidor de reabsorción de norepinefrina (NRI), un inhibidor de reabsorción de norepinefrina/dopamina (NDRI), un antagonista de serotonina-5-hidroxitriptamina 1A (5HT1A), un inhibidor de la dopamina-beta-hidroxilasa, un antagonista del receptor de la adenosina, un antagonista del receptor de adenosina A2A, un inhibidor de monoamina-oxidasa (MAOI), un inhibidor de la monoamino oxidasa B, un bloqueador del canal de sodio, un bloqueador del canal de calcio, un antagonista del receptor alfa adrenérgico central y periférico, un agonista alfa-adrenérgico central, un antagonista del receptor beta-adrenérgico central o periférico, un antagonista del receptor NK-1, un antagonista del factor liberador de corticotropina (CRF), un antidepresivo/antipsicótico atípico, un tricíclico, un anticonvulsivo, un antagonista del glutamato, un agonista del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un inhibidor de la enzima del metabolismo de GABA, un activador de la síntesis del GABA, un agonista parcial D2 de dopamina, un

inhibidor de la enzima del metabolismo de la dopamina, un inhibidor de catecol-O-metil-transferasa, un antagonista de receptores de opioides, un estabilizador del estado emocional, un agonista directo o indirecto de dopamina, un agonista parcial de 5HT1, un antagonista de 5HT2 de serotonina, un opioide, un inhibidor de carboxilasa, un agonista de opioide parcial, un agonista nicotínico parcial y un inhalante. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es un SSRI seleccionado entre paroxetina, sertralina, citalopram, escitalopram y fluoxetina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un SNRI seleccionado entre duloxetina, mirtazapina y venlafaxina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un NRI seleccionado entre bupropiona y atomoxetina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el NDRI bupropiona. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el inhibidor de dopamina-beta-hidroxilasa disulfiram. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el antagonista del receptor de adenosina A2A istradefilina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un bloqueador de canal de sodio seleccionado entre lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina y valproato. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un bloqueador de canal de calcio seleccionado entre nimodopona, lamotrigina y carbamazepina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el antagonista del receptor alfa-adrenérgico central y periférico prazosina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el agonista alfa-adrenérgico central clonidina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el antagonista del receptor beta-adrenérgico central o periférico propranolol. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es un antidepresivo/antipsicótico atípico seleccionado entre bupropiona, olanzapina, risperidona y quetiapina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es un tricíclico seleccionado entre amitriptidina, amoxapina, desipramina, doxepin, imipramina, nortriptilina, protriptilina y trimipramina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un anticonvulsivo seleccionado entre fenitoina, lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina, valproato, topiramato, tiagabina, vigabatrin y levetiracetam. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el antagonista del glutamato topiramato. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un antagonista del GABA seleccionado entre baclofeno, valproato y topiramato. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el inhibidor de la enzima del metabolismo de dopamina carbidopa. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el agonista parcial de dopamina D2 aripiprazol. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un antagonista de un receptor de opioide seleccionado entre naltrexona y naloxona. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es un estabilizador del estado emocional seleccionado entre carbamazepina y litio. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un agonista de dopamina

directo o indirecto seleccionado entre dopamina, bromocriptina, pergolida, amantadina, mazindol y metilfenidato. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el agonista parcial de 5HT1 gepirona. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el antagonista de 5HT2 de serotonina ritanserina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el opioide metadona. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el agonista de opioide parcial buprenorfina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el agonista nicotínico parcial champix. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es un inhalante que se selecciona entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenceno, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno y perfluorobenceno. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además la co-administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos otro agente seleccionado entre benzodiazpina, levodopa, carisprodol, modafenil, acamprosato, gamma-butirolactona, gamma-hidroxibutirato, opio, psilocibina, hongos halucinógenos, tabaco y nicotina. En algunas realizaciones, el Compuesto A se administra al paciente después de un período de abstinencia de la sustancia consumida por el paciente. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A en el paciente se determina mediante el aumento escalonado de la cantidad de Compuesto A administrada al paciente hasta observar una respuesta terapéutica deseada. En algunas realizaciones, la cantidad del Compuesto A se disminuye después de alcanzar la remisión en un paciente. En algunas realizaciones, la cantidad del Compuesto A permanece igual después de alcanzar la remisión en un paciente.

[066] También se proporcionan métodos para tratar al menos una fase de la dependencia de sustancias de al menos una sustancia en un paciente. En algunas realizaciones, la al menos una fase de dependencia de sustancia se selecciona entre adquisición, mantenimiento, extinción y recaída. Los métodos incluyen la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto A. En algunas realizaciones, el Compuesto A inhibe el desarrollo de la fase de adquisición en el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A promueve el desarrollo de la fase de extinción en el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce la frecuencia de las recaídas en el paciente. En algunas realizaciones, la al menos una sustancia se selecciona entre una droga de abuso y un medicamento. En algunas realizaciones, la droga de abuso se selecciona entre un agente psicoestimulante, un opioide, un halucinógeno, un inhalante, un sedante, un tranquilizante, un hipnótico, un ansiolítico y una sustancia ilícita. En algunas realizaciones, el agente psicoestimulante es un derivado de beta-fenilisopropilamina.

En algunas realizaciones, el derivado de beta-fenilisopropilamina se selecciona entre anfetamina, dextroanfetamina y metanfetamina. En algunas realizaciones, el agente psicoestimulante se selecciona entre éxtasis, fenmetrazina, metilfenidato, dietilpropiona, pemolina, mazindol, (-) cationa y fenfluramina. En algunas realizaciones el opioide se selecciona entre Lortab, Tramadol, heroína, metadona, hidrocodona y oxicodona. En algunas realizaciones, el halucinógeno se selecciona entre psilocibina, un hongo halucinógeno, dietilamida del ácido lisérgico (LSD), fenciclidina (PCP), y ketamina. En algunas realizaciones, el inhalante se selecciona entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenceno, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno y perfluorobenceno. En algunas realizaciones, el medicamento se selecciona entre un anestésico, un analgésico, un agente anticolinérgico, un antihistamínico, un relajante muscular, un medicamento anti-inflamatorio no esteroide, un medicamento de venta libre y un medicamento antidepresivo. En algunas realizaciones, la droga de abuso es alcohol, cafeína, opio, cannabinoide, cannabis, benzodiacepina, carisprodol, tabaco, nicotina, Vicodin, Lorcet, Percocet, Percodan y Tilox. En algunas realizaciones, el tratamiento con el Compuesto A mejora un puntaje del paciente en al menos una de las escalas ADHD-IV, HAM-D, HAM-A, BDI, la escala de apatía del Inventario Neuropsiquiátrico y una escala de puntaje de la función cognitiva. En algunas realizaciones, la escala de puntaje de la función cognitiva se selecciona entre las escalas WAIS-R, WMS-R, RAVLT, Ensayos I-VII, RCFT y TMT, Partes A y B. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el paciente al menos una de la cantidad y frecuencia de consumo de la al menos una sustancia consumida por el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de la al menos una sustancia. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso de sustancias seleccionado entre: uso recurrente de una sustancia que resulta en el incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o el hogar, uso recurrente de una sustancia en situaciones en las que el uso sea físicamente peligroso, problemas legales relacionados con el uso recurrente de la sustancia y uso continuado de la sustancia a pesar de tener problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes causados o exacerbados por los efectos de la sustancia. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma de dependencia de sustancias en un paciente seleccionado entre tolerancia, abstinencia, frecuente ingestión de la sustancia en cantidades mayores o durante un período más prolongado que el intencionado, existe un deseo persistente y/o esfuerzos infructuosos para disminuir o controlar el uso de la sustancia; se gasta una gran cantidad de tiempo en al menos una de las actividades para obtener la sustancia, consumir la sustancia, y recuperarse de sus

efectos, se abandona y/o se reduce al menos una de actividad de importancia social, laboral y recreacional debido al uso de la sustancia; y se continúa con el uso de la sustancia a pesar del conocimiento de que se tiene un problema físico y/o psicológico persistente y/o recurrente probablemente causado o exacerbado por la sustancia. En algunas realizaciones, el Compuesto A promueve la remisión en el paciente. En algunas realizaciones, la remisión se caracteriza por al menos una entre remisión completa temprana, remisión parcial temprana, remisión completa sostenida y remisión parcial sostenida. En algunas realizaciones, el Compuesto A prolonga un período de remisión en el paciente. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además el tratamiento con al menos uno entre manejo de contingencias y terapia cognitiva conductual. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además la co-administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un otro agente seleccionado entre: un inhibidor selectivo de reabsorción de serotonina (SSRI), un inhibidor de reabsorción de serotonina-norepinefrina (SNRI), un inhibidor de reabsorción de norepinefrina (NRI), un inhibidor de reabsorción de norepinefrina-dopamina (NDRI), un antagonista de serotonina-5-hidroxitriptamina 1A (5HT1A), un inhibidor de la dopamina- β -hidroxilasa, un antagonista del receptor de la adenosina, un antagonista del receptor de adenosina A2A, un inhibidor de monoamina-oxidasa (MAOI), un inhibidor de la monoamino oxidasa B, un bloqueador de canal de sodio, un bloqueador del canal de calcio, un antagonista del receptor alfa adrenérgico central y periférico, un agonista alfa-adrenérgico central, un antagonista del receptor beta-adrenérgico central o periférico, un antagonista del receptor NK-1, un antagonista del factor liberador de corticotropina (CRF), un antidepresivo/antipsicótico atípico, un tricíclico, un anticonvulsivo, un antagonista del glutamato, un agonista del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un inhibidor de la enzima del metabolismo del GABA, un activador de la síntesis del GABA, un agonista parcial de dopamina D2, un inhibidor de la enzima del metabolismo de dopamina, un inhibidor de catecol-O-metiltransferasa, un antagonista del receptor de opioides, un estabilizador del estado emocional, un agonista directo o indirecto de dopamina, un agonista 5HT1 parcial, un antagonista 5HT2 de serotonina, un opioide, un inhibidor de carboxilasa, un agonista parcial de opioide, un agonista nicotínico parcial y un inhalante.

En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un SSRI seleccionado entre paroxetina, sertralina, citalopram, escitalopram y fluoxetina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un SNRI seleccionado entre duloxetina, mirtazapina y venlafaxina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un NRI seleccionado entre bupropiona y atomoxetina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el NDRI bupropiona. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el

inhibidor de dopamina-beta-hidroxilasa disulfiram. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el antagonista del receptor de adenosina A2A istradefilina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un bloqueador de canal de sodio seleccionado entre lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina y valproato. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un bloqueador de canal de calcio seleccionado entre nimodopona, lamotrigina y carbamazepina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el antagonista del receptor alfa-adrenérgico central y periférico prazosina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el agonista alfa-adrenérgico central clonidina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el antagonista del receptor beta-adrenérgico central o periférico propranolol. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un antidepresivo/antipsicótico atípico seleccionado entre bupropiona, olanzapina, risperidona y quetiapina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un tricíclico seleccionado entre amitriptidina, amoxapina, desipramina, doxepina, imipramina, nortriptilina, protilina y trimipramina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un anticonvulsivo seleccionado entre fenitoina, lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina, valproato, topiramato, tiagabina, vigabatrin y levetiracetam. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el antagonista del glutamato topiramato. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un agonista del GABA seleccionado entre baclofeno, valproato y topiramato. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el inhibidor de la enzima del metabolismo de dopamina carbidopa. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el agonista parcial D2 de dopamina aripiprazol. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un antagonista de un receptor de opioide seleccionado entre naltrexona y naloxona. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un estabilizador del estado emocional seleccionado entre carbamazepina y litio. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un agonista de dopamina directo o indirecto seleccionado entre dopamina, bromocriptina, pergolida, amantadina, mazindol y metilfenidato. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el agonista parcial de 5HT1 gepirona. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el antagonista de 5HT2 de serotonina ritanserina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el opioide metadona. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el agonista de opioide parcial buprenorfina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el agonista nicotínico parcial champix. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un inhalante que se selecciona entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenceno, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno y perfluorobenceno. En algunas realizaciones, los métodos incluyen

además la co-administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos otro agente seleccionado entre benzodiazepina, levodopa, carisprodol, modafenil, acamprosato, gamma-butirolactona, gamma-hidroxibutirato, opio, psilocibina, hongos halucinógenos, tabaco y nicotina. En algunas realizaciones, el Compuesto A se

5 administra al paciente después de un período de abstinencia de la sustancia consumida por el paciente. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A en el paciente se determina mediante el aumento escalonado de la cantidad de Compuesto A administrada al paciente hasta observar una respuesta terapéutica deseada. En algunas realizaciones, la cantidad del Compuesto A se

10 disminuye después de alcanzar la remisión en un paciente. En algunas realizaciones, la cantidad del Compuesto A permanece igual después de alcanzar la remisión en un paciente.

[067] También se proporcionan métodos para tratar al menos una fase de dependencia de cocaína en un paciente. En algunas realizaciones, la al menos una fase se selecciona

15 entre adquisición, mantenimiento, extinción y recaída. Los métodos incluyen la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto A. En algunas realizaciones, el Compuesto A inhibe el desarrollo de la fase de adquisición en el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A promueve el desarrollo de la fase de extinción en el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce la

20 frecuencia de las recaídas en el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso de cocaína seleccionado entre: uso recurrente de cocaína que resulta en el incumplimiento de obligaciones importantes en el trabajo, la escuela o el hogar, uso

25 recurrente de cocaína en situaciones en las que el uso sea físicamente peligroso, problemas legales relacionados con el uso recurrente de cocaína y uso continuado de cocaína a pesar de tener problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes causados o exacerbados por los efectos de la cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma de dependencia de cocaína en el paciente

30 seleccionado entre tolerancia, abstinencia, ingestión abundante de la cocaína en cantidades mayores o durante un período más prolongado que los esperados; existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos para reducir o controlar el uso de cocaína, se gasta una gran cantidad de tiempo en al menos una de las actividades para obtener la cocaína, consumir la cocaína o recuperarse de sus efectos; se abandona o reduce al

35 menos una actividad de importancia social, laboral o recreativa debido al uso de la cocaína, y se sigue consumiendo la cocaína a pesar del conocimiento de tener un problema físico o psicológico persistente o recurrente probablemente causado o

exacerbado por la cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de cocaína seleccionado entre trastorno de déficit de atención con hiperactividad; euforia; energía, excitación y sociabilidad aumentadas; disminución de hambre y fatiga; una sensación marcada de fuerza física y mental; 5 sensación disminuida de dolor; bronquitis; dificultad de respiración; dolor de pecho; palpitaciones del corazón; arritmia; cardiomiopatía; ataque cardíaco; pupilas dilatadas; náuseas; vómitos; dolor de cabeza; vértigo; mareos; ansiedad; psicosis; confusión; irritación nasal; costras nasales; hemorragias nasales recurrentes; congestión nasal; dolor facial; disforia y ansias de cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A aumenta 10 al menos un síntoma subjetivo negativo del abuso y dependencia de cocaína. En algunas realizaciones, el compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia de cocaína seleccionado entre fatiga, falta de placer, depresión, irritabilidad, trastornos del sueño, aumento del apetito, retraso psicomotor, agitación, paranoia y ansiedad para la cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A mejora un puntaje del paciente en al menos 15 una de las escalas ADHD-IV, HAM-D, HAM-A, BDI, la escala de apatía del Inventario Neuropsiquiátrico y una escala de puntaje de la función cognitiva. En algunas realizaciones, la escala de puntaje de la función cognitiva se selecciona entre las escalas WAIS-R, WMS-R, RAVLT, Ensayos I-VII, RCFT y TMT, Partes A y B. En algunas realizaciones, el Compuesto A reduce en el paciente al menos una de la cantidad y 20 frecuencia del consumo de cocaína. En algunas realizaciones, el Compuesto A promueve la remisión en el paciente. En algunas realizaciones, la remisión se caracteriza por al menos una entre remisión completa temprana, remisión parcial temprana, remisión completa sostenida y remisión parcial sostenida. En algunas realizaciones, el Compuesto A prolonga un período de remisión en el paciente. En algunas realizaciones, los métodos 25 incluyen además el tratamiento con al menos uno entre manejo de contingencias y terapia cognitiva conductual. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además la co-administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un otro agente seleccionado entre un inhibidor selectivo de reabsorción de serotonina (SSRI), un inhibidor de reabsorción de serotonina-norepinefrina (SNRI), un inhibidor de 30 reabsorción de norepinefrina (NRI), un inhibidor de reabsorción de norepinefrina-dopamina (NDRI), un antagonista de 5-hidroxitriptamina 1A de serotonina (5HT1A), un inhibidor de la dopamina-beta-hidroxilasa, un antagonista del receptor de la adenosina, un antagonista del receptor de adenosina A2A, un inhibidor de monoamina-oxidasa (MAOI), un inhibidor de la monoamino oxidasa B, un bloqueador del canal de sodio, un bloqueador del canal de calcio, un antagonista del receptor alfa adrenérgico 35 central y periférico, un agonista alfa-adrenérgico central, un antagonista del receptor beta-adrenérgico central o periférico, un antagonista del receptor NK-1, un antagonista

del factor liberador de corticotropina (CRF), un antidepresivo/antipsicótico atípico, un tricíclico, un anticonvulsivo, un antagonista del glutamato, un agonista del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un inhibidor de la enzima del metabolismo del GABA, un activador de la síntesis del GABA, un agonista parcial de dopamina D2, un inhibidor de la enzima del metabolismo de la dopamina, un inhibidor de catecol-O-metil-transferasa, un antagonista de receptores de opioides, un estabilizador del estado emocional, un agonista directo o indirecto de dopamina, un agonista parcial de 5HT1, un antagonista de 5HT2 de serotonina, un opioide, un inhibidor de carboxilasa, un agonista de opioide parcial, un agonista nicotínico parcial y un inhalante. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un SSRI seleccionado entre paroxetina, sertralina, citalopram, escitalopram y fluoxetina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un SNRI seleccionado entre duloxetina, mirtazapina y venlafaxina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un NRI seleccionado entre bupropiona y atomoxetina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el NDRI bupropiona. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el inhibidor de dopamina-beta-hidroxilasa disulfiram. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el antagonista del receptor de adenosina A2A istradefilina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un bloqueador de canal de sodio seleccionado entre lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina y valproato. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un bloqueador de canal de calcio seleccionado entre nimodopona, lamotrigina y carbamazepina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el antagonista del receptor alfa-adrenérgico central y periférico prazosina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el agonista alfa-adrenérgico central clonidina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el antagonista del receptor beta-adrenérgico central o periférico propranolol. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es un antidepresivo/antipsicótico atípico seleccionado entre bupropiona, olanzapina, risperidona y quetiapina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un tricíclico seleccionado entre amitriptidina, amoxapina, desipramina, doxepina, imipramina, nortriptilina, protriptilina y trimipramina. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un anticonvulsivo seleccionado entre fenitoina, lamotrigina, carbamazepina, oxcarbazepina, valproato, topiramato, tiagabina, vigabatrin y levetiracetam. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el antagonista de glutamato topiramato. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un agonista de GABA seleccionado entre baclofeno, valproato y topiramato. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el inhibidor de la enzima del metabolismo de dopamina carbidopa. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es el agonista parcial D2 de dopamina

aripiprazol. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un antagonista de un receptor de opioide seleccionado entre naltrexona y naloxona. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un estabilizador del estado emocional seleccionado entre carbamazepina y litio. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es un agonista

5 directo o indirecto de dopamina seleccionado entre dopamina, bromocriptina, pergolida, amantadina, mazindol y metilfenidato. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el agonista parcial de 5HT1 gepirona. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el antagonista de 5HT2 de serotonina ritanserina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el opioide metadona. En algunas realizaciones, el al menos otro

10 agente es el agonista de opioide parcial buprenorfina. En algunas realizaciones, el al menos otro agente es el agonista nicotínico parcial champix. En algunas realizaciones, el al menos un otro agente es un inhalante que se selecciona entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenceno, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno y

15 perfluorobenceno. En algunas realizaciones, los métodos incluyen además la co-administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un otro agente seleccionado entre benzodiazepina, levodopa, carisprodol, modafenil, acamprosato, gamma-butirolactona, gamma-hidroxibutirato, opio, psilocibina, hongos halucinógenos, tabaco y nicotina. En algunas realizaciones, el Compuesto A se

20 administra al paciente después de un período de abstinencia del consumo de cocaína por el paciente. En algunas realizaciones, la cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A en el paciente se determina mediante el aumento escalonado de la cantidad de Compuesto A administrada al paciente hasta observar una respuesta terapéutica deseada. En algunas realizaciones, la cantidad del Compuesto A se

25 disminuye después de alcanzar la remisión de cocaína en el paciente. En algunas realizaciones, la cantidad del Compuesto A queda invariable después de alcanzar la dependencia de cocaína en el paciente. En algunas realizaciones, el Compuesto A trata al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de al menos una sustancia secundaria en el paciente. En algunas realizaciones, la al menos una sustancia secundaria

30 se selecciona entre una droga de abuso y un medicamento. En algunas realizaciones, la droga de abuso se selecciona entre un agente psicoestimulante, un opioide, un halucinógeno, un inhalante, un sedante, un tranquilizante, un hipnótico, un ansiolítico y una sustancia ilícita. En algunas realizaciones, el agente psicoestimulante es un derivado de beta-fenilisopropilamina. En algunas realizaciones, el derivado de beta-fenilisopropilamina se selecciona entre anfetamina, dextroanfetamina y metanfetamina.

35 En algunas realizaciones, el agente psicoestimulante se selecciona entre éxtasis, fenmetrazina, metilfenidato, dietilpropiona, pemolina, mazindol, (-) cationa y

fenfluramina. En algunas realizaciones, el opioide se selecciona entre Lortab, Tramadol, heroína, metadona, hidrocodona y oxicodona. En algunas realizaciones, el halucinógeno se selecciona entre psilocibina, un hongo halucinógeno, dietilamida del ácido lisérgico (LSD), fenciclidina (PCP), y ketamina. En algunas realizaciones, el inhalante se selecciona entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenceno, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno y perfluorobenceno. En algunas realizaciones, el medicamento se selecciona entre un anestésico, un analgésico, un agente anticolinérgico, un antihistamínico, un relajante muscular, un medicamento anti-inflamatorio no esteroide, un medicamento de venta libre y un medicamento antidepresivo. En algunas realizaciones, la droga de abuso es alcohol, cafeína, opio, cannabinoide, cannabis, benzodiacepina, carisprodol, tabaco, nicotina, Vicodin, Lorcet, Percocet, Percodan y Tilox.

[068] Los derivados farmacéuticamente aceptables incluyen ácidos, bases, éteres y ésteres enólicos, ésteres, hidratos, solvatos, y formas de prodroga. El derivado se selecciona de modo que sus propiedades farmacocinéticas son superiores con respecto a al menos una característica del agente neutral correspondiente. El Compuesto A puede ser derivatizado antes de la formulación.

[069] Una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A o un derivado farmacéuticamente aceptable puede variar ampliamente en dependencia de la severidad de la adicción o dependencia, la edad y salud relativa del paciente, la potencia del compuesto utilizado y otros factores. En ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva es desde aproximadamente 0,1 miligramos por kg (mg/kg) de peso corporal por día hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día. En otras realizaciones, la cantidad es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 10 mg/kg/día. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva para un humano de 70 kg es desde aproximadamente 7,0 a aproximadamente 3.500 mg/día, mientras que en otras realizaciones es de aproximadamente 70 a aproximadamente 700 mg/día.

[070] Un entendido en el arte de tratar tales enfermedades será capaz, sin experimentación indebida y en base a su conocimiento personal y la revelación de esta solicitud, de determinar una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A para el tratamiento o la prevención de la adicción o dependencia. En general, a modo de ejemplo y sin limitación, el Compuesto A será administrado en la forma de composiciones farmacéuticas por una de las vías siguientes: oral, sistémica (por ejemplo, transdérmica, intranasal o mediante supositorios) o parenteral (por ejemplo, intramuscular, intravenosa o subcutánea). Las composiciones, a modo de ejemplo y sin

- limitación, pueden tener la forma de tabletas, píldoras, cápsulas, semisólidos, polvos, formulaciones de liberación sostenida, soluciones, suspensiones, elixires, aerosoles o cualquier otra composición apropiada y dichas composiciones farmacéuticas comprenden generalmente el Compuesto A en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes aceptables son, a modo de ejemplo y sin limitación, no tóxicos, facilitan la administración y no afectan adversamente el beneficio terapéutico del compuesto. Tal excipiente puede ser, por ejemplo, cualquier sólido, líquido, semisólido o, en el caso de una composición de aerosol, un excipiente gaseoso generalmente disponible para un entendido en el arte.
- 10 [071] Los excipientes farmacéuticos sólidos incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, almidón, celulosa, talco, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, silicagel, estearato de magnesio, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, cloruro de sodio, leche descremada en polvo y similares. Los excipientes líquidos y semisólidos pueden seleccionarse entre, por ejemplo y sin limitación, agua,
- 15 etanol, glicerol, propilenglicol y varios aceites, incluyendo aquellos de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético (por ejemplo, aceite de maní, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, etc.). Excipientes líquidos preferidos, particularmente para soluciones inyectables, incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, agua, solución fisiológica, solución acuosa de dextrosa y glicoles. Pueden utilizarse gases comprimidos para dispersar el compuesto en forma de aerosol. Gases inertes adecuados para este propósito son, a modo de ejemplo y sin limitación, nitrógeno, dióxido de carbono, óxido nítrico, etc.
- 20 [072] Las preparaciones farmacéuticas pueden contener además, a modo de ejemplo y sin limitación, preservativos, solubilizantes, estabilizantes, agentes de humectación, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saborizantes, sales para variar la presión osmótica, búfferes, agentes de protección o antioxidantes. En ciertas realizaciones, las preparaciones farmacéuticas pueden contener todavía otras sustancias terapéuticamente valiosas. Otros excipientes farmacéuticamente aceptables y sus formulaciones se describen en A. R. Alfonso *Remington's Pharmaceutical Sciences* 1985, 17ava. ed.
- 25 Easton, Pa.: Mack Publishing Company.
- 30 [073] La cantidad de Compuesto A en la composición puede variar ampliamente en dependencia de, por ejemplo, el tipo de formulación, el tamaño de una unidad de dosificación, el tipo de excipientes y otros factores conocidos por los entendidos en el arte de las ciencias farmacéuticas. En general, la composición final comprenderá desde
- 35 10% p a 90% p del compuesto, preferentemente 25% p a 75% p, siendo el excedente uno o varios excipientes. Preferentemente la composición farmacéutica se administra en una sola forma de unidad de dosificación para el tratamiento continuo o en una sola forma de

unidad de dosificación ad libitum si se requiere específicamente el alivio de los síntomas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

5 [074] Después de la administración oral de [^{14}C]-nepicastat, la mayor parte de la radioactividad en el plasma estaba asociada con nepicastat, un glucurónido N-ligado de nepicastat (Metabolito 2, M2), y una fracción polar no identificada (M1). No se produjo
10 acumulación significativa de nepicastat con dosificación múltiple y $T_{1/2}$ fue similar después de una sola dosis o dosis múltiples. El $T_{1/2}$ fue de 10 – 14 horas. No se observaron diferencias significativas en la C_{max} o el AUC para nepicastat entre sujetos con el fenotipo acetilador rápido y aquellos con el fenotipo acetilador lento, si bien C_{max} y AUC para el metabolito N-acetilado fueron mucho menores en los acetiladores lentos que en los acetiladores rápidos, según lo esperado. En un estudio que compara la farmacocinética de una tableta de 40 mg tomada en ayunas o después de una comida, no
15 se observó ninguna diferencia significativa en las concentraciones plasmáticas. El T_{ax} aumentó a 3,5 horas después de una comida de 1,4 horas en ayunas.

[075] Se comparó la farmacocinética de nepicastat después de una sola dosis de 40 mg en hombres y mujeres. El AUC en mujeres fue aproximadamente 43% mayor que en hombres y la C_{max} fue aproximadamente 23% mayor en mujeres que en hombres. La $T_{1/2}$
20 fue mayor en mujeres que en hombres. Comparando la farmacocinética de nepicastat después de 10 días de dosificación con una dosis de 40 mg, el AUC fue mayor en sujetos sanos que en pacientes con CHEF, sin diferencia en el $T_{1/2}$. No hubo acumulación significativa con dosificación múltiple en cualquier población.

[076] En humanos, la radioactividad relacionada con el compuesto se elimina
25 rápidamente. En promedio, el 87,4% del marcador radioactivo administrado se recuperó en las primeras 72 horas, con un 82,4% en la orina y un 5,01% en las heces. Después de 10 días, la recuperación total media del marcador radioactivo fue de 93,8%. En el plasma, el T_{ax} para la radioactividad fue de 1-2 horas (similar al de nepicastat). Tanto en los acetiladores rápidos como así también en los lentos, un glucurónido N-ligado de nepicastat representó el mayor porcentaje de la radioactividad total en el plasma (26,8%)
30 y la orina (57,9%) durante 0 a 48 horas. Se encontró que el $T_{1/2}$ terminal para la radioactividad total en el plasma fue muy largo (~ 100 horas), lo más probablemente debido a una fracción polar presente en concentraciones bajas que se eliminó lentamente.

35 Ejemplo 2

[077] En un estudio diseñado para evaluar los efectos de nepicastat sobre la función cognitiva, sujetos tratados con 5 ó 40 mg de nepicastat no mostraron ningún deterioro

significativo del estado emocional, el sueño o la cognición. En estudios de absorción de ^{123}I por la glándula tiroidea, dosis de 5, 40 y 100 mg de nepicastat no mostraron ninguna diferencia respecto al placebo. La reducción de la absorción después de una sola dosis de 200 mg de nepicastat fue significativamente mayor que la con el placebo, pero
 5 significativamente menor que la después de una dosis de 10 mg de metimazol. En estudios de Fase I con dosis simples, dosis de 5 a 800 mg (cálculo de la dosis basado en la sal de clorhidrato) de nepicastat fueron generalmente bien toleradas por hombres sanos.

Ejemplo 3

10 **[078]** En un estudio de Fase I con dosis múltiples de nepicastat, dosis de 5 y 40 mg fueron generalmente bien toleradas por hombres sanos.

[079] Cinco de 6 sujetos tratados durante 8 días o más con 200 mg desarrollaron una irritación cutánea que se resolvió espontáneamente.

15 **[080]** Un sujeto desarrolló arritmias auriculares y bloqueo intermitente de la rama derecha después de una dosificación durante 6 días con 200 mg de nepicastat.

Ejemplo 4

[081] Se estudian como pacientes hospitalizados dieciseis voluntarios cocaína-dependientes que no buscan tratamiento, utilizando un diseño doble ciego controlado por placebo. Después de haber sido informados y dar su consentimiento, los voluntarios
 20 potenciales no hospitalizados completan exámenes de selección psiquiátricos y médicos. Los voluntarios elegibles son admitidos y completan un examen físico, ECG, ensayo de embarazo y ensayo psiquiátrico. El estudio utiliza un diseño de dosis escalada durante el cual los participantes ($n=12$) reciben dosis ascendentes de cocaína (0 mg, 10 mg, 20 mg y 40 mg) durante un tratamiento diario con dosis ascendentes de nepicastat (0 mg, 80
 25 mg, 160 mg). Un grupo paralelo de participantes ($n=4$) recibe durante la duración del estudio solamente tratamiento diario con placebo, para mantener el carácter ciego. Durante el tratamiento se administra cada nivel de dosis diariamente durante 4 días, o durante 4 vidas medias de nepicastat, siendo la vida media del nepicastat de 10 a 14 horas. El cuarto día de tratamiento a cada nivel de dosis, los participantes reciben 0 mg,
 30 10 mg, 20 mg y 40 mg de cocaína en este orden. La cocaína es administrada a intervalos de una hora, proporcionando suficiente tiempo para que tanto los efectos cardiovasculares como los efectos subjetivos vuelvan al valor de referencia (línea base). Los índices cardiovasculares se monitorean cuidadosamente utilizando ECG continuo y medición frecuente de la presión sanguínea durante todos los procedimientos que
 35 implican la administración de cocaína, y se evalúan los parámetros en el mismo lugar, de modo de no administrar la cocaína cuando los índices cardiovasculares exceden límites pre-establecidos. Estudios previos mostraron que 6 dosis de 32 mg de cocaína

administradas con intervalos de 14 minutos son seguras, y la seguridad puede aumentarse aún más extendiendo el intervalo entre las dosis durante 1 hora. Las muestras de sangre se recolectan para el análisis farmacocinético de 10 mg de cocaína administrados el tercer día de tratamiento con 0 mg de nepicastat y nuevamente el tercer día de tratamiento con 80 mg y 160 mg de nepicastat. Se estudian los efectos de nepicastat sobre la farmacocinética de la cocaína. En base a la información existente, no se espera interacción.

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

10 **[083]** Con el fin de participar en el estudio, los participantes deben:

1. Ser voluntarios que hablan inglés y que no buscan tratamiento en el momento del estudio;

2. Tener entre 18 y 55 años de edad;

3. Cumplir con los criterios para la dependencia de cocaína DSM-IV TR;

15 4. Tener un auto-reporte del uso de cocaína por vía IV y proporcionar al menos una muestra de orina cocaína-positiva previo a la admisión;

5. Tener los signos vitales siguientes: pulso en reposo entre 50 y 95 latidos/min, presión sanguínea entre 85-150 mm Hg sistólica y 45-96 mm Hg diastólica; este criterio debe cumplirse dentro de 2 días de la admisión;

20 6. Tener ensayos de laboratorio hematológicos y químicos dentro de los límites normales (+/- 10%) con las excepciones siguientes: a) ensayos de función hepática (total bilirrubina, ALT, AST y fosfatasa alcalina) ≤ 3 x límite normal superior, y b) ensayos de función renal (creatinina y BUN) ≤ 2 x límite normal superior;

25 7. Tener un electrocardiograma de referencia (línea base) que muestra un ritmo sinusal clínicamente normal, una conducción clínicamente normal y ausencia de arritmias clínicamente significativas;

8. Tener una historia clínica y exploración física breve que muestra que no existen contraindicaciones clínicamente significativas para participar en el estudio, a juicio del médico de admisión y del investigador principal.

30 **[084]** Los participantes potenciales son excluidos de la participación en el estudio si aplica alguno de los criterios siguientes:

1. Tener un historial o evidencia que sugiere un trastorno convulsivo o una lesión cerebral;

35 2. Haber tenido una reacción médicamente adversa a la cocaína anterior, incluyendo pérdida de conciencia, dolor de pecho o ataque epiléptico;

3. Tener trastornos neurológicos o psiquiátricos, tales como:

- psicosis, enfermedad bipolar o depresión mayor según la evaluación por SCID;

- enfermedad cerebral orgánica o demencia evaluada por entrevista clínica;
 - historial de cualquier trastorno psiquiátrico que requeriría tratamiento continuo o que haría difícil el cumplimiento del estudio;
 - antecedentes de intentos de suicidio en los últimos tres meses evaluados por SCID y/o ideas o plan actual de suicidio según lo evaluado por SCID;
4. evidencia de enfermedad cardíaca o hipertensión clínicamente significativa, según lo determinado por el investigador principal (PI), aunque los participantes pueden tomar medicación antihipertensiva;
5. tener una historia familiar de parientes en primer grado de morbilidad o mortalidad cardiovascular temprana, según lo determinado por el PI;
6. tener evidencia de enfermedad médica no tratada o inestable incluyendo enfermedad neuroendócrina, autoinmune, renal, hepática o infecciosa activa;
7. tener HIV con síntomas actuales, tener un diagnóstico de sida o recibir medicación antiretroviral;
8. estar embarazada o amamantando. Las otras mujeres deben ser incapaces de concebir (es decir, esterilizadas quirúrgicamente, estériles o post-menopáusicas) o deben utilizar una forma fiable de anticoncepción (por ejemplo, abstinencia, píldoras anticonceptivas, dispositivo intrauterino, condones o espermicidas). Todas las mujeres deben proporcionar ensayos de orina de embarazo negativo antes de entrar al estudio, al ingreso en el hospital y al final de la participación en el estudio;
9. tener asma o utilizar actualmente agonistas alfa o beta, teofilina u otros simpatomiméticos;
10. tener cualquier otra enfermedad, condición o el uso de medicamentos psicotrópicos, que en opinión del Investigador Principal (PI) y/o el médico de admisión podría impedir la seguridad y/o la finalización exitosa del estudio.

Criterios para la discontinuación después de la iniciación

11. Un examen de droga en la orina o un examen de aliento positivo que indique el uso ilícito de cocaína, alcohol, opiáceos u otras drogas de abuso no administradas como parte de este protocolo.
12. Incapacidad para cumplir con los procedimientos de estudio;
13. Cumplir con los criterios de discontinuación descritos más abajo debido a una respuesta exagerada a la cocaína.

Criterios de detención

- [085] Los participantes deben seguir con el cumplimiento de los criterios de inclusión para permanecer en el protocolo. La administración de la cocaína no se inicia si existen arritmias clínicamente significativas o si signos vitales se encuentran fuera de gamas aceptables: pulso en reposo < de 130 latidos por minuto (lpm) y presión sanguínea por

- debajo de 165 mm Hg sistólica y 100 mm Hg diastólica. Estos valores son más altos que aquellos de los criterios de inclusión/exclusión, debido a que la expectativa de recibir cocaína puede producir un aumento transitorio de los signos vitales. Además, no se administran dosis repetidas de cocaína (y el médico del estudio detiene la administración
- 5 continuada de cocaína) si existen manifestaciones de comportamiento de toxicidad de cocaína (agitación, psicosis, incapacidad para cooperar con los procedimientos del estudio).

Criterios de interrupción para seguir participando en el estudio

[086] La participación del sujeto termina si ocurre alguno de los siguientes eventos:

- 10
1. Presión sanguínea sistólica > 180 mm Hg durante 5 minutos o más;
 2. Presión sanguínea diastólica > 120 mm Hg durante 5 minutos o más;
 3. Frecuencia cardíaca > $(220 - \text{edad} \times 0,85)$ lpm durante cinco minutos o más.

Fundamentos para los criterios de selección de sujetos

- [087] Se requiere que los participantes hayan usado cocaína por vía intravenosa para
- 15 evitar exponer a los participantes a vías de administración que producen efectos interoceptivos más intensos. Los criterios de edad se seleccionaron principalmente para evitar enrolar participantes con enfermedad cardiovascular no diagnosticada. Los participantes con enfermedad HIV activa se excluyen para evitar una exacerbación potencial de su enfermedad subyacente; los participantes con HIV asintomática se
- 20 incluyen porque este grupo tiene un alto riesgo de dependencia de cocaína. Los participantes con asma (o que toman medicamentos para el asma) se excluyen debido a interacciones adversas potenciales entre medicamentos con agonista beta y cocaína.

Medicamentos de estudio

- [088] La cocaína produce efectos estimulantes prototípicos al inhibir la absorción de
- 25 DA, NE y serotonina por gránulos de almacenamiento presináptico. La cocaína tiene una corta vida media de eliminación de aproximadamente 90 minutos. Los efectos clínicos principales de la cocaína son activación psicomotora y aumento de tono simpático, que se evidencia por el aumento de la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea.

- [089] La cocaína se administra en dosis simples de hasta 40 mg y hasta 200 mg en
- 30 sesiones de auto-administración de 10 dosis de 20 mg administradas con intervalos de 13 minutos. Estas dosis son modestas en comparación con las cantidades reportadas por los participantes en estos estudios como uso diario; los patrones típicos de dosificación diaria son en promedio de 250 mg a 500 mg o mayores.

- [090] Dosis mucho más altas que las aquí propuestas han sido asociadas con ataques
- 35 epilépticos y con toxicidad cardiovascular severa y muerte. Estas toxicidades potenciales son mejoradas mediante el uso de dosis relativamente bajas, la selección cuidadosa de voluntarios potenciales, mediante el monitoreo cuidadoso de los participantes después de

la administración de la cocaína y mediante una rápida disponibilidad de intervención médica en el caso de un evento adverso.

5 [091] La cocaína se administra por vía intravenosa para una disponibilidad completa. La cocaína es metabolizada principalmente a benzoilecgonina por esterasas plasmáticas de las cuales se considera que no son afectadas por nepicastat. La benzoilecgonina y otros metabolitos menores son excretados por vía renal.

[092] La cocaína para uso intravenoso en humanos se obtiene de un contratista de NIDA y se obtiene una carta de autorización que nos permite hacer referencia al uso de la cocaína de NIDA, carta que se somete a la FDA.

10 [093] Se administran dosis ascendentes de nepicastat (0 mg, 80 mg y 160 mg) a las 7 a.m. El tratamiento en cada nivel de dosis se continúa durante 4 días.

[094] Al iniciar el tratamiento con una dosis más baja y aumentando la dosis después de completar las primeras series de los procedimientos de estudio, se minimizan los riesgos de la combinación de nepicastat con cocaína. Este enfoque también puede reducir el riesgo de erupción cutánea, que hasta ahora se produjo en un 7% a 20% de los voluntarios. La incidencia de la erupción cutánea se asoció con la dosis y la duración del tratamiento. Dosis mayores de 160 mg confieren un mayor riesgo de erupción cutánea.

15 [095] No se esperan interacciones farmacocinéticas, porque el nepicastat no es un inhibidor de enzima, aunque esto puede ser confirmado por la evaluación farmacocinética de la dosis de 10 mg de cocaína administrada el tercer día de tratamiento en cada nivel de dosis de nepicastat. Debido a que el nepicastat reduce la síntesis de la norepinefrina (NE), los efectos gratificantes de la cocaína pueden ser menores durante el tratamiento con nepicastat. Debido a que el nepicastat aumenta las concentraciones de la dopamina (DA) en el plasma y el cerebro, pueden producirse efectos laterales mediados por la DA, tal como paranoia. Estos síntomas no se observaron durante los ensayos para la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), pero en estos estudios no se administraron estimulantes.

25 [096] Después del consentimiento, los participantes deben proporcionar una muestra de orina cocaína-positiva para la documentación del uso de droga en curso. A algunos participantes (según el número de dispositivos disponibles), también se pide llevar un dispositivo de telemetría durante el examen de selección y todo el estudio para registrar la frecuencia cardíaca y el movimiento. Los datos de este dispositivo pueden identificar episodios de consumo de droga en base a los cambios de estos parámetros.

30 [097] Para controlar la exposición a la nicotina, se prohíbe fumar dentro de las 2 horas de los procedimientos de estudio que implican administración de cocaína o exposición a señales. Se requiere que los participantes se abstengan del uso de drogas ilícitas y

recetadas durante la duración del estudio y esto se confirma mediante ensayos diarios de orina y pruebas de alcoholemia.

[098] Las sesiones experimentales se realizan aproximadamente en la misma hora del día para un participante dado. La cocaína se administra en un cuarto de experimentación.

- 5 La cocaína se administra mediante una bomba de jeringa, que administra la dosis correcta de cocaína o un placebo de solución fisiológica durante 2 minutos. Durante las sesiones de administración de droga hasta una hora después de las mismas se monitorean la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea del paciente.

- [099]** Los participantes son sometidos a una entrevista con preguntas específicas y un examen físico. Se extrae sangre para los análisis de laboratorio estándar, incluyendo conteo sanguíneo completo (CBC), electrolitos, ensayo funcional hepático (LFT) y creatinina. Un examen de detección de HIV se realiza como un servicio para los participantes, y a quienes resulten positivos se aconseja someterse al tratamiento.

- [0100]** En algunos voluntarios se utiliza el monitor Actiheart MiniMitter para medir previo a la admisión la frecuencia cardíaca y el movimiento (el número de voluntarios está limitado por el número de dispositivos disponibles). El MiniMitter se adhiere a la piel de los participantes con una pasta y registra el electrocardiograma y el movimiento en forma no invasiva durante hasta dos semanas. Los datos pueden ser descargados a una PC para su posterior análisis.

- 20 **[0101]** Los participantes deben cumplir los criterios del DSM-IV TR para dependencia de cocaína y nicotina, determinados por la entrevista Mini International Neuropsychiatric Interview (MINI) y definidos por criterios de inclusión/exclusión. La MINI es una corta entrevista diagnóstica estructurada desarrollada en 1990 por psiquiatras y médicos clínicos en los Estados Unidos y Europa para trastornos psiquiátricos del DSM-IV TR y la ICD-10. La MINI es la entrevista psiquiátrica estructurada de elección para la evaluación psiquiátrica y el seguimiento de los resultados en ensayos clínicos psicofarmacológicos y estudios epidemiológicos, y es el instrumento de entrevista estructurada diagnóstica psiquiátrica de más amplio uso en el mundo. Este instrumento puede usarse para determinar si el sujeto cumple con los
- 25
- 30 criterios DSM-IV TR para dependencia de drogas y para descartar cualquier trastorno psiquiátrico mayor (por ejemplo, trastornos afectivos, esquizofrenia).

- [0102]** Durante el examen de selección, un miembro del personal de investigación entrenado mantiene una entrevista según la versión Addiction Severity Index-Lite Clinical Factors (ASI-Lite CF). El ASI-Lite es la estimación del entrevistador de la
- 35
- severidad del estado de los participantes en siete áreas (médica, empleo, consumo de drogas, consumo de alcohol, legal, familiar/social y psicológica). La versión Lite es una versión más corta de la ASI que conserva todavía todas las preguntas utilizadas para

calcular los puntajes del ASI. La sección de historia familiar del ASI, así como la versión ASI-Lite, retiene la información mínima sobre la historia de la familia del paciente.

5 [0103] Existe un Inventario de Depresión de Beck (BDI) de tercera generación, revisado en 1996. Este instrumento retiene su formato original de cuestionario de 21 items que requiere aproximadamente 10 minutos para ser completado. El BDI-II ha sido validado contra el BDI-IA y continúa siendo un excelente índice de depresión/trastorno. Este indicador se utiliza para monitorear los participantes que llegan a estar clínicamente deprimidos durante el ensayo, lo que también constituye una medida
10 para la seguridad de los participantes.

[0104] Los síntomas actuales de trastorno de déficit de atención con hiperactividad (ADHD) se evalúan semanalmente utilizando la escala de calificación ADHD-IV.

[0105] Se recolectan los datos de referencia de la escala de apatía del Inventario Neuropsiquiátrico.

15 [0106] El ADN se recolecta con isopos bucales que se aplican a tarjetas FTA de Whatman. Estas tarjetas permiten un almacenamiento seguro y estable de muestras biológicas para la extracción de ADN. El rendimiento anticipado de ADN genómico es de 50-100 µg, lo que es adecuado para más de 500 ensayos de genotipo utilizando métodos actualmente disponibles.

20 [0107] Los genotipos se determinan utilizando ensayos de genotipado con 5'-exonucleasa (Taqman). Los ensayos han sido desarrollados por Applied Biosystems (ABI; ensayos por diseño). La discriminación de los alelos se realiza utilizando el ciclador para PCR en tiempo real ABI 3730.

[0108] Las muestras de sangre para el análisis farmacocinético de la cocaína se
25 recolectan durante el tratamiento con 0 mg de nepicastat (primer día del estudio) y durante el tratamiento con 80 mg y 160 mg de nepicastat (días de estudio 4 y 8). Las muestras de sangre se recolectan a -15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 minutos después de la administración de 10 mg de cocaína el tercer día de tratamiento con cada nivel de dosis de nepicastat. Observe que el cuarto día del
30 tratamiento se administran otras dosis de cocaína (0-40 mg) con cada nivel de dosis de nepicastat, de modo que la evaluación farmacocinética no interfiere con las otras evaluaciones. Se recolecta la sangre y el plasma se separa y se congela a -70° C hasta su análisis. La cocaína y BE se analizan mediante cromatografía líquida / espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS). El límite de precisión cuantitativa para estos ensayos es
35 de 2,5 ng/ml. El análisis farmacocinético aclara los efectos de nepicastat sobre la farmacocinética de la cocaína.

[0109] La DBH se almacena en gránulos de almacenamiento de NE y se libera conjuntamente con la NE. Por lo tanto la DBH del plasma da un buen índice de actividad enzimática dentro del sistema nervioso central. Diariamente se saca una muestra de sangre a 10 a.m. (antes de la dosificación con cocaína /placebo) que se almacena para el análisis subsecuente. La actividad de la DBH se mide utilizando el método de tiramina-octopamina utilizando un sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento – fluorométrico, según lo descrito previamente. Esto permite el examen de la DBH en el tiempo, proporcionando una percepción de la farmacodinámica de la inhibición de DBH por nepicastat. Durante el protocolo se realiza repetidamente el BDI para monitorear los cambios del estado emocional.

[0110] Se miden efectos subjetivos utilizando una escala análoga visual (VAS) computarizada que consiste de una línea continua de 10 cm digitalizada con fines de puntaje desde 0 a 100. Se solicita a los participantes mover el cursor desde el extremo izquierdo y sobre la línea oprimiendo los botones izquierdo o derecho del ratón para obtener movimientos hacia la izquierda o hacia la derecha sobre la línea. La escala visual análoga está diseñada para obtener rápidamente puntajes de euforia, disforia y ansias por cocaína. Estos puntajes incluyen “cualquier efecto de la droga”, “alto”, “efectos buenos”, “estimulado”, y “efectos malos”, “sensación de paranoia”, “sensación de desconfianza” y “utilizaría cocaína si estaría disponible”, “ansias por cocaína”, “podría rechazar cocaína ahora” y “deseo por cocaína”. Las mediciones para la escala se recolectan antes de la administración de la cocaína y a los 5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos después de la administración de la droga.

[0111] Quince minutos después de la administración de la cocaína se pregunta a los participantes cuánto pagarían por la dosis de droga, en base a \$50/g (costo actual de compra en fuente ilícita). Se utiliza un valor constante para estandarizar las respuestas, ya que el precio de la cocaína varía con el tiempo y lugar.

[0112] El día 13, el último día del tratamiento con la medicación del estudio, todos los pacientes participan en las “Sesiones Experimentales”, en las cuales los sujetos hacen una serie de elecciones entre dinero y una infusión doble ciega de placebo (solución fisiológica) o 20 mg de cocaína. En una de las sesiones, sólo está disponible el placebo (solución fisiológica). En otra sesión, sólo está disponible 20 mg de cocaína. Los participantes eligen entre cualquiera de los dos, la auto-administración del placebo o la aceptación de dinero y 20 mg de cocaína o dinero. Esto ocurre en la mañana (a.m.) y en la tarde (p.m.), con el orden aleatorio y compensado, de modo que a igual número de sujetos se administra primero el placebo o el nepicastat.

Sesión experimental (elección):

- [0113] Durante cada sesión se solicita a los sujetos hacer una serie de elecciones entre una infusión correspondiente a un color (“azul” o “verde”) y dinero. El color corresponde a la dosis (cocaína 0 mg ó 20 mg) administrada al sujeto durante la sesión muestra. Para cada una de las dos sesiones de elección, los participantes hacen diez elecciones por la infusión (0 mg de cocaína IV en una sesión y 20 mg de cocaína en la otra) o dinero. El participante hace una serie de elecciones entre opciones de valores ascendentes de dinero ((\$0,05, \$0,05, \$0,05, \$0,05, \$1, \$4, \$7, \$10, \$13 y \$16) o cocaína (infusión/IV de 0 o 20 mg) utilizando una bomba para analgésicos controlada por el paciente (PCA).
- 10 [0114] Las elecciones de la infusión son realizadas por el participante utilizando un botón de la bomba PCA, mientras que las elecciones por dinero se indican verbalmente al investigador. Las infusiones se llevan a cabo durante un período de 2 minutos seguido por un período de espera de 3 minutos. Por lo tanto, las selecciones se realizan a intervalos de 5 minutos.
- 15 [0115] Los participantes reciben las dosis de cocaína inmediatamente después de indicar su elección, siempre que los signos vitales permanecen dentro de los límites establecidos hasta un máximo de 200 mg de cocaína (10 x 20 mg). Las opciones de dinero se entregan directamente al paciente inmediatamente después de la elección, pero este dinero debe gastarse antes de dar el alta.
- 20 La Tabla muestra sesiones de elección experimentales con un total de 16 participantes.

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

	Elecciones	8 participantes	8 participantes
pm	Elección 1	20 mg cocaína iv ó \$ 0,05	0 mg cocaína iv ó \$ 0,05
pm	Elección 2	20 mg cocaína iv ó \$ 0,05	0 mg cocaína iv ó \$ 0,05
pm	Elección 3	20 mg cocaína iv ó \$ 0,05	0 mg cocaína iv ó \$ 0,05
pm	Elección 4	20 mg cocaína iv ó \$ 0,05	0 mg cocaína iv ó \$ 0,05
pm	Elección 5	20 mg cocaína iv ó \$ 1,00	0 mg cocaína iv ó \$ 1,00
pm	Elección 6	20 mg cocaína iv ó \$ 4,00	0 mg cocaína iv ó \$ 4,00
pm	Elección 7	20 mg cocaína iv ó \$ 7,00	0 mg cocaína iv ó \$ 7,00
pm	Elección 8	20 mg cocaína iv ó \$ 10,00	0 mg cocaína iv ó \$ 10,00
pm	Elección 9	20 mg cocaína iv ó \$ 13,00	0 mg cocaína iv ó \$ 13,00
pm	Elección 10	20 mg cocaína iv ó \$ 16,00	0 mg cocaína iv ó \$ 16,00

- [0116] Un tamaño de muestra de 12 en el grupo tratado con nepicastat permite la detección de efectos medianos a grandes, lo que es apropiado para una evaluación inicial. La representación gráfica (Figura 1) muestra el tamaño del efecto logrado con tamaños de muestra en la gama de 5 a 15. El aumento del tamaño de la muestra por encima de 12
- 5 aumentaría la potencia del análisis para detectar diferencias entre los tratamientos pero a expensas de costo mayor. El grupo tratado con placebo se incluye solamente para mantener el carácter ciego del ensayo y no tiene la intención de servir como grupo de comparación.
- 10 [0117] El análisis se centra principalmente en los efectos de nepicastat en el grupo tratado con nepicastat. El grupo tratado con placebo se incluye principalmente para mantener el carácter ciego del ensayo. Los efectos laterales y los eventos adversos (AEs) se tabulan y se comparan con las condiciones de tratamiento utilizando ANOVA o la distribución X^2 (chi-cuadrado). Los efectos subjetivos y cardiovasculares producidos por
- 15 cocaína IV y placebo durante el tratamiento con nepicastat se comparan con los efectos producidos durante el tratamiento con placebo utilizando análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas (siendo la medida repetida el tiempo), ANOVA con efecto de pico de una vía y, si indicado, ANOVA con área bajo la curva.

Ejemplo 5

[0118] Se ensayó la actividad de dopamina- β -hidroxilasa bovina y humana midiendo la conversión de tiramina a octopamina. La dopamina- β -hidroxilasa bovina se obtuvo de Sigma Chemicals (St Louis, MO, USA), mientras que la dopamina- β -hidroxilasa humana se purificó a partir del medio de cultivo de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH. El ensayo se realizó a pH 5,2 y 32° C en un medio que contiene NaOAc 0,125 M, fumarato 10 mM, CuSO₄ 0,5 – 2 μ M, catalasa 0,1 mg.ml⁻¹, tiramina 0,1 mM y ascorbato 4 mM. En un ensayo típico, se agregaron a la mezcla de reacción 0,5 – 1 miliunidades de enzima y, subsecuentemente se agregó una mezcla de sustrato que contiene catalasa, tiramina y ascorbato para iniciar la reacción (volumen final de 200 μ l). Las muestras se incubaron con o sin la concentración apropiada de nepicastat o Compuesto B a 37° C durante 30 ó 40 minutos. La reacción se apagó mediante la solución de detención que contiene EDTA 25 mM y 3-hidroxitiramina 240 μ M (estándar interno). Las muestras se analizaron por octopamina mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con fase inversa utilizando detección ultravioleta a 280 nM. La operación de cromatografía HPLC se llevó a cabo con un caudal de 1 ml.min⁻¹ utilizando una columna LiChroCART 125-4 RP-18 y elución isocrática con ácido acético 10 mM, ácido 1-heptansulfónico 10 mM, fosfato de tetrabutilamonio 12 mM y 10% de metanol. La actividad porcentual remanente se calculó en base a controles, se corrigió utilizando estándares internos y se colocó en una curva no lineal de concentración-respuesta de cuatro parámetros.

[0119] El nepicastat (enantiómero S) y el Compuesto B (enantiómero R) produjeron una inhibición de la actividad de la dopamina- β -hidroxilasa bovina y humana en dependencia de la concentración. Las concentraciones IC₅₀ para nepicastat fueron 8,5 $\pm$ 0,8 nM y 9,0 $\pm$ 0,8 nM para la enzima bovina y humana, respectivamente. El Compuesto B fue ligeramente menos potente (concentraciones IC₅₀ de 25,1 $\pm$ 0,6 nM y 18,3 $\pm$ 0,6 nM para la enzima bovina y humana, respectivamente) que el nepicastat. Se mostró que nepicastat es un inhibidor potente de dopamina- β -hidroxilasa humana y bovina *in vitro*. Los efectos inhibitorios del compuesto fueron estereoespecíficos, ya que el enantiómero S (nepicastat) fue ligeramente, pero significativamente, más potente que el enantiómero R (Compuesto B).

[0120] Se determinó la actividad de nepicastat sobre doce enzimas y receptores seleccionados utilizando ensayos establecidos. La Figura 2 proporciona un breve informe sobre los principios que subyacen a cada uno de los ensayos enzimáticos. Los datos de unión se analizaron mediante el ajuste iterativo de curva a una ecuación logística de cuatro parámetros. Los valores Ki se calcularon a partir de valores IC₅₀ utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff. La actividad inhibitoria de la enzima se expresó

como IC₅₀ (concentración requerida para producir una inhibición del 50% de la actividad enzimática).

[0121] Nepicastat tenía una afinidad insignificante (IC₅₀S o Kis > 10 µM) para una gama de otras enzimas (tirosina, hidroxilasa, acetil CoA sintetasa, aciltransferasa de acil CoA-colesterol, Ca²⁺/calmodulin proteínaquinasa II, ciclooxigenasa-I, HMG-CoA reductasa, endopeptidasa neutra, óxido nítrico sintetasa, fosfodiesterasa III, fosfolipasa A₂ y proteínaquinasa C) y receptores de neurotransmisores (adrenoceptores α_{1A}, α_{1B}, α_{2A}, α_{2B}, β₁ y β₂, receptores muscarínicos M₁, receptores de dopamina D₁ y D₂, receptores opioides µ, receptores de serotonina 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, y 5-HT_{2C}). Nepicastat mostró un alto grado de selectividad para dopamina-β-hidroxilasa, ya que el compuesto tenía una afinidad insignificante para otras doce enzimas y trece receptores de neurotransmisores.

[0122] En estudios con ratas SHR, las drogas nepicastat (clorhidrato de ((S)-5-aminometil-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)-1,3-dihidroimidazol-2-tiona) y el correspondiente enantiómero R (Compuesto B) se disolvieron en agua destilada y se dosificaron oralmente con una aguja-sonda. En los estudios con perros, las drogas se llenaron en cápsulas y se administraron oralmente. Todas las dosis se expresaron en equivalentes de base libre.

[0123] Se utilizaron ratas macho SHR (15 – 16 semanas de edad Charles River, Wilmington, MA, USA) en estudios *in vivo*. El día del estudio, los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente para la dosificación con vehículo (control) o la dosis apropiada de nepicastat (3, 10, 30 o 100 mg.kg⁻¹, po) o Compuesto B (30 mg.kg⁻¹, po), tres veces consecutivas con doce horas de intervalo. Seis horas después de la tercera dosis, las ratas se anestesiaron con halotano, se decapitaron, y los tejidos (corteza cerebral, arteria mesentérica y ventrículo izquierdo) rápidamente se cosecharon, se pesaron, se colocaron en ácido perclórico (0,4 M) helado, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70° C hasta el análisis subsecuente. Para cuantificar las concentraciones de noradrenalina y dopamina, los tejidos se homogenizaron mediante sonicación breve y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos a 4° C. El sobrenadante al que se agregó 3,4-dihidroxibencilamina (estándar interno), se ensayó por noradrenalina y dopamina mediante HPLC utilizando detección electroquímica.

[0124] El contenido base de catecolamina en el tejido (µg.g⁻¹ de peso húmedo) en los animales de control fue el siguiente: arteria mesentérica (noradrenalina, 10,40 ± 1,03; dopamina, 0,25 ± 0,02), ventrículo izquierdo (noradrenalina, 1,30 ± 0,06; dopamina, 0,02 ± 0,00) y corteza cerebral (noradrenalina, 0,76 ± 0,03; dopamina, 0,14 ± 0,01). Nepicastat produjo una reducción dependiente de la dosis del contenido de noradrenalina y un aumento del contenido de dopamina y la relación dopamina/noradrenalina en los tres tejidos estudiados.

[0125] Estos cambios alcanzaron significancia estadística ($p < 0,05$) a dosis $\geq 3 \text{ mg.kg}^{-1}$ en la arteria mesentérica y el ventrículo izquierdo, pero sólo a dosis de 30 y 100 mg.kg^{-1} en la corteza cerebral. Con la mayor dosis estudiada (100 mg.kg^{-1} , po), las disminuciones de noradrenalina fueron 47%, 35%, 42%, y los aumentos en dopamina fueron 820%, 800% y 86% en la arteria mesentérica, el ventrículo izquierdo y la corteza cerebral, respectivamente. Al ser ensayado a 30 mg.kg^{-1} , po, nepicastat produjo cambios significativamente mayores en el contenido de catecolamina, en comparación con el enantiómero R (Compuesto B), en la arteria mesentérica y el ventrículo izquierdo.

[0126] También se utilizaron perros beagle machos (10 – 16 kg, Marshall Farms USA Inc, North Rose, NY, USA) en estudios *in vivo*. El día del estudio, los perros se pesaron y se asignaron aleatoriamente a la dosificación oral con cápsulas vacías (control) o la dosis apropiada de nepicastat (0,05, 0,5, 1,5 o 5 mg.kg^{-1} ; po, b.i.d.) por 5 días. A las seis horas después de la primera dosis del día 5, los perros se eutanizaron con pentobarbital y los tejidos (corteza cerebral, arteria renal y ventrículo izquierdo) se cosecharon rápidamente. A continuación los tejidos se procesaron y se analizaron por noradrenalina y dopamina.

[0127] Los datos se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). Los datos de catecolamina de tejido y plasma se analizaron usando un análisis no paramétrico de varianza (ANOVA) de una vía o de dos vías, respectivamente, seguido por la comparación de pares utilizando el ensayo LSD de Fisher. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

[0128] El contenido basal de catecolamina del tejido ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de peso húmedo) en los animales de control fue el siguiente: arteria renal (noradrenalina, $10,7 \pm 1,05$; dopamina, $0,22 \pm 0,01$), ventrículo izquierdo (noradrenalina, $2,11 \pm 0,18$; dopamina, $0,07 \pm 0,03$) y corteza cerebral (noradrenalina, $0,26 \pm 0,02$; dopamina, $0,03 \pm 0,00$). Al ser comparado con los animales de control, nepicastat produjo una reducción dependiente de la dosis del contenido de noradrenalina y un aumento del contenido de dopamina y la relación dopamina/noradrenalina en los tres tejidos estudiados.

[0129] Estos cambios adquirieron una significancia estadística ($p < 0,05$) con dosis $\geq 0,1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{día}^{-1}$ en los tres tejidos. Con la mayor dosis estudiada (5 mg.kg^{-1} , b.i.d., po), las disminuciones de noradrenalina fueron 88%, 91% y 96%, y los aumentos en dopamina fueron 627%, 700% y 166% en la arteria renal, el ventrículo izquierdo y la corteza cerebral, respectivamente.

[0130] Perros beagle macho se aleatorizaron para la dosificación oral con cápsulas vacías (control) o nepicastat (2 mg.kg^{-1} , po, b.i.d.) durante 15 días. Diariamente se sacaron muestras de sangre venosa, seis horas después de la primera dosis, para la medición de las concentraciones plasmáticas de dopamina y noradrenalina. Las muestras

se recolectaron en tubos que contienen heparina y grutational, se centrifugaron a -4°C , y el plasma separado se almacenó a -70°C hasta el análisis. Las concentraciones de referencia (de la línea base) de catecolaminas en los dos grupos de animales no difirieron significativamente entre sí: las concentraciones plasmáticas de noradrenalina y dopamina fueron $460,3 \pm 59,6$ y $34,4 \pm 11,9$ pg.ml^{-1} , respectivamente, en el grupo de control, y $401,9 \pm 25,5$ y $41,1 \pm 8,8$ pg.ml^{-1} , respectivamente, en el grupo tratado con nepicastat. En comparación con el grupo de control, nepicastat (2 mg.kg^{-1} , b.i.d, po) produjo disminuciones significativas en las concentraciones plasmáticas de noradrenalina y aumentos en las concentraciones plasmáticas de dopamina y la relación dopamina/noradrenalina.

[0131] La modulación inhibitoria del sistema nervioso simpático mediante medios farmacológicos es una estrategia terapéutica atractiva para el manejo de la insuficiencia cardíaca congestiva, ya que la actividad elevada de este sistema ha sido implicada en el empeoramiento progresivo de la enfermedad. El objetivo de este estudio fue caracterizar farmacológicamente los efectos de nepicastat, un compuesto que modula la síntesis de noradrenalina en nervios simpáticos mediante la inhibición de la enzima dopamina- β -hidroxilasa.

[0132] Se esperaba que la inhibición de la dopamina- β -hidroxilasa *in vivo* resultara en niveles elevados del sustrato (dopamina) y niveles disminuidos del producto (noradrenalina) en tejidos que reciben innervación noradrenérgica. Esta expectativa fue confirmada en experimentos que investigaron los efectos de nepicastat sobre niveles de catecolamina en tejidos centrales y periféricos *in vivo*. Tanto en ratas SHR como en perros beagle, nepicastat produjo reducciones en el contenido de noradrenalina y aumentos en el contenido de dopamina en los tejidos periférico (arteria mesentérica o renal, ventrículo izquierdo) y central (corteza cerebral). A este respecto, el Compuesto B fue menos potente que nepicastat, lo que es consistente con la IC_{50} menor del enantiómero mencionado en primer lugar en la enzima. Si bien la relación dopamina/noradrenalina también fue elevada, no se observó un reemplazo estequiométrico de noradrenalina por dopamina. La explicación más probable de este hallazgo es que los niveles de dopamina en el tejido han sido subestimados debido al metabolismo intraneuronal de dopamina.

[0133] La capacidad de nepicastat para modificar los niveles de catecolamina en la corteza cerebral sugiere que la droga penetra la barrera hematoencefálica. En perros, la magnitud de los cambios de catecolaminas en la corteza cerebral era comparable con aquella en los tejidos periféricos. En ratas SHR, sin embargo, bajas dosis ($\leq 10 \text{ mg.kg}^{-1}$), de nepicastat produjeron cambios significativos en el contenido de noradrenalina y

dopamina en tejidos periféricos sin afectar las catecolaminas en la corteza cerebral. Esto sugiere que, al menos en ratas SHR, la droga posee una modesta selectividad periférica.

- [0134] Las concentraciones plasmáticas de noradrenalina proporcionan una medida útil de la actividad general del sistema nervioso simpático, a pesar de que este parámetro puede estar influenciado por alteraciones de la absorción neuronal y la eliminación metabólica de la catecolamina. Las concentraciones de referencia de noradrenalina en el plasma fueron sorprendentemente elevadas en los perros, lo que es quizás un reflejo del estrés inicial inducido por el procedimiento de flebotomía y muestreo de sangre. Sin embargo, en comparación con el grupo de control, nepicastat produjo disminuciones significativas en las concentraciones plasmáticas de noradrenalina, lo que es consistente con la síntesis y liberación reducidas del transmisor, si bien no se puede descartar un efecto indirecto que es secundario a la facilitación de la absorción neuronal o la eliminación metabólica. Debido a que la noradrenalina liberada representa una pequeña fracción del total de las reservas neuronales de noradrenalina, un inhibidor de la biosíntesis de noradrenalina afectaría la liberación de noradrenalina sólo después de que las reservas existentes de catecolamina hayan sido suficientemente agotadas. Por lo tanto, la disminución de las concentraciones plasmáticas de noradrenalina no adquieren significancia estadística hasta 4 días de dosificación con nepicastat, lo que sugiere una modulación gradual del sistema nervioso simpático.
- [0135] Un cuerpo creciente de evidencia sugiere que la activación crónica del sistema nervioso simpático en la insuficiencia cardíaca congestiva es una respuesta maladaptativa. Esta afirmación es apoyada por ensayos clínicos que mostraron un efecto beneficioso de carvedilol en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva con respecto a la morbilidad a largo plazo y la mortalidad. Sin embargo, debe observarse que la mayoría de los pacientes necesita algún nivel de impulso del sistema simpático para apoyar la homeostasis cardiovascular. De hecho, el valor terapéutico de bloqueadores β , incluyendo carvedilol, puede estar limitado por su propensión a causar un deterioro hemodinámico, especialmente durante la iniciación de la terapia. Este efecto no deseado, que resulta de la retirada abrupta del apoyo del sistema simpático, exige una titulación cuidadosa de la dosis. Los inhibidores de dopamina- β -hidroxilasa, tal como nepicastat, pueden no tener estos efectos indeseables por las razones siguientes. En primer lugar, esta clase de drogas atenúa, pero no elimina, la liberación de noradrenalina y, en segundo lugar, estas drogas producen una modulación gradual del sistema, obviando de este modo la necesidad de titulación de una dosis. Otra ventaja de nepicastat sobre bloqueadores β es que aumenta los niveles de dopamina, lo que, vía el agonismo de receptores de dopamina, puede tener efectos beneficiosos sobre la función renal, tales como vasodilatación renal, diuresis y natriuresis.

[0136] Nepicastat es un inhibidor potente, selectivo y oralmente activo de dopamina- β -hidroxilasa, lo que puede ser de utilidad en el tratamiento de trastornos cardiovasculares asociados con la sobreactivación del sistema nervioso simpático.

Ejemplo 6

5 [0137] La preparación de nepicastat se basó en la reducción quiral de tetralona 3 (disponible a partir de la reacción de Friedel-Crafts catalizada con AlCl_3 de cloruro de 3,5-difluorofenilacetilo con etileno en CH_2Cl_2 a -65°C) bajo las condiciones descritas por Terashima (LAH, (-)-1R, 2S-N-metilefedrina, 2-etilaminopiridina) para proporcionar R-(+)-tetralol 4a (92 – 95% ee), que se convirtió a R-(+)-mesilato, seguido
10 por la reacción con azida sódica, lo que proporcionó una mezcla (9:1) de azida y dihidronaftaleno 7. La azida se hidrogenó, y el producto se trató con HCl anhidro para proporcionar clorhidrato de S-(-)-amina, convertido mediante una reacción de Strecker (complejo de bisulfito de formaldehído y KCN) a S-(-)-aminonitrilo. La formación del heterociclo se logró mediante diformilación secuencial de aminonitrilo, seguido por el
15 tratamiento subsecuente con ácido tiociánico. La hidrólisis competitiva del nitrilo proporcionó cantidades comparables de la amida primaria. La reducción del nitrilo a amina (93-96% ee) se logró utilizando LAH en THF. El enantiómero (91,6% ee) pudo obtenerse mediante la misma ruta de síntesis arriba descrita, utilizando (+)-1S, 2R-N-metilefedrina como auxiliar quiral en la reducción de Terashima de la cetona. La
20 configuración absoluta del centro quiral se basó sobre los datos de la literatura del S-(-)-2-tetralol previamente descrito.

[0138] Los puntos de fusión se determinaron con un aparato de puntos de fusión capilar Uni-Melt Thomas Hoover o una celda Mettler FB 81HT con un procesador Mettler FP90 y no se corrigen. Los espectros de masas se obtuvieron con un espectrómetro Finnigan
25 MAT 8230 (para impacto electrónico o ionización química) o un espectrómetro Finnigan MAT TSQ70 (para LSIMS). Los espectros ^1H NMR se registraron con un espectrómetro Bruker ACF300, AM300, AMX300 o EM390 y los desplazamientos químicos se expresan en ppm (δ) a partir de tetrametilsilano como estándar interno. Los espectros IR se registraron con un espectrómetro Nicolet SPC FT-IR. Los espectros UV se
30 registraron con un espectrómetro de UV visible Varian Cary 3, Leeman Labs Inc. Las rotaciones ópticas se midieron con un polarímetro Perkin-Elmer modelo 141. Las mediciones de HPLC quiral se realizaron con una columna AGP quiral Regis (4,6 x 100 mm) eluyendo con 2% de acetonitrilo – 98% de KH_2PO_4 20 mM (pH 4,7) a 1 mL/min a 20°C .

35 [0139] 5,7-difluoro-2-tetralona. SOCl_2 (100 mL) se agregó en una porción a ácido 3,5-difluorofenilacético (100 g, 0,58 mol), y después de agitar durante 15 h se evaporaron los volátiles bajo presión reducida. El cloruro ácido aceitoso resultante se disolvió en

CH₂Cl₂ (200 mL) y se agregó de a gotas a una suspensión agitada mecánicamente de AlCl₃ (154 g, 1,16 mol) en CH₂Cl₂ (1,0 L). La suspensión agitada se enfrió a una temperatura interna de -65° C en un baño de hielo seco / acetona, y la solución de cloruro de ácido se agregó a una velocidad tal para mantener una temperatura interna < -

5 60° C. Una vez completado el agregado, se hizo burbujear gas etileno a través de la mezcla de reacción a una velocidad rápida durante 10 minutos a -65° C. La mezcla de reacción se dejó calentar a 0° C durante 2 h con agitación, luego se enfrió a -10° C y se trató con H₂O (500 mL), inicialmente de a gotas, seguido por un agregado rápido. La capa orgánica se separó, se lavó con salmuera (100 mL) y se secó sobre MgSO₄. La

10 evaporación bajo presión reducida proporcionó un residuo aceitoso oscuro que se destiló *in vacuo* en un Kugelrohr, recolectando el material que hierve entre 90 – 110° C (1,0 a 0,7 mm Hg). El destilado se redestiló a 100-105° C (0,3 mm Hg) para proporcionar el producto en la forma de un sólido blanco (73,6 g, 0,40 mol; 70%): p.f. 46 °C; IR (KBr) 1705 cm⁻¹; ¹H NMR (CDCl₃) δ 2.55 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.10 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 3.58 (s,

15 2H), 6.70 (m, 2H); MS *m/z* 182 (M⁺). Análisis calculado para C₁₀H₈F₂O: C, 65.93; H, 4.42. Encontrado: C, 65.54; H, 4.42.

[0140] (R)-(+)-2-hidroxi-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno. Una solución de (-)-1R,2S-N-metilefedrina (81,3 g, 0,454 mol) en Et₂O anhidro (1,1 L) se agregó de a gotas (45 min) a hidruro de litio y aluminio 1,0 M (416 mL, 0,416 mol) en Et₂O a una velocidad

20 suficiente para mantener un reflujo suave. Una vez completado el agregado, la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h y luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregó una solución de 2-etilaminopiridina (111 g, 0,98 mol) en Et₂O anhidro (100 mL) (45 min) a una velocidad tal para mantener un reflujo suave. La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 1 h adicional, tiempo durante el cual apareció una suspensión

25 de color amarillo claro – verde. La mezcla se enfrió a una temperatura interna de -65° C utilizando un baño de hielo seco – acetona y se agregó de a gotas una solución de 5,7-difluoro-2-tetralona (23,0 g, 126 mmol) en Et₂O (125 mL) a una velocidad para mantener la temperatura interna por debajo de -60° C. Una vez completado el agregado, la mezcla se agitó a una temperatura de -65° C a -68° C durante 3 h y se apagó mediante

30 el agregado de MeOH (100 mL), manteniendo la temperatura interna por debajo de -60° C. La masa de reacción se agitó durante unos 10 min adicionales a -65° C y se dejó calentar a aproximadamente -20° C. Luego se agregó una solución de HCl 3N (2L) a una velocidad para no sobrepasar una temperatura de < 35° C. Después de agitar con mayor velocidad para lograr la disolución total, las capas se separaron y la capa etérea se

35 lavó con salmuera (200 mL) y se secó (MgSO₄). La solución etérea se evaporó bajo presión reducida y el residuo se disolvió en Et₂O caliente (20 mL) seguido por el agregado de hexano (200 mL). La solución sembrada con cristales se enfrió en un baño

de hielo y se mantuvo a 0° C durante 1 h, con lo cual se recolectaron los cristales depositados resultantes que se secaron *in vacuo* para proporcionar el alcohol (10,9 g, 47%): p.f. 85 °C; $[\alpha]^{25}_D +38.1^\circ$ ($c = 1.83$, CHCl_3); 93.4% ee mediante HPLC quiral: ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.70 (br s, 1H), 1.76-1.88 (m, 2H), 1.99-2.06 (m, 2H), 2.63-3.08 (m, 3H), 4.15 (m, 1H), 6.60 (m, 2H). Análisis calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}$: C, 65.21; H, 5.47. Encontrado: C, 65.38; H, 5.42. Los espectros para el enantiómero S 4b son idénticos: p.f. 84-85 °C; $[\alpha]^{25}_D -37.8^\circ$ ($c = 1.24$, CHCl_3); 92.4% ee mediante HPLC quiral. Análisis calculado pra $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{F}_2\text{O}$: C, 65.21; H, 5.47. Encontrado: C, 65.47; H, 5.39.

[0141] (R)-(+)-2-metansulfoniloxi-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno. Una solución de R-(+)-5,7-difluoro-2-tetralol (59,0 g, 320 mmol) y Et_3N (74,2 mL, 53,9 g, 530 mmol) en Et_2O anhidro (1,78 L) se enfrió (-15° C) usando un baño de hielo – MeOH y se trató bajo argon con agitación con MsCl (37,2 mL, 55,3 g, 480 mmol) durante 5 – 10 min. Después de 5 h la reacción se completó (según lo determinado por TLC) y se agregó agua para disolver los sólidos. Se agregó una pequeña cantidad de EtOAc para ayudar con la disolución completa de los sólidos. La fase orgánica se separó y se lavó secuencialmente con HCl 1N, solución acuosa de NaHCO_3 , salmuera y se secó sobre MgSO_4 . La evaporación del solvente proporcionó un sólido casi blanco (87,1 g, 332 mmol), que se usó directamente en la próxima etapa. La trituración de una pequeña muestra con $i\text{-Pr}_2\text{O}$ proporcionó una muestra analítica: p.f. 78.8-80.5 °C; $[\alpha]^{25}_D +16.8^\circ$ ($c = 1.86$, CHCl_3); $^1\text{HNMR}$ δ 2.13-2.28 (m, 2H), 2.78-2.96 (m, 2H), 3.07 (s, 3H), 3.09 (dd, $J = 17.1$ Hz, 4.7, 1H), 3.20 (dd, $J = 17,2$, 4.7 Hz, 1H), 5.20 (m, 1H), 6.67 (m, 2H). Análisis calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 50.37; H, 4.61. Encontrado: C, 50.41; H, 4.64. Los espectros para el enantiómero S 5b son idénticos: p.f. 79,9-80,9 °C; $[\alpha]^{25}_D -16,6^\circ$ ($c = 2,23$, CHCl_3). Análisis calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{F}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 50,37; H, 4,61. Encontrado: C, 50,41; H, 4,65.

[0142] Clorhidrato de (S)-(-)-2-amino-5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaftaleno. Se agregó azida sódica (40,0 g, 0,62 mol) a DMSO (1 L) con agitación hasta obtener una solución clara. El mesilato (138 g, 0,53 mol) se agregó en una porción y la mezcla se calentó a 50° C durante 16 h bajo una atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se diluyó con H_2O (1,8 L) y se extrajo con pentano (4 x 250 mL) seguido por un lavado secuencial de los extractos combinados de pentano con H_2O (2 x 100 mL), salmuera (100 mL) y el secado sobre MgSO_4 . La evaporación del solvente bajo presión reducida proporcionó un aceite volátil que se cromatografió rápidamente sobre sílice, utilizando pentano como eluyente para proporcionar dihidronaftaleno (8,50 g, 51,2 mmol) en la forma de un aceite volátil. Una elución adicional con pentano/ CH_2Cl_2 (9:1) proporcionó la azida (101 g, 483 mmol) en la forma de un aceite incoloro: IR (CHCl_3) 2103 cm^{-1} ; m/z 171 (M^+). La azida 6a se disolvió en EtOAc (1200 mL) y se hidrogenó sobre Pd/C al 10% (6 g) en una

botella Parr de 2,5 L (60 psi) durante 6 h. Después de cada hora, la botella se evacuó y se recargó con hidrógeno para separar el N₂ desarrollado. La mezcla resultante se filtró a través de Celite, se agitó con solución etérea de HCl (1N, 500 mL), y el precipitado fino se separó por filtración y se lavó con EtOAc y luego con éter anhidro. (La filtración duró
 5 aproximadamente 4 h). El sólido húmedo se transfirió a un balón, y el solvente remanente se separó *in vacuo* para proporcionar un sólido blanco (90,4 g, 412 mmol; 77,9%): p.f. >280 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -60,2° (c = 2,68, MeOH); ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 1.79 (m, 1H), 2.33 (m, 1H), 2.63 (m, 1H), 2.83-2.92 (m, 2H), 3.14 (dd, *J* = 16.7, 5.0 Hz, 1H), 3.46 (m, 1H), 6.93 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 7.00 (dt, *J* = 9.4, 2.5 Hz, 1H). Análisis calculado para
 10 C₁₀H₁₂ClF₂N: C, 54.68; H, 5.51; N, 6.37. Encontrado: C, 54.31; H, 5.52; N, 6.44. Los espectros para el enantiómero (R) 8b son idénticos: p.f. >280 °C; $[\alpha]_D^{25}$ +58,5° (c = 1.63, CHCl₃). Análisis calculado para C₁₀H₁₂ClF₂N: C, 54.68; H, 5.51; N, 6.37. Encontrado: C, 54.64; H, 5,51; N, 6.40.

[0143] (S)-(-)-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)(cianometil)amina. El clorhidrato
 15 de amina 8a (50,27 g, 229 mmol) se trató con una solución de NaOH (10,0 g, 250 mmol) en agua (150 mL), seguido por el agregado de unas pocas pellas adicionales de NaOH suficientes para obtener una solución. Se agregó agua adicional (300 mL) y la mezcla se colocó en un baño a 50° C y se trató con el complejo formaldehído – bisulfito de sodio (30,8 g, 230 mmol). Después de agitar la mezcla durante 30 min, se agregó KCN (15,0
 20 g, 230 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante una hora adicional a 80° C, se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo con EtOAc para proporcionar un aceite (51,3 g) que solidificó. La cromatografía de capa delgada (TLC) (5% de MeOH - CH₂Cl₂) mostró que quedó aproximadamente 10-15% de la amina de partida. La cromatografía sobre sílice proporcionó el producto de nitrilo (39,4 g) y la amina libre del título (7,12 g)
 25 que rápidamente forma el carbonato en contacto con el aire. El reciclado de esta amina proporcionó 5,35 g adicionales del producto. Rendimiento combinado (44,8 g, 202 mmol; 87,5%): p.f. 73.1-76.5 °C; $[\alpha]_D^{25}$ -58.0° (c = 1.63, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.50 (br s, 1H), 1.70 (m, 1H), 2.05 (m, 1H), 2.55-3.04 (m, 4H), 3.22 (m, 1H), 3.70 (s, 2H), 6.62 (m, 2H); MS *m/z* 222 (M⁺). Análisis calculado para C₁₂H₁₂F₂N₂: C, 64.85; H,
 30 5.44; N, 12.60. Encontrado: C, 65.07; H, 5.47; N, 12.44. Los espectros para el enantiómero (R) 9b son idénticos: p.f. 64,4-73,6 °C; $[\alpha]_D^{25}$ +52,3° (c = 2,12, CHCl₃). Análisis calculado para C₁₂H₁₂F₂N₂: C, 64,85; H, 5,44; N, 12.60. Encontrado: C, 65,14; H, 5,54; N, 12.53.

[0144] (S)-(-)-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)-5-ciano-2,3-dihidro-2-tioxo-
 35 1H-imidazol. El nitrilo (44,7 g, 201 mmol) en formato de butilo (240 mL) se calentó a reflujo (baño de 120° C) bajo N₂ durante 19 h, y luego se separó el solvente bajo presión reducida. Se agregó y se evaporó tolueno para separar las últimas trazas del solvente, y

el residuo se secó bajo alto vacío para proporcionar un aceite (53,2 g). La formamida resultante y formato de etilo (48,7 mL, 44,7 g, 604 mmol) en THF anhidro (935 mL) se enfriaron en hielo/MeOH (-15° C) y se agregó con agitación t-BuOK (1 M en THF, 302 mL, 302 mmol) durante 20 min. Después de la agitación de la masa de reacción durante 18 h, el solvente se evaporó, el residuo se disolvió en HCl 1 N (990 mL) y etanol (497 mL) y se trató con KSCN (78,1 g, 804 mmol). La mezcla se agitó durante 135 min a 85° C y luego se colocó en un baño de hielo para proporcionar un precipitado. El sólido filtrado se cargó en la forma de una suspensión en 10% MeOH/CH₂Cl₂ a una columna de sílice (1 kg) empaquetada en hexano. La elución con 10% acetona/CH₂Cl₂ proporcionó el producto (18,05 g, 62,1 mmol; 30,8%): p.f. 240.7-249.2 °C; $[\alpha]^{25}_D$ -69.1° (c=1.18, DMSO); ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 2.18 (br m, 1H), 2.47 (m, 1H), 2.75 (m, 1H), 3.03-3.35 (m, 3H), 5.19 (m, 1H), 6.94 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H), 7.03 (dt, *J* = 9.3, 2.4 Hz, 1H), 8.29 (s, 1H), 13.3 (br s, 1H); MS *m/z* 291 (M⁺). Análisis calculado para C₁₄H₁₁F₂N₃S: C, 57.72; H, 3.80; N, 14.42. Encontrado: C, 57.82; H, 3.92; N, 14.37. (La elución adicional de la columna con MeOH/CH₂Cl₂ 1:1 proporcionó la amida primaria 11a: p.f. 261.9-262.7 °C; $[\alpha]^{25}_D$ -90.5° (c = 0.398); IR (KBr) 1593, 1630 cm⁻¹; ¹H NMR (d₆-DMSO) δ 2.14 (m, 1H), 2.15-2.28 (m, 1H), 2.74-3.05 (m, 4H), 5.64 (m, 1H), 6.90 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.05 (dt, *J* = 9.5, 2.4 Hz, 1H), 8.73 (s, 1H), 9.70 (br s, 1H), 13.7 (br s, 1H); MS *m/z* 309 (M⁺). Análisis calculado para C₁₄H₁₃F₂N₃OS·0,25 H₂O: C, 53.57; H, 4.33; N, 13.39. Encontrado: C, 53.32; H, 3.96; N, 13.24. Los espectros para el enantiómero R son idénticos: p.f. 243,1-244,7 °C; $[\alpha]^{25}_D$ +74,9° (c = 2,14, DMSO). Análisis calculado para C₁₄H₁₁F₂N₃S: C, 57,72; H, 3,80; N, 14,42. Encontrado: C, 57,85; H, 3,85; N, 14,45.

[0145] (S)-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)-5-aminometil-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol. El nitrilo arriba indicado (5,00 g, 17,2 mmol) en THF (75 mL) se agitó bajo argon en un baño de hielo hasta obtener una solución homogénea. Se agregó de a gotas durante 10 min una solución de LAH en THF (1 M, 34,3 mL, 34,3 mmol), luego la solución se agitó durante 30 min a 0° C y se dejó llegar a temperatura ambiente durante 1,5 h. La mezcla de reacción se enfrió nuevamente a 0° C y se trató con una solución saturada de tartrato de sodio y potasio hasta que la mezcla pudo agitarse libremente. Se agregó solución de tartrato adicional (30 mL), seguido por 10% MeOH/CH₂Cl₂ (200 mL) y la mezcla se agitó durante 15 min y se trató con agua (100-150 mL). La capa orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con 10% MeOH/CH₂Cl₂ (2 x 125 mL). Los extractos combinados se lavaron, se secaron (MgSO₄), y se evaporaron. La cromatografía del residuo (5,2 g) sobre sílice y eluyendo con 5% MeOH/CH₂Cl₂ proporcionó la amina libre (2,92 g, 9,89 mmol; 58%): p.f. 170 °C; $[\alpha]^{25}_D$ -11,0° (c = 1,59, DMSO). Análisis calculado para C₁₄H₁₅F₂N₃S·0,25H₂O: C, 56,07; H, 5,21; N, 14,01. Encontrado: C, 56,11; H, 5,10; N, 14,14.

[0146] Clorhidrato de (S)-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)-5-aminometil-2,3-dihidro-2-tioxo-1H-imidazol (nepicastat). La sal de clorhidrato se preparó mediante el agregado de HCl en éter (1M, 20 mL, 20 mmol) a la amina libre 2a (3,12 g, 10,6 mmol) que había sido disuelta en MeOH (250 mL) mediante calentamiento. El solvente se separó parcialmente bajo presión reducida y se eliminó mediante co-evaporación con EtOAc realizada varias veces sin evaporación a sequedad. El precipitado resultante se trató con EtOAc (150 mL) y éter (150 mL), se separó por filtración, se lavó con éter, y se secó bajo nitrógeno y luego bajo alto vacío a 78° C durante 20 h para proporcionar la sal de clorhidrato (3,87 g): p.f. 245 °C (dec); $[\alpha]_D^{25} +9.65^\circ$ (c = 1.70, DMSO); (93% ee mediante HPLC quiral); ^1H NMR (T = 320 °K, DMSO) δ 2.07 (m, 1H), 2.68-3.08 (m, 4H), 4.09 (m, 3H), 4.77 (m, 1H), 6.84 (m, 2H), 7.05 (s, 1H), 8.57 (br s, 3H), 12.4 (br s, 1H). Análisis calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClF}_2\text{N}_3\text{S}\cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$: C, 49.33; H, 5.03; N, 12.33. Encontrado: C, 49.44; H, 4.96; N, 12.18. Los espectros para el enantiómero R (R)-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)-5-aminometil-2,3-dihidro- son idénticos; p.f. 261-263 °C; $[\alpha]_D^{25} -10.8^\circ$ (c = 1.43, DMSO), 91.6% ee mediante HPLC quiral. Análisis calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{ClF}_2\text{N}_3\text{S}\cdot 0.35\text{H}_2\text{O}$: C, 49.73; H, 4.98; N, 12.42. Encontrado: C, 49.80; H, 4.93; N, 12.39.

[0147] Se demostró que nepicastat es un inhibidor competitivo de DBH bovina ($\text{IC}_{50} = 8,5 \pm 0,8$ nM) y humana ($\text{IC}_{50} = 9,0 \pm 0,8$ nM). El enantiómero R (R)-1-(5,7-difluoro-1,2,3,4-tetrahidronaft-2-il)-5-aminometil-2,3-dihidro- ($\text{IC}_{50\text{s}} = 25,1 \pm 0,6$ nM; $18,3 \pm 0,6$ nM) y SKF 102698 ($\text{IC}_{50\text{s}} = 67,0 \pm 4,2$ nM; $85,0 \pm 3,7$ nM) son inhibidores menos potentes de las enzimas bovina y humana, respectivamente. Se determinó la actividad de DBH midiendo la conversión de tiramina a octopamina. La DBH bovina de glándulas adrenales se obtuvo de Sigma Chemical Co (St Louis, MO). La DBH segregada por humanos se purificó a partir del medio de cultivo de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH. El ensayo se realizó a pH 5,2 y 32° C en NaOAc 0,125 M, fumarato 10 mM, CuSO_4 0,5 – 2 μM , catalasa 0,1 mg/mL, tiramina 0,1 mM y ascorbato 4 mM. En un ensayo típico, se agregaron a la mezcla de reacción 0,5 – 1 miliunidades de enzima y luego se agregó una mezcla de sustrato que contiene catalasa, tiramina y ascorbato para iniciar la reacción (volumen final de 200 μl). Las muestras se incubaron con o sin la concentración apropiada del inhibidor a 37° C durante 30-40 min. La reacción se apagó mediante la solución de detención que contiene EDTA 25 mM y 3-hidroxitiramina 240 μM (estándar interno). Las muestras se analizaron por octopamina mediante HPLC de fase inversa utilizando detección UV a 280 nM. La actividad porcentual remanente se calculó en base a controles (sin inhibidor), se corrigió utilizando estándares internos y se colocó en una curva no lineal de concentración-respuesta de cuatro parámetros para obtener valores IC_{50} .

[0148] Se determinó la actividad de nepicastat sobre once enzimas diferentes utilizando ensayos establecidos. Se determinó la afinidad de nepicastat por trece receptores seleccionados mediante ensayos de unión de radioligando utilizando técnicas de filtración estándar y preparaciones de membrana. Los datos de unión se analizaron mediante el ajuste iterativo de curva a una ecuación logística de cuatro parámetros. Los valores K_i se calcularon utilizando la ecuación Cheng-Prusoff. La Figura 3 muestra una tabla que describe la interacción de nepicastat con DBH y una gama de enzimas y receptores seleccionados. Nepicastat mostró una afinidad débil para una gama de otras enzimas y receptores de neurotransmisores. Estos datos sugieren que nepicastat es un inhibidor potente y altamente selectivo de DBH *in vitro*. Además, el enantiómero S de nepicastat es aproximadamente 2-3 veces más potente que el enantiómero R, lo que sugiere estereoselectividad.

[0149] La administración oral de nepicastat a ratas (SHR) espontáneamente hipertensivas y perros normales produjo aumentos potentes dosis dependientes de las relaciones dopamina (DA) / norepinefrina (NE) del tejido en arterias periféricas (renales o mesentéricas), el ventrículo izquierdo y la corteza cerebral. La administración oral crónica de nepicastat a perros normales también produjo aumentos sostenidos de la relación DA/NE en el plasma. En ratas SHR conscientes, la administración oral aguda de nepicastat produjo efectos dosis dependientes y de larga duración (> 4 h) y también atenuó las respuestas presoras a la estimulación del nervio simpático preganglionico. Los niveles de T_3 y T_4 en suero no se vieron afectados por una dosis (6,2 mg/kg, po, b.i.d. por 10 días) que elevó la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica. Sobre la base de su capacidad para modular potentemente el impulso simpático en tejidos cardiovasculares, nepicastat fue evaluado clínicamente para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva.

[0150] La insuficiencia cardíaca congestiva (CHF) es una causa principal de mortalidad en los Estados Unidos. La CHF se caracteriza por una activación marcada del sistema nervioso simpático (SNS) y del sistema renina-angiotensina (RAS). La activación simultánea de estos dos sistemas neurohormonales ha sido implicada cada vez más en la perpetuación y progresión de la CHF. Intervenciones terapéuticas que bloquean los efectos de estos sistemas neurohormonales probablemente modifican favorablemente la historia natural de CHF. En efecto, se mostró que los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), que bloquean la formación de angiotensina II, reducen la morbilidad y mortalidad en pacientes con CHF. Los inhibidores de ACE, sin embargo, tienen una capacidad indirecta limitada para atenuar el SNS. La inhibición del SNS con antagonistas del adrenoceptor β es un enfoque promisorio que se encuentra actualmente bajo evaluación clínica. Una estrategia alternativa para modular

directamente el SNS es la inhibición de la biosíntesis de la norepinefrina (NE) vía la inhibición de dopamina- β -hidroxilasa (DBH), la enzima responsable de la conversión de NE a dopamina (DA). Se esperaría que la inhibición de la DBH reduce los niveles de NE en el tejido y aumenta los niveles de DA en el tejido, incrementando de este modo la relación DA/NE en el tejido. Este enfoque tiene ventajas potenciales con respecto a los antagonistas del adrenoceptor β , tales como una estimulación reducida de adrenoceptores α y elevados niveles de DA, los que pueden producir vasodilatación renal, natriuresis y liberación disminuida de aldosterona. Inhibidores de DBH anteriores, tales como ácido fusarico y SKF-102698, tienen inconvenientes tales como baja potencia y especificidad, que han impedido su desarrollo clínico en insuficiencia cardíaca.

[0151] El nepicastat se usó en estudios bioquímicos *in vivo* para estudiar los efectos en ratas (SHR) espontáneamente hipertensivas y perros beagle normales. El día del estudio, los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente para recibir o placebo (vehículo) o la dosis apropiada de nepicastat. Cada rata se dosificó oralmente tres veces, con intervalo de 12 h, comenzando en la mañana. Seis horas después de la tercera dosis, las ratas se anestesiaron con halotano, se decapitaron, y los tejidos (corteza cerebral, arteria mesentérica y ventrículo izquierdo) rápidamente se cosecharon, se pesaron, se colocaron en ácido perclórico 0,4 M helado, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70° C hasta análisis. Las concentraciones de NE y DA en el tejido se determinaron mediante HPLC utilizando detección electroquímica. En el estudio se utilizaron perros beagle machos (10 – 16 kg, Marshall Farms USA Inc, North Rose, NY). El día del estudio, los perros se pesaron y se asignaron aleatoriamente para recibir o placebo (cápsula vacía) o la dosis apropiada de nepicastat. A cada perro se administraron las dosis dos veces por día durante 4,5 días. El día cinco, 6 h después de la primera dosis, los perros se eutanizaron con pentobarbital y los tejidos (corteza cerebral, arteria renal, ventrículo izquierdo) se cosecharon, se pesaron, se colocaron en ácido perclórico 0,4 M helado, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70° C hasta análisis. Las concentraciones de NE y DA en el tejido se determinaron mediante HPLC utilizando detección electroquímica.

[0152] La administración oral de nepicastat produjo aumentos dosis-dependientes de las relaciones DA/NE en las arterias (mesentérica o renal), el ventrículo izquierdo y la corteza cerebral en ratas SHR y perros.

[0153] Con las dosis más altas ensayadas (100 mg/kg en ratas SHR y 5 mg/kg en perros), los incrementos máximos de la relación DA/NE fueron 14, 11 y 3,2 veces (en ratas SHR) y 95, 151 y 80 veces (en perros) en las arterias, el ventrículo izquierdo y la corteza cerebral, respectivamente. Al efectuar el ensayo con la dosis de 30 mg/kg en

- ratas SHR, SKF-102698 (1) aumentó la relación DA/NE 5,5 veces, 3,5 veces y 2,7 veces, mientras que nepicastat, con la misma dosis, aumentó la relación 8,3, 7,5 y 1,5 veces en las arterias mesentéricas, el ventrículo izquierdo y la corteza cerebral, respectivamente. Con la dosis de 30 mg/kg en ratas SHR, el Compuesto B produjo solamente aumentos de
- 5 la relación DA/NE de 2,6, 3,5 y 1,1 veces en la arteria mesentérica, el ventrículo izquierdo y la corteza cerebral, respectivamente. Estos datos sugieren que nepicastat produce los efectos bioquímicos esperados tanto en ratas SHR como así también en perros, pero que es más potente en la última especie mencionada. Además, nepicastat es más potente que su enantiómero, el Compuesto B, y SKF-102698 (1) en ratas SHR.
- 10 **[0154]** Los efectos crónicos de nepicastat (tratamiento durante 14,5 días) sobre la relación DA/NE en plasma fueron investigados en perros normales. Los animales se aleatorizaron para recibir, oralmente, ya sea placebo (cápsula vacía) o nepicastat (2 mg/kg, b.i.d) durante 14,5 días. Diariamente se sacaron muestras de sangre, seis horas después de la primera dosis, para la medición de las concentraciones plasmáticas de
- 15 dopamina y noradrenalina. Las muestras se recolectaron en tubos que contienen heparina y grutaciona, se centrifugaron a -4°C , y se almacenaron a -70°C hasta análisis.
- [0155]** La administración oral de nepicastat (2 mg/kg; b.i.d) produjo un aumento significativo de la relación DA/NE, la que alcanzó su efecto pico a aproximadamente 6-7 días y luego se estabilizó a un nuevo estado constante entre 7-14 días.
- 20 **[0156]** La actividad hemodinámica *in vivo* de nepicastat fue evaluada además con ratas SHR conscientes enjauladas, un modelo que tiene un elevado impulso sobre el nervio simpático del tejido vascular. Estudio hemodinámico en ratas SHR. En el estudio se utilizaron ratas SHR macho (de 15 – 16 semanas de edad). Los animales se anestesiaron ligeramente con éter y se cateterizaron la arteria femoral y vena izquierda para la
- 25 medición de la presión sanguínea y la administración de la droga, respectivamente. Los animales se colocaron en jaulas y se dejaron recuperarse durante 30-40 minutos. Después de las mediciones de referencia (línea base), los animales se trataron, oralmente, con vehículo o la dosis apropiada de nepicastat, y los parámetros hemodinámicos se registraron continuamente durante 4 h. Luego, los animales se
- 30 anestesiaron con pentobarbital, se colocaron sobre una almohadilla térmica (37°C) y se ventilaron con un ventilador Harvard para roedores. Después de la administración de atropina (1 mg/kg, iv) y tubocurarina (1 mg/kg, iv), los animales se descerebraron a través de la órbita ocular con una varilla de acero inoxidable. La varilla de descerebración se estimuló eléctricamente con pulsos de 1 ms de 80V a diferentes
- 35 frecuencias (0,15, 0,45, 1,5, 5, 15 Hz) para obtener curvas frecuencia - respuesta presora.
- [0157]** La dosificación oral con nepicastat resultó en un efecto antihipertensivo dosis-dependiente. Los animales se colocaron en jaulas y se dejaron recuperarse durante 30-40

minutos. Después de las mediciones de referencia (línea base), los animales se trataron, oralmente, con vehículo o la dosis apropiada de nepicastat, y los parámetros hemodinámicos se registraron continuamente durante 4 h. Nepicastat produjo una disminución significativa ($p < 0,05$) de la presión arterial media en todas las dosis y puntos de tiempo con excepción de 0,3 mg/kg (180, 210 y 240 min) y 1 mg/kg (30, 210 y 240 min).

[0158] Una disminución máxima de la presión sanguínea media de 53 ± 4 mm Hg (una reducción de 33% con respecto a la presión medida con el vehículo de control) se observó a la dosis de 10 mg/kg. La respuesta fue lenta al inicio, alcanzando su meseta después de 3-4 h. La razón exacta por la pérdida de eficacia anti-hipertensiva con la dosis máxima (30 mg/kg) no está clara actualmente. La frecuencia cardíaca no fue afectada significativamente con excepción de una ligera, si bien significativa, disminución a 10 y 30 mg/kg (9,8 y 10,5%, respectivamente). Después de este estudio, las ratas se descerebraron, y 5 h después de la dosificación se evaluaron los efectos de nepicastat sobre la respuesta presora a la estimulación nerviosa pre-ganglionar (PNS) de la médula espinal. La curva frecuencia – respuesta presora se desplazó significativamente ($p < 0,05$) hacia la derecha en dependencia de la dosis (desplazamiento máximo ~ 5 veces en la curva frecuencia-respuesta). La respuesta de la frecuencia cardíaca al sistema nervioso periférico (PNS) no fue afectada significativamente. Estos datos sugieren que nepicastat inhibe el impulso simpático a la vasculatura y es el mecanismo probable para su efecto anti-hipertensivo en ratas SHR.

[0159] Debido a que la porción heterocíclica de nepicastat es estructuralmente similar a metimazol, un potente supresor conocido de la función tiroidea en los mamíferos, se evaluaron durante 10 días los efectos de nepicastat sobre la función tiroidea a dosis de 2,0 y 6,2 mg/kg, po, b.i.d, en ratas Sprague-Dawley (n=9-12) yodo-deficientes. Metimazol (1 mg/kg, po, b.i.d), usado como control positivo, causó una reducción significativa de los niveles de T_3 , (día 3, 31%, $p < 0,05$; días 7 y 9, 42% y 44%, $p < 0,01$) y T_4 (días 3 y 7, 46% y 58%, $p < 0,01$) en suero, 4 h después de la dosis, mientras que nepicastat no mostró efectos significativos durante todo el estudio (días 3, 7 y 9). Ambas dosis de nepicastat aumentaron significativamente la relación DA/NE en la arteria mesentérica ($p < 0,01$ con relación al vehículo de control) pero no en la corteza, 4 h después de la dosis final del día 10.

[0160] Los resultados de este estudio sugieren que nepicastat es un inhibidor potente, selectivo y oralmente activo de DBH. Este compuesto también carece de efectos significativos sobre el comportamiento en modelos animales, y estos resultados serán el objeto de una futura publicación. Como el compuesto nepicastat modula eficazmente el

impulso simpático en tejidos cardiovasculares, ha sido ensayado para el tratamiento de CHF.

Ejemplo 7

- 5 [0161] Se determinaron las concentraciones de dopamina y norepinefrina en 942 muestras de plasmas recolectadas de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (CHF). Los objetivos del estudio fueron:
- [0162] 1. evaluar los efectos de varias dosis de nepicastat sobre los niveles de catecolamina trasmiocardiales (arteria – sinus coronario) y del sinus coronario después de cuatro semanas, y evaluar la seguridad y tolerancia a nepicastat durante 12 semanas.
- 10 [0163] 2. evaluar los efectos de nepicastat sobre los cambios desde los valores de referencia en:
- [0164] a) Niveles de catecolamina en plasma (venoso) después de cuatro semanas y 12 semanas,
- [0165] b) Calidad de vida (QoL), síntomas de CHF, evaluaciones globales y clase 15 NYHA después de cuatro semanas y 12 semanas,
- [0166] c) Parámetros hemodinámicos, incluyendo output cardíaco, resistencia vascular sistémica, MVO₂, presión de la arteria pulmonar y presión capilar de la arteria pulmonar después de cuatro semanas,
- [0167] d) Hospitalizaciones y cambios en las dosificaciones del medicamento para el 20 tratamiento de CHF durante 12 semanas,
- [0168] e) Presión sanguínea y frecuencia cardíaca a las cuatro y 12 semanas,
- [0169] f) Prueba de caminata durante 6 minutos después de 4 y 12 semanas,
- [0170] g) Fracción de eyección ventricular izquierda, volúmenes sistólico final ventricular y diastólico final ventricular a las 12 semanas.
- 25 [0171] Se recolectaron muestras de sangre de una vena periférica de pacientes, mientras que estaban en posición decúbito supina, a las dos horas después de la dosis durante las semanas 4 y 12. Muestras adicionales de pacientes en posición decúbito supina se recolectaron el día 0 (es decir, el día anterior al inicio de la dosificación) en un tiempo correspondiente a 2 horas postdosis. Además, un grupo de pacientes fue 30 sometido a la cateterización cardíaca derecha y del sinus coronario durante la semana 4 a las 2 horas postdosis y el día 0 (es decir, el día previo al inicio de la dosificación) en un tiempo correspondiente a 2 horas postdosis. Se recolectaron muestras de sangre por triplicado de la vena arterial y el sinus coronario de estos pacientes.
- [0172] Se determinaron las concentraciones de la base libre de dopamina y 35 norepinefrina mediante un método radioenzimático. El método implica la incubación de muestras de plasma con catecol-O-metil transferasa y S-adenosilmetionina tritiada. Una vez completada la incubación, las catecolaminas O-metiladas se extraen del plasma

mediante extracción líquido/líquido y luego se separan mediante cromatografía de capa delgada. Las bandas relevantes para cada catecolamina se marcan y luego se raspan en frasquitos de centelleo para el conteo. El límite cuantitativo del método es 1 pg de dopamina o norepinefrina por mL de plasma. La gama lineal es de 1 a 333000 pg de dopamina o norepinefrina por mL de plasma utilizando alicuotas de 0,045 mL a 1 mL.

[0173] Una muestra combinada de plasma humano se utilizó como muestra de control de calidad (QC) y se analizó una sola muestra cada día durante el uso rutinario del método para monitorear el rendimiento del método.

Ejemplo 8

[0174] Se realizaron estudios farmacológicos preclínicos *in vitro* e *in vivo* con nepicastat. Los estudios *in vitro* evaluaron la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de DBH y su afinidad de unión a receptores seleccionados. Los estudios *in vivo* se subdividen en cuatro categorías: 1) efectos bioquímicos (es decir, la capacidad para disminuir los niveles de norepinefrina y aumentar los niveles de dopamina en los tejidos), 2) efectos sobre la función tiroide, 3) efectos cardiovasculares y 4) efectos sobre el comportamiento.

[0175] El nepicastat fue un inhibidor potente, tanto de la DBH bovina como de la humana. La IC_{50} para nepicastat sobre DBH humana fue 9 nM (CL 6960), significativamente menor que aquella para el inhibidor de DBH SKF-102698 (85 nM). El enantiómero S de nepicastat fue más potente que el enantiómero R (18 nM), designado como Compuesto B.

[0176] Se examinó la afinidad de unión para nepicastat con receptores seleccionados. Nepicastat mostró una afinidad de unión menor de 5,0 para M1, D1 y D2, y 5HT_{1A}, 2A y 2c. El metabolito N-acetilado de nepicastat en ratas y monos mostró una falta similar de afinidad de unión por estos receptores. Por lo tanto, nepicastat y su metabolito primario no fueron inhibidores potentes para los receptores arriba mencionados.

[0177] La respuesta contráctil de la aorta *in vitro* a fenilefrina es deteriorada en ratas SHR espontáneamente hipertensivas en relación con ratas Wistar-Kyoto de tensión normal. El tratamiento diario con nepicastat (10 mg/kg, p.o.) en ratas SHR durante 21 días restauró la capacidad de respuesta a fenilefrina a valores comparables con las ratas Wistar-Kyoto.

[0178] En general, nepicastat fue un inhibidor efectivo de la DBH en ratas y perros. La administración oral o intravenosa resultó en una disminución significativa ($p < 0,05$) de la norepinefrina en los tejidos, un aumento de los niveles de dopamina y un aumento de la relación dopamina/norepinefrina en el corazón, la arteria mesentérica o renal y la corteza cerebral en ambas especies.

- [0179] En estudios con ratas SHR macho espontáneamente hipertensivas, nepicastat disminuyó significativamente norepinefrina y aumentó dopamina y la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica desde 0,5 a 4 horas después de la administración oral o i.v. a 6,2 mg/kg. Cambios significativos de estos parámetros también se observaron en el ventrículo izquierdo de ratas macho Sprague-Dawley 6 horas después de la segunda de dos inyecciones i.v. (15 mg/kg) administradas con un intervalo de 12 horas. Se estudió el contenido de catecolaminas en el tejido de ratas SHR macho durante un transcurso de 24 horas después de la administración oral de 10 ó 30 mg/kg, respectivamente. El aumento de la relación dopamina/norepinefrina fue significativo después de 1 hora, y fue de larga duración (12 horas a 10 mg/kg, arteria mesentérica, y 24 horas a 30 mg/kg, ventrículo izquierdo). Se observaron cambios significativos de los niveles de dopamina y norepinefrina en la arteria mesentérica después de 10 días de dosificación a ratas Sprague-Dawley macho a 2,0 y 6,2 mg/kg p.o. b.i.d., sin observar efectos significativos en la corteza cerebral. Ratas SHR dosificadas con 1 ó 10 mg/kg/d p.o. durante 7 ó 25 días mostraron aumentos significativos en dopamina y la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica y la corteza cerebral. En resumen, nepicastat resultó en una disminución significativa de norepinefrina y un aumento de dopamina y la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica de ratas, con dosificación ya sea aguda o crónica (hasta 25 días).
- [0180] Se encontró que los efectos de nepicastat en ratas macho SHR y Sprague-Dawley responden a la dosis si son evaluados 6 horas después de una dosis oral simple de 0,3, 1, 3, 10, 30 y 100 mg/kg. En ratas SHR se produjeron cambios significativos en la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica a dosis de 0,3 mg/kg, en el ventrículo izquierdo a 3,0 mg/kg y en la corteza cerebral a 10 mg/kg. En ratas Sprague-Dawley se produjeron cambios significativos en la relación dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica a dosis de 3,0 mg/kg, en el ventrículo izquierdo a 1,0 mg/kg y en la corteza cerebral solamente a 100 mg/kg. En un segundo estudio de respuesta a la dosis en ratas SHR, se administraron tres dosis con un intervalo de 12 horas de 3,0, 10, 30 o 100 mg/kg y el tejido se cosechó 6 horas después de la tercera dosis. Nepicastat causó una disminución de norepinefrina (10 mg/kg) y un aumento de dopamina (3,0 mg/kg) y la relación dopamina/norepinefrina (3,0 mg/kg) significativos y dependientes de la dosis en el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica. Los efectos de nepicastat sobre las concentraciones de dopamina y norepinefrina y la relación dopamina/norepinefrina en la corteza cerebral sólo eran significativos a 30 y 100 mg/kg. Efectos similares de respuesta a la dosis significativa en el ventrículo izquierdo se observaron en ratas hembra Wistar dosificadas con nepicastat durante 7 días vía el agua potable (0,3, 0,6 y 1,0 mg/mL). En conclusión, nepicastat fue menos potente en inhibir DBH en la corteza

cerebral de ratas (60-100 mg/kg/d) que en el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica (1-6 mg/kg/d).

[0181] Nepicastat (el enantiómero S) fue significativamente más potente que el enantiómero R en el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica en ratas SHR después de tres dosis administradas con intervalos de 12 horas (30 mg/kg p.o.). Nepicastat fue significativamente más potente que el inhibidor de DBH SKF-102698 en disminuir norepinefrina y aumentar dopamina y la relación dopamina/norepinefrina en el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica en ratas SHR después de una sola dosis, o tres dosis de 30 mg/kg. Las relaciones de potencia en el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica resultantes de esos estudios *in vivo* resultan ser fuertemente paralelas a aquellas obtenidas con estudios *in vitro* utilizando DBH purificada (vea arriba). Sin embargo, nepicastat tenía efectos significativamente menores que SKF-102698 en disminuir los niveles de norepinefrina y aumentar los niveles de dopamina en la corteza cerebral. Se mostró que la norepinefrina estimula la liberación de renina y aumenta la actividad de la renina plasmática. Por lo tanto, resultó ser de interés evaluar si niveles de norepinefrina decrecientes con nepicastat resultarían en una disminución de la actividad de renina plasmática. Sin embargo, nepicastat (30 y 100 mg/kg/d p.o. durante 5 días) no alteró la actividad de renina plasmática en ratas SHR macho. Por lo tanto, cuando nepicastat se administra en dosis que disminuyen los niveles de norepinefrina en los tejidos, no altera la actividad de renina plasmática en ratas SHR.

[0182] Nepicastat causó una disminución significativa de los niveles de norepinefrina y un aumento de la relación dopamina/norepinefrina, pero no modificó los niveles de dopamina en la arteria mesentérica de perros beagle macho 5 horas después de la administración intraduodenal de 30 mg/kg. Cuando se administra nepicastat a perros beagle durante 4,5 días (5, 15 y 30 mg/kg b.i.d., ó 10, 30 y 60 mg/kg/d) se produjo una disminución significativa en norepinefrina, y un aumento en dopamina y la relación dopamina/norepinefrina en la arteria renal, la corteza renal y la médula renal, comenzando una meseta de respuesta a 10 mg/kg/d que se extiende hasta 60 mg/kg/d. Resultados similares se observaron en el ventrículo izquierdo, con excepción de que no se observó un aumento significativo de dopamina. En la corteza cerebral, la norepinefrina disminuyó significativamente a 30 y 60 mg/kg/d, y la dopamina y la relación dopamina/norepinefrina aumentaron significativamente con todas las dosis. En conclusión, nepicastat fue un inhibidor potente, oralmente activo de DBH en perros a dosis de al menos 10 mg/kg/d.

[0183] Nepicastat tiene similitudes estructurales con metimazol, un inhibidor potente de la peroxidasa tiroidea *in vivo*. Nepicastat, a dosis de 4 ó 12,4 mg/kg/d, p.o. no tenía ningún efecto sobre los niveles séricos de triyodotiramina o tiroxina en ratas Sprague-

Dawley macho alimentadas con una baja dieta en yodo y dosificadas durante 10 días, mientras que metimazol (2 mg/kg/d) redujo significativamente los niveles de triyodotiramina o tiroxina en suero. Por lo tanto, nepicastat, a diferencia de metimazol, no afectó los niveles séricos de triyodotiramina o tiroxina.

- 5 [0184] Nepicastat indujo un efecto antihipertensivo significativo durante hasta 4 horas en ratas SHR conscientes, enjauladas (1,0 – 30 mg/kg p.o.), y redujo significativamente la frecuencia cardíaca (10 y 30 mg/kg). Los efectos antihipertensivos de nepicastat en ratas SHR conscientes, enjauladas (10 mg/kg, p.o.) no fueron atenuados por un pretratamiento con el antagonista del receptor de dopamina (DA-1) SCH-23390.
- 10 Nepicastat (10 mg/kg) también redujo la presión sanguínea 4 horas después de haber sido administrado a ratas Wistar-Kyoto conscientes normotensivas enjauladas; sin embargo, la disminución de la presión fue menor (-13 mm Hg) que con ratas SHR (-46 mm Hg). En resumen, nepicastat causa una disminución de la presión sanguínea tanto en ratas SHR como en ratas normotensivas, aunque el efecto antihipertensivo es más
- 15 pronunciado en ratas SHR. Los efectos antihipertensivos en ratas SHR parecen no estar mediados por receptores DA-1.

[0185] Nepicastat también atenuó significativamente las respuestas hipertensivas y taquicárdicas a la estimulación del nervio preganglionico en ratas SHR descerebradas 5 horas después de la dosificación (3 mg/kg p.o.). Por lo tanto, nepicastat reduce el

20 aumento de la presión sanguínea en respuesta a la estimulación del nervio simpático.

[0186] El tratamiento intravenoso agudo de ratas SHR anestesiadas con nepicastat (3,0 mg/kg, i.v.) disminuyó la presión arterial media durante un período de 3 horas, pero no disminuyó el flujo de sangre renal ni alteró la producción de orina o la excreción urinaria de sodio o potasio. Después de la dosificación disminuyó la resistencia vascular renal

25 calculada. Se intentó usar el antagonista de DA-1 SCH-23390 para evaluar si los efectos vasodilatadores renales de nepicastat fueron mediados por receptores de DA-1. Sin embargo, este compuesto redujo la presión sanguínea al ser administrado por si solo, lo que impidió interpretar los resultados. En general, nepicastat no deterioró la función renal en ratas SHR anestesiadas y no disminuyó el flujo de sangre renal a pesar de

30 causar una disminución de la presión sanguínea arterial.

[0187] El tratamiento diario con nepicastat (1 y 10 mg/kg p.o.) en ratas SHR durante 21 días no modificó la frecuencia cardíaca o la presión sanguínea sistólica medida por el método tail cuff (manguito en la cola). Sin embargo, nepicastat (10 mg/kg, p.o.) indujo un efecto antihipertensivo significativo cuando las ratas fueron enjauladas y se midió su

35 presión sanguínea directamente vía una sonda arterial.

[0188] Nepicastat bajó significativamente la presión sanguínea en ratas SHR, medida con instrumento de radiotelemetría con transductor de presión sanguínea, a dosis de 30 y

100 mg/kg/d durante 30 días, pero no se produjeron efectos significativos con dosis de 3 y 10 mg/kg/d. El efecto a 30 y 100 mg/kg/d persistió durante un período de 24 horas después de una dosis simple, y el efecto no se perdió durante 30 días. La frecuencia cardíaca no aumentó, y la actividad motora no fue afectada. Una combinación de una
 5 dosis del inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina enalapril (1 mg/kg, p.o.) que no produjo una disminución de la presión sanguínea con nepicastat (30 mg/kg) causó una potenciación de los efectos antihipertensivos de nepicastat durante 30 días de dosificación y resultó en una reducción significativa de la masa ventricular izquierda. Una reducción de la masa ventricular izquierda no se produjo administrando solo
 10 enalapril. Por lo tanto, 30 días de tratamiento de ratas SHR con nepicastat a 30 y 100 mg/kg/d resultó en una disminución de la presión sanguínea y, en combinación con enalapril, se observaron disminuciones adicionales de la presión sanguínea con una reducción de la masa ventricular izquierda.

[0189] El efecto de disminuir la presión sanguínea de nepicastat en ratas Wistar
 15 normotensivas, medido con instrumento de radiotelemetría con transductores de presión sanguínea, fue menor que el efecto observado en ratas SHR con dosis de 30 y 100 mg/kg/d durante 7 días. A 30 mg/kg/d, la disminución pico de la presión sanguínea fue de -10 mm Hg, en comparación con -20 en ratas SHR. A 100 mg/kg/d, la disminución pico de la presión sanguínea fue de -17 mm Hg, en comparación con -42 en ratas SHR.
 20 Por lo tanto, nepicastat tenía un mayor efecto en bajar la presión sanguínea en ratas SHR que en ratas normotensivas.

[0190] Estudios en perros normales anestesiados mostraron ausencia de efectos cardiovasculares de nepicastat después de una dosificación intravenosa aguda (1-10 mg/kg i.v.) sin cambios en la presión sanguínea arterial, presión ventricular izquierda
 25 (incluyendo dp/dt pico), frecuencia cardíaca, output cardíaco o flujo sanguíneo renal durante hasta cinco horas después de la dosificación. Una ausencia de efecto similar se observó en perros conscientes instrumentados crónicamente estudiados durante 12 horas después de una sola dosis (3-30 mg/kg i.v.).

[0191] Nepicastat (30 mg/kg intraduodenal) no inhibió significativamente ni la
 30 disminución del flujo de sangre renal en respuesta a la estimulación directa del nervio renal, ni el aumento en presión sanguínea arterial en respuesta a la oclusión de la arteria carótida hasta 5 horas después de la dosificación en perros beagle macho anestesiados. Sin embargo, nepicastat causó una disminución significativa en los niveles de norepinefrina y un aumento en la relación dopamina/norepinefrina, pero no de los
 35 niveles de dopamina, en la arteria mesentérica 5 horas después de la dosificación. Por lo tanto, a pesar de que los niveles tisulares de norepinefrina se redujeron

significativamente, no se produjo ninguna inhibición significativa de respuestas funcionales evocadas por el simpático.

5 [0192] Cuando se administró nepicastat a perros beagle macho durante 4,5 días a 10 mg/kg/d, no se observó una disminución estadísticamente significativa del grado de aumento de presión sanguínea y frecuencia cardíaca en respuesta a la oclusión de la arteria carótida en animales anestesiados. El tratamiento con nepicastat redujo significativamente el aumento de la frecuencia cardíaca en respuesta a un estímulo por tiramina i.v., pero produjo solamente una inhibición ligera y no significativa en el aumento de la presión sanguínea. Por lo tanto, la dosificación crónica con nepicastat con
10 una dosis que mostró resultar en una disminución máxima de los niveles tisulares de norepinefrina, no tiene un efecto inhibitorio mayor sobre respuestas funcionales evocadas por el sistema nervioso simpático.

[0193] Nepicastat no causó efectos significativos sobre la conducta motora en ratones después de la administración aguda de 1,0-30 mg/kg, p.o., y no tuvo efectos sobre
15 actividad locomotora en ratones (10-100 mg/kg i.p.). La administración aguda a ratas no causó actividad locomotora o reactividad de sobresalto acústico (3-100 mg/kg i.p.).

[0194] No se observaron efectos sobre el comportamiento en ratas después de 10 días de dosificación con 10, 30 y 100 mg/kg/d, p.o. La temperatura rectal tampoco fue afectada. La actividad motora y los reflejos de sobresalto auditivo se redujeron
20 significativamente mediante el tratamiento con el inhibidor de DBH SKF-102698 (100 mg/kg/d, p.o.) y mediante el agonista adrenérgico que actúa sobre el sistema nervioso central clonidina (20 mg/kg, b.i.d., p.o.). La actividad motora tampoco fue afectada durante 30 días de dosificación en ratas SHR (3-100 mg/kg/d, p.o.). Por lo tanto, nepicastat no causó cambios detectables de efectos de comportamiento en ratas
25 mediados por el sistema nervioso central.

[0195] Nepicastat es un inhibidor competitivo potente de DBH humana *in vitro*, y en ratas y perros *in vivo*. En ratas, el tratamiento oral con nepicastat resultó en una evidencia significativa de la inhibición de DBH en el corazón y la arteria mesentérica a dosis de 6 mg/kg/d. En contraste a otro inhibidor de DBH, SKF-102698, nepicastat
30 mostró alguna selectividad para el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica en relación con la corteza cerebral. No se observaron efectos de comportamiento con nepicastat en ratas. En perros, se produjo un efecto meseta para la inhibición de DBH a 10 mg/kg/d en el corazón, la arteria renal y el riñón. Nepicastat redujo significativamente la respuesta hipertensiva a la estimulación del nervio simpático en
35 ratas (3 mg/kg, p.o.), y disminuyó significativamente la presión sanguínea durante todo el día al ser dosificado una vez por día (30 mg/kg/d, p.o.) durante 30 días en ratas SHR.

En conclusión, nepicastat es un inhibidor de DBH potente que modula la acción del sistema nervioso simpático.

Ejemplo 9

5 [0196] Los estudios aquí descritos fueron diseñados para evaluar la farmacocinética de dosis orales mayores de nepicastat, con el fin de comparar la farmacocinética en ratas macho y hembra, y para determinar la penetración de nepicastat en el CNS mediante la cuantificación de niveles de nepicastat en el cerebro.

10 [0197] Ratas macho (CrI: CD BR Vaf+) de 180 – 220 g de peso se mantuvieron en ayunas durante la noche previa a la dosificación y hasta 4 horas después de la dosificación. Las dosis se formularon en agua que contiene 2% de 1-hidroxipropilmetilcelulosa (viscosidad 50 centipoises), 1% de alcohol bencílico y 0,6% de Tween 80 (todos obtenidos de Sigma Chemical Company). La concentración de la droga en las soluciones de dosis fue de 5, 15 y 50 mg/mL para las dosis de 10, 30 y 100 mg/kg, respectivamente, y se verificó mediante cromatografía líquida (LC). La dosis de 15 5 mg/ml fue una solución clara y las concentraciones mayores fueron una suspensión translúcida. Los volúmenes de las dosis fueron 2,0 ml/kg. A varios tiempos después de la dosificación, se obtuvieron muestras de sangre mediante punción cardíaca con jeringas heparinizadas, y se preparó el plasma mediante la centrifugación. Los cerebros de las ratas se extirparon quirúrgicamente y todas las muestras se congelaron a -20° C 20 hasta el análisis.

[0198] Alícuotas de plasma (0,05 ó 0,5 ml) se mezclaron con un estándar interno (50 µL de metanol que contiene 5 µg/mL de un análogo monofluorado de nepicastat, y 5 mg/ml de ditiotreitol). Las muestras se mezclaron con búffer de fosfato de sodio 200 mM, pH 7,0, (0,5 ml), y se extrajeron con 3 mL de acetato de etilo / hexano (1/1, v/v). La fase 25 orgánica que contiene analitos se extrajo con 250 µL de ácido acético 250 mM y alícuotas de 100 mL de la fase acuosa se ensayaron mediante cromatografía líquida (LC). El sistema LC utilizó una columna C₈ Keystone Hypersil BDS de 15 cm a temperatura ambiente. La fase móvil A fue fosfato de potasio 12,5 mM, pH 3,0, con ácido dodecansulfónico 5 mM y la fase móvil B fue acetonitrilo. La composición del 30 solvente fue 40% de B y se bombeó a un caudal de 1 ml/min. La detección se realizó mediante absorción UV a 261 nm. Las concentraciones de los analitos se determinaron a partir de una curva estándar generada a partir del análisis de plasma de ratas no tratadas fortificado con concentraciones conocidas de analito. Los datos de concentración en plasma se expresan como µg (base libre) por ml.

35 [0199] Los cerebros se enjuagaron brevemente con solución fisiológica, se secaron con una tohalla de papel y luego se pesaron (1,5 – 2,0 g). Se agregó el estándar interno (50 mL de metanol que contiene 20 µg/mL de un análogo monofluorado de nepicastat, y los

cerebros se homogenizaron en 5 mL de fosfato de sodio 200 mM, pH 7,0, que contiene 0,5 mg/mL de ditioneitol. Las alícuotas del homogenizado (2 ml) se extrajeron con 10 mL de acetato de etilo / hexano (1/1, v/v). La fase orgánica se extrajo suavemente con 150 μ L de ácido acético 250 mM.

5 [0200] Después del agregado de 100 μ L de metanol a la fase acuosa (para dispersar cualquier emulsión), se ensayaron alícuotas de 100 μ L mediante LC según lo descrito para el plasma. Los niveles en cerebro se expresan como μ g (base libre) por g de tejido cerebral.

10 [0201] Se calcularon parámetros farmacocinéticos a partir de concentraciones medias de plasma. La vida media ($T_{1/2}$) del plasma se calculó como $0,693/\beta$, donde β es la constante de velocidad de eliminación determinada mediante regresión lineal de la concentración logarítmica de plasma versus datos de tiempo dentro de la porción lineal terminal de los datos. Las áreas bajo la curva concentración plasmática vs. tiempo (AUC) desde cero hasta el tiempo de las últimas concentraciones plasmáticas

15 cuantificables se calcularon mediante la regla trapezoidal. El AUC desde cero a infinito (AUC_{total}) se calculó como:

[0202] $AUC_{total} = AUC (0-C_{\text{último}}) + C_{\text{último}}/\beta$ donde $C_{\text{último}}$ es la última concentración cuantificable de plasma.

20 [0203] Se obtuvieron las concentraciones de nepicastat en plasma de ratas macho a las cuales se administró dosis orales simples de 10, 30 ó 100 mg/kg. Las concentraciones plasmáticas de nepicastat aumentaron con el aumento de la dosis, y la relación entre AUC_{total} y la dosis fue lineal. La vida media de eliminación parece aumentar ligeramente con dosis mayores (1,70, 2,09 y 3,88 h después de dosis orales de 10, 30 y 100 mg/kg a ratas macho, respectivamente). Después de una dosis oral de 30 mg/kg de nepicastat a

25 ratas hembra, la $AUC_{sub-total}$ plasmática de nepicastat fue 77% mayor en ratas hembra que en ratas macho que recibieron una dosis equivalente de nepicastat. Los niveles de nepicastat en cerebro (expresados como μ g/g) fueron inicialmente menores que aquellos en plasma (expresados como μ g/mL). A partir de 2 horas en adelante, sin embargo, las concentraciones de nepicastat en cerebro excedieron aquellas en plasma.

30 [0204] Los niveles plasmáticos de nepicastat en ratas macho aumentaron linealmente con el aumento de las dosis entre 10 y 100 mg/kg, en base a los valores de AUC_{total} .

[0205] Después de una dosis oral de 30 mg/kg, los niveles plasmáticos de nepicastat fueron mayores en ratas hembra que en ratas macho.

35 [0206] Después de la administración de una dosis oral de 10 mg/kg de nepicastat a ratas macho, los niveles de nepicastat en el cerebro fueron inicialmente menores que aquellos en plasma, pero a partir de 2 horas en adelante, los niveles de nepicastat en el cerebro fueron mayores que en el plasma.

Ejemplo 10

[0207] El propósito de este estudio fue determinar los efectos de nepicastat (10 mg/kg) durante el transcurso de 24 horas sobre los niveles de dopamina y norepinefrina en la arteria mesentérica después de una dosis oral simple en ratas espontáneamente hipertensivas. Los niveles de catecolamina se midieron a 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 24 horas después de la administración de una sola dosis de nepicastat (10 mg/kg) o vehículo (dH₂O; 10 ml/kg).

[0208] A ratas SHR macho espontáneamente hipertensivas de 16 a 17 semanas de edad que pesan 300 – 400 gramos se permitió alimentarse y tomar agua ad libitum. Los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente, la tarde antes del estudio, a uno de los siguientes grupos de tratamiento (n=9 por grupo): una administración oral simple de nepicastat de 10 mg/kg o una administración oral simple de vehículo (10 ml/kg) y sacrificio posterior a 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 o 24 horas.

[0209] Nepicastat se sintetizó en la forma de la sal de clorhidrato y se disolvió en vehículo (dH₂O) para proporcionar una dosis oral que puede administrarse en volúmenes repetidos de 10 ml/kg. Todas las dosis de nepicastat se administraron como equivalentes de base libre y se prepararon la misma mañana de la administración.

[0210] En la mañana del día de sacrificio los animales se dosificaron cada minuto. 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 24 horas después de la administración, 9 animales tratados y 9 animales que recibieron vehículo se anestesiaron con halotano, se decapitaron, y el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica se recolectaron rápidamente y se pesaron. La arteria mesentérica se colocó en 0,5 ml de ácido perclórico 0,4 M en un tubo centrífugo y el ventrículo izquierdo se colocó en un criotubo vacío. Ambos tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70° C. Los niveles de catecolamina en la arteria mesentérica se determinaron utilizando HPLC con detección electroquímica. En el momento de la decapitación, se tomaron muestras de plasma mediante el drenaje de sangre del animal sacrificado en un tubo que contiene heparina y centrifugando a 4° C.

[0211] Para cada punto de tiempo se comparó cada grupo tratado con el grupo que recibió vehículo. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con efectos de tratamiento (TRT) y recolección (HARVEST) y su interacción. Para cada tiempo de recolección se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía con factor TRT. En cada punto de tiempo se llevaron a cabo análisis de comparación por parejas entre animales tratados y los que recibieron vehículo, utilizando la estrategia LSD de Fisher para controlar la tasa de error del experimento. Los valores de norpinefrina eran significativamente menores ($p < 0,05$) que los correspondientes solo vehículo en el punto de tiempo 4 h. En el punto de tiempo de 6 horas los niveles fueron marginalmente

menores ($0,05 < p < 0,1$). Los niveles de dopamina fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que aquellos de vehículo a las 2 y 6 horas después de la recolección. La relación dopamina/norepinefrina fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que aquella de animales tratados con vehículo en los puntos de tiempo 1, 2, 4, 6 y 12.

- 5 [0212] En general, nepicastat tuvo pocos efectos estadísticamente significativos sobre los niveles de norepinefrina o dopamina en la arteria mesentérica después de una administración oral simple de 10 mg/kg en ratas espontáneamente hipertensivas a las 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 o 24 horas después de la dosificación. Sin embargo, se observó un aumento consistente de las relaciones dopamina/norepinefrina durante la mayor parte de las primeras 12 horas de tratamiento. A las 16 y 24 horas después de la recolección no se observaron cambios de ninguno de estos tres parámetros.

Ejemplo 11

- 15 [0213] El propósito de este estudio fue determinar los efectos de la administración intravenosa de nepicastat sobre los niveles de dopamina y norepinefrina en el ventrículo izquierdo de ratas Sprague-Dawley. Los animales recibieron dos administraciones intravenosas (iv), con intervalo de 12 horas, ya sea de vehículo (75% de propilenglicol + 25% de DMSO; 1,0 ml/kg) o de 15 mg/kg de nepicastat. Los niveles en el tejido de norepinefrina y dopamina se midieron seis horas después de la última administración de compuesto.

- 20 [0214] A ratas Sprague-Dawley macho de 16 a 17 semanas de edad que pesan 300 – 400 gramos se permitió alimentarse y tomar agua ad libitum. Los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente, la tarde antes del estudio, a uno de los siguientes grupos de tratamiento ($n=10$ por grupo): vehículo (1,0 ml/kg) o nepicastat (15 mg/kg).

- 25 [0215] Nepicastat se sintetizó y se disolvió en la cantidad apropiada de vehículo (75% de propilenglicol + 25% de DMSO) para obtener un volumen de dosificación de 1,0 ml/kg. Nepicastat se administró como equivalentes de base libre y se preparó la tarde previa a la primera administración.

- 30 [0216] La tarde previa a la recolección, cada rata se dosificó iv en la vena de la cola. La dosificación se repitió 12 horas más tarde a la mañana siguiente. Seis horas después de la administración final, las ratas se anestesiaron con halotano, se decapitaron, y rápidamente se recolectó y se pesó el ventrículo izquierdo. El ventrículo se colocó en 1,0 ml de ácido perclórico 0,4 M helado. Los tejidos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70° C. Se determinaron las concentraciones tisulares de dopamina y norepinefrina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento utilizando detección electroquímica.

- 35 [0217] Para norepinefrina se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un efecto principal para tratamiento. Se realizó una prueba de Kruskal-Wallis para

dopamina y su relación, principalmente debido a varianzas heterogéneas entre grupos de tratamiento. Subsecuentemente se realizaron comparaciones pareadas entre ratas tratadas con nepicastat y con vehículo utilizando la prueba LSD de Fisher. Se realizó un ajuste de Bonferroni con todos los valores p para asegurar una tasa de error experimental global de tipo 1 del 5%.

[0218] Nepicastat administrado a una dosis de 15 mg/kg disminuyó significativamente ($p < 0,01$) los niveles de norepinefrina en 51% y aumentó significativamente ($p < 0,01$) los niveles de dopamina en 472% y aumentó significativamente ($p < 0,01$) la relación dopamina/norepinefrina en 1117%, en comparación con animales tratados con vehículo.

[0219] En conclusión, la administración intravenosa de nepicastat resultó en una inhibición significativa de DBH en el ventrículo izquierdo de ratas Sprague-Dawley.

Ejemplo 12

[0220] Este estudio evaluó la efectividad de nepicastat en alterar los niveles de dopamina y norepinefrina en la corteza, el ventrículo izquierdo y la arteria mesentérica de ratas SHR macho espontáneamente hipertensivas. A los animales se administraron, con intervalo de 12 horas, 3 dosis de 3, 10, 30 ó 100 mg/kg p.o.

[0221] Este estudio también comparó la eficacia del enantiómero S (nepicastat) con el enantiómero R (Compuesto B) después de tres dosis (30 mg/kg). Este estudio también comparó los efectos de nepicastat con SKF-102698, un inhibidor de DBH del cual se mostró previamente que es oralmente activo en ratas.

[0222] Los compuestos se prepararon y se administraron como equivalentes de base libre. Nepicastat se disolvió en la cantidad apropiada de vehículo (dH_2O para nepicastat y PEG 400 : dH_2O , 50:50 vol : vol para SKF-102698). Se prepararon dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg de nepicastat y de 30 mg/kg de SKF-102698 en volúmenes de dosificación de 10,0 ml/kg.

[0223] A ratas SHR macho espontáneamente hipertensivas de 15 a 16 semanas de edad (Charles River Labs) se permitió alimentarse y tomar agua ad libitum. Los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de tratamiento: 1) vehículo de agua destilada (dH_2O), o nepicastat a dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg, 2) Compuesto B a 30 mg/kg en agua destilada, o 3) vehículo PEG 400 : dH_2O ó SKF-102698 a 30 mg/kg. Cada rata se dosificó oralmente (p.o., utilizando una aguja sonda) tres veces con intervalo de 12 h, comenzando en la mañana. Seis horas después de la tercera dosis, las ratas se anestesiaron con halotano, se decapitaron, y la corteza cerebral, la arteria mesentérica y el ventrículo izquierdo rápidamente se recolectaron, se pesaron, se colocaron en ácido perclórico 0,4 M helado, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C . Se determinaron las concentraciones tisulares de dopamina y

norepinefrina mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y detección electroquímica.

[0224] Se realizaron cuatro series de análisis estadísticos. Las primeras series compararon las ratas tratadas con varias dosis de nepicastat y Compuesto B a 30 mg/kg con los animales de control que recibieron vehículo. Para cada tejido y cada cepa se realizó por separado un análisis de varianza (ANOVA) no paramétrico de una vía con la Dosis como factor y el Día como factor de bloqueo. Se informan los resultados totales. Se llevó a cabo un análisis pareado entre animales tratados y de control con cada dosis, utilizando la prueba de Dunnett para controlar la tasa de error experimental. La segunda prueba estadística comparó SKF-102698 con el grupo tratado con vehículo PEG-dH₂O utilizando una prueba t no paramétrica. La tercera prueba estadística comparó Compuesto B con nepicastat a dosis de 30 mg/kg usando una prueba t no paramétrica. Un cuarto análisis estadístico comparó nepicastat con SKF-102698 a dosis de 30 mg/kg. Debido a que se utilizaron dos vehículos diferentes, se desarrolló un contraste lineal que calcula la diferencia de diferencias como sigue:

$$[0225] \text{ Diferencia} = (30 \text{ mg/kg} - \text{vehículo})_{\text{Nepicastat}} - (30 \text{ mg/kg} - \text{vehículo})_{\text{SKF-102698}}$$

[0226] Esta nueva variable se ensayó por igualdad a cero mediante el procedimiento de Modelos Lineales Generales SAS.

[0227] La concentración de dopamina en la corteza cerebral fue significativamente mayor ($p < 0,05$), la concentración de norepinefrina fue significativamente menor ($p < 0,05$), y las relaciones dopamina/norepinefrina fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) en comparación con vehículo a dosis de 30 y 100 mg/kg de nepicastat.

[0228] La concentración de dopamina en el ventrículo izquierdo fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación con vehículo a dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg. La concentración de norepinefrina fue significativamente menor ($p < 0,05$) que con vehículo a dosis de 10, 30 y 100 mg/kg. La relación dopamina/norepinefrina en el ventrículo izquierdo fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que con vehículo a dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg de nepicastat.

[0229] La concentración de dopamina en la arteria mesentérica de ratas SHR fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación con vehículo a dosis de 3, 10, 30 y 100 mg/kg. La concentración de norepinefrina no fue significativamente menor ($p > 0,05$) que con vehículo a dosis de 10, 30 y 100 mg/kg. Las relaciones de dopamina/norepinefrina en la arteria mesentérica fueron significativamente mayores ($p < 0,05$) que con vehículo a todas las dosis de nepicastat.

[0230] En la corteza cerebral, en relación con el tratamiento con vehículo, el Compuesto B resultó en un aumento significativo en ambas, dopamina y norepinefrina ($p < 0,01$), y no tenía efecto sobre la relación dopamina/norepinefrina. Los niveles de

norepinefrina fueron significativamente menores con nepicastat en comparación con el Compuesto B ($p<0,01$).

5 [0231] En el ventrículo izquierdo, en relación al tratamiento con vehículo, el Compuesto B resultó en un aumento significativo en dopamina y la relación dopamina/norepinefrina ($p<0,01$), pero no disminuyó significativamente los niveles de norepinefrina. Nepicastat fue significativamente más efectivo ($p<0,01$) que el Compuesto B en disminuir los niveles de norepinefrina y en aumentar dopamina y la relación dopamina/norepinefrina.

10 [0232] En la arteria mesentérica, en relación al tratamiento con vehículo, el Compuesto B resultó en un aumento significativo en dopamina y la relación dopamina/norepinefrina ($p<0,01$), pero no disminuyó significativamente los niveles de norepinefrina. Nepicastat fue significativamente más efectivo ($p<0,01$) que el Compuesto B en disminuir los niveles de norepinefrina y en aumentar dopamina y la relación dopamina/norepinefrina.

15 [0233] Comparando nepicastat con SKF-102698 a 30 mg/kg en la corteza cerebral, la concentración de dopamina en la corteza fue significativamente mayor ($p<0,01$), en relación con el tratamiento con vehículo, para SKF-102698 a una dosis de 30 mg/kg. El aumento por encima del valor con vehículo fue mayor para SKF-102698 que para nepicastat ($p<0,01$). La concentración de norepinefrina fue significativamente menor en relación con vehículo para SKF-102698, y la disminución fue mayor para SKF-102698 que para nepicastat ($p<0,01$). Las relaciones dopamina/norepinefrina en la
20 corteza fueron significativamente mayores ($p<0,01$) que con vehículo para SKF-102698, y el aumento por encima del valor con vehículo fue mayor para SKF-102698 que para nepicastat ($p<0,01$).

[0234] La concentración de dopamina en el ventrículo izquierdo fue significativamente mayor ($p<0,01$) que con vehículo para SKF-102698, y el aumento por encima del valor
25 con vehículo fue mayor para nepicastat que para SKF-102698 ($p<0,01$). Con tratamiento con SKF-102698, la concentración de norepinefrina no difirió de aquella con vehículo, sin embargo, el tratamiento con nepicastat disminuyó significativamente más la concentración de norepinefrina en relación con vehículo que SKF-102698 ($p<0,01$). Las relaciones dopamina/norepinefrina en el ventrículo izquierdo fueron significativamente
30 mayores ($p<0,05$) que con vehículo para SKF-102698, y el aumento por encima del valor con vehículo fue mayor para nepicastat que para SKF-102698 ($p<0,05$).

[0235] La concentración de dopamina en la arteria mesentérica fue significativamente mayor que con vehículo para SKF-102698, y el aumento por encima del valor con
vehículo fue mayor para nepicastat que para SKF-102698. La concentración de
35 norepinefrina fue significativamente menor en relación con vehículo con tratamiento con SKF-102698, y el tratamiento con nepicastat disminuyó significativamente más la concentración de norepinefrina en relación con vehículo que SKF-102698. Las

relaciones dopamina/norepinefrina en el ventrículo izquierdo fueron significativamente mayores en relación con vehículo que para SKF-102698, y el aumento por encima del valor con vehículo fue mayor para nepicastat que para SKF-102698.

[0236] En conclusión, los datos muestran que nepicastat es un inhibidor potente de DBH *in vivo* en la arteria mesentérica, el ventrículo izquierdo y la corteza cerebral de ratas SHR, seis horas después de la tercera de tres dosis orales administradas con 12 horas de intervalo. El enantiómero S, nepicastat, fue más potente que el enantiómero R (Compuesto B) en los tres tejidos a 30 mg/kg. Además, nepicastat fue más efectivo que SKF-102698 en la arteria mesentérica y el ventrículo izquierdo, pero menos efectivo en la corteza cerebral, después de tres dosis de 30 mg/kg administradas durante 24 horas.

Ejemplo 13

[0237] Nepicastat se preparó y se administró como equivalente de base libre. Nepicastat y metimazol se disolvieron en vehículo (66,7% de propilenglicol : 33% dH₂O) para proporcionar soluciones de dosificación de concentraciones apropiadas para que todas las dosis puedan administrarse en un volumen de 1,0 ml/kg.

[0238] Ratas macho Sprague-Dawley, de peso 180-200 gramos, se alimentaron con una dieta deficiente en yodo (Purina, 5891C, Lote 1478, 0,066 ± 0,042 mg de yodo/kg de muestra) ad libitum durante 14 días previos al tratamiento. Los animales se pesaron y se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de tratamiento (n=12 por grupo): nepicastat a 2,0 mg/kg, nepicastat a 6,2 mg/kg, metimazol a 1 mg/kg o vehículo a 1 ml/kg. A cada grupo de ratas se administró la dosis oralmente a la noche y la mañana siguiente, con intervalo de aproximadamente 12 horas, durante 10 días consecutivos.

[0239] Cuatro horas después de la segunda dosis, el día 10, las ratas se anestesiaron con halotano, se decapitaron y se recolectaron y pesaron la corteza, el cuerpo estriado y la arteria mesentérica. No se recolectaron muestras de tejido de los grupos de metimazol ya que sólo sirvieron como controles positivos para la determinación de la función tiroidea. La arteria mesentérica, la corteza y el cuerpo estriado se colocaron inmediatamente en ácido perclórico 0,4 M helado y se analizaron el mismo día para determinar los niveles de norepinefrina y dopamina utilizando HPLC.

[0240] Se tomaron muestras de sangre orbital el día -3, 0, 3, 7 y 9 (el día 0 fue el primer día de dosificación). Las muestras de suero se analizaron para determinar los niveles de T₃ y T₄ usando un radioinmunoensayo.

[0241] Para evaluar estadísticamente los cambios de niveles de T₃ y T₄, se calculó un cambio de los valores de referencia a partir del punto de tiempo día -3. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) intrasujeto de dos vías no paramétrico. También se realizó ANOVA de una vía para detectar si se produjo una diferencia significativa con referencia al control. Se llevaron a cabo análisis pareados entre controles y cada grupo

de tratamiento, utilizando la estrategia LSD de Fisher para controlar la tasa de error experimental. Para el análisis estadístico de los niveles de catecolamina, se realizó ANOVA de una vía con factor DOSIS. Se llevaron a cabo análisis pareados entre animales tratados y de control con cada dosis, utilizando la estrategia LSD de Fisher para controlar la tasa de error experimental.

[0242] Los niveles de norepinefrina en los animales tratados con nepicastat no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$) en la corteza en comparación con el vehículo de control a dosis de 2,0 y 6,2 mg/kg. Los niveles de norepinefrina en la arteria mesentérica fueron significativamente menores ($p < 0,05$) en los grupos de dosis de 2,0 y 6,2 mg/kg, y los niveles de norepinefrina en el cuerpo estriado fueron marginalmente menores ($p < 0,10$) en ambos, los grupos de dosis de 2,0 y 6,2 mg/kg, en comparación con el vehículo de control.

[0243] Los niveles de dopamina en los tres tejidos no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$) de aquellos del vehículo de control en cualquiera de las dosis del grupo de nepicastat, 2,0 ó 6,2 mg/kg.

[0244] La relación dopamina/norepinefrina de la corteza y el cuerpo estriado a 2,0 y 6,2 mg/kg de nepicastat no difirieron significativamente ($p > 0,05$) en comparación con el vehículo de control, mientras que la relación de la arteria mesentérica a ambas dosis de nepicastat, 2,0 y 6,2 mg/kg, fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que para el vehículo de control.

[0245] Ninguna dosis de 2,0 ó 6,2 mg/kg de nepicastat afectó la función tiroidea mediante la alteración de los niveles de T_3 libre o T_4 total en suero de rata. Una dosis de 1,0 mg/kg de Metimazol, el control positivo, disminuyó significativamente ($p < 0,05$) los niveles de T_3 en todos los días de tratamiento y los niveles T_4 los días 3 y 7, en comparación con el vehículo de control. El día nueve, los niveles de T_4 de los animales tratados con metimazol fueron solamente marginalmente menores ($p < 0,10$).

[0246] Nepicastat (2,0 ó 6,2 mg/kg) no causó ningún cambio significativo ($p > 0,05$) en los niveles de dopamina o norepinefrina ó en la relación dopamina/norepinefrina en comparación con el vehículo. En el cuerpo estriado, se observó una disminución marginalmente significativa ($p < 0,10$) del nivel de norepinefrina en el grupo de dosis 6,2 mg/kg, pero no se observó ningún otro cambio significativo. En la arteria mesentérica, ambas dosis de nepicastat, 2,0 y 6,2 mg/kg, produjeron niveles significativamente menores ($p < 0,05$) de norepinefrina y relaciones dopamina/norepinefrina significativamente mayores ($p < 0,05$), en comparación con el vehículo, pero no se observaron cambios significativos en los niveles de dopamina. Parece pues, que nepicastat es un inhibidor efectivo de dopamina- β -hidroxilasa *in vivo*, con un efecto

mayor en la arteria mesentérica que en la corteza cerebral o el cuerpo estriado, después de 10 días de dosificación en ratas Sprague-Dawley.

Ejemplo 14

[0247] Este estudio se realizó para determinar las concentraciones de dopamina y norepinefrina en la médula renal y la corteza renal de perros dosificados con nepicastat. Perros beagle macho adultos se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos de 8 perros por grupo y se dosificaron mediante administración oral con nepicastat. El nepicastat se proporcionó en dosis de 5, 15 y 30 mg/kg colocadas en cápsulas simples. El vehículo fue una cápsula vacía. Cada perro recibió 2 dosis diarias, a la mañana y a la tarde (con intervalo de 8-10 horas) durante cuatro días. El quinto día, cada perro recibió una dosis simple a la mañana y los perros fueron eutanizados seis horas después de la última dosis. Muestras de médula renal y corteza renal se recolectaron rápidamente, se pesaron, se colocaron en ácido perclórico 0,4 M frío, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C .

[0248] Para cuantificar las concentraciones de norepinefrina (NE) y dopamina (DA), cada tejido se homogeneizó mediante una breve sonicación en ácido perclórico 0,4 M. Después de la sonicación, los homogeneizados se centrifugaron a 13000 rpm en una microcentrífuga durante 30 minutos a 4°C . Una alícuota de cada sobrenadante se separó y se agregó 3,4-dihidroxibencilamina (DHBA) como estándar interno. El extracto de cada muestra fue sometido a una separación mediante HPLC utilizando detección electroquímica. El método tiene un límite de cuantificación de 2,0 ng/mL y un rango lineal de 2,0 ng/mL a 400 ng/mL para cada analito.

[0249] Cada determinación de analito se normalizó con respecto al peso de la muestra de tejido y se expresó como μg de analito por gramo de tejido. Para cada perro se obtuvo la concentración de dopamina, la concentración de norepinefrina y la relación de concentración de dopamina a concentración de norepinefrina (DA/NE). Además, para cada grupo de tratamiento se proporcionaron las medias calculadas y las desviaciones estándar para cada analito y la relación DA/NE.

Ejemplo 15

[0250] En el estudio se utilizaron perros beagle macho (Marshall farms, North Rose, NY) que pesan entre 9-16 kg. Los animales podían tomar agua ad libitum y se alimentaron una vez al día $\sim 10.00\text{ AM}$. Los animales se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de tratamiento ($n=8$ por grupo): placebo (cápsula vacía), o nepicastat a 2 mg/kg b.i.d. (4 mg/kg/día). Cada animal recibió 2 dosis diarias, a la mañana y a la tarde (con intervalo de 8-10 horas). Diariamente, 6 h después de la dosis AM, se sacaron muestras de sangre (10 ml) para la medición de los niveles en plasma de nepicastat y catecolaminas. La sangre se recolectó en tubos que contienen heparina y

glutathiona y se centrifugó a -4°C dentro de 1 h de la recolección. El plasma se separó y se dividió en dos muestras, una para la medición de catecolaminas en plasma y la otra para el análisis de nepicastat.

[0251] También se tomaron muestras de tejido de los perros al final del estudio para el caso que se considere necesario analizar las catecolaminas tisulares en un punto de tiempo posterior. El día 15, 6 horas después de la dosis AM, se tomó una muestra de sangre final (10 ml). Los perros se anestesiaron con pentobarbital sódico (40 mg/kg iv), se colocaron sobre una mesa de necropsia y se eutanizaron con una segunda inyección de pentobarbital (80 mg/kg, iv). Se realizaron una rápida transtoracotomía bilateral e incisión abdominal. Se tomaron biopsias de la arteria renal y el ventrículo izquierdo. Se abrió el cráneo para exponer el lóbulo frontal de la corteza cerebral y se tomó una biopsia. Muestras de tejido se pesaron, se colocaron en ácido perclórico 0,4 M helado, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta el análisis.

[0252] Se analizaron norepinefrina (NE), dopamina (DA) y epinefrina (EPI) en el plasma mediante HPLC utilizando detección electroquímica. Se determinó la concentración plasmática de nepicastat mediante HPLC usando detección electroquímica.

[0253] Las transformaciones Box-Cox indicaron que el logaritmo fue una transformación estabilizadora de varianza apropiada; por lo tanto todos los análisis se realizaron con valores logarítmicos. El BQL (límite por debajo de la cuantificación, below quantitation limit) en la concentración de DA del perro 1 el día 10 se estableció a 0; $\ln(0)$ se consideró como dato faltante. Los análisis se realizaron usando un modelo mixto (usando PROC MIXED), tomando las variables Día y Tratamiento como fijas y el perro en tratamiento como factor aleatorio. Para los efectos fijos, se incluyó la interacción entre el Día y el Tratamiento, ya que la diferencia entre los grupos de droga y placebo varía de día a día. Se calcularon los contrastes utilizando la instrucción CONTRASTE, que toma en cuenta correctamente los términos de error para cada contraste particular. En particular, los contrastes que comparan el grupo de tratamiento con el grupo de droga utilizan la media cuadrática de perro para su término de error, mientras que las comparaciones utilizadas para establecer el período de estado constante se realizaron todas con un solo perro y requieren el error cuadrático medio.

[0254] Se calculó el período de estado constante utilizando la transformación de Helmert (vea manual SAS PROC GLM). Estas transformaciones comparan cada media de tratamiento con el promedio de las medias de tratamiento de los puntos de tiempo siguientes. Se define el período de estado constante desde el primer punto de tiempo que sigue al tiempo máximo en el cual el contraste de Helmert es estadísticamente significativo. Sin embargo, como este método puede fallar para detectar un proceso que

cambia suavemente, como puede ser el caso aquí, también se calculó la pendiente de la concentración de analito durante el período de estado constante. La pendiente durante el período de estado constante se calculó individualmente para cada perro, proporcionando una pendiente por animal. Luego se calcularon las pendientes con procedimientos estadísticos monofactoriales, aplicando a la pendiente media intervalos de confianza para la distribución normal, y se ensayó la hipótesis de igualar la pendiente a cero y se calculó su valor p para la distribución normal. Este análisis de la pendiente se utilizó como base para determinar si el período de estado constante fue un período de concentración cambiante.

10 [0255] En comparación con el grupo de placebo, nepicastat (2 mg/kg, b.i.d.) produjo disminuciones en plasma significativas en NE (2,1 veces) y EPI (1,91 veces) y aumentos significativos de DA (7,5 veces) y la relación DA/NE (13,6 veces).

[0256] Las disminuciones pico plasmáticas en NE y EPI se observaron el día 6 y el día 8, respectivamente, mientras que los aumentos picos en DA plasmática y la relación DA/NE se observaron el día 7 y el día 6, respectivamente. Los efectos sobre NE, DA y EPI plasmáticas alcanzaron el período estático a aproximadamente 4, 8 y 6 días postdosis, respectivamente. Los cambios en DA plasmática y la relación DA/NE fueron significativamente diferentes con relación al placebo durante todos los días postdosis. Los cambios en NE plasmática fueron significativamente diferentes con relación al placebo los días 4-9 y los días 11-13 postdosis. Los cambios en EPI plasmática fueron significativamente diferentes con relación al placebo los días 7-9 y el día 12 postdosis.

20 [0257] La administración de nepicastat (2 mg/kg b.i.d.) produjo niveles plasmáticos significativos de la droga todos los días. Los niveles pico se observaron a los 2 días postdosis. No se detectaron niveles significativos del metabolito N-acetilado de nepicastat en cualquiera de estos días.

[0258] La administración crónica (14,5 días) de nepicastat (2mg/kg, b.i.d., p.o.) produjo disminuciones significativas en NE y EPI plasmáticas y aumentos significativos en DA plasmática y la relación DA/NE. Estos cambios reflejan la inhibición del sistema simpático-adrenal vía la inhibición de la enzima β -hidroxilasa.

30 Ejemplo 16

[0259] Se pesó nepicastat y se colocó en cápsulas (tamaño 13 - Torpac; East Hanover, NJ) para proporcionar dosis de 5, 15 y 30 mg/kg por cápsula (administradas b.i.d. para proporcionar dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día). Para determinar la dosis de cada animal se utilizó el peso inicial del perro. Los perros que recibieron 0 mg/kg/día recibieron cápsulas vacías (placebo). Todas las dosis de nepicastat se administraron como equivalentes de base libre.

- [0260] Treinta y dos perros beagle macho, con peso de 10-12 kg, se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes 4 grupos de tratamiento (n=8 por grupo): nepicastat a 0 mg/kg/día (placebo), 10 mg/kg/día (5 mg/kg b.i.d.), 30 mg/kg (15 mg/kg b.i.d.) ó 60 mg/kg/día (30 mg/kg b.i.d.). A los perros del grupo de dosificación A se asignaron los números 1-16 y a los perros del grupo de dosificación B se asignaron los números 17-32. La cirugía terminal para recolectar tejido se realizó durante 2 días con 16 animales estudiados por día. Dos o 3 días previos a la primera administración de compuesto, cada perro fue pesado y se afeitaron las regiones de la piel que cubren ambas venas cefálicas, safena y yugular. La dosificación consistió en la administración oral de una cápsula, proporcionándose la segunda cápsula 8-10 horas más tarde. Los días 1-3 los perros se dosificaron según lo previsto. El día 4, antes de la dosis AM, se obtuvieron 3 ml de sangre de una vena yugular para la determinación de los niveles de referencia (línea base) del compuesto en plasma. Luego se administró al perro la dosis AM, y a las 1, 2, 4 y 8 h después de la dosis se recolectaron muestras de sangre adicionales de 3 ml para determinar los niveles del compuesto en plasma. Las muestras de sangre se colocaron en tubos que contienen heparina, se centrifugaron a 4° C y se almacenaron a –20° C hasta análisis. Luego se administró la dosis PM según lo programado. Los días de cirugía se administró la dosis AM según lo programado. Aproximadamente 6 h después de la dosis AM, se tomó una muestra de sangre final de 3 ml de la vena yugular para la determinación de los niveles plasmáticos del compuesto. Luego el perro se anestesió con pentobarbital sódico (~40 mg/kg), administrado i.v. en una vena cefálica o safenosa y se entregó a la sala de necropsia donde se administró una dosis adicional de pentobarbital sódico (~80 mg/kg, iv). Luego, el ventrículo izquierdo, la arteria renal, el riñón, la médula renal, la corteza renal y la corteza cerebral, rápidamente se recolectaron, se pesaron, se colocaron en 2 ml de ácido perclórico 0,4 M helado, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a –70° C hasta el análisis de catecolaminas mediante HPLC utilizando detección electroquímica. Todas las muestras de tejido se dividieron en dos porciones, la segunda de las cuales se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a –70° C para la determinación de los niveles del compuesto en el tejido. Una tercera muestra transmural tomada del ventrículo izquierdo se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenó a –70° C para el uso en estudios de unión a receptores.
- [0261] Los ventrículos se homogeneizaron en búffer de Tris-HCl 50 mM, Na₂EDTA 5 mM (pH 7,4 a 4° C) utilizando un desintegrador de tejido Polytron P-10 (ajuste 10, 2 roturas x 15 segundos). Los homogeneizados se centrifugaron a 500 x g durante 10 minutos y los sobrenadantes se almacenaron sobre hielo. Las pellas se lavaron mediante resuspensión y se centrifugaron a 500 x g y los sobrenadantes se combinaron. Los

sobrenadantes combinados se centrifugaron a 48000 por g durante 20 minutos. Las pellas se lavaron mediante resuspensión y se centrifugaron una vez en búffer homogeneizante y dos veces en buffer Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,5 mM (pH 7,4 a 4° C). Las membranas se almacenaron a -70° C hasta su utilización. Los experimentos de saturación se llevaron a cabo utilizando [³H] CGP-12177 en buffer que contiene Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,5 mM (pH 7,4 a 32° C). La unión no específica se definió mediante isoproterenol 10 µM. Se prepararon tubos de ligadura total, ligadura no específica y conteo total para 8 concentraciones de [³H] CGP-12177 en la gama desde 0,016 nM a 2 nM. Las muestras se incubaron a 32° C durante 60 minutos. Las muestras se filtraron sobre placas de filtro de fibra de vidrio GF/B pre-tratadas con 0,1% de PEI utilizando un aparato de filtración al vacío Brandel cell harvester. Las muestras se lavaron tres veces con agua a temperatura ambiente durante 3 segundos. A cada frasquito se agregó fluido de centelleo aquasol y se determinó radioactividad mediante el conteo de centelleo en líquido. Se analizaron las isotermas de saturación de ligadura después de convertir en primer lugar las concentraciones de ligando total a concentraciones de ligando libre (total – ligado = libre). Para cada tejido se completaron las isotermas de saturación individuales. Las membranas se ensayaron por proteína utilizando el método de unión de proteína Bio-Rad y utilizando la globulina gamma como estándar. Las densidades del receptor se expresaron, en proteína por mg, como media para cada grupo de tratamiento. Los niveles de catecolamina en tejido se analizaron comparando grupos tratados con nepicastat con los grupos tratados con placebo (control). Para cada tejido se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía no paramétrico con factor DOSIS y cada catecolamina se midió por separado. Con cada dosis se llevaron a cabo análisis pareados entre animales tratados y de control, utilizando la prueba de Dunnett para controlar la tasa de error experimental. Como validación se realizaron las pruebas LSD de Student-Neuman-Kuels y Fisher. Los análisis de los niveles de compuesto en tejido y plasma se llevaron a cabo de dos modos. En primer lugar, para cada parámetro se llevaron a cabo ensayos t individuales para comparar cada nivel de dosis con el nivel multiplicado por un factor de su dosis asociada. Por ejemplo, tres veces el nivel de compuesto presente a 10 mg/kg en un tejido o plasma particular debería ser comparable con el nivel de compuesto observado en el grupo 30 mg/kg. Además, se calculó un contraste ortogonal lineal para todas las tres dosis dentro del contexto de un análisis ANOVA de una vía. Se utilizó una prueba t pareada para determinar cualquier diferencia de unión entre el grupo tratado con vehículo y el grupo de 10 mg/kg/día de nepicastat.

[0262] A los perros se administraron oralmente cápsulas de 0, 5, 15 ó 30 mg/kg de nepicastat b.i.d. para proporcionar dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día durante 4,5 días y se

recolectó tejido 6 h después de la administración final. En la arteria renal, nepicastat administrado a dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día disminuyó significativamente ($p<0,01$) los niveles de norepinefrina en 86%, 81% y 85%, respectivamente. Los niveles de dopamina aumentaron significativamente ($p<0,01$) con dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día en 180%, 273% y 268%, respectivamente. Dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día de nepicastat aumentaron significativamente ($p<0,01$) la relación dopamina/norepinefrina en 1711%, 1767% y 1944%, respectivamente, en comparación con el placebo. Después de la administración de 10 y 60 mg/kg/día de nepicastat, los niveles de dopamina aumentaron significativamente ($p<0,01$) 632% y 411%, respectivamente, en la corteza cerebral. La relación dopamina/norepinefrina aumentó significativamente ($p<0,01$) 531% después de la administración de 10 mg/kg/día de nepicastat y 612% después de la administración de 60 mg/kg/día de nepicastat. Los niveles de norepinefrina no fueron afectados significativamente ($p>0,01$) con estas dos dosis. A 30 mg/kg/día, norepinefrina se redujo significativamente ($p<0,01$) en 63% y la relación aumentó significativamente ($p<0,01$) en 86%, mientras que los niveles de dopamina aumentaron marginalmente ($0,05<p<0,10$) 174%, en comparación con el placebo. Después de la administración de 10, 30 y 60 mg/kg/día de nepicastat, los niveles de norepinefrina disminuyeron significativamente ($p<0,01$) en 85%, 58% y 79%, respectivamente, en el ventrículo izquierdo. La relación dopamina/norepinefrina aumentó significativamente ($p<0,01$) en 852%, 279% y 607%, respectivamente, en comparación con los animales placebo. No se observaron cambios significativos en los niveles de dopamina con dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día de nepicastat.

[0263] En la corteza renal, en comparación con placebo, los niveles de norepinefrina disminuyeron significativamente ($p<0,01$) en 86%, 66% y 85%, respectivamente, después de dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día de nepicastat. Los niveles de dopamina aumentaron significativamente ($p<0,01$) en 156%, 502% y 208%, respectivamente, a estas dosis. La relación dopamina/norepinefrina aumentó significativamente ($p<0,01$) en 1653%, 1440% y 1693%, respectivamente, a dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día. En la médula renal, las relaciones dopamina/norepinefrina aumentaron significativamente ($p<0,01$) en 555%, 636% y 677%, respectivamente, después de dosis de 10, 30 y 60 mg/kg/día de nepicastat, en comparación con placebo. Los niveles de dopamina aumentaron significativamente ($p<0,01$) 522% a 30 mg/kg/día y aumentaron marginalmente ($0,05<p<0,10$) en 150% y 156%, respectivamente, a 10 y 60 mg/kg/día. Los niveles de norepinefrina disminuyeron significativamente ($p<0,01$) 72% después de la administración de 10 mg/kg/día de nepicastat, en comparación con placebo, y disminuyeron marginalmente ($0,05<p<0,10$) en 69% después de 60 mg/kg/día.

[0264] El análisis estadístico indicó que la concentración de nepicastat en plasma obtenida el Día 4 y en tejido y plasma obtenida el Día 5 fue proporcional a la dosis entre cada nivel de dosis y los niveles ampliados por un factor de sus dosis asociadas (partner dose). Por lo tanto, se determinó que los puntos de dosis fueron lineales, con las excepciones siguientes (un resultado significativo sugeriría que los datos no son lineales):

[0265] Médula renal: $3 \times 10 < 30$ ($p < 0,05$)

Médula renal: $6 \times 10 < 60$ ($p = 0,077$)

Plasma (día 4): $2 \times 30 > 60$ ($p = 0,076$)

10 [0266] El Día 5, los niveles de nepicastat en todos los tejidos examinados fueron mayores que aquellos en plasma.

[0267] Los resultados demostraron que no hay diferencia entre las muestras del ventrículo izquierdo del grupo tratado con 10 mg/kg/día de nepicastat y el grupo tratado con vehículo.

15 Ejemplo 17

[0268] Nepicastat se evaluó por su actividad sobre una gama de enzimas incluyendo tirosina hidroxilasa, NO sintasa, fosfodiesterasa III, fosfolipasa A₂, endopeptidasa neutral, Ca²⁺ / calmodulin proteína quinasa II, acetil CoA sintetasa, acil CoA-colesterol acil transferasa, HMG-CoA reductasa, proteína quinasa (no selectiva) y ciclooxigenasa-I. Como muestra la Figura 4, nepicastat tenía un IC₅₀ > 10 µM con todas las 12 enzimas estudiadas y por lo tanto es un inhibidor altamente selectivo (>1000 veces) de dopamina-β-hidroxilasa.

Ejemplo 18

[0269] Se obtuvo la DBH bovina de glándulas adrenales de Sigma Chemical (St Louis, MO). La DBH segregada por humanos se purificó a partir del medio de cultivo de la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH y se utilizó para obtener los datos de inhibición. Se preparó una columna de lentil-lectin-sefarosa que contiene 25 ml de gel y se equilibró con KH₂PO₄ 50mM, pH 6,5, NaCl 0,5 M. La columna se eluyó con 35 mL de metil-α, D-manopiranosido al 10% en KH₂PO₄ 50 mM, pH 6,5, NaCl 0,5 M a 0,5 ml/min. Las fracciones que contienen más actividades enzimáticas se reunieron y se concentraron con una celda agitada Amicon utilizando una membrana YM30. El metil-α, D-manopiranosido se separó mediante intercambio con buffer KH₂PO₄ 50mM, pH 6,5, NaCl 0,1 M. La solución concentrada de enzima se subdividió en alícuotas y se almacenó a -25° C.

35 [0270] Se usó un ensayo HPLC para medir la actividad de DBH utilizando tiramina y ascorbato como sustratos. El método se basa sobre la separación y cuantificación de tiramina y octopamina mediante cromatografía HPLC de fase inversa (Feilchenfeld,

N.B., Richter, H. & Waddell, W.H. (1982). Anal. Biochem: A time-resolved assay of dopamine- β -hydroxylase activity utilizing high-pressure liquid chromatography. 122: 124-128.). El ensayo se realizó a pH 5,2 y 37° C en NaAc 0,125 M, fumarato 10 mM, CuSO₄ 0,5 – 2,0 μ M, catalasa 0,1 mg/mL (6.500 u, Boeringer Mannheim, Indianapolis, IN), tiramina 0,1 mM y ascorbato 4 mM. En un ensayo típico, se agregaron a la mezcla de reacción 0,5 – 1,0 miliunidades de enzima y luego se agregó una mezcla de sustrato que contiene catalasa, tiramina y ascorbato para iniciar la reacción (volumen final de 200 μ l). Las muestras se incubaron a 37° C durante 30-40 minutos. Las reacciones se apagaron mediante la solución de detención que contiene EDTA 25 mM y 3-hidroxitiramina 240 μ M (estándar interno). Las muestras (150 μ l) se cargaron a un automuestreador Gilson y se analizaron mediante HPLC usando detección UV a 280 nm. Para la integración y los datos de análisis se utilizó el software PC-1000 (Thermo Separations products, Fremont, CA). La operación de cromatografía HPLC se llevó a cabo con un caudal de 1 ml/min utilizando una columna LiChroCART 125-4 RP-18 y elución isocrática con ácido acético 10 mM, ácido 1-heptansulfónico 10 mM, fosfato de tetrabutilamonio 12 mM y metanol al 10%. La actividad porcentual remanente se calculó en base a controles sin inhibidor, se corrigió utilizando estándares internos y se ajustó a una curva dosis-respuesta de cuatro parámetros no lineal para obtener los valores IC₅₀.

[0271] Purificación de [¹⁴C]-tiramina. Clorhidrato de [¹⁴C]tiramina se purificó mediante una columna de carga liviana C18 (dos columnas combinadas en una) que se lavó con 2 ml de MeOH, 2 ml de KH₂PO₄ 50 mM, pH 2,3, acetonitrilo al 30%, y luego 4 ml de KH₂PO₄ 50 mM, pH 2,3. Se utilizó un colector múltiple a vacío (Speed Mate 30, de Applied Separations) para lavar y eluir la columna a vacío. Después de cargar [¹⁴C]tiramina, la columna se lavó con 6 ml de KH₂PO₄ 50 mM, pH 2,3, y se eluyó con 2 ml de KH₂PO₄ 50 mM que contiene 30% de acetonitrilo. El eluado se liofilizó para separar acetonitrilo, se resuspendió en H₂O y se almacenó a -20° C.

[0272] Ensayo enzimático mediante método radioactivo. La actividad enzimática se determinó utilizando [¹⁴C]tiramina como sustrato y una columna C18 para separar el producto. El ensayo se realizó en un volumen de 200 μ l que contiene NaAc 100 mM, pH 5,2, ácido fumárico 10 mM, CuSO₄ 0,5 μ M, ácido ascórbico 4 mM, catalasa 0,1 mg/ml y varias concentraciones de tiramina. El conteo total de cada reacción fue ~ 150.000 cpm. La DBH bovina (0,18 ng para cada reacción) se mezcló con tiramina e inhibidor en el buffer de reacción a 37° C. La reacción se inició mediante el agregado de mezcla de ascorbato/catalasa y se incubó a 37° C durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante el agregado de 100 μ l de EDTA 25 mM, KH₂PO₄ 50mM, pH 2,3. La mezcla total se cargó a una columna de carga liviana C18 (dos combinadas en una) que se pre-lavó con MeOH y se equilibró con KH₂PO₄ 50 mM, pH 2,3. La elución en los

frasquitos de centelleo se llevó a cabo con 1 ml de buffer KH_2PO_4 , pH 2,3, dos veces, seguido por 2 ml del mismo buffer. A los frasquitos de centelleo se agregó fluido de centelleo ReadySafe (16 ml) y las muestras se contaron para determinar radioactividad ^{14}C .

- 5 [0273] Se utilizaron concentraciones de nepicastat de 0, 1, 2, 4, 8 nM para estudiar la cinética de inhibición a las siguientes concentraciones de tiramina: 0,5, 1, 2, 3, 4 mM. Los conteos de ^{14}C fueron idénticos en cada reacción que se llevó a cabo según lo arriba descrito. Como control se utilizó un blanco sin enzima para obtener el nivel de fondo. Los datos se corrigieron tomando en cuenta el nivel de fondo, se convirtieron a actividad
- 10 en nmol/min, y se representaron gráficamente ($1/V$ vs $1/S$). Se calculó K_m' a partir de las pendientes, y se utilizaron las intersecciones con Y y regresión lineal para obtener el valor K_i .

- [0274] Se obtuvieron los valores IC_{50} para SKF-102698, nepicastat y Compuesto B contra DBH humana y bovina utilizando el ensayo HPLC con las concentraciones de
- 15 sustrato de tiramina 0,1 mM, ascorbato 4 mM a pH 5,2 y 37°C . Todos los tres compuestos causaron una inhibición dosis-dependiente de la actividad de DBH, tanto de la enzima bovina como la humana.

- [0275] Los valores IC_{50} calculados para nepicastat, Compuesto B y SKF-102698 mostraron que el enantiómero S (nepicastat) fue más potente que el enantiómero R (Compuesto B), 3 veces contra DBH bovina y 2 veces contra la enzima humana. Nepicastat fue más potente que SKF-102698, 8 veces contra la enzima bovina y 9 veces
- 20 contra DBH humana.

- [0276] Se determinó un K_m de 0,6 mM a partir de la curva de Lineweaver-Burk. Nepicastat (1-8 nM) causó un mayor desplazamiento de K_m , como se predeciría para un
- 25 inhibidor competitivo. La inhibición de DBH bovina mediante nepicastat parece ser competitiva con tiramina. Se calculó un K_i de $4,7 \pm 0,4$ nM mediante regresión lineal.

- [0277] Nepicastat fue un inhibidor potente, tanto de la DBH bovina como de la humana. Fue 8-9 veces más potente que SKF-102698. Nepicastat (el enantiómero S) es 2-3 veces más potente que el Compuesto B (el enantiómero R). La inhibición de DBH bovina por
- 30 nepicastat resultó ser competitiva con tiramina, con un K_i de $4,7 \pm 0,4$ nM.

Ejemplo 19

[0278] Se determinó la afinidad de nepicastat con los ensayos de unión expuestos utilizando métodos estándar de unión y filtración del radioligando.

- [0279] Los datos de unión competitiva se analizaron mediante el ajuste iterativo de
- 35 curva a una ecuación logística de cuatro parámetros. Los coeficientes de Hill y la IC_{50} se obtuvieron directamente. Las pK_i ($-\log$ de K_i) de ligandos competitivos se calcularon a partir de los valores IC_{50} utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff.

[0280] Nepicastat tenía una afinidad moderada por receptores α_1 (pK_i de 6,9 – 6,7). La afinidad para todos los otros receptores examinados fue relativamente baja ($pK_i < 6,2$).

Ejemplo 20

5 [0281] En el momento de la dosificación, se preparó una formulación de nepicastat de 60 mg/ml mediante el mezclado de vehículo con polvo de nepicastat, seguido por agitación. Las formulaciones de 6 y 20 mg/ml de nepicastat se prepararon diluyendo la formulación de 60 mg/ml con vehículo. Las formulaciones de nepicastat reconstituidas
10 retuvieron la potencia durante la duración de uso. El vehículo acuoso y las formulaciones de nepicastat contenían hidroxipropilmetilcelulosa, alcohol bencílico y polisorbato 80.

[0282] La selección de las dosis se basó sobre estudios de toxicidad aguda en los cuales se administraron a ratones dosis orales simples de 250, 1000 o 2500 mg/kg de nepicastat. Los síntomas clínicos de toxicidad y muerte se produjeron con 1000 y 2500
15 mg/kg.

[0283] A cada ratón se administró mediante sonda una dosis oral simple de vehículo o formulación de nepicastat utilizando un entubador para roedores. Se seleccionó la ruta oral porque es una ruta de administración clínica propuesta. Los volúmenes de las dosis se calcularon a base de los pesos corporales individuales registrados antes de la dosificación (los datos de pesos corporales no se tabularon en este informe). Los ratones
20 no tenían acceso a alimento y agua durante 2,5 a 3,5 horas antes de la dosificación, en vez de 1,5 horas según lo especificado en el protocolo. Esta desviación no afectó la integridad del estudio.

[0284] Previo a la dosificación se registraron las observaciones clínicas. Comenzando
25 60 minutos después de la dosificación, los ratones de cada grupo de tratamiento fueron evaluados en grupos de hasta 3 ratones durante un intervalo de aproximadamente 10 minutos, mediante observaciones clínicas y pruebas de comportamiento protocolo-específicos. Un ratón del grupo 30 mg/kg y un ratón del grupo 100 mg/kg murió después de la dosificación y se retiraron del estudio. Los ratones sobrevivientes se eutanizaron y
30 se separaron del estudio al final del período de observación/ensayo.

[0285] A cada ratón de grupos de 6 machos se administró mediante sonda dosis orales simples de 0 (vehículo), 30, 100 ó 300 mg/kg de nepicastat. Las observaciones clínicas y las pruebas de comportamiento se iniciaron 60 minutos después de la administración de la formulación de ensayo. Al final del período de observación, todos los ratones
35 sobrevivientes se eutanizaron y se separaron del estudio.

[0286] Los ratones de los grupos de 30, 100 y 300 mg/kg tenían una temperatura corporal menor en comparación con los del grupo de control que recibieron vehículo. No

se observaron modificaciones clínicas o de comportamiento relacionados con el tratamiento. Se obtuvieron datos de temperatura corporal rectal, de ensayos de observación y pruebas de comportamiento. No se observaron modificaciones clínicas o de comportamiento relacionados con el tratamiento. Se produjo un agrupamiento social anormal (enumerado como otra reacción) entre ratones del grupo 100 mg/kg, pero no en el grupo de 300 mg/kg; este hallazgo se consideró incidental. Los cambios clínicos / de comportamiento en 1 ratón del grupo 100 mg/kg incluyeron inactividad, forma de andar y postura anormal, actividad inducida disminuida, pasividad anormal y vocalización suave/continua; estos cambios no se atribuyeron a nepicastat. Un ratón de cada grupo de 30 y 100 mg/kg murió después de la dosificación; las muertes se consideraron incidentales y los ratones se separaron del estudio.

Ejemplo 21

[0287] El propósito de este estudio fue determinar si los inhibidores de DBH SKF-102698 y nepicastat produjeron cambios en la actividad locomotora o la reactividad a sobresalto acústico. Por lo tanto, los cambios en estos comportamientos pueden reflejar una actividad de estos compuestos sobre el sistema nervioso central.

[0288] Se obtuvieron ratas Sprague-Dawley macho adultas (250 – 350 g de peso el día del estudio) de Charles Rivers Labs. Las ratas se alojaron bajo un ciclo de luz/oscuridad normal con iluminación entre 0900 hs. y 2100 hs. Los animales se alojaron de a pares en jaulas de tela metálica estándar y se les permitió alimento y agua ad libitum.

[0289] La caja para determinar actividad locomotora consistió de una caja de Plexiglas^R de 18'' x 18'' de piso y 12'' de altura. Circundando las cajas de Plexiglas^R, estaban dispuestos monitores Omnitech Digiscan (modelo # RXXCM 16) que consistieron de una banda de una pulgada de células fotoeléctricas y fotosensores, 32 por caja. Se analizó el número de interrupciones de los rayos fotoeléctricos mediante un analizador Omnitech Digiscan (modelo # DCM-8). Los animales se ensayaron en un ambiente cerrado con un generador de ruido blanco para enmascarar ruidos externos.

[0290] Se realizaron ensayos de reactividad de sobresalto debido a estímulo acústico en 8 estaciones de ensayo automático SR-Lab (San Diego Instruments, San Diego, CA). Las ratas se colocaron individualmente en un cilindro de Plexiglas^R (diámetro 10 cm) alojado dentro de un recinto ventilado que atenúa sonidos. Se produjeron estallidos acústicos de ruido (un ruido de banda ancha con un tiempo de subida y un tiempo de bajada de 1 msec) mediante un altoparlante montado 30 cm por encima del animal. Un acelerómetro piezoeléctrico transforma el movimiento del sujeto en un voltaje arbitrario en una escala de 0 a 4095.

[0291] Previo a la administración de droga, cada una de 72 ratas se colocó en el aparato de sobresalto, y después de un período de adaptación de 5 minutos se hizo percibir a las

ratas un estallido de ruido acústico cada 20 segundos durante 15 minutos (45 sobresaltos en total). Para cada rata se calculó el sobresalto promedio tomando la media de los sobresaltos 11 a 45 (no se tomaron en cuenta los primeros diez sobresaltos). Luego se colocaron 46 de estas ratas en uno de 8 grupos de tratamiento, de modo que cada grupo tenía valores de media de sobresalto similares. Los 8 grupos de tratamiento fueron los siguientes: SKF-102698 (100 mg/kg) y su vehículo (50% agua / 50% polietilenglicol), clonidina (40 µg/kg), nepicastat (3, 10, 30 y 100 mg/kg) y su vehículo, dH₂O. Trabajos previos han demostrado que este procedimiento de comparación es el más apropiado para determinar sobresalto, debido a que existe una variabilidad significativa de la respuesta a sobresalto entre ratas individuales, pero, hay un elevado grado de consistencia de una misma rata desde un día al siguiente.

[0292] Cada día después de este procedimiento de ensayo, se inyectó a 8 ratas (una rata de cada uno de los 8 grupos de tratamiento) su tratamiento con la droga asignada e inmediatamente las ratas se colocaron individualmente en una caja de actividad motora. La actividad motora de las ratas fue monitoreada durante cuatro horas. Luego, las ratas se colocaron en una jaula de transferencia durante quince minutos. Al comienzo de estos quince minutos, la rata que había sido asignada al tratamiento con clonidina recibirá otra inyección de 40 µg/kg. Luego, las ratas se colocaron en el aparato de sobresalto, y después de un período de aclimatización se les presentó un estallido de ruido de 90 dB cada minuto durante 4 horas.

[0293] Para evaluar la actividad motora, se midieron la actividad horizontal (número de interrupciones de los haces fotoeléctricos), el número de movimientos y el tiempo de descanso. Cada parámetro fue analizado por separado. Para cada intervalo de tiempo (también llamado muestra), se realizó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) utilizando los datos agrupados por rangos (técnica no paramétrica) para determinar el efecto de tratamiento bloqueado por día. También se realizaron comparaciones pareadas para grupos tratados con vehículo de control utilizando la prueba t de Dunnett.

[0294] Para evaluar la reactividad de sobresalto, durante los 200 milisegundos que siguieron inmediatamente a cada sobresalto se midieron la fuerza promedio ejercida por cada rata sobresaltada durante el período entero de 200 milisegundos, como así también la fuerza máxima. Para cada ensayo (TRIALN) de cada tratamiento (TREAT) se computarizaron los voltajes promedios máximo y promedio (MAXMEAN y AVGMEAN), y luego se graficaron estos valores contra el número de ensayo para cada tratamiento. Los gráficos se adjuntan al informe. Los ensayos 1-60 se hicieron corresponder a tiempo=1, los ensayos 61-120 a tiempo=2, los ensayos 121-180 a tiempo=3 y los ensayos 181-240 a tiempo=4. Dentro de cada período de tiempo y para cada tratamiento se computarizaron la media del máximo y el promedio de la respuesta

- de sobresalto. Las medias se utilizaron luego en el análisis estadístico. Las respuestas de sobresalto se analizaron utilizando análisis de covarianza. Las comparaciones de tratamientos dentro de un tiempo fueron de interés para los investigadores, pero no los efectos del tiempo dentro de un tratamiento. Por lo tanto, las respuestas de sobresalto se
- 5 analizaron en función del tiempo. El modelo incluyó términos para el día de ensayo de la rata (fecha), la respuesta de sobresalto de referencia (línea base) y el tratamiento. La fecha fue un factor de bloqueo y la respuesta de sobresalto de referencia fue una covariante. Se utilizaron tres modelos separados para cada uno de los objetivos arriba expresados. Se compararon las dosis variantes de nepicastat con vehículo utilizando el
- 10 procedimiento de Dunnett para controlar comparaciones múltiples.
- [0295] Al comparar los cuatro grupos tratados con nepicastat con los controles tratados con vehículo, no se encontraron diferencias significativas ni globales ni entre parejas para cualquier tiempo examinado de cualquiera de los tres parámetros.
- [0296] Al ser comparado con los controles tratados con vehículo, el grupo tratado con
- 15 clonidina tuvo significativamente más actividades horizontales a 2 y 2,5 horas, significativamente más movimientos a 2 horas, y significativamente menos tiempo de descanso a 2 horas (todos $p < 0,05$). Observe que el grupo tratado con clonidina tenía significativamente más tiempo de descanso que los controles tratados con vehículo a 1 hora ($p < 0,05$).
- [0297] En comparación con los controles tratados con vehículo, el grupo tratado con
- 20 SKF-102698 tenía significativamente menos actividades horizontales y significativamente menos movimientos a 2,5 horas (ambos $p < 0,05$). Observe que el grupo tratado con SKF-102698 tenía significativamente más movimientos que los controles tratados con vehículo a 1,5 hora y 4 horas (ambos $p < 0,05$). No se detectaron
- 25 diferencias significativas entre SKF-102698 y vehículo en cualquier tiempo examinado durante el tiempo de descanso.
- [0298] En general, la actividad horizontal y el número de movimientos disminuyeron durante las primeras dos horas y permanecieron bajos durante las últimas dos horas. Similarmente, el tiempo de descanso aumentó durante las primeras 2 horas y permaneció
- 30 elevado durante las últimas 2 horas.
- [0299] Nepicastat no tenía efectos significativos sobre la actividad locomotora en ratas. Los animales tratados con 3, 10, 30 ó 100 mg/kg de nepicastat no eran significativamente diferentes de los controles tratados con vehículo con respecto al examen a cualquier tiempo de la actividad horizontal, el número de movimientos o el
- 35 tiempo de descanso.
- [0300] En la respuesta de sobresalto, los efectos de tratamiento totales para nepicastat y vehículo no fueron significativos ($p > 0,05$) a cualquier tiempo para cualquier respuesta.

El efecto de tratamiento total para la respuesta de sobresalto promedio al tiempo 2 fue marginalmente significativo ($p=0,0703$), y la prueba de Dunnett reveló que nepicastat tenía una respuesta de sobresalto promedio significativamente mayor que el grupo de vehículo ($p<0,05$). La respuesta de sobresalto promedio de referencia fue estadísticamente significativa a los tiempos 3 y 4 para ambas respuestas ($p\leq 0,05$), y marginalmente significativa a los tiempos 1 y 2 para la respuesta de sobresalto máxima y al tiempo 2 para la respuesta de sobresalto promedio ($p\leq 0,10$)

[0301] SKF-102698 (100 mg/kg) no fue significativamente diferente del vehículo a cualquier tiempo para cualquier medición de respuesta de sobresalto.

[0302] La clonidina tenía estadísticamente respuestas de sobresalto máxima y promedio significativamente menores que el vehículo al tiempo 1 ($p<0,01$) y al tiempo 2 solamente para la respuesta de sobresalto promedio ($p=0,0352$). La respuesta de sobresalto máxima al tiempo 2 y la respuesta de sobresalto promedio al tiempo 3 para el grupo de clonidina fueron marginalmente significativamente menores que las del grupo de agua.

[0303] Nepicastat administrado a 3, 10, 30 ó 100 mg/kg parece no tener efecto sobre la respuesta de sobresalto máxima o promedio en ratas en comparación con el vehículo a cualquier tiempo. SKF-102698 se comportó similarmente para el vehículo (PEG) para ambas respuestas de sobresalto para todos los tiempos.

Clonidina disminuyó exitosamente ambos, la respuesta de sobresalto máxima y promedio, durante períodos de tiempo tempranos, y se comportó similarmente con vehículo durante tiempos posteriores.

Ejemplo 22

[0304] Se examinaron los efectos de dosificación crónica de nepicastat en ratas. Entre tres y trece días previos al primer día de dosificación, las ratas se colocaron dentro del aparato de sobresalto y después de un período de aclimatización de 5 minutos fueron sometidas a un estallido de ruido de 118 dB, en promedio durante 1 minuto (se utilizará un intervalo entre ensayos variable en el rango entre 30 y 90 segundos) durante 20 minutos. Las respuestas de sobresalto se midieron, y para cada rata se calculó una media para las últimas veinte respuestas de sobresalto. Las ratas se colocaron aleatoriamente en uno de los ocho grupos de tratamiento (nepicastat, 5, 15 ó 50 mg/kg, b.i.d.; SKF-102698, 50 mg/kg, b.i.d.; clonidina, 20 μ g/kg, b.i.d.; d-anfetamina, 2 mg/kg b.i.d.; dH₂O ó ciclodextrina (vehículo de SKF-102698). Las ratas se dosificaron mediante sonda oral con un volumen de dosificación de 10 ml/kg. Las ratas se dosificaron cada día a la mañana y a la tarde durante diez días. El tiempo entre la dosificación a la mañana y a la tarde será entre 6 y 10 horas. Trabajos previos mostraron que este procedimiento de comparación es el más apropiado para determinar la reactividad de sobresalto acústico,

debido a que existe una variabilidad significativa de la respuesta a sobresalto entre ratas individuales, pero, hay un elevado grado de consistencia de una misma rata desde un día al siguiente.

5 [0305] Como era imposible ensayar todas las 96 ratas (8 grupos de tratamiento, $n=12$) el mismo día, el cronograma de dosificación fue escalonado de modo que se trataron solamente 8 ratas cada día. Estos 12 grupos de ocho ratas consistieron cada uno de una rata de cada uno de los ocho grupos de tratamiento, de modo que los grupos de tratamiento estaban balanceados a través de los días. Además, todos los grupos de tratamiento estaban balanceados a través de las ocho cámaras de actividad motora, sin embargo, no era posible balancear los grupos de tratamiento a través de las cámaras de sobresalto.

[0306] Se administraron las siguientes pruebas de comportamiento durante y después de la dosificación crónica; temperatura corporal interna, actividad motora, reactividad de sobresalto acústico e inhibición pre-pulso de sobresalto acústico.

15 [0307] Los animales se ensayaron en un ambiente cerrado con un generador de ruido blanco en funcionamiento. Los ensayos de actividad motora se efectuaron inmediatamente después de leer la temperatura corporal interna el día de dosificación 10 (aproximadamente 3 horas y 35 minutos después de la dosis diaria matutina de nepicastat, y SKF-102698, y 20 minutos previos a la administración diaria de clonidina y d-anfetamina el día de dosificación 10). Los ensayos de actividad motora se efectuaron durante una hora. Previo a cada sesión de ensayo, se hace correr un programa diagnóstico con cada una de las cámaras de actividad motora, para asegurar que los haces fotoeléctricos y los sensores de luz operan apropiadamente. Se mostró que la actividad motora es sensible a los cambios de los niveles de dopamina en el sistema nervioso central (Dietze y Kuschinsky, 1994), lo que hace que esta prueba de comportamiento sea un potencial ensayo sensible para los efectos in-vivo de los inhibidores de DBH. Para este ensayo se usó d-anfetamina como control positivo.

25 [0308] Las temperaturas corporales internas de las ratas se obtuvieron insertando la sonda rectal 2 cm en el colon de cada rata. La temperatura corporal interna de cada rata se midió tres veces y se calculó el promedio de estas tres lecturas. Las lecturas de temperatura corporal interna se obtuvieron inmediatamente antes del programa de dosificación crónica durante diez días (para obtener un valor de referencia), y 3,5 horas después de la dosis diaria matutina de nepicastat, y SKF-102698, y 15 minutos antes de la administración diaria de clonidina y d-anfetamina, los días de dosificación uno, cinco y diez. Se mostró que la temperatura corporal interna es sensible a ambos, los niveles de dopamina y norepinefrina, lo que hace que esta prueba de comportamiento sea un potencial ensayo sensible a los efectos in-vivo de los inhibidores de DBH. Ambos, la

clonidina (un agonista α_2), y la d-anfetamina (un liberador de dopamina) se utilizaron como controles positivos para este ensayo.

[0309] Se midieron ambas, la reactividad de sobresalto acústico (una serie de contracciones musculares suscitadas por un estallido intenso de ruido con comienzo rápido) y la inhibición por prepulso (una regulación sensomotora medida mediante el análisis de cualquier disminución de la reactividad de sobresalto que se produce cuando un estímulo que produce sobresalto esta precedido inmediatamente por un estímulo que no produce sobresalto), en ocho estaciones de prueba del laboratorio SR-Lab (San Diego Instruments, San Diego, CA). Las ratas se colocaron individualmente en un cilindro de Plexiglas^R (diámetro 10 cm) alojado dentro de un recinto ventilado que atenúa sonidos. Se produjeron estallidos acústicos de ruido (un ruido de banda ancha con un tiempo de subida y un tiempo de bajada de 1 mseg) mediante un altoparlante montado 30 cm por encima del animal. Estos altoparlantes produjeron también un ruido de fondo de nivel de 68 dB a través de todas las sesiones de prueba. Un acelerómetro piezoeléctrico adherido por debajo del cilindro de Plexigras transformó el movimiento del sujeto en un voltaje, que luego se rectificó y digitalizó (en una escala desde 0 a 4095) mediante una computadora PC equipada con un ensamblaje de software e interfaz de SR-Lab. Se utilizó un decibelímetro para calibrar los altoparlantes en cada una de las ocho estaciones de prueba a $\pm 1\%$ de la media. Además, se utilizó un instrumento de calibración SR-Lab para calibrar a cada uno de los ocho aparatos de detección de sobresalto a $\pm 2\%$ de la media. Las pruebas de reactividad de sobresalto e inhibición por prepulso se hicieron correr simultáneamente, inmediatamente después de la prueba de actividad motora. (aproximadamente 4 horas y 40 minutos después de la inyección diaria matutina de nepicastat, y SKF-102698, y 10 minutos después de una administración suplementaria de clonidina y d-anfetamina el día de dosificación diez). Las pruebas de reactividad de sobresalto e inhibición por prepulso consistieron en colocar cada rata individualmente en una estación de prueba SR-Lab, y después de un período de aclimatización de cinco minutos, las ratas se sometieron a uno de tres tipos diferentes de estallido de ruido (midiendo la reacción de sobresalto correspondiente), en promedio uno por minuto, (se utilizó un intervalo entre pruebas variable entre 30 y 90 segundos) durante una hora (con un total de 60 estallidos de ruido y reacciones de sobresalto). Los tres tipos diferentes de estallido de ruido consistieron en un estallido de ruido fuerte (118 dB), y un estallido de ruido relativamente tranquilo (77 dB), de modo que el estallido tranquilo precede el estallido de ruido fuerte en 100 mseg (prueba de inhibición mediante pre-pulso). Estas pruebas se realizaron en un orden pseudo-aleatorio. Se mostró que la inhibición por prepulso es sensible a los cambios de niveles de dopamina mesolímbica. Además, también se mostró que la reactividad de sobresalto acústico es

sensible a los cambios de niveles de dopamina y norepinefrina, lo que hace que esta prueba de comportamiento sea un potencial ensayo de sensibilidad para los efectos in-vivo de los inhibidores de DBH. La clonidina y la d-anfetamina sirvieron como control positivo para la reactividad de sobresalto acústico y la inhibición por pre-pulso de las pruebas de sobresalto acústico.

[0310] El cronograma de las pruebas diarias de comportamiento fue el siguiente. A $t=0$, se inyecta el inhibidor. A 3,5 horas, se mide la temperatura corporal interna. A 3 horas y 35 minutos, se evalúa la actividad motora. A 4 horas y 40 minutos, se evalúan la reactividad de sobresalto y la inhibición por pre-pulso.

[0311] Se tomaron tres lecturas de temperatura de cada sujeto durante el tiempo de la prueba. Luego se calculó el promedio de estas tres lecturas.

[0312] Se obtuvo la locomoción espontánea de cada rata calculando el número total de fotohaces interrumpidos por el sujeto durante la sesión de prueba.

[0313] La reacción del sujeto se midió durante cada prueba para la ventana de 40 mseg después de presentar el estímulo. Cada reacción de sobresalto se calculó tomando el promedio de 40 lecturas (una por milisegundo), comenzando inmediatamente después de cada estallido de ruido. La reactividad de sobresalto acústico se calculó determinando la respuesta media para cada sobresalto del sujeto suscitado por el estallido acústico de 118 dB. Los valores de inhibición por pre-pulso se calcularon sustrayendo la respuesta de sobresalto media suscitada por la prueba de pulsos pareados 77dB – 118 dB (prueba de inhibición por pre-pulso arriba descrita) de la respuesta a la prueba de sólo 118 dB y dividiendo luego este valor por el de la prueba con sólo 118 dB, para cada rata, es decir $[(\text{valor de la prueba con 118 dB} - \text{valor de la prueba de inhibición por pre-pulso}) / \text{valor de la prueba con 118 dB}]$.

[0314] Para cada tiempo se realizó un ANOVA global de una vía con un efecto principal para tratamiento para los cambios desde el valor de referencia para cada animal. Se realizaron pruebas t subsecuentes para cada comparación de interés.

[0315] Se midió la actividad motora espontánea para cada animal cada 15 min durante 1 h. Cada bloque de tiempo (cada 15 min) se analizó por separado. Se realizó la prueba de Kruskal-Wallis (técnica no paramétrica) para ensayar la diferencia entre grupos de tratamiento. Si no se detecta una diferencia significativa global, se realiza el ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples.

[0316] Para cada tratamiento (TREAT) y tipo de prueba (TRIALT) de cada prueba (TRIALN) se computaron la media del voltaje promedio (AVGMEAN) y la inhibición por prepulso porcentual media (RATIO). Los valores de inhibición por prepulso se calcularon sustrayendo la respuesta de sobresalto media suscitada por la prueba pareada pulso de 77 dB – pulso de 118 dB (la prueba de inhibición por pre-pulso arriba descrita)

de la respuesta suscitada por el ensayo de sólo 118 dB y dividiendo luego este valor por el valor de la prueba de sólo 118 dB, para cada rata, es decir ([valor de la prueba de 118 dB – valor de la prueba de inhibición por prepulso] dividido por el valor de la prueba con 118 dB).

- 5 **[0317]** Estos valores se graficaron contra el número de la prueba para cada tratamiento y tipo de prueba, y estos gráficos se adjuntan al informe. Observe que el eje y de los gráficos varía. Las pruebas 1-15 corresponden al tiempo 1, 16-30 al tiempo 2, 31-45 al tiempo 3 y 46-60 al tiempo 4. También se adjuntan gráficos que representan la inhibición por pre-pulso porcentual media y la media del sobresalto promedio de los
- 10 animales durante el TIEMPO para cada tratamiento.

- [0318]** Se analizaron la respuesta de sobresalto promedio y la inhibición por prepulso porcentual utilizando el análisis de varianza. El modelo incluyó términos para tratamiento, animales agrupados dentro de un tratamiento, tiempo, e interacción entre tiempo y tratamiento. Los efectos del tratamiento se ensayaron utilizando el término error para los animales agrupados dentro del tratamiento. Se estudiaron los efectos
- 15 globales del tratamiento y los efectos del tratamiento por períodos de tiempo. Se utilizó el método de las menores diferencias significativas de Fisher para ajustar comparaciones múltiples. Si los efectos globales de tratamiento o tratamiento por períodos de tiempo no fueron significativos (valor $p > 0,05$) se efectuó un ajuste de Bonferroni. Si los efectos
- 20 globales del tratamiento no fueron significativos, entonces el ajuste se aplicó a comparaciones por pares específicos. Además, si el efecto del tratamiento por pares específicos no fue significativo (valor $p > 0,05$), entonces el ajuste también se aplicó a los efectos de tratamiento dentro del período de tiempo. Si ambos, los efectos del tratamiento global y del tratamiento por períodos de tiempo no fueron significativos
- 25 (valor $p > 0,05$), entonces se hizo un ajuste de Bonferroni para las comparaciones individuales dentro del período de tiempo y promediando a lo largo del tiempo.

- [0319]** Para el análisis se calculó para cada animal el cambio en pesos corporales con respecto a la dosis pre-tratamiento. Se utilizó un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas para ensayar por los efectos globales de tratamiento, tiempo e interacción entre
- 30 tiempo y tratamiento. Luego se realizaron ANOVAS de una vía para ensayar el efecto de tratamiento para cada día.

- [0320]** Los controles positivos (d-anfetamina y clonidina) aumentaron significativamente la temperatura corporal interna el día uno de la dosificación crónica, pero ningún otro compuesto tenía cualquier efecto significativo sobre la temperatura
- 35 corporal interna en cualquier tiempo.

- [0321]** El grupo de d-anfetamina tenía actividad locomotora significativamente mayor que el grupo de control con vehículo en todos los tiempos examinados. Sin embargo, el

grupo de clonidina no fue significativamente diferente de los controles con vehículo en cualquier tiempo examinado. El grupo dosificado con SKF-102698 50 mg/kg b.i.d. no tenía actividad locomotora significativamente menor que su vehículo de control durante los primeros 45 minutos (es decir, muestras 1 – 3), pero los valores no fueron

5 significativos después de 45 minutos.

[0322] No se observó un efecto global del tratamiento significativo para nepicastat en cualquier tiempo examinado. Comparaciones pareadas revelaron que ninguno de los grupos tratados con nepicastat fue significativamente diferente de los controles con vehículo en cualquier tiempo examinado. Tampoco se observó ninguna diferencia

10 significativa entre los dos controles con vehículo (dH₂O y vehículo de SKF) en cualquier tiempo examinado.

[0323] Ninguno de los grupos de tratamiento produjo cualquier cambio significativo en la inhibición por pre-pulso. El efecto global del tiempo fue estadísticamente significativo para el grupo SKF-102698 y el grupo de ciclodextrina ($p=0,0001$). La interacción por

15 período de tiempo del tratamiento fue estadísticamente significativa para ciclodextrina versus dH₂O ($p=0,0283$), pero no para otros. Los efectos de tratamiento no fueron significativos para cualquier comparación de interés. Sin embargo, el grupo SKF tenía una inhibición por prepulso porcentual marginalmente mayor en comparación con el grupo de ciclodextrina ($p=0,0782$).

[0324] Durante los tiempos 1 y 2, el grupo de clonidina tenía una inhibición por prepulso porcentual apenas significativamente mayor que el vehículo de control y no fue significativamente diferente del vehículo durante los tiempos 3 y 4. Ni d-anfetamina ni SKF-102698 fueron significativamente diferentes de su propio vehículo en cualquier tiempo. Ninguno de los grupos de dosificación con nepicastat fue significativamente

25 diferente del grupo con dH₂O en cualquier tiempo.

[0325] Sólo el grupo de tratamiento con SKF-102698 produjo un cambio significativo de la reactividad de sobresalto acústico. El efecto global del tiempo fue estadísticamente significativo para todas las comparaciones de interés (para todas $p = 0,0001$). La interacción por períodos de tiempo del tratamiento fue estadísticamente significativa

30 para la comparación de anfetamina versus dH₂O, clonidina versus dH₂O y ciclodextrina versus dH₂O (todos $p < 0,05$), pero no para otros. Los efectos de tratamiento fueron significativos para SKF-102698 50 mg/kg b.i.d. versus ciclodextrina ($p=0,0007$) y para nepicastat 50 mg/kg b.i.d. versus SKF-102698 50 mg/kg b.i.d. ($p=0,0047$), pero no para otros. El grupo SKF-102698 50 mg/kg b.i.d. tenía una respuesta de sobresalto

35 significativamente menor en comparación con la ciclodextrina, y también tenía una respuesta de sobresalto significativamente menor en comparación con el grupo de nepicastat 50 mg/kg b.i.d.

[0326] El grupo de SKF-102698 (50 mg/kg b.i.d.) tenía una respuesta de sobresalto significativamente menor que el grupo de ciclodextrina en todos los tiempos. Durante los tiempos 1 y 3, el grupo nepicastat (50 mg/kg b.i.d.) tenía una respuesta de sobresalto significativamente mayor que el grupo SKF-102698 (50 mg/kg b.i.d.). No se detectaron otras diferencias significativas.

[0327] No había diferencias globales o por pares significativas en el peso corporal entre los grupos con la dosificación de referencia pre-tratamiento.

[0328] El grupo de d-anfetamina tenía un cambio del peso corporal significativamente menor con respecto a la dosificación pre-tratamiento que los grupos de control con vehículo ($p < 0,01$). Cuando los valores se analizan dentro de cada día, los controles con vehículo tenían un aumento de peso corporal con respecto a la dosis pre-tratamiento significativamente mayor que el grupo de anfetamina los días de tratamiento 4-10. Sin embargo, el grupo de clonidina no fue significativamente diferente de los controles con vehículo en cualquier tiempo examinado. El grupo SKF-102698 (50 mg/kg b.i.d.) mostró un aumento del peso corporal con respecto a la dosis de referencia pre-tratamiento significativamente menor ($p < 0,01$) que su control con vehículo (vehículo SKF). Cuando los valores se analizan dentro de cada día, los controles con vehículo SKF tenían un aumento de peso corporal con respecto a la dosis pre-tratamiento significativamente mayor que el grupo de SKF-102698 los días de tratamiento 2-10, excepto los días 3 y 6.

Es importante destacar que no había diferencia de cambios de peso corporal entre los grupos SKF-vehículo y vehículo de control en cualquier día.

[0329] No había un efecto global del tratamiento significativo sobre el peso corporal para cualquier dosis de nepicastat en cualquier tiempo examinado. Comparaciones pareadas revelaron que ninguno de los grupos tratados con nepicastat fue significativamente diferente de los controles con vehículo en cualquier tiempo examinado. Es de interés, que había una diferencia global significativa ($p < 0,05$) entre el grupo SKF-102698 (50 mg/kg b.i.d.) y el grupo nepicastat (50 mg/kg b.i.d.) con respecto a los cambios del peso corporal. Al considerar los análisis dentro de cada día, el grupo SKF-102698 (50 mg/kg b.i.d.) tenía pesos corporales significativamente menores que el grupo de nepicastat (50 mg/kg b.i.d.) los días 7-9.

Ejemplo 23

[0330] Se compró 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) de RBI, Inc, (Natick, MA). Para la administración, MPTP fue suspendida en agua a una concentración de 2 mg/ml (base libre) e inyectada subcutáneamente en un volumen (ml) igual al peso (kg) de cada animal. Por ejemplo, un animal de 950 gramos recibió una

inyección de 0,95 ml de MPTP con una concentración de 2 mg/ml, lo que resultó en 2,0 mg/kg finales por inyección.

5 [0331] Se mantuvieron monos bajo un ciclo luz-oscuridad de 13h/11h con acceso a alimento y agua ad libitum. Todos los procedimientos utilizados en este estudio siguieron las directivas NIH y fueron aprobados por el comité de cuidado de animales “Institutional Animal Care and Use Committee” (IACUC). Los animales se alojaron individualmente y se les concedió un mínimo de un mes para aclimatarse a la colonia antes de comenzar con los estudios de comportamiento.

10 [0332] Se usaron seis monos-ardilla, tres sin lesión y tres con lesión (recibieron 2 mg/kg de MPTP 3 meses antes), para estudiar la ruta óptima de administración de nepicastat. Se examinaron tres enfoques diferentes incluyendo (i) inserción en golosinas, (ii) administración oral por jeringa y (iii) administración oral por sonda. Se ensayó la inserción de solución de nepicastat (5 mg/ml) en malvaviscos en 3 monos sin lesión y se comprobó que se trata de una ruta de administración de droga pobre debido a que los
15 animales se niegan a ingerir las golosinas, probablemente por un sabor adverso. La inyección oral con jeringa con nepicastat (0,5, 2 y 5 mg/kg) en la boca de tres monos sin lesión y tres monos con lesión tampoco fue una ruta aceptable debido a que los animales tendieron a escupir la solución con la concentración de droga más elevada. Se llevó a cabo la administración oral por sonda en 3 monos lesionados con MPTP con la dosis mayor (5 mg/kg) que fue bien aceptada.
20

[0333] Se usaron seis monos-ardilla, tres sin lesión y tres con lesión (recibieron 2 mg/kg de MPTP 3 meses antes), para estudiar la seguridad y tolerancia de nepicastat. Los animales recibieron nepicastat a una concentración de 0,5, 2,0 ó 5,0 mg/kg dos veces por día, (10 am y 2 pm), durante 5 días con un período de dos días de reposo farmacológico
25 entre los diferentes niveles de dosis. El nepicastat se administró con jeringa vía oral para las dosis de 0,5, 2,0 y 5,0 mg/kg y con sonda vía oral para la dosis de 5,0 mg/kg. La droga se toleró bien para las dos dosis menores. Un mono sin lesión que recibió 5,0 mg/kg tenía deposiciones flojas de color beige claro en los dos días finales de la administración, lo que se resolvió mediante la retirada de la droga durante un día.

30 [0334] 24 monos-ardilla, 14 hembras y 10 machos, se utilizaron en un modelo para Parkinson. Los 24 animales se asignaron aleatoriamente a uno de cuatro grupos de tratamiento, con 6 animales por grupo. Los grupos fueron los siguientes: El Grupo A (6 animales) recibió tratamiento con placebo (agua); el Grupo B (5 animales) recibió droga nepicastat a 1 mg/kg/día (0,5 mg/kg dos veces por día); el Grupo C (6 animales) recibió
35 4 mg/kg/día (2 mg/kg dos veces por día); y el Grupo D (6 animales) recibió 10 mg/kg/día (5 mg/kg dos veces por día). En el Grupo B, un animal sufrió muerte aguda después de la lesión con MPTP y no fue reemplazado.

[0335] Previo a la lesión, los animales se sometieron a una evaluación cuantitativa de la actividad motora espontánea utilizando una jaula con un monitor de actividad infrarrojo (IRAM). Todas las sesiones de registro tenían una duración de 60 minutos y se llevaron a cabo durante 10 sesiones durante un período de 2 semanas. El comportamiento de los animales también fue evaluado por 1 a 3 evaluadores clínicos que utilizaron una escala de puntaje de evaluación clínica [clinical rating scale (CRS)] para Parkinson una vez por día (desde las 12 del mediodía hasta 1 pm) por 3 a 5 días consecutivos. Los animales normales típicamente no tenían puntajes mayores de 3 en la escala CRS. Se estableció la actividad de referencia media para cada animal mediante ambos, el monitoreo de la actividad (IRAM) y las evaluaciones clínicas para establecer el puntaje.

[0336] Los animales fueron lesionados mediante la administración de MPTP a una concentración de 2,0 mg/kg (base libre) vía inyección subcutánea para lograr un estado parkinsoniano. Dos a cuatro semanas después de la última lesión con MPTP se llevó a cabo una evaluación de comportamiento post-lesión con MPTP. Se monitoreó la actividad locomotora mediante IRAM en sesiones de 60 minutos durante 3-5 días. El comportamiento clínico (CAS) se evaluó mediante el puntaje de tres evaluadores durante un período de 3 a 5 días.

[0337] En algunos casos, los animales requirieron dosis adicionales de MPTP (2 mg/kg) para obtener un grado de lesión suficiente para exhibir síntomas parkinsonianos, definido como un puntaje total de evaluación clínica mayor de 3. Dentro de las tres semanas de comenzar el estudio de eficacia, todos los animales recibieron una evaluación final del comportamiento post-MPTP (IRAM y CRS). Esta evaluación final post-MPTP se utilizó para establecer un estado clínico parkinsoniano de referencia y se utilizó como valor de pretratamiento para el análisis estadístico.

[0338] Los animales se ensayaron por la respuesta a L-Dopa y la eficacia de la droga nepicastat. La prueba se llevó a cabo 4 a 12 semanas después de la última dosis de MPTP. L-Dopa se administró a una concentración de 2,5, 5 ó 7,5 mg/kg mediante sonda oral dos veces por día (a 10 am y 2 pm) durante 7 días consecutivos. El comportamiento se determinó mediante IRAM y CRS. La evaluación clínica se llevó a cabo 60 a 90 minutos después de la dosis matutina de 10 am los últimos 4 días del tratamiento. Los evaluadores (uno a tres individuos) no conocieron (estaban ciegos para) los diferentes grupos de tratamiento. La evaluación IRAM se realizó durante 90 minutos inmediatamente después de la administración de droga a 2 pm los últimos 2 a 5 días de tratamiento con droga. Había un período de reposo farmacológico mínimo de 2 días entre cada dosis de tratamiento.

[0339] Nepicastat o agua (como placebo) se administraron durante 12 días después de un período de reposo farmacológico mínimo de 2 días después de la dosificación con L-

Dopa. La droga se administró 2 veces por día a las 10 am y 2 pm mediante sonda oral. El comportamiento se evaluó mediante IRAM y CRS. La evaluación clínica con escala CRS se realizó a la mañana, 60 a 90 minutos después de la dosis matutina de 10 am de nepicastat los 5 últimos días del tratamiento con droga. Los evaluadores (uno a tres individuos) no conocieron (estaban ciegos para) los diferentes grupos de tratamiento. Las evaluaciones IRAM se realizaron durante 90 minutos inmediatamente después de la administración de droga a 2 pm los últimos 5 días de tratamiento con droga.

[0340] Para los análisis estadísticos se monitorearon la actividad locomotora y los puntajes de evaluación clínica. La actividad locomotora promedio se calculó antes y después de la lesión con MPTP para cada animal. La lesión pre-MPTP de referencia se determinó promediando diez sesiones de monitoreo de 1 hora de duración. La evaluación del comportamiento post-MPTP (pre-tratamiento) se obtuvo dentro de las tres semanas de comenzar el estudio de eficacia. La actividad locomotora después de la lesión con MPTP se determinó promediando 3 a 5 sesiones de monitoreo (IRAMS) de 1 hora de duración. El monitoreo de la actividad fue informado en la forma de “movimientos/10 minutos”. Un puntaje más alto fue considerado correspondiente a un animal más rápido. La prueba de Wilcoxon con los rangos con signo se utilizó para comparar la actividad antes y después de la lesión con MPTP para cada grupo de animales (grupos A a D).

[0341] La actividad locomotora IRAM se monitoreó cada 10 minutos durante un mínimo de 90 minutos después de cada nivel de droga. Se considera que un puntaje más alto corresponde a un animal más rápido (menos parkinsoniano).

[0342] El análisis estadístico consistió de estadística descriptiva y la representación gráfica de la media de cada uno de bloques de datos de 10 minutos de placebo y droga experimental a 1, 4 y 10 mg/kg. Luego se examinó el gráfico para detectar cualquier tendencia. No se realizó ningún análisis estadístico adicional, ya que no se determinó ninguna diferencia a partir del análisis gráfico.

[0343] No se realizó ningún análisis estadístico que compara la lesión post-MPTP (pre-tratamiento) con 2,5, 5,0 y 7,5 mg/kg de L-Dopa y nepicastat (1,4, 10 mg/kg/día o placebo) debido a una recolección insuficiente de datos IRAM. Sólo se recolectaron sesiones de 60 minutos post-MPTP versus 90 minutos para nepicastat.

[0344] En las mediciones de puntaje de evaluación clínica, ningún animal previo a la lesión con MPTP obtuvo un puntaje mayor de 3 en la escala CRS. Se determinó un puntaje de evaluación clínica post-MPTP dentro de 3 semanas después de comenzar el estudio de eficacia, promediando el valor CRS total de 1 a 3 evaluadores individuales a partir de datos durante de 3 a 5 días consecutivos.

[0345] Se evaluaron ocho características parkinsonianas en cada animal y se derivó el puntaje total a partir de la suma de estas ocho características. Para cada animal se obtuvo un solo puntaje de evaluación clínica para cada dosis de droga, promediando los puntajes de evaluación clínica de todos los evaluadores (uno a tres) obtenidos durante los días consecutivos de dosificación múltiple (con la misma dosis). Este valor CRS promedio se utilizó para el análisis estadístico. Se consideró que un puntaje menor corresponde a un estado con menor comportamiento parkinsoniano.

[0346] El análisis estadístico consistió de: (1) comparaciones entre el valor CRS promedio de placebo y nepicastat a 1, 4 y 10 mg/kg/día, utilizando la ecuación de Kruskal-Wallis (análisis no paramétrico de varianza). Esta comparación se repitió usando el valor CRS promedio para cada concentración de droga experimental corregido por las evaluaciones finales post-MPTP para cada animal. Los puntajes clínicos corregidos son puntajes clínicos de droga experimental a cada concentración expresados como proporción de puntajes clínicos post-MPTP. (2) Comparaciones pareadas entre el valor CRS promedio de lesión post-MPTP (pre-tratamiento) con 2,5, 5,0 y 7,5 mg/kg de L-Dopa y el tratamiento con placebo, utilizando el análisis de Friedman (análisis no paramétrico de varianza, mediciones repetidas). El mismo análisis se realizó para nepicastat a concentraciones de 1, 4 y 10 mg/kg. El análisis post hoc de Dunnett para datos no paramétricos se realizó en caso necesario.

[0347] Se utilizaron IRAM (monitoreo de la actividad) y CRS (escala de evaluación clínica) para evaluar el grado de lesión por MPTP en cada mono-ardilla.

[0348] No había diferencia significativa entre grupos IRAM pre lesión y post lesión, debido al alto grado de variabilidad de movimientos por 10 minutos por animal para el Grupo A: Tratamiento con placebo. Prueba de Wilcoxon con los rangos con signo: $W = 19$, $N = 6$, $P < 0,06$, aceptación de la hipótesis nula. El CRS promedio para el Grupo A fue 8,9, rango 4,8 a 15,4. Todos los animales mostraron un aumento sustancial en los puntajes de evaluación clínica después de la lesión con MPTP. Animales normales (no lesionados) típicamente tienen puntajes menores de 3.

[0349] No había diferencia significativa entre grupos IRAM pre lesión y post lesión, debido al alto grado de variabilidad de movimientos por 10 minutos por animal para el Grupo B: Tratamiento 1 mg/kg/día. Prueba de Wilcoxon con los rangos con signo: $W = 9$, $N = 5$, $p < 0,06$, aceptación de la hipótesis nula. El CRS promedio para el Grupo B fue 10,32, rango 4,3 a 16,1. Todos los animales mostraron un aumento sustancial en los puntajes de evaluación clínica después de la lesión con MPTP. Animales normales (no lesionados) típicamente tienen puntajes menores de 3.

[0350] No había diferencia significativa entre grupos IRAM pre lesión y post lesión, debido al alto grado de variabilidad de movimientos por 10 minutos por animal para el

Grupo C: Tratamiento 4 mg/kg/día. Prueba de Wilcoxon con los rangos con signo: $W = 17$, $N = 6$, $P > 0,06$, aceptación de la hipótesis nula. El CRS promedio para el Grupo C fue 8,97, rango 6,5 a 17,3. Todos los animales mostraron un aumento sustancial en los puntajes de evaluación clínica después de la lesión con MPTP. Animales normales (no lesionados) típicamente tienen puntajes menores de 3.

[0351] No había diferencia significativa entre grupos IRAM pre lesión y post lesión, debido al alto grado de variabilidad de movimientos por 10 minutos por animal para el Grupo D: Tratamiento 10 mg/kg/día. Prueba de Wilcoxon con los rangos con signo: $W = 21$, $N = 6$, $P > 0,06$, aceptación de la hipótesis nula. Todos los animales mostraron un aumento sustancial en los puntajes de evaluación clínica después de la lesión con MPTP. El CRS promedio para el Grupo C fue 8,02, rango 4,0 a 15,6. Animales normales (no lesionados) típicamente tienen puntajes menores de 3.

[0352] Globalmente no se encontró una diferencia significativa en la actividad locomotora medida por IRAM entre las lesiones pre-MPTP (valor de referencia) y las lesiones post-MPTP dentro de los grupos, debido al alto grado de variabilidad de los resultados IRAM para cada animal. Los resultados CRS mostraron una diferencia entre los estados antes y después de la lesión con MPTP. Los animales antes de la lesión con MPTP tenían un puntaje de la escala CRS no mayor de 3. Los animales después de la lesión con MPTP tenían todos un puntaje mayor de 3. Todos los grupos (A a D) tenían un puntaje CRS promedio de 8 a 10 de un total posible de 24.

[0353] No se observaron diferencias detectables entre el tratamiento con placebo y con tres concentraciones diferentes de nepicastat (1, 4, 10 mg/kg/día) en el mono-ardilla lesionado con MPTP. Ambos, los tratamientos con 4 y 10 mg/kg/día de nepicastat y con placebo, mostraron una mejora significativa sobre el estado post-MPTP (pre-tratamiento). Todos los grupos de animales mostraron una mejora significativa con ambos, 5 mg/kg y 7,6 mg/kg de L-Dopa, en comparación con el estado post-MPTP (pre-tratamiento), con la excepción del Grupo C para la dosis 7,5 mg/kg y el Grupo B para la dosis de 5 mg/kg. Ningún grupo de animales mostró una mejora significativa con 2,5 mg/kg de L-Dopa en comparación con post-MPTP.

[0354] Para una comparación entre grupos de tratamiento y L-Dopa, se utilizaron los resultados de la prueba de Friedman, estadística descriptiva y el análisis post hoc con la prueba de Dunnett y se realizó una comparación entre el monitoreo de la actividad del tratamiento con placebo con el monitoreo de todas las otras concentraciones de nepicastat en los puntos de tiempo 10 a 90 minutos post-dosificación. Se graficó cada nivel de dosis de droga para intervalos de 10 minutos. No había diferencia del tratamiento con droga (nepicastat) a los niveles de dosis 4 y 10 mg/kg/día en comparación con el placebo. A 1 mg/kg/día los animales fueron más lentos que con el

- tratamiento con placebo. En base a un análisis comparativo no pareado de 4 grupos de tratamiento diferentes (1, 4 y 10 mg/kg de nepicastat y placebo), nepicastat no produjo ningún efecto significativo en los síntomas parkinsonianos en comparación con el placebo (tratamiento con agua) en el modelo de primate no humano lesionado con MPTP con la enfermedad de Parkinson. En base a un análisis comparativo pareado de animales (animales del mismo grupo examinados pre y post tratamiento), concentraciones de nepicastat a 4 y 10 mg/kg/día mostraron un efecto significativo en los síntomas parkinsonianos en comparación con lesiones post-MPTP (evaluación previa al tratamiento). El placebo tenía un efecto límite significativo. Utilizando la misma comparación pareada, dosis de L-Dopa de 5 y 7,5 mg/kg mostraron un efecto significativo en comparación con el estado después de la lesión con MPTP en todos los grupos con la excepción de los animales del Grupo B (sin efecto a 5 mg/kg de L-Dopa) y del Grupo C (sin efecto a 7,5 mg/kg de L-Dopa). Sin embargo, 2,5 mg/kg de L-Dopa mostraron ningún efecto significativo.
- 15 [0355] Se llevó a cabo un estudio farmacocinético para determinar la concentración plasmática de nepicastat en el mono-ardilla. Este estudio se llevó a cabo simultáneamente con el estudio de seguridad y tolerancia. Se utilizaron tres monos-ardilla lesionados con MPTP (#353, 358 y 374). Para el análisis se recolectó un mililitro de sangre (sacada de la vena femoral de cada animal). Se administró nepicastat a concentraciones de 1, 4 y 10 mg/kg durante 5 días con un período de reposo farmacológico de 2 días entre cada concentración de droga. La sangre para el análisis se recolectó 1 hora previo a la primera dosis para establecer el valor de referencia y 6 horas después de esta primera dosis de droga de cada uno de los diferentes niveles de droga.
- 25 [0356] Se llevó a cabo un segundo estudio farmacocinético para determinar el nivel plasmático de nepicastat en el estado constante. Este estudio se llevó a cabo simultáneamente con el estudio de eficacia en el cual los animales se ensayaron para cada una de tres concentraciones de droga diferentes durante 12 días. Se sacó un mililitro de sangre de la vena femoral 6 horas después de la primera dosis el día 1, luego 6 horas después de la primera dosis el día 7, y finalmente 6 horas después de la primera dosis el día 12. Los niveles plasmáticos de referencia se determinaron con muestras recolectadas la semana anterior a la dosificación con droga.
- 30 [0357] Este estudio también demostró que un análisis pareado que reduce la variabilidad de animal a animal mediante la comparación del mismo animal pre- y post-tratamiento, es más adecuado para detectar un efecto de droga significativo que un estudio no pareado diseñado para el uso con un pequeño número de animales.
- 35

Ejemplo 24

[0358] Ratas macho, espontáneamente hipertensivas (280-345g; Charles River Labs, Kingston, NY) se mantuvieron en ayunas durante la noche y luego se anestesiaron con éter. Se insertó una cánula con tubo PE50 en una arteria femoral y vena femoral para registrar la presión sanguínea y administrar los compuestos, respectivamente. Luego, los animales se colocaron en jaulas MAYO y sus patas se fijaron con cinta a la jaula sin apretar. Se utilizó solución fisiológica heparinizada (50 unidades de heparina sódica / ml) para mantener destapada cada cánula durante todo el experimento. Se registraron continuamente los siguientes parámetros utilizando software Modular Instruments MI² BioReport™ instalado en una computadora personal IBM: presión arterial media (MAP), frecuencia cardíaca (HR) y el cambio de cada parámetro con respecto al valor de referencia a puntos de tiempo específicos del experimento.

[0359] Todos los compuestos se disolvieron el día de uso. Nepicastat se disolvió en agua desionizada (vehículo) a una concentración de base libre de 1 mg/ml. El volumen de dosificación oral para nepicastat o vehículo fue 10 ml/kg. SCH-23390 se disolvió en solución fisiológica (vehículo) a una concentración de base libre de 0,2 mg/ml. Nepicastat o la solución fisiológica se administraron intravenosamente en la forma de un bolo en un volumen de 1,0 ml/kg, seguido por un enjuague con 0,2 ml de solución fisiológica isotónica.

[0360] Después de la preparación quirúrgica, a cada animal se permitió un período de recuperación mínimo de una hora. Los animales se asignaron aleatoriamente a cuatro grupos de tratamiento: vehículo (iv) / vehículo (po); vehículo (iv) / nepicastat (po); SCH-23390 (iv) / vehículo (po); o SCH-23390 (iv) / nepicastat (po). Once animales se estabilizaron (mínimo una hora), se determinaron la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca de referencia tomando un promedio de cada parámetro durante un período de 15 min de tiempo. Una vez establecidos los valores de referencia para la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca, los animales recibieron una dosis intravenosa con SCH-23390 (200 µg/kg) o vehículo (solución fisiológica, 1 ml/kg). Quince minutos más tarde, los animales recibieron la dosis oral de nepicastat (10 mg/kg) o vehículo (agua desionizada, 10 ml/kg).

[0361] Los parámetros registrados se midieron 15 min antes de aplicar la dosis intravenosa para establecer los valores de referencia de la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca. Luego, se midieron los parámetros registrados a los 5, 10 y 15 min después de la administración intravenosa de SCH-23390 o vehículo. Después de la administración oral de nepicastat o vehículo, los parámetros registrados se midieron a 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 y 240 min.

[0362] Al final del experimento, cada animal fue anestesiado con halotano y eutanizado vía decapitación. La corteza, el ventrículo izquierdo (apex) y la arteria mesentérica se

separaron por disección, se pesaron y se fijaron en ácido perclórico 0,4 M. Luego, los tejidos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70° C. En una fecha posterior se realizaron análisis bioquímicos con estos tejidos para determinar los niveles de catecolamina, incluyendo los niveles de dopamina y norepinefrina. La presión sanguínea y la frecuencia cardíaca se analizaron por separado. El cambio del valor de referencia para la presión sanguínea y la frecuencia cardíaca se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con efectos para tratamiento, tiempo y su interacción. Este análisis se realizó para ambos, el período de tiempo post iv y el período de tiempo post oral. Para cada tiempo se realizaron análisis adicionales mediante un ANOVA con un efecto principal para tiempo. Después de cada ANOVA se realizaron comparaciones pareadas mediante la estrategia LSD de Fisher con una corrección de Bonferroni si el efecto global del tratamiento no fue significativo.

[0363] Se realizó un análisis adicional para comparar las medias de referencia para cada grupo de tratamiento mediante un ANOVA con un efecto principal para tratamiento y subsecuentemente se realizaron comparaciones por pares. Se efectuaron comparaciones de SCH-23390 (iv) / vehículo (po) vs vehículo (iv) / vehículo (po), vehículo (iv) / nepicastat (po) vs vehículo (iv) / vehículo (po), y SCH-23390 (iv) / nepicastat (po) vs vehículo (iv) / nepicastat (po).

[0364] No habían diferencias significativas en los valores de referencia de frecuencia cardíaca o presión arterial media entre los grupos de tratamiento.

[0365] El tratamiento intravenoso con SCH-23390 resultó en una disminución significativa ($p < 0,05$) de la frecuencia cardíaca durante el período post-oral a 120 min y 240 min en comparación con el vehículo de control. Nepicastat no disminuyó la frecuencia cardíaca tanto como lo observado en animales tratados con vehículo. Esto fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) a 150 y 180 min post dosis. Debe observarse la gran variabilidad de la frecuencia cardíaca observada durante el transcurso de este experimento.

[0366] La administración intravenosa de SCH-23390 produjo un descenso pequeño (5 ± 1 mmHg) pero significativo ($p < 0,05$) de la presión arterial media en comparación con animales que recibieron vehículo durante el período de 15 min post-iv. El tratamiento oral con nepicastat causó un descenso significativo ($p < 0,05$) de la presión arterial media a los 30 min post dosis que continuó durante la duración del experimento. Un pretratamiento con SCH-23390 no atenuó significativamente los efectos antihipertensivos observados con la administración de solo nepicastat.

35 Ejemplo 25

[0367] Se usaron ratas macho Crl:COBS(WI)BR de 15 semanas de edad. A veinticuatro ratas se implantaron crónicamente implantes telemétricos (TA11PA-C40, Data Sciences,

- Inc., St. Paul, MN) para la medición de presión de sangre arterial, frecuencia cardíaca y actividad motora. La rata se anestesió con pentobarbital sódico (60 mg/kg, ip) y se afeitó su abdomen. Bajo condiciones asépticas se realizó una incisión en la línea media. Se expuso la aorta abdominal y se insertó una cánula con el cateter de una unidad de transmisión telemétrica. Después de suturar el transmisor a la musculatura abdominal, se cerró la piel. Se dejó recuperar a cada rata durante al menos dos semanas antes de someterla a la administración de droga. Tres días previos al inicio del experimento, las ratas se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento: vehículo (p.o.), hidralazina (10 mg/kg, p.o.), nepicastat (30 mg/kg, p.o.), nepicastat (100 mg/kg, p.o.).
- 5 [0368] Se monitorearon presión de sangre sistólica (SBP), presión de sangre diastólica (DBP), presión sanguínea media (MBP), frecuencia cardíaca (HR) y actividad motora (MA). Ambos, nepicastat e hidralazina se prepararon en agua con trazas de Tween 80. Todas las dosis que se administraron oralmente a la rata fueron de 10 ml/kg expresados como equivalentes de base libre.
- 15 [0369] Se utilizó un sistema de recolección de datos computarizado para recolectar continuamente datos de SBP, DBP, MBP, HR y MA. Los datos de cada rata se recolectaron cada 5 min durante 10 seg. Luego estos datos se promediaron horariamente y se calcularon los errores estándar de la media (SEM). Todos los valores se expresaron como medias $\pm$ SEM. La significancia estadística se definió como un nivel de p menor de 0,05. Los datos de MBP, HR y MA se analizaron por separado. Cada análisis se efectuó en 26 puntos de tiempo medidos cada día. Se usó un ANOVA de dos vías con efectos principales para tratamiento y tiempo y su interacción. Si se detectó un efecto global del tratamiento o una interacción significativa, se realiza una serie de ANOVA de una vía en cada punto de tiempo. Las comparaciones por pares en cada punto de tiempo se realizaron utilizando el procedimiento de Dunn. Si no se detectó un efecto global del tratamiento, se determina la diferencia pareada del control mediante el ajuste del valor crítico utilizando un ajuste de Bonferroni.
- 20 [0370] Después de establecer los valores de pre-dosis para estos parámetros, los grupos de ratas respectivos recibieron un tratamiento diario de 7 días con vehículo, nepicastat o hidralazina.
- 30 [0371] La administración oral de nepicastat a 30 mg/kg (todas las dosis expresadas a continuación son po) mostró la tendencia de bajar lentamente la presión sanguínea, pero no indujo un efecto hipotensivo consistente el día 1. A medida que el efecto progresó, se observó un efecto hipotensivo pico de -10 mmHg el día 2 a las 13 horas. Fueron inducidos efectos antihipertensivos de grados similares durante todo el estudio. A 100 mg/kg, el compuesto indujo una respuesta antihipertensiva pico de -11 mmHg a las 22 horas después de dosificar el día 1 ($p < 0,01$). La MBP continuó disminuyendo y alcanzó
- 35

su nadir de aproximadamente -17 mmHg el día 3 ($p<0,01$). La MBP permaneció baja durante todo el estudio.

[0372] Hidralazina a 10 mg/kg causó un efecto hipotensivo inmediato que disminuyó después de 10 horas, y se observó una disminución máxima de -24 mmHg ($p<0,01$) de la MBP dentro de una hora después de la dosificación el día 1. Se observaron efectos hipotensivos transitorios similares durante todo el estudio.

[0373] Nepicastat a 30 y 100 mg/kg no afectó consistentemente HR el día 1. El día 2, sin embargo, nepicastat a 100 mg/kg causó una respuesta bradicárdica de -100 b/mm 3 horas después de la dosificación. Se observaron respuestas bradicárdicas significativas pero menos pronunciadas los días 3-7. En comparación, hidralazina a 10 mg/kg indujo grados variados de taquicardia durante todo el estudio.

[0374] Durante todo el estudio, ninguno de los tratamientos de droga mostró un efecto consistente sobre la MA.

[0375] Los pesos corporales se registraron diariamente. Para el peso corporal, se usó un ANOVA de dos vías con respecto a los cambios a partir de la predosis para analizar los efectos globales para tratamiento, día, e interacción entre tratamiento y día. Luego se realizó un ANOVA de una vía para cada día y se efectuaron comparaciones pareadas para los grupos tratados con droga con referencia a los controles con vehículo utilizando el procedimiento de Dunn y la estrategia LSD de Fisher para ajustar por comparaciones múltiples. En comparación con el tratamiento con vehículo, ninguno de los tratamientos con droga tenía cualquier efecto sobre pesos corporales ($p<0,05$). A pesar de que el tratamiento con nepicastat a 100 mg/kg tendió a disminuir el peso corporal el día 3, no fue estadísticamente significativo.

Ejemplo 26

[0376] Nepicastat reduce la conversión de dopamina a norepinefrina. Ensayos básicos para la actividad de nepicastat miden los niveles plasmáticos o urinarios de dopamina o la relación de dopamina a norepinefrina en plasma u orina. El tratamiento con nepicastat puede aumentar los niveles plasmáticos o urinarios de dopamina o aumentar la relación dopamina/norepinefrina en plasma u orina.

[0377] La Figura 5, muestra los niveles de dopamina urinaria en voluntarios normales después de 24 horas de tratamiento con nepicastat.

[0378] Utilizando el análisis de mediciones repetidas de un modelo de varianza, se detectó un aumento significativo en la relación dopamina/norepinefrina plasmática media en posición supina en sujetos que recibieron 200 mg de nepicastat en comparación con aquellos que recibieron placebo ($p<0,05$). Los niveles de dopamina urinaria aumentaron después de 10 días de dosificación con ambos, 40 mg y 200 mg de nepicastat.

Ejemplo 27

[0379] En pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (CHF), dosis diarias de 40, 80 y 120 mg de nepicastat administradas durante 10 días fueron generalmente bien toleradas. La dosis con la cual aumentó la frecuencia de eventos significativamente adversos fue

5 160 mg.

[0380] Cuatro de 8 pacientes tratados con 160 mg durante 8 días o más desarrollaron una irritación cutánea. Dos de las irritaciones cutáneas estaban acompañadas por prurito. Un paciente también mostró falta de respiración con la irritación cutánea.

[0381] Un paciente tratado con la dosis de 80 mg fue separado del estudio debido a

10 hipotensión ortostática sintomática. Medicaciones concomitantes incluyeron hidralazina y tres diuréticos. Se informó sobre casos ocasionales de hipotensión ortostática en pacientes tratados con todas las dosis, incluyendo placebo. Se informó hipotensión ortostática sintomática en 6 de los 8 pacientes que recibieron 160 mg.

[0382] En un estudio en curso en pacientes con CHF se produjeron 2 muertes: una

15 muerte se debía a un empeoramiento de la CHF (el paciente estaba recibiendo 80 mg qd) y una fue una muerte súbita de un paciente que estaba recibiendo placebo.

[0383] Un evento adverso serio posiblemente relacionado con la droga fue un incremento del nivel de creatinina que requirió hospitalización. Eventos medicinalmente significativos que no se consideran relacionados con la droga de estudio incluyen:

20 empeoramiento de la CHF en 2 pacientes (uno de los cuales tenía subsecuentemente un infarto de miocardio (MI) agudo y un paro cardíaco), angina inestable en un paciente, dolor de pecho atípico en un paciente y una masa adrenal en un paciente que tenía una historia de cáncer de mama.

[0384] En estudios de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, se determinaron

25 cambios en los niveles de dopamina, niveles de norepinefrina y relaciones de dopamina/norepinefrina en plasma después del tratamiento con nepicastat en un estudio de 10 días. El tratamiento con nepicastat aumentó los niveles dopamina/norepinefrina en el estudio de 10 días.

[0385] En estudios de pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva, se determinaron

30 niveles de dopamina, niveles de norepinefrina y relaciones de dopamina/norepinefrina en plasma y cambios de los niveles y las relaciones después de un tratamiento con nepicastat en un estudio de 30 días. El tratamiento con nepicastat aumentó los niveles de dopamina/norepinefrina en el estudio de 30 días.

Ejemplo 28

35 [0386] Se determinaron las relaciones dopamina/norepinefrina en el cerebro de roedores tratados con nepicastat. Las relaciones dopamina/norepinefrina aumentaron en los cerebros de roedores tratados con nepicastat o disulfiram.

[0387] Será fácilmente aparente para un entendido en el arte relevante que pueden efectuarse otras modificaciones y adaptaciones adecuadas a los métodos y las aplicaciones descritos en ésta y que tales modificaciones y adaptaciones pueden realizarse sin apartarse del alcance de la invención o cualquier realización de la misma.

- 5 Si bien la invención ha sido descrita en conexión con ciertas realizaciones, es la intención del inventor cubrir tales alternativas, modificaciones y equivalentes que están incluidas dentro del espíritu y el alcance de la invención definida por las reivindicaciones siguientes.

Ejemplo 29

- 10 [0388] Se utiliza la prueba de emparejamiento demorado con la posición (DMTP) para examinar los efectos potenciales de drogas sobre la memoria a corto plazo y de trabajo en ratas.

- [0389] Previo al comienzo de la prueba de nepicastat en el estudio de emparejamiento demorado con la posición, se realizaron estudios piloto con el objeto de evaluar los efectos comportacionales/fisiológicos de ambos, la administración aguda y repetida de la
15 dosis propuesta más alta de nepicastat (100 mg/kg, p.o.) y establecer la dosis oral máxima tolerada de fisostigmina administrada repetidamente.

- [0390] En estudios piloto, se administró agudamente nepicastat (30 y 100 mg/kg, p.o.) o vehículo a ratas Sprague-Dawley macho (n = 8) que tenían el mismo rango de peso de los animales entrenados (400-480 g). Los animales fueron observados por un observador que no conocía (estaba ciego para) el estado del tratamiento de cada animal a la 1, 3 y 24 h después de la administración de droga o vehículo. Similarmente, en un estudio separado, se administró agudamente fisostigmina (1, 3, 10 ó 30 mg/kg p.o.) o vehículo a grupos de 8 ratas. Las observaciones se efectuaron a 1, 3 y 24 horas después de la
25 administración de droga o vehículo.

- [0391] En estudios piloto de administración repetida, se administró nepicastat (100 mg/kg p.o.) o vehículo dos veces por día (06:00 y 18:00 h) durante 10 días (una vez el día 11) a grupos de 8 ratas. Los pesos de los animales se monitorearon durante todo el estudio y, el día 5, los animales fueron observados “ciegamente” por un observador independiente para evaluar cualquier efecto comportacional/fisiológico manifiesto después de la administración repetida. En un estudio separado, grupos de 8 ratas recibieron vehículo o fisostigmina (0,3, 1, 3 o 10 mg/kg p.o.) utilizando el mismo cronograma de dosificación. Los pesos de los animales se monitorearon durante todo el estudio.

- 35 [0392] Nepicastat (30 o 100 mg/kg, administración aguda p.o.) no indujo ningún cambio comportacional/fisiológico manifiesto. Similarmente, no se produjeron efectos manifiestos por la administración repetida de nepicastat con una dosis de 100 mg/kg p.o.

Sin embargo, en el último estudio, los animales tratados con la droga exhibieron una pérdida media del peso corporal de 28 g después de 11 días, mientras que los controles mostraron un aumento medio del peso corporal de 1 g. Los animales tratados con droga también se volvieron más irritables que los controles después de ser manipulados durante 11 días de estudio.

[0393] La administración aguda de fisostigmina a dosis de 3 mg/kg o mayores indujo efectos comportacionales manifiestos (movimientos de masticar de la boca y salivación). Se observaron signos de toxicidad a 30 mg/kg p.o. (cianosis, temblor, sacudidas de la cabeza, ataxia). La administración repetida de 3 y 10 mg/kg p.o. de fisostigmina fue tóxica (3 de 8 animales se encontraron muertos el día 2 en el grupo de 10 mg/kg, y 2 de 8 animales del grupo 3 mg/kg tuvieron convulsiones el día 5). No se produjeron efectos por administración repetida de 0,3 o 1 mg/kg de fisostigmina.

[0394] Como resultado de estos estudios, la dosis más alta de nepicastat para el estudio DMTP se redujo a 30 mg/kg p.o., y se eligió una dosis de 1 mg/kg p.o. de fisostigmina para la administración repetida.

[0395] En el presente estudio DMTP, se entrenaron ratas para memorizar la posición de una palanca a través de una demora programada de 0, 8, 16 ó 32 s para ganar una recompensa de alimento. Después del entrenamiento, se examinaron los efectos de la administración repetida de nepicastat (1, 3, 10 y 30 mg/kg p.o. b.i.d) o fisostigmina (1,0 mg/kg p.o. b.i.d.) a través de 10 días sucesivos de pruebas en la tarea DMTP. El día 11 del experimento, a los animales que habían sido tratados con nepicastat y fisostigmina se les co-administró escopolamina HBr (0,1 mg/kg, s.c., tiempo pretratamiento 30 min). La dosis de escopolamina fue seleccionada en base a datos de un estudio piloto DMTP en el cual se encontró que 0,1 mg/kg de escopolamina indujeron un deterioro significativo en la exactitud de elección. Además de los animales tratados con nepicastat o fisostigmina, un grupo de animales que previamente había sido tratado con vehículo fue tratado con escopolamina. Otro grupo de ratas recibió solamente tratamiento con vehículo durante todo el experimento. El propósito de la prueba final con escopolamina fue determinar si la administración crónica de nepicastat o fisostigmina podría revertir un deterioro inducido por escopolamina de la exactitud de elección en la tarea DMTP.

[0396] Las mediciones dependientes en el presente estudio incluyeron el porcentaje de elecciones correctas, el tiempo necesario para hacer respuestas de elección y el número de ensayos que los animales eran capaces de completar durante sesiones de 70 min. Los cambios en las mediciones mencionadas en primer lugar pueden indicar cambios de la memoria y/o la función atencional, mientras que los cambios en las dos últimas mediciones pueden indicar otros efectos no cognitivos de las drogas.

[0397] Se usaron 56 ratas macho Sprague-Dawley que pesaron 200-290 g al comienzo del entrenamiento. Las ratas se alojaron en grupos de cuatro por jaula y cada una se alimentó

5 con aproximadamente 12-15 g de alimento por rata por día. Esta cantidad de alimento mantuvo las ratas en aproximadamente 85% de su peso con alimentación libre. A cualquier animal que comenzó a caer por debajo de este peso se proporcionó alimento adicional. El agua estaba libremente disponible. Los animales se mantuvieron con un ciclo de luz/oscuridad 12:12, comenzando el período de luz a las 6 a.m.

[0398] Para la prueba de comportamiento se usaron doce cámaras operativas Campden
10 Instruments con dos palancas retraíbles y un depósito de alimento situado en el centro. Frente al depósito de alimento, se posicionó una clapeta que podía ser empujada hacia atrás por la rata para obtener pellas de alimento. Las cajas se modificaron de modo que a cada lado del depósito de alimento podían insertarse particiones. Las particiones fueron de Perspex transparente, que alcanzaron desde el piso rejilla hasta el techo de la cámara
15 y se extendieron 105 mm en el área central. Las cajas operativas estaban contenidas dentro de armazones que atenuaban el sonido y la luz. Para controlar el sistema operativo se utilizaron Sistemas de control Paul Fray y una computadora Acorn A5000 programada con software Arachnid.

[0399] Con la luz del alojamiento encendida durante toda la sesión, las ratas se
20 entrenaron inicialmente para recoger pellas de alimento Noyes 45 mg Fórmula A que estaban atrás de la clapeta del depósito. Luego, las ratas se entrenaron para oprimir ambas, las palancas izquierda y derecha, para obtener la recompensa de alimento. Durante una sesión de 30 mm se presentó aleatoriamente la palanca izquierda o derecha. Una respuesta a la palanca insertada resultó en la retracción de la palanca, la entrega de
25 una pella de alimento y la iluminación de la luz del depósito. La luz del depósito permaneció encendida hasta recoger la pella.

[0400] Como próximo paso comenzó el entrenamiento del emparejamiento con la posición. Este y todos los entrenamientos subsecuentes se condujeron con las particiones colocadas en las cajas operativas. Las sesiones tenían inicialmente una duración de 50
30 minutos. Las ratas se colocaron en la caja operativa y la sesión comenzó en el momento de iluminarse la luz del alojamiento. Después de un intervalo entre ensayos (ITI) de 30 s, se insertó una de las dos palancas (la palanca muestra) en la cámara. La palanca permaneció insertada en la cámara hasta que se produjo una respuesta que consistió en presionar la palanca. Una respuesta a la palanca resultó en la retracción de la palanca y
35 la iluminación de la luz del depósito (pero sin entrega de pella). Apenas se empujó la clapeta del depósito, se apagó la luz del depósito y se insertaron ambas palancas. Una respuesta a la palanca muestra (es decir, la misma palanca presentada previamente)

- resultó en la retracción de ambas palancas, la entrega de una pella de alimento y la iluminación de la luz del depósito. La luz del depósito permaneció encendida hasta empujar la clapeta. Una respuesta a la palanca incorrecta (la palanca opuesta a la presentada como palanca muestra) no produjo una pella de alimento e inició un período
- 5 de espera (TO) de 10 s durante el cual se apagó la luz del alojamiento. Se inició un intervalo entre pruebas (ITI) de 30 s antes de comenzar con un nuevo ensayo. La palanca insertada como palanca muestra se determinó semi-aleatoriamente, de modo que las palancas de derecha e izquierda se presentaron como palanca muestra 8 veces en un bloque de 16 pruebas.
- 10 **[0401]** Durante este y todos los demás entrenamientos se utilizó un procedimiento de corrección. La palanca a ser insertada (izquierda o derecha) como palanca muestra fue determinada aleatoriamente por la computadora en los ensayos no corregidos (es decir, el primer ensayo de la sesión y los ensayos que siguieron inmediatamente a un ensayo en el cual se produjo una elección correcta). Cada vez que se produjo una respuesta
- 15 incorrecta, la palanca que no había sido elegida (es decir, la palanca “correcta”) fue presentada como palanca muestra en el ensayo “de corrección” subsecuente. Estos ensayos de corrección previnieron hábitos de posición (es decir, de responder siempre a la palanca izquierda o derecha y lograr así un 50% de respuestas correctas). El número de ensayos de corrección se registró, pero solamente se usaron los datos recolectados
- 20 con los ensayos no corregidos para evaluar el porcentaje de elecciones correctas.
- [0402]** Después de 24 sesiones, los animales realizaron la tarea de emparejamiento con la posición con un alto grado de exactitud. En la sesión 25, se interpuso un intervalo de demora variable entre la presión de la palanca muestra y la presentación de las palancas en la prueba de elección. Después de una respuesta a la palanca muestra, las palancas de
- 25 elección se insertaron después del primer empuje a la clapeta con una demora de 0 s (inmediato), 4, 8 ó 16 s. El orden de los cuatro tipos de ensayo (demora de 0, 4, 8 ó 16 s) se determinó semi-aleatoriamente con la restricción de que en un bloque de 16 pruebas, cada demora se produjo 4 veces; dos veces con una prueba con palanca izquierda y dos veces con una prueba con palanca derecha. Se usó una espera limitada, de modo que
- 30 cuando la rata no hizo su elección de respuesta dentro de 30 s del final del período de demora programado, la prueba terminó y comenzó el intervalo entre pruebas. Tal intervalo se contó como incompleto y no contribuyó con el análisis de los datos. La misma prueba se reincorporó al final del intervalo entre pruebas. Desde la sesión 25 en adelante se omitió el período de espera después de elecciones incorrectas y la duración
- 35 de la sesión se aumentó a 70 minutos.
- [0403]** Después de 26 sesiones con la demora 0-16 s (sesiones 25-50), el intervalo entre pruebas se disminuyó a 10 s y, durante las próximas 8 sesiones (sesión 51-58), se usó

una demora de hasta 64 s. Debido al bajo rendimiento con la demora de 64 s, sin embargo, no se utilizó esta demora en cualquier sesión posterior. En la sesión 59, se usaron demoras de 0, 8, 16 y 32 s. Estas demoras se usaron en todas las sesiones subsecuentes. Sólo 51 de 56 ratas completaron más de 24 pruebas (corregidas plus no corregidas) durante la sesión 59. Estas ratas se seleccionaron y se asignaron semi-aleatoriamente a los 7 grupos siguientes, de modo que los grupos coincidieron en rendimiento (porcentaje de respuestas correctas, tiempo necesario para responder y número de ensayos completados): vehículo/vehículo (n=7), vehículo/escopolamina (n=), nepicastat 1,0 mg/kg/escopolamina (n=7), nepicastat 3,0 mg/kg/escopolamina (n=7), nepicastat 10,0 mg/kg/escopolamina (n=7), nepicastat 30 mg/kg/escopolamina y fisostigmina/escopolamina (n=8).

[0404] A las 6:00 am y 6:00 pm de los días consecutivos durante los cuales se realizaron las sesiones 60-69, las ratas recibieron una administración oral de ya sea vehículo, fisostigmina (Phys) o nepicastat (1, 3, 10 ó 30 mg/kg). Debido al alto grado de exactitud de elección exhibido por los animales tratados con vehículo durante las sesiones 68 y 69, la demora de 0, 8, 16 y 32 s también se utilizó durante la sesión de la prueba final (sesión 70) en la cual todas las ratas, con excepción del grupo tratado con vehículo/vehículo, recibieron 0,1 mg/kg de escopolamina HBr administrados s.c. 30 minutos previos a la prueba. Los animales del grupo vehículo/vehículo recibieron una inyección s.c. de solución fisiológica 30 minutos antes de la sesión de la prueba final. Por lo tanto, los tratamientos con droga administrados a los siete grupos durante los 11 días consecutivos del presente experimento fueron:

Grupo	Sesiones 60-69 (demora 0, 8, 16 y 32 s)	Sesión 70 (demora 0, 4, 8 y 32 s)
1	vehículo	vehículo/vehículo
2	vehículo	vehículo/escopolamina
3	nepicastat 1,0 mg/kg	nepicastat 1,0 mg/kg/escopolamina
4	nepicastat 3,0 mg/kg	nepicastat 3,0 mg/kg/escopolamina
5	nepicastat 10 mg/kg	nepicastat 10 mg/kg/escopolamina
6	nepicastat 30 mg/kg	nepicastat 30 mg/kg/escopolamina
7	fisostigmina	fisostigmina/escopolamina

[0405] Los datos recolectados y analizados en el presente estudio DMTP incluyen 1) el porcentaje de respuestas correctas; 2) el tiempo transcurrido entre la realización de una

respuesta a la palanca muestra y la realización de la respuesta de elección y 3) el número total de pruebas corregidas y no corregidas completadas. Las últimas dos mediciones dependientes se recolectaron solamente para pruebas no corregidas.

5 [0406] Para aumentar la potencia y sensibilidad de los análisis estadísticos, durante las primeras 10 sesiones de tratamiento con droga (sesiones 60-69), los datos se reunieron en bloques de dos sesiones (Bloque 1-5), si bien se incluyen los valores de los datos recolectados desde el Día 1 hasta el Día 10 del estudio. También, debido a que los animales de los grupos vehículo/vehículo y vehículo/escopolamina recibieron el mismo tratamiento durante los primeros 10 días de la prueba, se combinaron los animales de
10 estos dos grupos con el propósito del análisis estadístico para los Bloques 1-5.

[0407] Para analizar el porcentaje de elecciones correctas y el tiempo necesario para la respuesta, se usó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, tomando el tratamiento con droga como el factor entre individuos, y la demora (0, 8, 16 ó 32 s) como el factor intraindividual. Estos análisis se condujeron por separado para cada bloque de datos. Se
15 siguió con un análisis de interacciones significativas mediante ANOVA de una vía que se realizó para cada demora. Después de un análisis del efecto principal significativo mediante ANOVA de una vía se realizó una prueba t de Dunnett de dos colas. Si apropiado, se usó ANOVA de una vía seguido por una prueba de Dunnett post hoc para analizar la media del número de pruebas realizadas.

20 [0408] Todas las pruebas estadísticas se realizaron con una computadora Macintosh utilizando software SuperAnova. Alfa se estableció siempre como 0,05. Los animales que fueron incapaces de completar las pruebas con cada uno de los cuatro períodos de demora se excluyeron de los análisis del porcentaje de elecciones correctas y de demora de la respuesta. Se registró el número de animales incluidos en los análisis de porcentaje
25 de elecciones correctas y demora a la respuesta para cada uno de los 5 bloques de pruebas con droga y el día de prueba con escopolamina (scop). Para evaluar los efectos globales de las drogas sobre la capacidad de realizar la tarea de emparejamiento demorado con la muestra, se incluyeron todos los animales en el análisis del número de pruebas completadas.

30 [0409] Sulfato de fisostigmina (1,0 mg/kg, provisto por RBI) y nepicastat (1, 3, 10 y 30 mg/kg, provisto por Roche) se administraron p.o. dos veces por día comenzando a las 6:00 am y 6:00 pm. Escopolamina HBr (0,1 mg/kg, provisto por Sigma) fue administrado s.c. 30 minutos antes de la última sesión de prueba. Fisostigmina y nepicastat se disolvieron o suspendieron en agua destilada y se inyectaron en un
35 volumen de 2,5 ml/kg. Escopolamina HBr se disolvió en solución fisiológica y se inyectó en un volumen de 1,0 ml/kg. Todas las dosis de droga se expresan como peso de base.

[0410] Durante los primeros bloques de prueba, las drogas no tuvieron efectos significativos sobre el porcentaje de elecciones correctas o la demora para realizar una respuesta de elección en la tarea DMTP. El tratamiento con droga tampoco afectó el número de pruebas completadas, $F(5,45)=0,319$, $p=0,899$.

- 5 [0411] En el bloque 2, nepicastat y fisostigmina no tuvieron efectos significativos sobre cualquiera de las mediciones dependientes durante este bloque de pruebas. Si bien el efecto no fue estadísticamente significativo, $F(5,45)=1,717$, $p=0,150$, se observó una tendencia hacia una disminución del número de pruebas completadas. Este efecto aparente fue ligeramente más marcado en los grupos tratados con 3 ó 30 mg/kg de
10 nepicastat, y en el grupo tratado con fisostigmina. En efecto, durante este bloque de entrenamiento, sólo 4 de los 7 animales tratados con 30,0 mg/kg de nepicastat fueron capaces de completar los ensayos con todas las cuatro demoras.

- [0412] Durante el bloque 3 de las pruebas, los animales tratados con fisostigmina exhibieron un deterioro de la exactitud de selección independiente de la demora. El
15 análisis ANOVA con el porcentaje de elecciones correctas reveló un efecto principal significativo del tratamiento con droga, pero la interacción tratamiento con droga X demora no alcanzó significancia estadística. Una prueba post hoc de Dunnett sobre el efecto principal del tratamiento con droga reveló que sólo el grupo tratado con fisostigmina difirió significativamente del grupo tratado con vehículo. El tratamiento
20 con droga no afectó significativamente la demora a la respuesta o el número de prueba completadas, $F(5,45)=0,701$, $p=0,625$, durante este bloque de pruebas.

- [0413] Los efectos del tratamiento con droga sobre el porcentaje de elecciones correctas se acercó a, pero no alcanzó, una significancia estadística en el bloque 4 ($p=0,056$). El
tratamiento con droga, sin embargo, deterioró significativamente la demora a la
25 respuesta, revelando el análisis ANOVA una interacción significativa tratamiento con droga X demora. ANOVAS de una vía subsecuente conducidos con demoras de 0, 8, 16 y 32 s encontraron un efecto de grupo estadísticamente significativo sólo para la demora de 32 s; $F(5,40)=2,115$, $p=0,084$; $F(5,40)=1,403$, $p=0,244$; $F(5,40)=2,259$, $p=0,067$; $F(5,40)=3,325$, $p=0,013$, para las demoras de 0, 8, 16 y 32 s, respectivamente. Una
30 prueba post hoc de Dunnett con la demora de 32 s encontró que sólo el grupo tratado con 10,0 mg/kg de nepicastat tenía una demora mayor para realizar las respuestas de elección que el grupo tratado con vehículo. El tratamiento con droga no afectó significativamente el número de ensayos completados durante el Bloque 4 de la prueba, $F(5,45)=1,533$, $p=0,199$.

- 35 [0414] Durante el Bloque 5 de pruebas, nepicastat indujo un marcado deterioro de la exactitud de elección dependiente de la dosis y la demora. Un análisis ANOVA de dos vías reveló una interacción significativa de tratamiento con droga X demora y ANOVAS

de una vía subsecuentes con demoras de 0, 8, 16 y 32 s encontraron una diferencia grupal significativa en el porcentaje de elecciones correctas solamente con la demora de 32 s, $F(5,39)=0,327$, $p=0,894$; $F(5,39)=0,825$, $p=0,539$; $F(5,39)=1,188$, $p=0,333$; $F(5,39)=3,018$, $p=0,021$, para las demoras de 0, 8, 16 y 32 s, respectivamente. Una prueba post hoc de Dunnett conducida con la demora de 32 s encontró que ambos, los grupos tratados con 10 y 30 mg/kg de nepicastat mostraron deterioros del porcentaje de elecciones correctas en relación con los animales tratados con vehículo.

[0415] Nepicastat y fisostigmina no afectaron significativamente la demora a la respuesta o el número de prueba completadas, $F(5,45)=1,692$, $p=0,156$, durante el Bloque 5 de la prueba.

[0416] Muchos animales no realizaron la prueba de emparejamiento demorado con la muestra después de la administración de escopolamina HBr. Sólo una rata tratada con 10,0 mg/kg de nepicastat plus escopolamina, y solo 2 ratas tratadas con 30,0 mg/kg de nepicastat plus escopolamina fueron capaces de completar las pruebas con cada una de las cuatro demoras. En efecto, se produjo $n < 4$ en todos los grupos, con excepción de los grupos vehículo/vehículo y vehículo/escopolamina en los cuales siete y cuatro ratas, respectivamente, completaron las pruebas con cada una de las cuatro demoras.

[0417] El número de pruebas completadas por los animales en todos los grupos tratados con escopolamina fue significativamente reducido, $F(6, 16)=8,801$, $p=0,001$.

[0418] Debido al pequeño número de sujetos en los grupos tratados con escopolamina, la exactitud de los datos de elección y demora a la respuesta no se sometió a ANOVA. Además, el porcentaje medio de elecciones correctas colapsó a través de las cuatro demoras. Una prueba t que compara la exactitud de elección en el grupo vehículo/escopolamina con la exactitud en el grupo vehículo/vehículo encontró que escopolamina deterioró significativamente el porcentaje de elecciones correctas, $t(9)=4,15$, $p=0,003$. Con menos de 4 sujetos en los otros grupos, no se condujeron análisis estadísticos adicionales. Es interesante de observar, sin embargo, que los dos animales en el grupo al que se administraron 30 mg/kg de nepicastat plus escopolamina se desempeñaron bien en comparación con el grupo tratado solamente con escopolamina: ambos animales tratados con 30,0 mg/kg de nepicastat plus escopolamina hicieron más elecciones correctas que cualquiera de los animales en el grupo tratado con vehículo/escopolamina o cualquiera de los animales en los otros grupos tratados con escopolamina.

[0419] Nepicastat, al ser administrado solo, no parece inducir efectos que mejoran la memoria en la prueba DMTP. Es notable que el deterioro de la memoria inducido por demora observado en los animales de control tratados con vehículo parece disiparse a través de los cinco bloques de prueba. Sin embargo, en el quinto bloque de pruebas, los

animales de control tratados con vehículo mostraron todavía un deterioro de la memoria dependiente de la demora, con 100% de exactitud de elección con la demora de 0 s y 80% de exactitud de elección con una demora de 32 s. Por lo tanto, no se observó un efecto límite superior del rendimiento de los animales tratados con vehículo con una demora de 32 s.

[0420] Notablemente, en el quinto bloque de entrenamiento, nepicastat puede tener efectos disruptores de la memoria selectiva. La fisostigmina no mejoró el rendimiento en cualquiera de los días de tratamiento y produjo realmente un deterioro de la exactitud de elección independientemente de la demora durante el Bloque 3 de pruebas (Días 5 y 6).

No era posible analizar los resultados de una prueba de estímulo con escopolamina realizada el día 11, en la cual a los animales se co-administraron escopolamina HBr (0,1 mg/kg) y nepicastat o fisostigmina, debido al pequeño número de sujetos en los grupos tratados con nepicastat y fisostigmina que eran capaces de realizar la tarea DMTP. Sin embargo, dos ratas que recibieron 30,0 mg/kg de nepicastat y escopolamina que fueron capaces de realizar la prueba DMTP exhibieron una mayor exactitud de elección que cualquiera de los otros animales tratados con escopolamina. Es posible que nepicastat sea capaz de revertir algo del efecto de disrupción cognitiva inducido por escopolamina, un efecto que puede haber sido enmascarado por otras acciones “no cognitivas” del compuesto.

[0421] Nepicastat indujo deterioros significativos dependientes de la dosis y la demora en la exactitud de elección. Los animales tratados con 10,0 mg/kg de nepicastat mostraron una ausencia absoluta de deterioros en la exactitud de elección con demoras de 0, 8 y 16 s. Al contrario, con una demora de 32 s, los animales del grupo de 10,0 mg/kg mostraron una exactitud de elección deteriorada en relación con el grupo tratado con vehículo. El grupo tratado con la dosis más alta de 30,0 mg/kg de nepicastat mostró ningún deterioro de la exactitud de elección con una demora de 0 s, una tendencia a exactitud de elección deteriorada con demoras de 8 y 16 s, y un deterioro significativo de la exactitud de elección con relación a los grupos tratados con vehículo con la demora de 32 s. La naturaleza dependiente de la demora de estos deterioros en la exactitud de elección inducidos por la droga sugiere que el compuesto podría actuar directamente sobre la memoria a corto plazo o de trabajo. Los animales están suficientemente motivados y son capaces de realizar con exactitud la tarea DMTP con demoras más cortas, y muestran deterioros solamente con un intervalo de retención largo. Pocos compuestos que han sido ensayados con este modelo mostraron este perfil. Muchos compuestos de los cuales se afirma que deterioran la memoria inducen típicamente deterioros en la exactitud de elección observados con todas las demoras (por ejemplo, MK-801, escopolamina). Nepicastat tenía un pequeño efecto sobre el tiempo necesario

para completar las pruebas, lo que fue aparente en el cuarto bloque de entrenamiento, durante el cual los animales tratados con 10,0 mg/kg de nepicastat necesitaron más tiempo para completar las pruebas con 32 s de demora que los animales tratados con vehículo. Este efecto no fue dependiente de la dosis y no se observó en el grupo tratado con 30,0 mg/kg. También se observó una tendencia para los animales tratados con nepicastat de completar menos pruebas que los animales tratados con vehículo: estas tendencias de reducciones del número de pruebas completadas se observaron durante los últimos dos bloques de entrenamiento. Debido a la variabilidad de los datos, sin embargo, estas tendencias no alcanzaron significancia estadística. Esta variabilidad de los datos fue inesperada. Parece probable que el estrés inicial inducido por el régimen de dosificación oral crónica interrumpió el rendimiento de estos animales privados de comida, particularmente durante los primeros pocos bloques del experimento. Todos los grupos mostraron una reducción del número de pruebas completadas durante el primer y segundo bloque de entrenamiento. Los animales se recuperaron de esta declinación inicial y mostraron un rendimiento más consistente a través de los próximos tres bloques de entrenamiento.

[0422] Encontramos que algunos animales de este estudio comenzaron a perder peso, en algunos casos más del 5% del peso corporal total. Los animales que mostraron pérdida de peso se separaron y se les proporcionó alimento adicional al final de su sesión diaria de entrenamiento. Esta alimentación extra puede haber contribuido con la variabilidad en el número de pruebas completadas. Si bien no se efectuaron registros sistemáticos, la observación casual sugirió que más animales del grupo 30 mg/kg necesitaron alimento adicional que animales de otros grupos. Esta observación es consistente con los resultados de un estudio piloto en el cual la administración diaria de 100 mg/kg p.o. de nepicastat indujo una marcada pérdida de peso corporal.

[0423] Fisostigmina no mejoró el rendimiento de las ratas en la prueba DMTP. En efecto, los animales tratados con fisostigmina mostraron un deterioro significativo en el porcentaje de elecciones correctas durante el Bloque 3 de entrenamiento. Contrariamente a los efectos obtenidos con nepicastat, el deterioro de la exactitud de elección inducido por fisostigmina fue independiente de la demora. El término de interacción del análisis de varianza no alcanzó significancia estadística. Por lo tanto, los efectos de fisostigmina sobre la exactitud de respuesta son probablemente secundarios con respecto a los efectos tóxicos comportamentales de la droga al ser administrada a esta dosis. Parece que los animales desarrollaron tolerancia a estos efectos durante los últimos dos bloques de entrenamiento durante los cuales los deterioros de la exactitud de elección inducidos por fisostigmina no alcanzaron más significancia estadística.

[0424] Finalmente, parece que la fisostigmina no revierte los efectos de escopolamina durante la prueba con escopolamina. Es posible que una dosis diferente de fisostigmina pueda haber sido efectiva contra escopolamina. No hemos intentado previamente revertir la acción de escopolamina con fisostigmina utilizando el presente régimen de dosificación, y por lo tanto no disponemos de datos históricos para la comparación con los resultados presentes. Esta falta de efecto de fisostigmina puede ser debido al hecho de que, en comparación con la administración aguda, debía emplearse una dosis menor de fisostigmina para la administración crónica. Los animales no hubiesen tolerado la administración repetida de una dosis mayor de fisostigmina (vea los resultados del estudio piloto), lo que podía haber sido necesario para revertir los efectos de escopolamina. Además, nepicastat parece no revertir los efectos de escopolamina, si bien es interesante que los dos animales tratados con 30,0 mg/kg de nepicastat que fueron capaces de responder durante la prueba de escopolamina mostraron una mayor exactitud de elección que cualquiera de los animales en cualquiera de los otros grupos tratados con escopolamina. Se necesitaría una investigación adicional para determinar inequívocamente si un tratamiento agudo o crónico con nepicastat puede revertir los efectos de escopolamina en esta prueba.

[0425] Nepicastat parece tener efectos específicos disruptores sobre la memoria que son aparentes después de 8 días de dosificación. La fisostigmina no mejoró el rendimiento en cualquiera de los días de tratamiento y produjo realmente un deterioro de la exactitud de elección independientemente de la demora durante el Bloque 3 de pruebas (Días 5 y 6). No era posible analizar los resultados de una prueba de estímulo con escopolamina realizada el día 11, en la cual a los animales se co-administraron escopolamina HBr (0,1 mg/kg) y nepicastat o fisostigmina, debido al pequeño número de sujetos en los grupos tratados con nepicastat y fisostigmina que eran capaces de realizar la tarea DMTP. Sin embargo, dos ratas que recibieron 30,0 mg/kg de nepicastat y escopolamina que fueron capaces de realizar la prueba DMTP exhibieron una mayor exactitud de elección que cualquiera de los otros animales tratados con escopolamina. Es posible que nepicastat sea capaz de revertir algo del efecto de disrupción cognitiva inducido por escopolamina, un efecto que puede haber sido enmascarado por otras acciones “no cognitivas” del compuesto. Durante el bloque final de entrenamiento, nepicastat indujo deterioros en la exactitud de elección dependientes de la dosis y la demora. Este es un hallazgo inesperado, ya que muchas otras drogas que disruptoras de la memoria, tales como escopolamina y MK-801, inducen deterioros en la exactitud de elección independientes de la demora, debidos probablemente a deterioros de la atención y/o factores motores/motivacionales. En cambio, es poco probable que cambios en atención o rendimiento motor/motivación podrían explicar los presentes resultados con nepicastat.

Si esta droga es selectiva para un nuevo receptor o mecanismo farmacológico, estos resultados sugieren un rol importante para este sustrato en la memoria de trabajo.

Ejemplo 30

[0426] Recientemente hemos demostrado que nepicastat, un inhibidor selectivo de dopamina-β-hidroxilasa, exhibió una actividad antihipertensiva efectiva en estudios agudos en ratas SHR. Los efectos antihipertensivos de nepicastat se examinaron crónicamente en la misma cepa de ratas. Además, también exploramos los posibles efectos de potenciación de la co-administración del compuesto con el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina enalapril. También se examinaron los efectos de los tratamientos sobre la hipertrofia cardíaca en ratas SHR.

[0427] Se utilizaron ratas SHRs/NCrl BR macho (de 22-28 semanas de edad al comienzo de la dosificación), y ratas WKY/NCrl BR del mismo peso. Se condujeron secuencialmente cuatro series de experimentos.

Serie I

- 15 Vehículo
- Enalapril 10 mg/kg
- nepicastat 3 mg/kg
- nepicastat 10 mg/kg

Serie II

- 20 Vehículo
- Enalapril 10 mg/kg
- nepicastat 30 mg/kg
- nepicastat 100 mg/kg

Serie III

- 25 Vehículo
- Enalapril 1 mg/kg
- nepicastat 30 mg/kg
- nepicastat 30 mg/kg + enalapril 1 mg/kg

Serie IV

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

[0428] En cada serie, a 24 ratas SHR se implantaron crónicamente implantes telemétricos para la medición de presión sanguínea arterial, frecuencia cardíaca y actividad motora. La rata se anestesió con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.) y se afeitó su abdomen. Bajo condiciones asépticas se realizó una incisión en la línea media.

Se expuso la aorta abdominal, y se insertó una cánula con el cateter de una unidad de transmisión telemétrica. Después de suturar el transmisor a la musculatura abdominal, se cerró la piel. Se dejó recuperar a cada rata durante al menos dos semanas antes de someterla a la administración de droga. Las ratas se alojaron individualmente en un ambiente tranquilo con un ciclo luz/oscuridad invertido (08:00-20:00, luces apagadas).

5 [0429] Tres días antes del inicio del experimento, las ratas se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos y se monitoreó su presión sanguínea sistólica (SBP), presión sanguínea diastólica (DBP), presión sanguínea media (MBP), frecuencia cardíaca (HR) y actividad motora (MA). Después de establecer los valores predosis para estos parámetros, los grupos de ratas respectivos recibieron un tratamiento diario durante 30 días de nepicastat y/o enalapril (vea abajo).

10 [0430] Veinticuatro horas después del último tratamiento, las ratas se sacrificaron y los ventrículos izquierdos se recolectaron, se pesaron (peso húmedo), y se liofilizaron durante al menos 24 horas para obtener pesos secos.

15 [0431] Al principio de cada experimento, el número de ratas en cada grupo sometido a monitoreo telemétrico fue siempre 6. En la Serie I, sin embargo, se alojaron en forma similar 7 ratas Wistar Kyoto (WKY) y se dosificaron con vehículo (agua), mientras que en las Series III y IV se trataron similarmente 2 ratas adicionales en cada grupo (para aumentar el número de animales para el análisis estadístico de efectos sobre la hipertrofia de ratas SHR). Con estas ratas no se realizó ninguna instrumentación telemétrica ni monitoreo.

20 [0432] Ambos, nepicastat y enalapril, se prepararon en agua. Todas las dosis que se administraron oralmente a la rata fueron de 10 ml/kg expresados como equivalentes de base libre. Enalapril (Vasotec®) se obtuvo comercialmente de una farmacia local.

25 [0433] Se utilizó un sistema de recolección de datos computarizado para recolectar continuamente datos de SBP, DBP, MBP, HR y MA. Los datos de cada rata se recolectaron cada 5 min durante 10 seg. Luego estos datos se promediaron horariamente y se calcularon los errores estándar de la media (SEM). Al final del tratamiento, se obtuvo la masa ventricular izquierda (peso seco y húmedo). Los pesos corporales se registraron diariamente.

30 [0434] Todos los valores se expresaron como medias $\pm$ SEM. La significancia estadística se definió como un nivel de p menor de 0,05.

[0435] Los datos de MBP, HR y MA se analizaron por separado. Cada análisis se efectuó en 26 puntos de tiempo medidos cada día. Se usó un ANOVA de dos vías con efectos principales para tratamiento y tiempo y su interacción. Si se detectó un efecto global del tratamiento o una interacción significativa, se realiza una serie de ANOVA de una vía en cada punto de tiempo. Las comparaciones por pares en cada punto de tiempo

se realizaron utilizando el procedimiento de Dunn. Si no se detectó un efecto global del tratamiento, se determina la diferencia pareada del control mediante el ajuste del valor crítico utilizando un ajuste de Bonferroni.

5 [0436] Para la masa ventricular izquierda, se usó un análisis de covarianza con una covariable de pesos corporales finales para analizar los pesos húmedos del tejido y los pesos secos del tejido, mientras que se usó la prueba de Kruskal-Wallis para analizar las relaciones peso húmedo del tejido / peso corporal y peso seco del tejido / peso corporal. Si no se detectó un efecto global del tratamiento entre todos los grupos, se realizó el ajuste de Bonferroni para comparaciones múltiples.

10 [0437] Para el peso corporal, se usó un ANOVA de dos vías con respecto a los cambios a partir de la predosis para analizar los efectos globales para tratamiento, día, e interacción entre tratamiento y día. Luego se realizó un ANOVA de una vía para cada día, y se efectuaron comparaciones pareadas entre los grupos tratados con droga y los controles con vehículo, usando el procedimiento de Dunn y la estrategia LSD de Fisher para ajustar por comparaciones múltiples.

15 [0438] Para las Series I y II, la administración oral de nepicastat a 3 y 10 mg/kg (todas las dosis expresadas en lo sucesivo son po) no afectó significativamente la presión sanguínea en cualquiera de los 30 días de tratamiento (datos no mostrados). A 30 mg/kg, nepicastat disminuyó gradualmente la MBP el día 1 y continuó bajando la MBP a un máximo de -20 mmHg el día 3 ($p < 0,01$), con poca recuperación dentro de 24 h. Fueron inducidos efectos antihipertensivos similares durante todo el estudio. A 100 mg/kg, el compuesto indujo una respuesta antihipertensiva pico de -29 mmHg a las 21 horas después de dosificar el día 1 ($p < 0,01$). La MBP continuó disminuyendo y alcanzó su nadir de aproximadamente -42 mmHg el día 3 ($p < 0,01$). La MBP permaneció baja durante todo el estudio.

[0439] Enalapril a 10 mg/kg disminuyó consistentemente la MBP durante todo el estudio. Una disminución máxima de -29 mmHg ($p < 0,01$) de la MBP se observó dentro de 1 hora después de la dosificación el día 5.

30 [0440] En la Serie III, si bien la mono-administración de enalapril a 1 mg/kg ($n=6$) o nepicstat a 30 mg/kg ($n=6$) indujo sólo un pequeño efecto antihipertensivo, la co-administración de los dos compuestos ($n=6$) indujo una mayor respuesta antihipertensiva (-21 mmHg a las 16 horas del día 1, $p < 0,01$). El inicio de la respuesta fue lento y gradual. Con una segunda administración el día 2, con el tratamiento combinado se observó una mayor respuesta antihipertensiva durante la mayor parte del día (-25 mmHg a las 13 horas, $p < 0,01$). La potenciación se observó durante todo el estudio.

35 [0441] En la serie IV, la potenciación de los efectos de nepicastat mediante una dosis no antihipertensiva de enalapril se estudió con mayor detalle. En la presencia de enalapril (1

mg/kg), a pesar de que nepicastat a 60 mg/kg produjo inicialmente un efecto antihipertensivo mayor y más prolongado que los efectos inducidos por el compuesto a 15 ó 30 mg/kg, no se observó un efecto mayor los días 8 a 30. Por lo tanto, la potenciación no estaba relacionada con las dosis de nepicastat ensayadas (15, 30 y 60 mg/kg). El grupo que recibió 15 mg/kg de nepicastat y E1 exhibió una presión sanguínea media promedio baja con un gran error estándar (dos ratas mostraron respuestas antihipertensivas mayores que el resto).

[0442] Nepicastat a 3 y 10 mg/kg no afectó consistentemente la frecuencia cardíaca (HR) en los estudios de 30 días. Los grupos tratados con nepicastat a 100 mg/kg, sin embargo, tendieron a exhibir HRs menores que el grupo de control con vehículo, al menos en las primeras pocas horas después de la dosificación. A pesar de que enalapril a 1 mg/kg no afectó la HR, a 10 mg/kg el compuesto tendió a inducir una pequeña taquicardia transitoria dentro de 2 horas después de la dosificación. En la serie III, ninguno de los tratamientos, es decir, enalapril (1 mg/kg), nepicastat (30 mg/kg) o la combinación, afectó consistentemente la HR. En la serie IV, los grupos tratados con nepicastat (15, 30 y 60 mg/kg) y enalapril (1 mg/kg) tendieron a exhibir una HR menor que el grupo tratado solamente con enalapril (1 mg/kg).

[0443] Durante todo el estudio, ninguno de los tratamientos con droga mostró un efecto significativo sobre la actividad motora (MA).

[0444] Nepicastat a 3 – 100 mg/kg no afectó la hipertrofia cardíaca observada en ratas SHR ($p > 0,05$). Enalapril (10 mg/kg) redujo significativamente la masa ventricular izquierda en la Serie II, pero no en la Serie I. En la serie III, enalapril a 1 mg/kg no hizo retroceder la hipertrofia, pero la co-administración de enalapril (1 mg/kg) y nepicastat (30 mg/kg) disminuyó significativamente la masa ventricular izquierda de las ratas SHR ($p < 0,01$). En la Serie IV, sin embargo, los efectos de co-administración de enalapril (1 mg/kg) y nepicastat a 15, 30 y 60 mg/kg sobre la masa ventricular izquierda no difirieron de los efectos de enalapril solo ($p > 0,05$).

[0445] En comparación con el tratamiento con vehículo, el tratamiento de ratas SHR con nepicastat a 3 y 10 mg/kg no tuvo ningún efecto sobre los pesos corporales de ratas SHR ($p > 0,05$). El tratamiento con el compuesto a 30 y 100 mg/kg, sin embargo, indujo mayores aumentos del peso corporal ($p < 0,05$).

[0446] En comparación, enalapril a 10 mg/kg disminuyó significativamente ($p < 0,05$) o no tenía ningún efecto sobre los pesos corporales de la rata. A pesar de que el tratamiento con enalapril a 1 mg/kg disminuyó ligeramente los pesos corporales, la co-administración de enalapril (1 mg/kg) y nepicastat (30 y 60 mg/kg) aumentó ligeramente los pesos corporales de la rata.

[0447] Los pesos corporales pre-dosis de las ratas tratadas con vehículo, enalapril, y nepicastat a 3 y 10 mg/kg fueron 387 ± 11 , 415 ± 12 , 407 ± 4 y 415 ± 12 g, respectivamente.

[0448] Los pesos corporales pre-dosis de las ratas tratadas con vehículo, enalapril, y nepicastat a 30 y 100 mg/kg fueron 399 ± 10 , 389 ± 6 , 389 ± 9 y 401 ± 10 g, respectivamente.

[0449] Los pesos corporales pre-dosis de las ratas tratadas con vehículo, enalapril, y nepicastat a 30 mg/kg sin y con enalapril fueron 365 ± 9 , 371 ± 8 , 361 ± 7 y 369 ± 7 g, respectivamente.

[0450] Los pesos corporales pre-dosis de las ratas tratadas con enalapril solo y co-administraciones de nepicastat a 15, 30 y 60 mg/kg fueron 357 ± 6 , 363 ± 6 , 347 ± 8 y 346 ± 8 g, respectivamente.

[0451] Se observaron cuatro muertes en las 4 series de tratamientos de 30 días. Las causas de estas muertes quedaron sin determinar, pero parece improbable que estas muertes estaban relacionadas con el tratamiento con nepicastat.

[0452] Se evaluaron los efectos de la administración oral crónica durante 30 días de nepicastat sobre presión sanguínea, frecuencia cardíaca, actividad motora y masa ventricular izquierda mediante cuatro series de experimentos en ratas SHR espontáneamente hipertensivas con implantes radio-telemétricos. Un tratamiento diario con nepicastat a 3 y 10 mg/kg ($n=6$) no afectó la presión sanguínea. Nepicastat a 30 mg/kg ($n=6$) indujo un efecto antihipertensivo pico de -20 mmHg el día 3 ($p<0,01$). El efecto antihipertensivo fue modesto, pero se detectó durante todo el estudio. A 100 mg/kg, nepicastat ($n=5$) indujo un efecto antihipertensivo mayor. El efecto fue gradual y alcanzó su pico de -42 mmHg el día 3 ($p<0,01$). Magnitudes comparables de efectos antihipertensivos se observaron durante el resto del estudio. En comparación, el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina enalapril (10 mg/kg, $n=6$) indujo un efecto antihipertensivo de -20 a -30 mmHg durante todo el estudio. A pesar de que la mono-administración de enalapril (1 mg/kg) no indujo efectos antihipertensivos significativos, la co-administración con nepicastat (30 mg/kg; $n=6$) indujo un efecto antihipertensivo mayor y de mayor duración ($p<0,01$). La potenciación se observó durante todo el estudio de 30 días. La potenciación de los efectos antihipertensivos de nepicastat mediante enalapril (1 mg/kg) también se observó a dosis de 15, 30 y 60 mg/kg, si bien estos efectos no dependieron de la dosis.

[0453] En grupos tratados con nepicastat a 3-10 mg/kg o enalapril a 1 mg/kg no se observaron efectos significativos sobre la frecuencia cardíaca. Los grupos que recibieron nepicastat a 30 ó 100 mg/kg, sin embargo, exhibieron una ligera bradicardia durante las horas que las ratas estaban despiertas. En contraste, enalapril a 10 mg/kg indujo una taquicardia transitoria. La co-administración de nepicastat (15, 30 y 60 mg/kg) y

enalapril (1 mg/kg) tendió a exhibir una frecuencia cardíaca menor que enalapril (1 mg/kg) solo. En ninguno de los grupos de tratamiento se detectó un efecto significativo sobre la actividad motora.

5 [0454] El tratamiento con nepicastat a 30 (n=6) y 100 (n=5) mg/kg no tuvo efecto significativo sobre la hipertrofia ventricular izquierda observada en ratas SHR. A pesar de que enalapril (1 mg/kg, n=8) o nepicastat (30 mg/kg, n=7) solo no hizo retroceder la hipertrofia, la co-administración de los dos compuestos (n=8) disminuyó significativamente la masa ventricular izquierda de las ratas SHR. El efecto de la co-administración sobre la masa ventricular izquierda, sin embargo, no estaba relacionado
10 con la dosis de nepicastat (15, 30 y 60 mg/kg) y no fue estadísticamente diferente del efecto de enalapril (1 mg/kg) solo.

[0455] En las cuatro series de experimentos se produjeron cuatro muertes durante el transcurso de los tratamientos de 30 días. Tres ratas se encontraron en los grupos tratados con nepicastat y una en el grupo tratado con vehículo. Las causas de las muertes
15 quedaron sin determinar, pero parece que no estaban relacionadas con el tratamiento con nepicastat.

[0456] Nepicastat redujo significativamente la presión sanguínea en ratas SHR durante el período de 30 días a 30 y 100 mg/kg sin causar ninguna taquicardia reflejo. La co-administración de nepicastat (30 mg/kg) con una dosis no antihipertensiva de enalapril
20 (1 mg/kg) tuvo un efecto antihipertensivo mayor y un mayor efecto sobre la regresión de la hipertrofia en ratas SHR que el tratamiento con solamente nepicastat. Estos efectos, sin embargo, no estaban relacionados con la dosis de nepicastat (15, 30 y 60 mg/kg)

Ejemplo 31

[0457] Se efectuó un estudio para evaluar los efectos de nepicastat sobre las respuestas
25 a agentes autónomos en perros anestesiados, instrumentados.

[0458] A perros beagle se administraron dosis intraduodenales simples de 0 (vehículo) ó 60 mg/kg de nepicastat a través de una cánula intraduodenal. El grupo de control con vehículo consistió de 1 macho y 1 hembra, y el grupo de tratamiento con nepicastat consistió de 2 machos y 2 hembras. Mientras que estaba anestesiado con gas isoflurano,
30 cada animal fue instrumentado quirúrgicamente. Antes de ser dosificado con la formulación de ensayo, se evaluaron las respuestas de la presión sanguínea promedio a dosis intravenosas de agentes autónomos, norepinefrina (3 µg/kg), isoproterenol (0,3 µg/kg) y acetilcolina (10 µg/kg). Luego se administró a cada animal una dosis simple en bolo de la formulación de ensayo y se evaluaron las respuestas de la presión sanguínea a
35 los agentes autónomos aproximadamente 1, 2 y 3 horas después de la dosificación. Una vez completado el experimento, cada perro fue eutanizado y separado del estudio.

- [0459] Se seleccionó un perro porque este animal se usa comunmente para evaluar los efectos de compuestos de ensayo sobre parámetros hemodinámicos. Se obtuvieron perros beagle de Marshall Farms, Inc., North Rose, New York. Cada perro estaba identificado unívocamente mediante un tatuaje en la oreja aplicado por el proveedor. Los animales se aclimataron a las condiciones del laboratorio durante al menos 3 semanas previas a la dosificación. Durante el período de aclimatización, se evaluó la condición general de cada animal y se usaron aquellos considerados sanos. Los perros se asignaron aleatoriamente a grupos de tratamiento; a los machos se asignaron números impares y a las hembras números pares.
- 10 [0460] Después de asignar los perros al estudio, se alojaron individualmente en jaulas de acero inoxidable identificadas con el número del estudio, el número del animal y el número del tatuaje. El ambiente de alojamiento de los perros se controló ambientalmente. Las jaulas se limpiaron diariamente y cada dos semanas los animales se transfirieron a jaulas higienizadas. Una vez al día se proporcionó alimento “Purina Certified Canine Chow®” y agua se proporcionó ad libitum.
- 15 [0461] El día del tratamiento, los perros tenían una edad de aproximadamente 14 a 16 meses. Los machos pesaron 10,3 a 12,9 kg y las hembras pesaron 8,5 a 11,2 kg.
- [0462] En el momento de la dosificación, se preparó una suspensión de 60 mg/ml mediante el mezclado de polvo de nepicastat con vehículo. La formulación reconstituida de 60 mg/ml de nepicastat retuvo la potencia durante la duración de uso. Cada día de dosificación se prepararon soluciones acuosas de norepinefrina (60 µg/ml), isoproterenol (6 µg/ml) y acetilcolina (200 µg/ml) en agua estéril.
- 20 [0463] A un grupo de control tratado con vehículo de 1 macho y 1 hembra se administró 1 ml/kg de vehículo, y a un grupo de tratamiento con nepicastat de 2 machos y 2 hembras se administró 1 ml/kg de una solución de 60 mg/ml de nepicastat. La dosis total de nepicastat administrada a cada animal fue 60 mg/kg.
- 25 [0464] La selección de la dosis estaba basada en datos obtenidos a partir de dos estudios con nepicastat. En un estudio de toxicidad aguda en perros, una dosis oral simple de 400 mg/kg resultó en síntomas clínicos transitorios de toxicidad. En un estudio de 1 mes, se administraron oralmente a perros, una vez por día, dosis de 5, 20 u 80 mg/kg. Síntomas clínicos de toxicidad se presentaron con dosis de 80 mg/kg/día.
- 30 [0465] Una dosis intraduodenal simple de vehículo o formulación de nepicastat se administró directamente en el duodeno a través de una cánula intraduodenal. Se seleccionó la ruta intraduodenal porque la ruta oral es una ruta clínica propuesta para la administración de nepicastat. Los volúmenes de las dosis se calcularon a base de los pesos corporales individuales registrados antes de la dosificación (los datos no se tabularon en este informe). Al final de cada experimento, el perro a ser evaluado fue
- 35

eutanizado mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (300 mg/kg, iv) y separado del estudio.

[0466] Los perros se instrumentaron quirúrgicamente de acuerdo con los procedimientos descritos en el protocolo. La noche previa a la instrumentación quirúrgica los animales no recibieron alimento. Cada animal a ser evaluado fue anestesiado inicialmente mediante la inyección (iv) de una mezcla de quetamina (10 mg/kg) y diazepam (0,5 mg/kg). Cada animal se colocó sobre una mesa quirúrgica encima de una almohadilla por la que circula agua caliente para mantener la temperatura corporal y fue ventilado mecánicamente durante el experimento. Se mantuvo un plano quirúrgico de anestesia con gas isoflurano (proporcionado en la proporción entre 1,5% a 2% en oxígeno con un caudal de aproximadamente 1,5 L/minutos). La temperatura corporal rectal se monitoreó solamente para medir los niveles de gas en sangre y los datos no se presentan en este informe. Se colocaron subcutáneamente electrodos de aguja externos para monitorear la derivación estándar II de las extremidades con un electrocardiograma (ECG) para evaluar la anestesia.

[0467] Se insertó una cánula en la vena femoral izquierda y la punta del tubo de polietileno se hizo avanzar en la vena cava para la administración de agentes autónomos. Para la canulación de la arteria femoral izquierda se usó un tubo de polietileno llenado con 50 U/ml de solución fisiológica heparinizada. La punta de la cánula arterial se hizo avanzar en la aorta torácica y se acopló a un transductor de presión externo y se registró la presión sistólica y diastólica en la aorta. De la cánula arterial se sacaron muestras de sangre arterial para análisis sanguíneos de pH, PCO₂ y PO₂.

[0468] Se realizó una laparotomía en la línea media y se aisló el duodeno exactamente desde el píloro caudal hasta el esfínter pilórico. Se insertó una aguja en el duodeno y se hizo avanzar la punta de una cánula llenada con solución fisiológica a través de la aguja y en el lumen para la administración de la formulación de ensayo. La aguja se retiró del sitio de incisión, la cánula se ancló en su posición, la válvula de cierre de la cánula se posicionó fuera del abdomen y se reacomodó la piel de la incisión abdominal.

[0469] Si necesario, después de la instrumentación quirúrgica se efectuaron ajustes ventilatorios para llevar los niveles de pH y PCO₂ de la sangre arterial a rangos fisiológicos aproximadamente normales (pH = 7,43 a 7,50 y PCO₂ = 22 a 27 mmHg).

[0470] Los agentes autónomos, norepinefrina (3 µg/kg), isoproterenol (0,3 µg/kg) y acetilcolina (10 µg/kg), se administraron intravenosamente mediante inyección en bolo (durante aproximadamente 15 segundos) usando la cánula de la vena femoral, con un intervalo aproximado de 10 minutos entre cada dosis. Después de cada administración de un agente, la cánula se enjuagó con 3 ml de agua. La administración de los agentes se

repitió aproximadamente 20 minutos después de la primera administración de acetilcolina.

[0471] Aproximadamente 30 minutos después de la segunda administración de acetilcolina, cada animal se dosificó con vehículo o nepicastat. El volumen de la dosis fue 1 ml/kg administrado en la forma de bolo directamente en el duodeno, utilizando la cánula intraduodenal. Inmediatamente después de la dosificación, la cánula intraduodenal se enjuagó con 3 ml de solución de vehículo. Aproximadamente 50, 110 y 170 minutos después de la dosificación, se repitió la administración de los agentes autónomos con un intervalo de aproximadamente 10 minutos entre la administración de cada agente.

[0472] La presión sanguínea en la aorta, la frecuencia cardíaca y los parámetros ECG se registraron continuamente directamente en un polígrafo. Los valores de pH, PCO₂ y PO₂ de la sangre en el tiempo aproximado de la toma de muestras de sangre, valores obtenidos a partir del analizador del gas sanguíneo, se anotaron manualmente sobre el diagrama de registro del polígrafo. Los parámetros de frecuencia cardíaca, ECG y gas sanguíneo se utilizaron solo para evaluar el nivel de anestesia y la estabilidad del animal; estos datos no se presentan en este informe.

[0473] Las presiones sanguíneas sistólica, diastólica y media en la aorta se evaluaron justo antes de la administración (valor de referencia) y en el tiempo de la respuesta pico a cada agente (cambio máximo del valor de referencia). Las presiones sanguíneas sistólica, diastólica y media en la aorta y el pH, PCO₂ y PO₂ sanguíneos se evaluaron antes de la dosificación y aproximadamente 50, 110 y 170 minutos después de la dosificación con la formulación de ensayo.

[0474] Las respuestas a norepinefrina se caracterizaron mediante la evaluación de la presión sanguínea media en la aorta justo antes de cada administración de norepinefrina y en el tiempo del aumento de presión pico. Las respuestas a isoproterenol y acetilcolina se caracterizaron mediante la evaluación de la presión sanguínea diastólica en la aorta justo antes de la administración y en el tiempo de la disminución de presión pico para cada administración de isoproterenol y acetilcolina.

[0475] Al final del experimento, cada perro fue eutanizado mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (aproximadamente 300 mg/kg, iv) y separado del estudio.

[0476] No se observaron diferencias relacionadas con el tratamiento entre la respuesta predosis y la respuesta postdosis a norepinefrina. En los perros de control que recibieron vehículo, las respuestas postdosis a norepinefrina tenían una magnitud menor que las respuestas predosis; este resultado se consideró incidental. No se observaron diferencias relacionadas con el tratamiento entre la respuesta predosis y la respuesta postdosis a isoproterenol. No se observaron diferencias relacionadas con el tratamiento entre la respuesta predosis y la respuesta postdosis a acetilcolina.

[0477] A perros beagle anestesiados, instrumentados quirúrgicamente, se administró una dosis intraduodenal simple de 60 mg/kg de nepicastat. Se evaluaron las respuestas de la presión sanguínea a dosis intravenosas de agentes autónomos (norepinefrina, isoproterenol y acetilcolina) antes de la dosificación y aproximadamente 1, 2 y 3 horas después de la dosificación. No se observaron diferencias relacionadas con el tratamiento entre la respuesta predosis y la respuesta postdosis a agentes autónomos.

Ejemplo 32

[0478] Los efectos de la administración intraperitoneal aguda de nepicastat, un inhibidor de la DBH (DBHI), sobre la actividad locomotora en ratones. Se sugirió que compuestos de esta clase tienen efectos sobre la actividad locomotora.

[0479] Ratones CD-1 (ICR) macho adultos (de 30-40 g de peso el día del estudio) fueron alojados en grupos de ocho bajo un ciclo de luz/oscuridad normal con las luces encendidas entre 09:00 h y 21:00 h. Alimento y agua se permitieron ad libitum. Todos los animales se sometieron por primera vez a un tratamiento de droga y una prueba de comportamiento. Cada animal se usó sólo una vez.

[0480] La actividad locomotora se monitoreó en un sistema de monitoreo de actividad automático de 14 estaciones (San Diego Instrument Co.). Cada estación consistió de una jaula de perspex transparente (25 cm x 45 cm x 20 cm; ancho x longitud x altura) colocada dentro de un marco metálico que contiene 3 fotoemisores y 3 fotodetectores dispuestos a distancias iguales a lo largo de la longitud de la pared. El piso de cada jaula se recubrió con una cubierta de cedro limpia.

[0481] Los ratones se colocaron en el ambiente de ensayo al menos 1 hora previa al ensayo. Los ratones se colocaron individualmente en una de las jaulas de actividad y se les permitió explorar el alojamiento durante 30 minutos. A continuación de este período de acomodamiento, se administraron a los ratones dosis intraperitoneales de ya sea nepicastat (10, 30 y 100 mg/kg), SKF-102698 (30 y 100 mg/kg), cocaína (30 mg/kg) o vehículo y los ratones se devolvieron inmediatamente a la misma jaula. Después de un período de pretratamiento de 60 minutos, se monitoreó la actividad motora durante 180 minutos. Para cada animal se registraron cada 30 minutos conteos de actividad y movimientos ambulatorios (definidos como una interrupción de 2 fotohaces consecutivos).

[0482] Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías con mediciones repetidas utilizando los datos del rango total (técnica no paramétrica) para ensayar efectos globales del tratamiento, intervalo de tiempo e interacción entre tratamiento e intervalo de tiempo. Para cada intervalo de tiempo se realizó un ANOVA de una vía para ver en cual de los intervalos, si había, existían efectos del tratamiento. Luego, se realizaron comparaciones pareadas para cada intervalo de tiempo usando el

procedimiento de Dunn y la estrategia LSD de Fisher para ajustar por el problema de comparaciones múltiples.

[0483] Para nepicastat, el rango de la dosis fue 3-100 mg/kg y la droga se disolvió en dH₂O y se sometió a ultrasonido. Para SKF-102698, el rango de dosis fue de 30-100 mg/kg. Para clorhidrato de cocaína, la dosis fue 30 mg/kg. Los compuestos se administraron en un volumen de 1 ml/100 g. Todas las dosis mencionadas están expresadas como la base libre, con excepción de cocaína para la cual se utilizó el peso de la sal.

[0484] En el modelo global, había un efecto significativo para ambos, tratamiento y tiempo (ambos $p < 0,01$), mientras que la interacción entre tratamiento y tiempo no fue significativa. El análisis en cada punto de tiempo reveló que había efectos globales del tratamiento significativos en los intervalos de tiempo 1-4 (es decir, los primeros 120 minutos de la prueba; todos $p < 0,01$), mientras que no se detectó ningún efecto global del tratamiento significativo en los intervalos de tiempo 5 y 6 (es decir, los últimos 60 minutos de la prueba).

[0485] Al comparar el grupo de cocaína con el grupo de vehículo con respecto a ambos, conteos de actividad y movimientos ambulatorios, existían efectos globales significativos para tratamiento y tiempo (ambos $p < 0,01$), mientras que la interacción entre tratamiento y tiempo no fue significativa. El análisis en cada intervalo de tiempo reveló que el grupo de cocaína tenía conteos de actividad total significativamente mayores y un número de movimientos ambulatorios significativamente mayor en los intervalos de tiempo 1-4, pero no 5 y 6 (todos $p < 0,05$).

[0486] En contraste, no había diferencias significativas en ya sea los conteos de actividad total o los movimientos ambulatorios para cualquiera de los grupos tratados con nepicastat o los grupos tratados con SKF-102698 en comparación con el vehículo de control en cualquier intervalo de tiempo.

[0487] Se demostró efectivamente que la cocaína es un estimulante locomotor en la dosis de 30 mg/kg. En contraste, la administración aguda de nepicastat en dosis de 3, 10, 30 ó 100 mg/kg no causó ningún cambio significativo en la actividad total o los movimientos ambulatorios en cualquier intervalo de tiempo, en comparación con el vehículo de control. Similarmente, SKF-102698 en dosis de 30 y 100 mg/kg no tenía efectos significativos sobre la actividad total o los movimientos ambulatorios en cualquier intervalo de tiempo examinado. Estos datos sugieren que estos DBHI carecen de acción motora en ratones.

35 Ejemplo 33

[0488] Se mostró que una dosificación aguda con el inhibidor de dopamina- β -hidroxilasa nepicastat inhibe la enzima en la arteria mesentérica y el ventrículo izquierdo

en ratas espontáneamente hipertensivas. Se examinaron cambios en los niveles de norepinefrina y dopamina en la corteza cerebral y la arteria mesentérica de ratas espontáneamente hipertensivas después de 7 y 25 días de administración oral de 1 mg/kg ó 10 mg/kg de nepicastat.

- 5 [0489] Se preparó nepicastat en la concentración de 1 y 10 mg/kg en términos de base libre. Las cantidades pesadas se disolvieron en vehículo (dH₂O) para proporcionar dosis orales que pueden administrarse en un volumen de 10,0 ml/kg.

- [0490] Se usaron ratas SHR macho espontáneamente hipertensivas de 16-17 semanas de edad al principio del estudio. A los animales se permitió tomar alimento y agua ad libitum. Los animales se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos de
10 tratamiento: administración oral de nepicastat a 10 mg/kg, 1 mg/kg, o un grupo de vehículo de agua desionizada a 10 ml/kg. Las ratas se dosificaron oralmente una vez al día durante 7 ó 25 días con 1 mg/kg de vehículo ó 10 mg/kg de nepicastat (n=8), con excepción del día 25 en el cual n=9. El día 7, cuatro horas después de la administración
15 del compuesto, los animales se anestesiaron con halotano, se decapitaron, y la corteza y la arteria mesentérica de 24 ratas (n=8 / grupo de tratamiento) se recolectaron, se pesaron y se analizaron. Las 31 ratas remanentes siguieron recibiendo administración oral con uno de los tres tratamientos durante los 18 días siguientes. Cuatro horas después del último tratamiento, se recolectaron, se pesaron y se analizaron la arteria
20 mesentérica y corteza de este grupo, para determinar los niveles de catecolamina.

[0491] Los animales sacrificados el día 25 también se usaron para mediciones de presión sanguínea. La última medición de presión sanguínea se realizó el día 22.

- [0492] Estadísticamente, los tres tratamientos se compararon para cada período de tiempo (7 ó 25 días) usando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía no
25 paramétrico. Se realizaron comparaciones pareadas de cada tratamiento con el control utilizando la estrategia LSD de Fisher para las medias, ajustando los resultados por las diferencias en el tamaño de muestra, para controlar la tasa de error experimental. Cada variable se analizó por separado. Para las figuras 6-11, *, $p < 0,05$ y **, $P < 0,01$.

- [0493] Después de siete días de tratamiento, el grupo de dosis 10 mg/kg tenía niveles de
30 norepinefrina en la corteza cerebral significativamente menores ($p < 0,1$) y una relación de dopamina/norepinefrina significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación con el grupo de vehículo. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los niveles de dopamina en comparación con vehículo en cualquiera de los dos grupos de tratamiento (1 ó 10 mg/kg de nepicastat), o en los niveles de norepinefrina o la relación
35 dopamina/norepinefrina del grupo dosificado con 1 mg/kg de nepicastat, después de siete días de tratamiento (Figuras 6-8). Se observó un aumento ligeramente significativo

($p < 0,05$) en la relación dopamina/norepinefrina en la corteza el día 7 con la dosis de 10 mg/kg de nepicastat.

5 [0494] Después de 25 días de tratamiento, los niveles en la corteza de dopamina en el grupo dosificado con 1 mg/kg de nepicastat fueron significativamente más altos ($p < 0,05$) en comparación con el grupo de vehículo. La relación dopamina/norepinefrina en la corteza en este grupo también fue significativamente mayor ($p < 0,01$) que la relación en el grupo de vehículo. La relación del grupo dosificado con 10 mg/kg de nepicastat fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en comparación con el vehículo. Los niveles de norepinefrina en cualquiera de estos grupos de dosificación no fueron
10 significativamente diferentes ($p > 0,05$) que los niveles del control, como tampoco fueron diferentes los niveles de dopamina en el grupo de dosificación de 10 mg/kg (Figuras 6-8).

[0495] En la arteria mesentérica, después de ambos períodos, 7 días ($p < 0,05$) y 25 días ($p < 0,01$) de dosificación, el grupo de dosificación con 10 mg/kg tenía niveles de
15 dopamina y relaciones dopamina/norepinefrina significativamente mayores en comparación con el grupo de vehículo, pero no se observaron diferencias en los niveles de norepinefrina. Ninguno de los parámetros medidos fue significativamente diferente ($p < 0,05$) que los parámetros del control en el grupo de dosificación con 1 mg/kg de nepicastat (Figuras 9-11).

20 [0496] Nepicastat, administrado oralmente durante 7 y 25 días, inhibió significativamente ($p < 0,05$) dopamina- β -hidroxilasa en la corteza y la arteria mesentérica de ratas SHR espontáneamente hipertensivas. Una inhibición mayor se observó con la administración de 10 mg/kg de nepicastat en comparación con 1 mg/kg, por lo cual los efectos observados fueron dependientes de la dosis.

25 [0497] Será fácilmente aparente para un entendido en el arte relevante que pueden efectuarse otras modificaciones y adaptaciones adecuadas a los métodos y las aplicaciones descritos en ésta y que tales modificaciones y adaptaciones pueden realizarse sin apartarse del alcance de la invención o cualquier realización de la misma. Si bien la invención ha sido descrita en relación con ciertas realizaciones, el inventor no
30 tiene la intención de limitar la invención a las formas particulares expuestas, sino al contrario, se intenta cubrir tales alternativas, modificaciones y equivalentes como incluidas en el espíritu y alcance de la invención definida por las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

1. Un método para tratar a un paciente que sufre de, o es susceptible a, al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de al menos una sustancia, estando
5 dicho método caracterizado porque comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A.

2. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque la al menos una sustancia se selecciona entre una droga de abuso (droga adictiva) y un medicamento.

3. El método de la reivindicación 2, caracterizado porque la droga de abuso se
10 selecciona entre un agente psicoestimulante, un opioide, un halucinógeno, un inhalante, un sedante, un tranquilizante, un hipnótico, un ansiolítico y una sustancia ilícita.

4. El método de la reivindicación 3, caracterizado porque el agente psicoestimulante es un derivado de beta-fenilisopropilamina.

5. El método de la reivindicación 4, caracterizado porque el derivado de beta-
15 fenilisopropilamina se selecciona entre anfetamina, dextroanfetamina y metanfetamina.

6. El método de la reivindicación 3, caracterizado porque el agente psicoestimulante se selecciona entre éxtasis, fenmetrazina, metilfenidato, dietilpropiona, pemolina, mazindol, (-) cationa y fenfluramina.

7. El método de la reivindicación 3, caracterizado porque el opioide se selecciona
20 entre Lortab, Tramadol, heroína, metadona, hidrocodona y oxicodona.

8. El método de la reivindicación 3, caracterizado porque el halucinógeno se selecciona entre psilocibina, un hongo halucinógeno, dietilamida del ácido lisérgico (LSD), fenciclidina (PCP) y ketamina.

9. El método de la reivindicación 3, caracterizado porque el inhalante se
25 selecciona entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno, fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenceno, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno y perfluorobenceno.

10. El método de la reivindicación 2, caracterizado porque el medicamento se selecciona entre un anestésico, un analgésico, un agente anticolinérgico, un
30 antihistamínico, un relajante muscular, un medicamento anti-inflamatorio no esteroide, un medicamento de venta libre y un medicamento antidepresivo.

11. El método de la reivindicación 2, caracterizado porque la droga de abuso es cocaína, alcohol, cafeína, opio, cannabinoide, cannabis, benzodiacepina, carisprodol, tabaco, nicotina, Vicodin, Lorcet, Percocet, Percodan y Tilox.

35 12. El método de la reivindicación 11, caracterizado porque la droga de abuso es cocaína y el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso y dependencia de la cocaína seleccionado entre trastorno por déficit de atención con

hiperactividad; euforia; energía, excitación y sociabilidad aumentadas; menos hambre y fatiga; una marcada sensación de fortaleza física y mental; disminución de la sensación de dolor; bronquitis; dificultad para respirar; dolor de pecho; palpitaciones del corazón; arritmia; cardiomiopatía; ataque cardíaco; pupilas dilatadas; náuseas; vómitos; dolor de
 5 cabeza; vértigo; mareos; ansiedad; psicosis; confusión; irritación nasal; costras nasales; hemorragias nasales recurrentes; congestión nasal; dolor facial; disforia y ansia de cocaína.

13. El método de la reivindicación 11, caracterizado porque la droga de abuso es cocaína y el Compuesto A aumenta al menos un síntoma subjetivo negativo de abuso y
 10 dependencia de la cocaína.

14. El método de la reivindicación 11, caracterizado porque la droga de abuso es cocaína y el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia de cocaína seleccionado entre fatiga, falta de placer, depresión, irritabilidad, trastornos del sueño, aumento del apetito, retraso psicomotor, agitación, paranoia y ansiedad para la cocaína.

15 15. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque el método comprende además la co-administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un otro agente seleccionado entre un inhibidor selectivo de reabsorción de serotonina (SSRI), un inhibidor de reabsorción de serotonina-norepinefrina (SNRI), un inhibidor de reabsorción de norepinefrina (NRI), un inhibidor de reabsorción de
 20 norepinefrina/dopamina (NDRI), un antagonista de serotonina-5-hidroxitriptamina 1A (5HT1A), un inhibidor de la dopamina- β -hidroxilasa, un antagonista del receptor de la adenosina, un antagonista del receptor de adenosina A2A, un inhibidor de monoamina-oxidasa (MAOI), un inhibidor de la monoamino oxidasa B, un bloqueador del canal de sodio, un bloqueador del canal de calcio, un antagonista del receptor alfa adrenérgico
 25 central y periférico, un agonista alfa-adrenérgico central, un antagonista del receptor beta-adrenérgico central o periférico, un antagonista del receptor NK-1, un antagonista del factor liberador de corticotropina (CRF), un antidepresivo/antipsicótico atípico, un tricíclico, un anticonvulsivo, un antagonista del glutamato, un agonista del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un inhibidor de la enzima del metabolismo de GABA,
 30 un activador de síntesis de GABA, un agonista parcial de dopamina D2, un inhibidor de la enzima del metabolismo de dopamina, un inhibidor de catecol-O-metil-transferasa, un antagonista del receptor de opioides, un estabilizador del estado emocional, un agonista directo o indirecto de dopamina, un agonista parcial de 5HT1, un antagonista de 5HT2 de serotonina, un opioide, un inhibidor de carboxilasa, un agonista parcial de opioide, un
 35 agonista parcial nicotínico y un inhalante.

16. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque el método incluye además co-administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un otro

agente seleccionado entre benzodiazepina, levodopa, carisprodol, modafenil, acamprosato, gamma-butirolactona, gamma-hidroxibutirato, opio, psilocibina, hongos halucinógenos, tabaco y nicotina.

5 17. El método de la reivindicación 1, caracterizado porque el Compuesto A es administrado al paciente después de un período de abstinencia del uso de sustancias por parte del paciente.

10 18. Un método para tratar al menos una fase de dependencia de sustancia de al menos una sustancia en un paciente, caracterizado porque la al menos una fase de dependencia de sustancia se selecciona entre adquisición, mantenimiento, extinción y recaída, método caracterizado porque comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A.

19. El método de la reivindicación 18, caracterizado porque el Compuesto A inhibe el desarrollo de la fase de adquisición en el paciente.

15 20. El método de la reivindicación 18, caracterizado porque el Compuesto A promueve el desarrollo de la fase de extinción en el paciente.

21. El método de la reivindicación 18, caracterizado porque el Compuesto A reduce la frecuencia de recaídas en el paciente.

22. El método de la reivindicación 18, caracterizado porque la al menos una sustancia se selecciona entre una droga de abuso y un medicamento.

20 23. El método de la reivindicación 22, caracterizado porque la droga de abuso se selecciona entre un agente psicoestimulante, un opioide, un halucinógeno, un inhalante, un sedante, un tranquilizante, un hipnótico, un ansiolítico y una sustancia ilícita.

24. El método de la reivindicación 23, caracterizado porque el agente psicoestimulante es un derivado de beta-fenilisopropilamina.

25 25. El método de la reivindicación 24, caracterizado porque el derivado de beta-fenilisopropilamina se selecciona entre anfetamina, dextroanfetamina y metanfetamina.

26. El método de la reivindicación 23, caracterizado porque el agente psicoestimulante se selecciona entre éxtasis, fenmetrazina, metilfenidato, dietilpropiona, pemolina, mazindol, (-) cationa y fenfluramina.

30 27. El método de la reivindicación 23, caracterizado porque el opioide se selecciona entre Lortab, Tramadol, heroína, metadona, hidrocodona y oxycodona.

28. El método de la reivindicación 23, caracterizado porque el halucinógeno se selecciona entre psilocibina, un hongo halucinógeno, dietilamida del ácido lisérgico (LSD), fenciclidina (PCP) y ketamina.

35 29. El método de la reivindicación 23, caracterizado porque el inhalante se selecciona entre benceno, tolueno, o-xileno, m-xileno, p-xileno, etilbenceno,

fluorobenceno, o-difluorobenceno, 1,3,5-trifluorobenceno, 1,2,4-trifluorobenceno, pentafluorotolueno, pentafluorobenceno y perfluorobenceno.

30. El método de la reivindicación 22, caracterizado porque el medicamento se selecciona entre un anestésico, un analgésico, un agente anticolinérgico, un
5 antihistamínico, un relajante muscular, un medicamento anti-inflamatorio no esteroide, un medicamento de venta libre y un medicamento antidepresivo.

31. El método de la reivindicación 22, caracterizado porque la droga de abuso es alcohol, cafeína, opio, cannabinoide, cannabis, benzodiacepina, carisprodol, tabaco, nicotina, Vicodin, Lorcet, Percocet, Percodan y Tilox.

10 32. El método de la reivindicación 18, caracterizado porque el método comprende además la co-administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un otro agente seleccionado entre un inhibidor selectivo de reabsorción de serotonina (SSRI), un inhibidor de reabsorción de serotonina-norepinefrina (SNRI), un inhibidor de reabsorción de norepinefrina (NRI), un inhibidor de reabsorción de
15 norepinefrina-dopamina (NDRI), un antagonista de serotonina-5-hidroxitriptamina 1A (5HT1A), un inhibidor de la dopamina- β -hidroxilasa, un antagonista del receptor de la adenosina, un antagonista del receptor de adenosina A2A, un inhibidor de monoamina-oxidasa (MAOI), un inhibidor de la monoamino oxidasa B, un bloqueador del canal de sodio, un bloqueador del canal de calcio, un antagonista del receptor alfa adrenérgico
20 central y periférico, un agonista alfa-adrenérgico central, un antagonista del receptor beta-adrenérgico central o periférico, un antagonista del receptor NK-1, un antagonista del factor liberador de corticotropina (CRF), un antidepresivo/antipsicótico atípico, un tricíclico, un anticonvulsivo, un antagonista del glutamato, un agonista del ácido gamma-aminobutírico (GABA), un inhibidor de la enzima del metabolismo de GABA,
25 un activador de la síntesis del GABA, un agonista parcial de dopamina D2, un inhibidor de la enzima del metabolismo de la dopamina, un inhibidor de catecol-O-metil-transferasa, un antagonista de receptores de opioides, un estabilizador del estado emocional, un agonista directo o indirecto de dopamina, un agonista parcial de 5HT1, un antagonista de 5HT2 de serotonina, un opioide, un inhibidor de carboxilasa, un agonista
30 de opioide parcial, un agonista nicotínico parcial y un inhalante.

33. Un método para tratar al menos una fase de dependencia de cocaína en un paciente, donde la al menos una fase se selecciona entre adquisición, mantenimiento, extinción y recaída, método caracterizado porque comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A.

35 34. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque el Compuesto A inhibe el desarrollo de la fase de adquisición en el paciente.

35. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque el Compuesto A promueve el desarrollo de la fase de extinción en el paciente.

36. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque el Compuesto A reduce la frecuencia de recaídas en el paciente.

5 37. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de cocaína.

38. El método de la reivindicación 37, caracterizado porque el Compuesto A reduce en el paciente al menos un síntoma de abuso de cocaína seleccionado entre uso
10 recurrente de cocaína que resulta en un incumplimiento de obligaciones importantes en el trabajo, la escuela o el hogar; uso recurrente de cocaína en situaciones en las que el uso sea físicamente peligroso, problemas legales relacionados con el uso recurrente de cocaína; y uso continuado de cocaína a pesar de tener problemas sociales o
15 interpersonales persistentes o recurrentes causados o exacerbados por los efectos de la cocaína.

39. El método de la reivindicación 37, caracterizado porque el Compuesto A reduce al menos un síntoma de dependencia de cocaína en el paciente seleccionado entre tolerancia; abstinencia; ingestión abundante de la cocaína en cantidades mayores o
20 durante un período más prolongado que el intencionado; existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos para reducir o controlar el uso de cocaína; se gasta una gran cantidad de tiempo en actividades para obtener la cocaína, consumir la cocaína o recuperarse de sus efectos; se abandona o reduce actividades de importancia social, laboral o recreativa debido al uso de la cocaína; y se sigue consumiendo la cocaína a
25 pesar del conocimiento de tener un problema físico o psicológico persistente o recurrente probablemente causado o exacerbado por la cocaína.

40. El método de la reivindicación 37, caracterizado porque el Compuesto A reduce al menos un síntoma de abuso y dependencia de la cocaína seleccionado entre trastorno por déficit de atención con hiperactividad; euforia; energía, excitación y
30 sociabilidad aumentadas; disminución de hambre y fatiga; una marcada sensación de fortaleza física y mental; disminución de la sensación de dolor; bronquitis; dificultad para respirar; dolor de pecho; palpitaciones del corazón; arritmia; cardiomiopatía; ataque cardíaco; pupilas dilatadas; náuseas; vómitos; dolor de cabeza; vértigo; mareos; ansiedad; psicosis; confusión; irritación nasal; costras nasales; hemorragias nasales recurrentes; congestión nasal; dolor facial; disforia y ansia de cocaína.

35 41. El método de la reivindicación 37, caracterizado porque el Compuesto A aumenta al menos un síntoma subjetivo negativo del abuso y dependencia de cocaína.

42. El método de la reivindicación 37, caracterizado porque el compuesto A reduce al menos un síntoma de abstinencia de cocaína seleccionado entre fatiga, falta de placer, depresión, irritabilidad, trastornos del sueño, aumento del apetito, retraso psicomotor, agitación, paranoia y ansiedad para la cocaína.

5 43. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque el Compuesto A mejora un puntaje del paciente en al menos una de las escalas ADHD-IV, HAM-D, HAM-A, BDI, la escala de apatía del Inventario Neuropsiquiátrico y una escala de puntaje de la función cognitiva.

10 44. El método de la reivindicación 43, caracterizado porque la escala de puntaje de la función cognitiva se selecciona entre las escalas WAIS-R, WMS-R, RAVLT, Ensayos I-VII, RCFT y TMT, Partes A y B.

45. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque el Compuesto A reduce en el paciente al menos una entre cantidad y frecuencia de consumo de cocaína.

15 46. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque el Compuesto A promueve la remisión en el paciente.

47. El método de la reivindicación 46, caracterizado porque la remisión es al menos una entre remisión completa temprana, remisión parcial temprana, remisión completa sostenida y remisión parcial sostenida.

20 48. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque el Compuesto A prolonga un período de remisión en el paciente.

49. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque el método comprende además un tratamiento con al menos uno entre terapia de manejo de contingencias y terapia de comportamiento cognitivo.

25 50. El método de la reivindicación 33, caracterizado porque el método comprende además la co-administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un otro agente seleccionado entre un inhibidor selectivo de reabsorción de serotonina (SSRI), un inhibidor de reabsorción de serotonina-norepinefrina (SNRI), un inhibidor de reabsorción de norepinefrina (NRI), un inhibidor de reabsorción de norepinefrina-dopamina (NDRI), un antagonista de serotonina-5-hidroxitriptamina 1A (5HT1A), un inhibidor de la dopamina-β-hidroxilasa, un antagonista del receptor de la adenosina, un antagonista del receptor de adenosina A2A, un inhibidor de monoamina-oxidasa (MAOI), un inhibidor de la monoamino oxidasa B, un bloqueador del canal de sodio, un bloqueador del canal de calcio, un antagonista del receptor alfa adrenérgico central y periférico, un agonista alfa-adrenérgico central, un antagonista del receptor beta-adrenérgico central o periférico, un antagonista del receptor NK-1, un antagonista del factor liberador de corticotropina (CRF), un antidepresivo/antipsicótico atípico, un tricíclico, un anticonvulsivo, un antagonista del glutamato, un agonista del ácido

30

35

- gamma-aminobutírico (GABA), un inhibidor de la enzima del metabolismo del GABA, un activador de la síntesis del GABA, un agonista parcial de dopamina D2, un inhibidor de la enzima del metabolismo de dopamina, un inhibidor de catecol-O-metil-transferasa, un antagonista del receptor de opioides, un estabilizador del estado emocional, una
- 5 agonista directo o indirecto de dopamina, un agonista 5HT1 parcial, un antagonista 5HT2 de serotonina, un opioide, un inhibidor de carboxilasa, un agonista parcial de opioide, un agonista nicotínico parcial y un inhalante.

RESUMEN

Se proporcionan métodos para tratar pacientes que sufren de, o son susceptibles a, al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de al menos una sustancia con el Compuesto A. También se proporcionan métodos para tratar en pacientes al menos una

5 fase de dependencia de al menos una sustancia y métodos para tratar en pacientes al menos una fase de dependencia de cocaína.

Figure 1

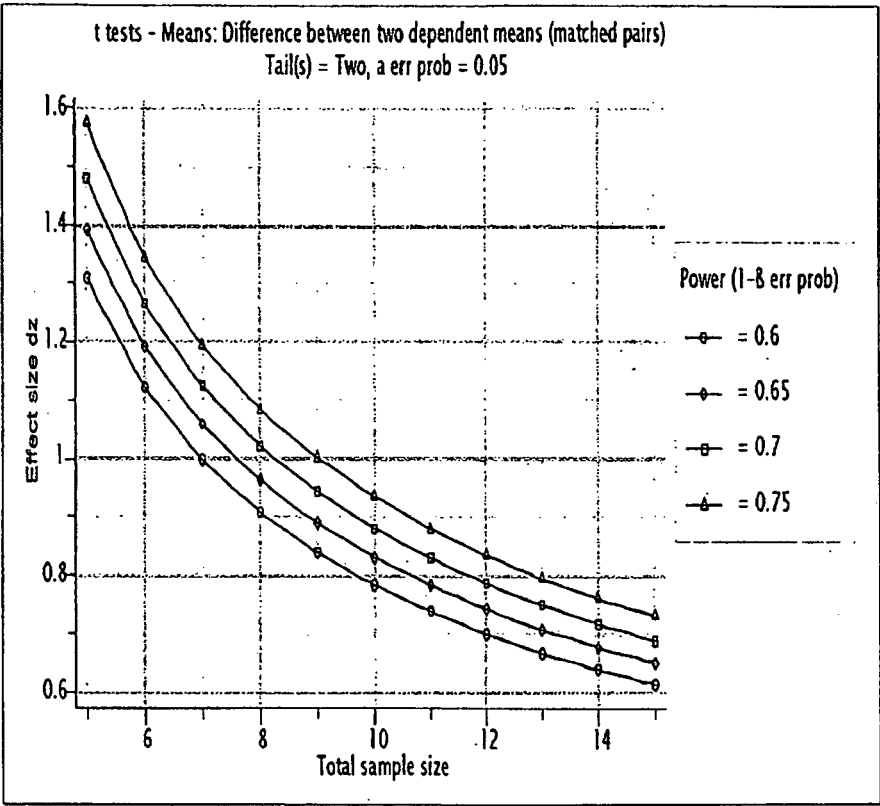


Figure 2

ENZYME	ASSAY
Tyrosine hydroxylase	Release of [$^3\text{H}_2\text{O}$] associated with conversion of L-[3,5- ^3H]-tyrosine to DOPA
Acetyl CoA synthetase	Utilization of [^3H]-acetic sodium acetate
Acyl-CoA, Cholesterol acyltransferase	Formation of cholesteryl ester from [1- ^{14}C]-palmitoyl-CoA and endogenous cholesterol
Ca^{2+} /Calmodulin-protein kinase II	Phosphorylation [^{32}P] of BB40 (a synthetic peptide substrate)
Cyclooxygenase-I	Oxidation of arachidonic acid followed by spectrophotometric quantitation of malondialdehyde
HMG-CoA reductase	Formation of [^{14}C]-mevalonic acid from [^{14}C]-HMG-CoA
Neutral endopeptidase (human)	Formation of 4-methoxy-2-naphthylamine from glutaryl-ala-ala-phe-4-methoxy-2-naphthylamide
Nitric oxide synthase (constitutive)	Conversion of [^3H]-arginine to [^3H]-citrulline
Nitric oxide synthase (inducible)	Measurement of iNOS reaction products (NO_2 and NO_3) in cytosol preparation from mouse macrophages induced by interferon- γ and lipopolysaccharide
Phosphodiesterase III (human)	Conversion of [^3H]-cAMP to [^3H]-AMP which is subsequently converted to [^3H]-adenosine
Phospholipase A_2	Formation of [^{14}C]-palmitate from [^{14}C]-3-phosphatidylcholine
Protein kinase C (non-selective)	Phosphorylation [^{32}P] of Histone H1

Figure 3

ENZYME OR RECEPTOR	IC ₅₀ (enzyme) or pKi (receptor)
<u>Enzymes</u>	
Dopamine-β-hydroxylase (bovine)	8.5 nM
Dopamine-β-hydroxylase (human)	9 nM
Acetyl CoA Synthetase	< 10 μM
Acyl-CoA: Cholesterol Acyltransferase	< 10 μM
Ca ²⁺ /Calmodulin Protein Kinase II	< 10 μM
Cyclooxygenase-I	< 10 μM
HMG-CoA Reductase	< 10 μM
Neutral Endopeptidase (human)	< 10 μM
Nitric oxide synthase (constitutive)	< 10 μM
Nitric oxide synthase (inducible)	< 10 μM
Phosphodiesterase III (human)	< 10 μM
Phospholipase A ₂	< 10 μM
Protein Kinase (non-selective)	< 10 μM
<u>Receptors</u>	
α _{1A} , α _{1B} adrenoceptors	< 5
α _{2A} , α _{2B} adrenoceptors	< 5
β ₁ , β ₂ adrenoceptors	< 5
M ₁ muscarinic receptors	< 5
D ₁ , D ₂ dopamine receptors	< 5
μ-opioid receptors	< 5
5-HT _{1A} , 5-HT _{2A} , 5-HT _{2C} serotonin receptors	< 5

Figure 4

ENZYME	N	CONCENTRATION OF NEPICASTAT (μM)	% INHIBITION OF ENZYME	IC ₅₀ * (μM)
Tyrosine hydroxylase	2	100	11	>100
NO synthase (constitutive)	2	10	6	>10
NO synthase (inducible)	2	10	-1	>10
Phosphodiesterase III	2	100	-9	>100
Phospholipase A ₂	2	300	3	>300
Neutral endopeptidase (human)	2	10	-12	>10
CA ²⁺ /calmodulin dependent protein kinase II	2	100	53	~100
Acetyl CoA synthetase	2	100	-4	>100
Acyl CoA-cholesterol acyl transferase	2	100	6	>100
HMG-CoA reductase	2	30	16	>30
Protein kinase (non-selective)	2	300	39	>300
Cyclooxygenase-I	2	300	44	>300

* Approximate estimation of IC₅₀

Figure 5

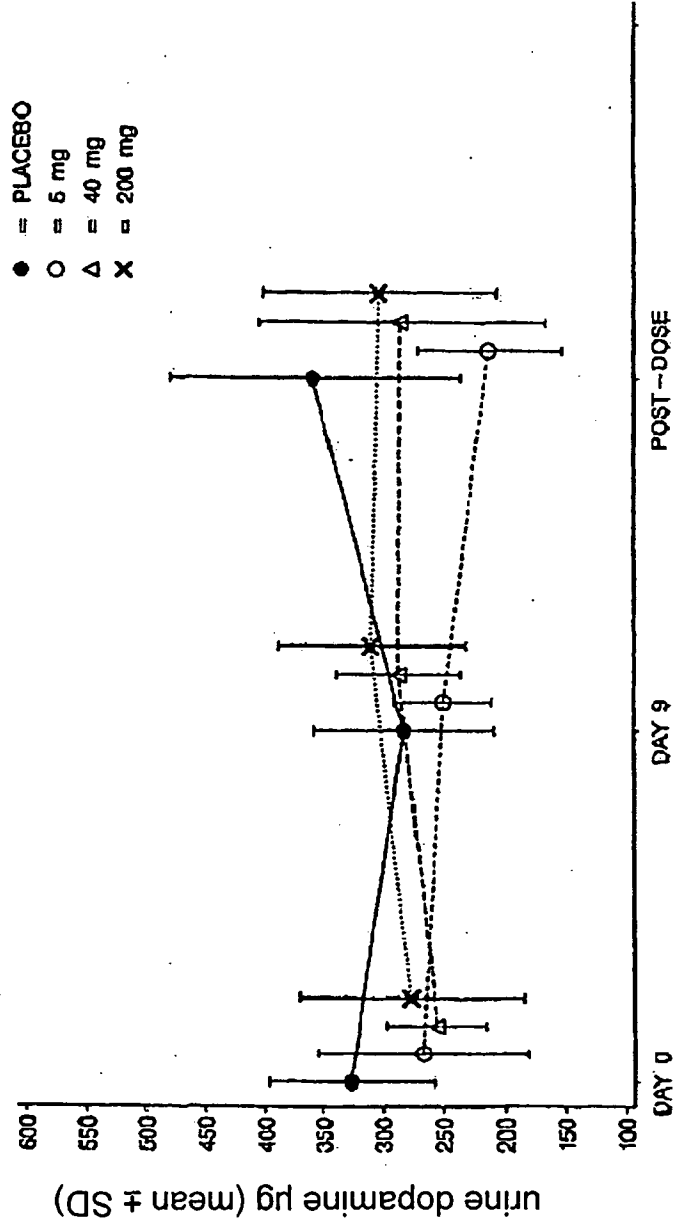
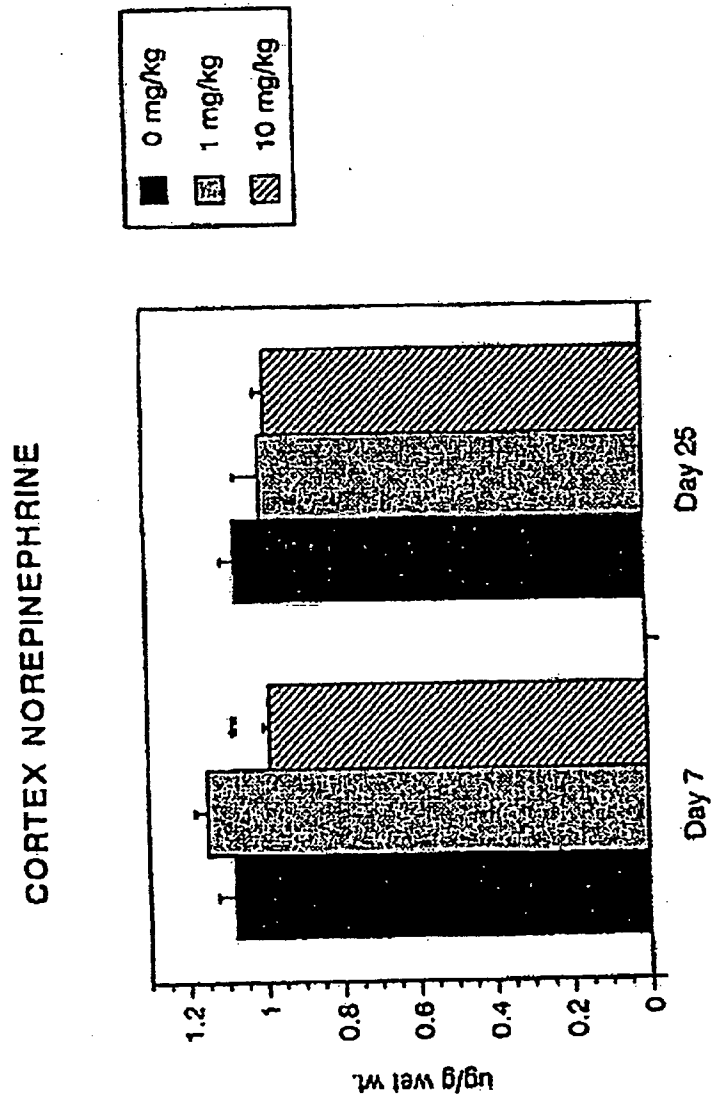


Figure 6



7/11

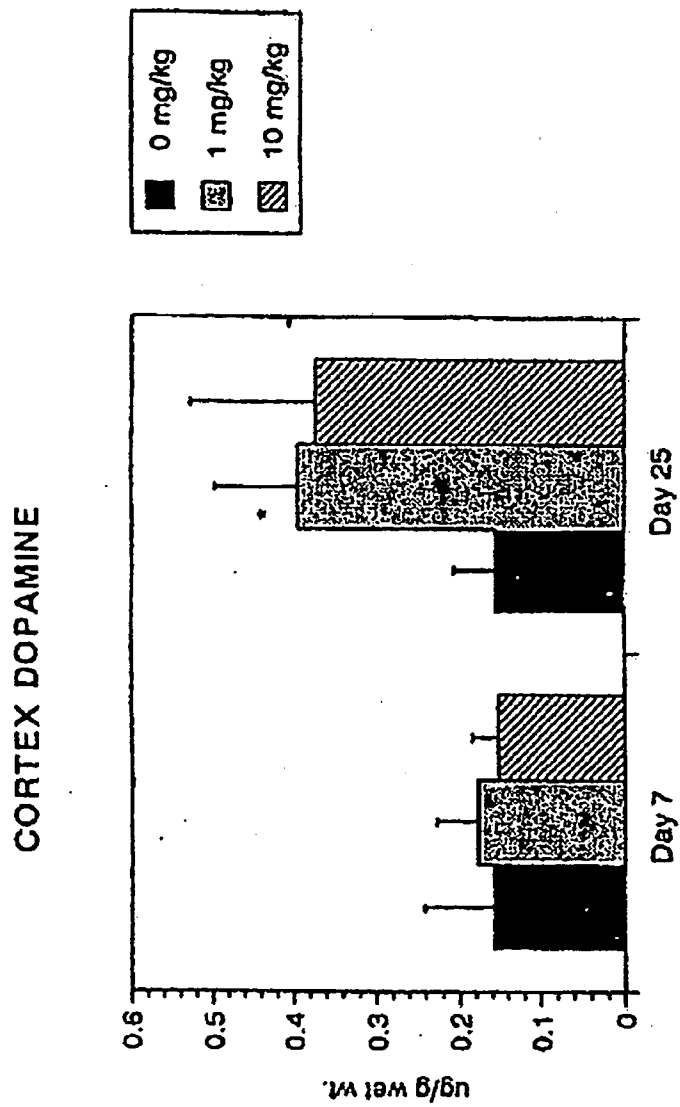


Figure 7

Figure 8

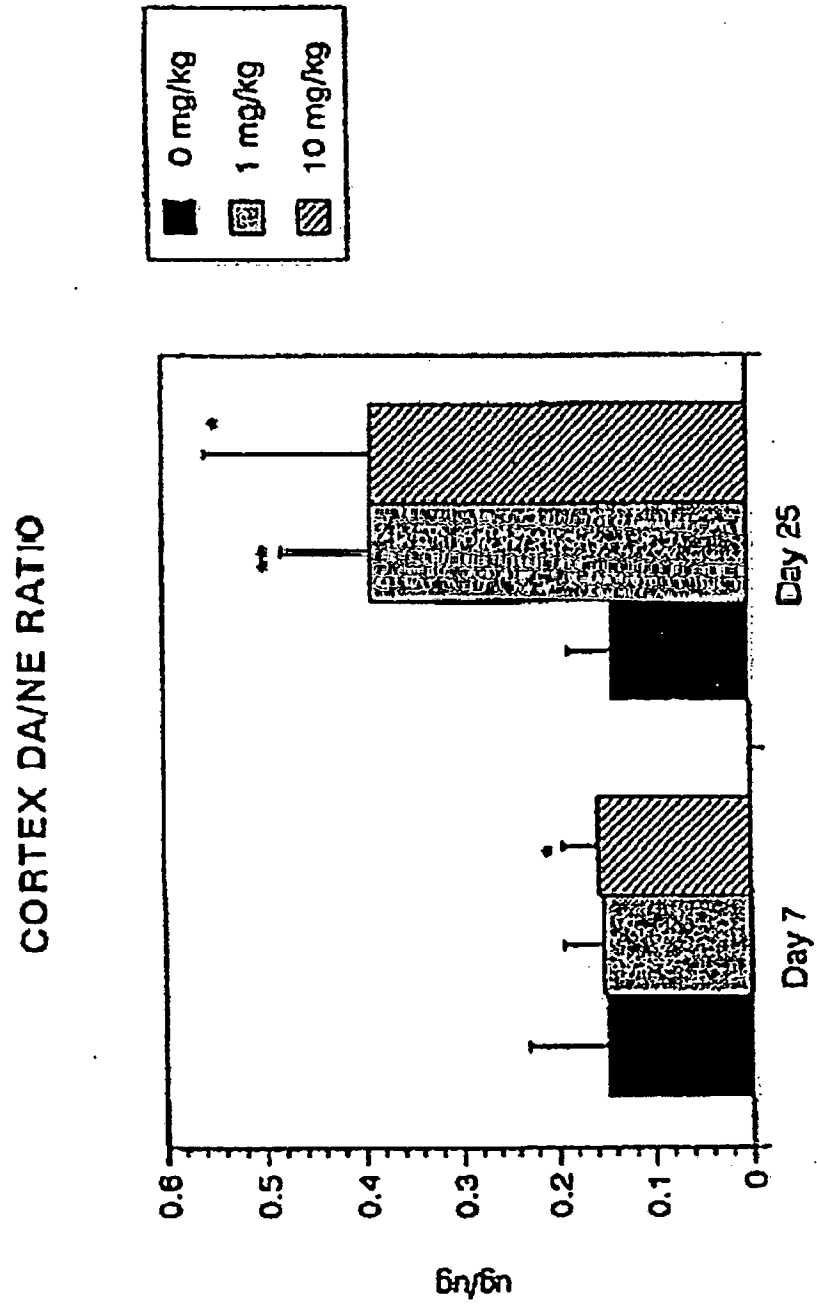


Figure 9

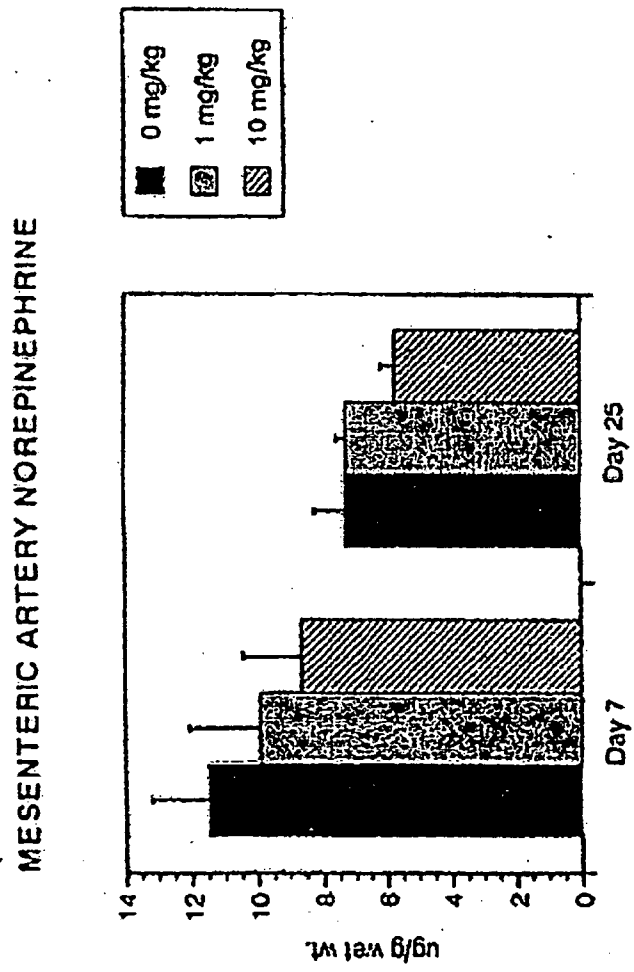


Figure 10

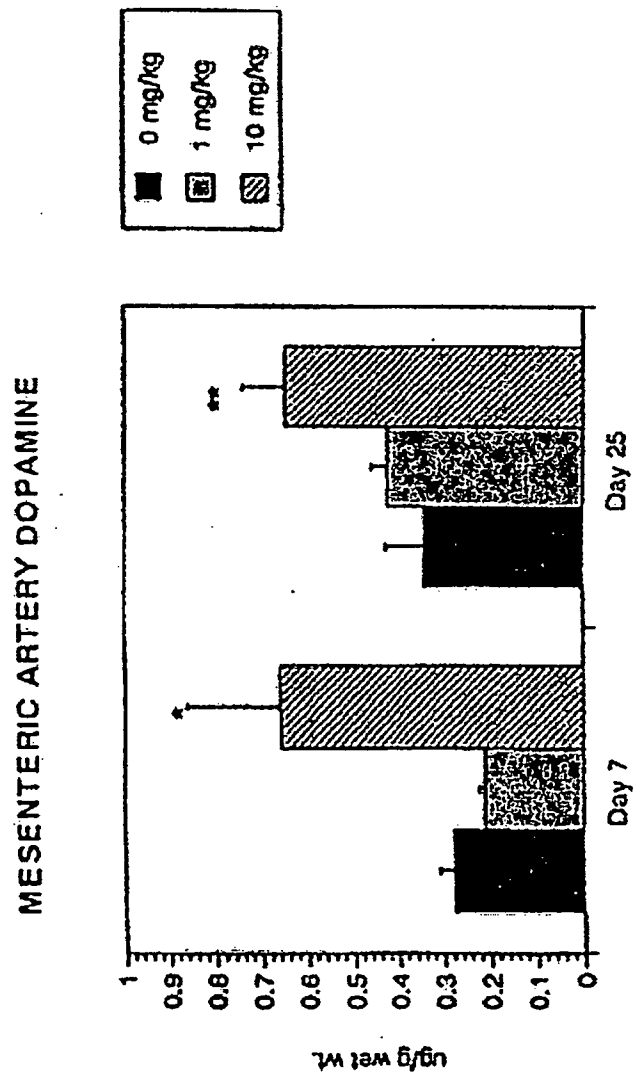
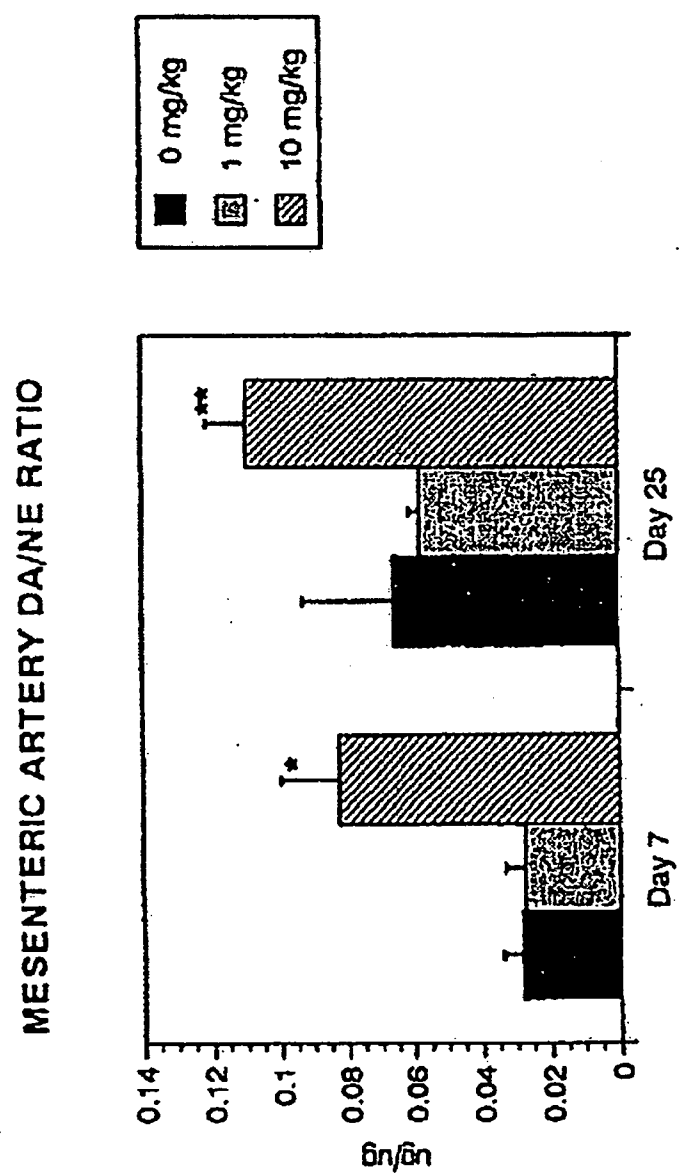


Figure 11



11/11



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: **26 DE FEBRERO DE 2010**

(51) Clasificación Internacional :

(71) Solicitante(s) **SYNOSIA THERAPEUTICS, INC**

(72) Inventor(es) **Tom WOIWODE; Mark MORAN y Lesley PICKFORD**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad

(31) No. Prioridad

32)

Fecha

(33) País

ESTADOUNIDENSE

60/935,323

06/08/2007

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

ESTADOUNIDENSE

60/956,555

17/08/2007

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

ESTADOUNIDENSE

60/960,591

04/10/2007

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional :

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **12/02/2009**

Fecha de presentación de la solicitud: **06/08/2008**

N° publicación: **WO 2009/021055**

No. de solicitud: **PCT/US2008/072357**

(54) Título: **MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE DEPENDENCIA**

163

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(24) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: **26 DE FEBRERO DE 2010**

(25) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) **SYNOSIA THERAPEUTICS, INC.**

(72) Inventor(es) **Tom WOIWODE; Mark MORAN y Lesley PICKFORD**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
ESTADOUNIDENSE		60/935,323		06/08/2007		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE		60/956,555		17/08/2007		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE		60/960,591		04/10/2007		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **06/08/2008**

No. de solicitud: **PCT/US2008/072357**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **12/02/2009**

No. de publicación: **WO 2009/021055**

(90) Título: **MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE DEPENDENCIA**

Resumen:

Un método para tratar a un paciente que sufre de, o es susceptible a, al menos un síntoma de abuso, dependencia o abstinencia de al menos una sustancia, estando dicho método caracterizado porque comprende administrar al paciente una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto A.



No. 10-023191- -00000-0000

Fecha: 2010-02-26 13:13:17 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 163

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art.33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
 - ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐



Bogotá,
2020

Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO

REFERENCIA	Radicación No.	10 23191
	Solicitud internacional	PCT/US2008/072357
	Fecha inicio fase nacional	06/03/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	04801

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

3. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal

Continúa en la página siguiente...

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el rótulo

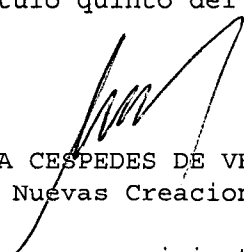
Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Radicación No.:10 23191

e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 09.ABR.2010
adpall