



Organización y
Digitalización CSA Ltda



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PCT

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

08-46632

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: ACIDO 1-(1-(2-ETOXIETIL)-3-ETIL-7-(4-METILPIRIDIN-2-ILAMINO)-
1H-PIRAZOLO[4,3-D]PIRIMIDIN-5-IL)PIPERIDINA-4-CARBOXILICO Y LAS
SALES DEL MISMO

SOLICITANTE: PFIZER PRODUCTS INC.

DIRECCIÓN: EASTERN POINT ROAD, GROTON, CONNECTICUT 06340 E.U.A

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 8 de Mayo de 2008

P2008/000068

55

OLARTE RAISBECK

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-046632-00000-0000

Fecha: 2008-05-08 16:22:03 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE IYI Eve: 378 FASE NACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 240

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2008/000068

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: PFIZER PRODUCTS INC.

Dirección: Eastern Point Road, Groton, CT
06340 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: ESTADOUNIDENSE
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América.

Teléfono: Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual

Número

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8A-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otr ☐

Cual

Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Michel Brent Tollefson

Dirección: 700 chesterfield Parkway, Chesterfield, MO 63017 E.U.A.

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/IB2006/003132 Fecha Octubre 31, 2006

Publicación Internacional No. WO 2007/054778 Fecha Mayo 18, 2007

6

Título (54) ACIDO 1-(1-(2-ETOXIETIL)-3-ETIL-7-(4-METILPIRIDIN-2-ILAMINO)-1H-PIRAZOLO[4,3-D]PRIMIDIN-5-IL)PIPERIDINA-4-CARBOXILICO Y LAS SALES DEL MISMO

Clasificación Internacional (51) C07D 487/04, A61K 31/505, A61P 9/12, A61P 13/12, A61P 25/00, A61P 43/00

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Noviembre 10, 2005

(31) Número de Solicitud

60/735,320

9

Comprobante de pag No. 08-34,696

Fecha Abril 30 de 2008



ANEXOS



Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.



Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.



Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. 06-100.763



Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.



Declaraciones.



Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).



Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).



Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.



De ser el caso, copia del contrato de acceso.



De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.



De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.



Arte final 12 x 12.



De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.



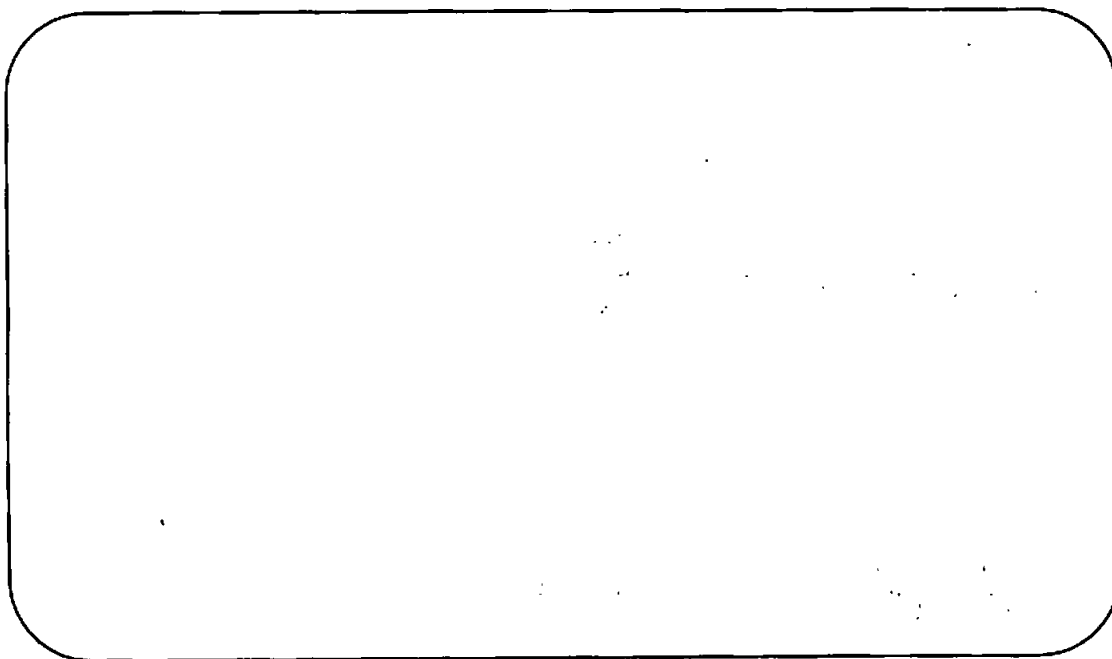
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.



Otros. Búsqueda Internacional

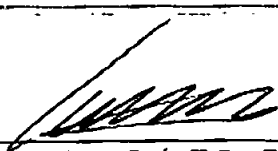


FIGURA CARACTERÍSTICA:



Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA: 

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-046632- -00000-0000

Fecha: 2008-05-08 16:22:03 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 240

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 34,696
FECHA : ABRIL 30 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	106978	29/04/2008	5,510,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SOM: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

21

TRADUCCION OFICIAL No. 05-223

Efectuada el día 9 de diciembre de 2005, de un documento escrito en Inglés, al cual para su identificación se le estampa el sello de Sergio Andrés Rueda Iglesias, Traductor e Intérprete Oficial por Resolución No. 0138 expedida por el Ministerio de Justicia y del Derecho el 11 de febrero de 2002.

Traducción de las Autenticaciones Notariales y subsiguientes correspondientes a un Poder otorgado por PFIZER PRODUCTS, INC., a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro, documento este que viene en español, se explica por sí solo y fue firmado por Grover F. Fuller, Jr. el 17 de noviembre de 2005 en Nueva York, Estados Unidos de América.

También en inglés y en español viene Certificación Notarial mediante la cual se confirma el nombre y cargo de Grover F. Fuller, Jr, así como la existencia legal de la compañía. Dicha certificación notarial está firmada por Susan Z. Killian, Notario Público de Nueva York, cuyo cargo expira el 4 de octubre de 2008, según consta en su correspondiente sello notarial.

Suscrito y jurado ante mí el 17 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Susan Z. Killian


SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. 11.1
TRADUCTOR E INTÉRPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - ESPAÑOL
RESOLUCIÓN No. 0138 - 11/02/02
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

5

ESTADO DE NUEVA YORK - CONDADO DE NUEVA YORK No. 467518

El suscrito, Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York, tribunal éste provisto de sello por ley, por medio de este documento certifico conforme a la ley ejecutiva del Estado de Nueva York que Susan Z. Killian, cuyo nombre aparece suscrito en la declaración jurada o certificado de reconocimiento anexo, desempeñaba en el momento de tomar el mismo, las funciones de Notario Público, en y para el Estado de Nueva York, estando debidamente comisionado bajo juramento y habilitado como tal; que conforme a la ley en mi despacho obra un certificado de su nombramiento con su firma autógrafa; que conozco bien la letra manuscrita de dicho Notario Público o he comparado la firma que aparece en el instrumento anexo con la que reposa en los archivos de mi oficina, y creo en conciencia que la misma es auténtica.

EN FE DE LO CUAL, firmo de mi puño y letra y estampo mi sello oficial, el día 22 de noviembre de 2005.

(Fdo.) Norman Goodman, Escribano del Condado y del Tribunal Supremo del Estado de Nueva York.

SERGIO ANDRÉS RUEDA IGLESIAS
C. C. E. 11.773
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
REGISTRACIÓN No. 01380 DEL 11/06/02
MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEL DERECHO

1. País: Estados Unidos de América

2. Fue firmado por: Norman Goodman

4. Lleva el sello del Condado de Nueva York

5. En Nueva York, Nueva York

7. Por parte del Secretario de Estado, (Encargado) del
Estado de Nueva York

9. Aparece Sello del Estado de Nueva York

10. Firmado por: James Bizzarri, Secretario de Estado
Especial Encargado

Es traducción fiel y completa efectuada por:


Sergio Andrés Rueda Iglesias
c.c. 80.424.773 de Bogotá

SERGIO ANDRÉS BREA Iglesias
N.º 6.507.981
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS / INGLÉS - ESPAÑOL
C.º DE INFORMACIÓN Y COMUNICACIÓN Nº 1.306.2
SECRETARÍA DE JUSTICIA Y DEL DISTRITO

Apostille

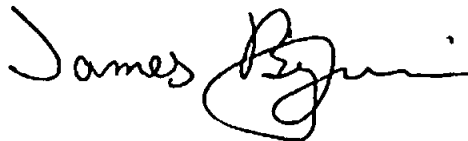
(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

2

1. Country: **United States of America**
This public document
2. has been signed by **Norman Goodman**
3. acting in the capacity of **County Clerk**
4. bears the seal/stamp of the county of **New York**

Certified

5. At New York, New York
6. the 22nd day of November 2005
7. by Special Deputy Secretary of State, State of New York
8. No. NYC-10404952A
9. Seal/Stamp
10. Signature



James Bizzarri
Special Deputy Secretary of State

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Ana María Frieri
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Zayde Chahin
Zaava Ravid
Jacqueline Chaparro
Jose Luis Londoño
Camilo Alvarez
Felipe Mendoza
Camilo Rodríguez
Santiago Pardo

Of Counsel
Guillermo Chahin
Graciela Melo

Power of Attorney

Poder

The undersigned,

El suscrito,

PFIZER PRODUCTS INC.,

domiciled in

domiciliado en

Eastern Point Road, Groton, State of Connecticut 06340, United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte and/or J. Ian Raisbeck and/or Ana María Frieri and/or Juan Guillermo Moure and/or Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, recourses, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Ana María Frieri y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, recursos, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma:

PFIZER PRODUCTS INC.,

By:

Grover F. Fuller, Jr.

Vice President, Attorney-In- Fact

Date/Fecha:

17 November 2005

City/Country/Ciudad,País: New York, NY USA

9

Notarial Certification

Certificación Notarial

On this date,

En esta fecha,

The undersigned Notary Public certifies:

el Notario Público suscrito certifica:

1. That

1. Que

Grover P. Fuller, Jr.

of legal age and domiciled in

mayor de edad y domiciliado

Street 150 East 42nd Street
City New York
State New York 10017-5612 USA

signed the foregoing document.

suscribió el documento que antecede.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Vice President, Attorney-In-Fact of **PFIZER PRODUCTS INC.**

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de
de

3. That **PFIZER PRODUCTS INC.**, having its principal place of business located in Groton, State of Connecticut 06340, United States of America is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

NOTARY PUBLIC (Signature):

Susan Z. Killian



SUSAN Z. KILLIAN
Notary Public, State of New York
No. 01K16116521
Qualified in New York County
Commission Expires October 4, 2008

State of New York
County of New York
SWORN to and SUBSCRIBED before me
this 1st day of Nov. 2005
Susan Z. Killian

APOSTILLA

(Convención de la Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. El presente documento público fue firmado por: BRIAN JACKSON, JR.
3. Que actuó en su calidad de Notario Público en y para El Distrito de Columbia.
4. Y lleva el sello del Notario Público BRIAN JACKSON, JR.,

Se certifico

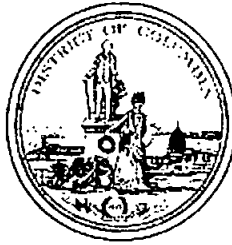
5. En Washington, D.C
6. El 27 de febrero de 2008
7. Por el secretario de Distrito de Columbia.
8. Bajo el Número **187886**. Lleva el Sello
10. Firmado por Stefhanie D. Scott, Secretario de Estado

ASIGNACION

Para la valiosa consideración pagada por mi (nosotros) by PFIZER PRODUCTS INC. una corporación organizada bajo las leyes del estado de Connecticut, Estados Unidos de América que es dirección completa de la oficina de correos Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, Estados Unidos de América, Yo (nosotros) vende y asigna por este medio a PFIZER PRODUCTS INC, toda mi (nuestra) derecha, título e interés en y para mi (nuestro) invención para una nueva y útil mejora dentro de " 4-ACIDO CARBOXILICO DE 1-(1-(2-ETOXIETIL)-3-ETIL-7-(4-METILPIRIDINE-2-ILAMINO)-1H-PIRAZOLO(4,3-D)PIRIMIDIN-5-IL)PIPERIDINA Y SALES DE LAS MISMAS cuanto la República de Colombia se refiere, como completamente dispuesto descrito en la especificación yo (nosotros) autoriza por este medio a comisión de patentes de Colombia a publicar la patente dicha a PFIZER PRODUCTS INC de acuerdo a esta asignación.

Dando fe yo (nosotros) tiene

(firma ilegible) Michael Brent Tollefson
Chesterfield, MO USA 19 de septiembre de 2006 – Michael Brent Tollefson



Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
United States of America
2. This public document has been signed by BRIAN JACKSON, JR.
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT
OF COLUMBIA
4. bears the seal/stamp of BRIAN JACKSON, JR., NOTARY PUBLIC, D.C.

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
27TH FEBRUARY 2008
6. the _____ day of _____
7. by Secretary of the District of Columbia
8. No. 187886
9. Seal/



10. Signature

STEPHANIE D. SCOTT

ASSIGNMENT

For valuable consideration paid to me (us) by **PFIZER PRODUCTS INC.** a corporation organized under the laws of the State of Connecticut, United States of America whose full post office address is Eastern Point Road, Groton, Connecticut 06340, United States of America, I (we) do hereby sell and assign to the said **PFIZER PRODUCTS INC.**, all my (our) right, title and interest in and to my (our) invention for a new and useful Improvement in 1-(1-(2-ETHOXYETHYL)-3-ETHYL-7-(4-METHYLPYRIDIN-2-YLAMINO)-1H-PYRAZOLO[4,3-D]PYRIMIDIN-5-YL)PIPERIDINE-4-CARBOXYLIC ACID AND SALTS THEREOF so far as the Republic of Colombia is concerned, as fully set forth and described in the specification, and I (we) do hereby authorize and request the Commissioner of Patents of Colombia to issue said patent to the said **PFIZER PRODUCTS INC.** in accordance with this assignment.

In witness whereof I (we) have hereunto set my (our) hand(s) this

Michael Brent Tollefson Sept 19, 2006 Chesterfield, MO
Place, date and signature - Michael Brent TOLLEFSON USA

I HEREBY CERTIFY THAT THIS
IS THE ORIGINAL DOCUMENT



District of Columbia: SS
Subscribed and Sworn to before me
this 17th day of February, 2008
Brian Jackson, Jr.
Brian Jackson, Jr. Notary Public, D.C.
My Commission Expires February 29, 2012

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 May 2007 (18.05.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/054778 A1

(51) International Patent Classification:

C07D 487/04 (2006.01) A61P 13/12 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/IB2006/003132

(22) International Filing Date: 31 October 2006 (31.10.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60735,320 10 November 2005 (10.11.2005) US

(71) Applicant (for all designated States except US): PFIZER PRODUCTS INC. [US/US]; Eastern Point Road, Groton, CT 06340 (US).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): TOLLEFSON, Michael Brent [US/US]; Pfizer Global Research and Development, 700 Chesterfield Parkway, Chesterfield, MO 63017 (US).

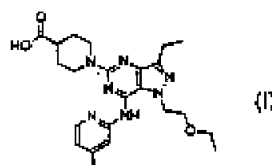
(74) Agent: FULLER, Grover, F., Jr.; Pfizer Inc., 150 East 42nd Street, New York, NY 10017-5612 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, 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, LV, LY, MA, MD, 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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(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, HU, IE, IS, IT, LI, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

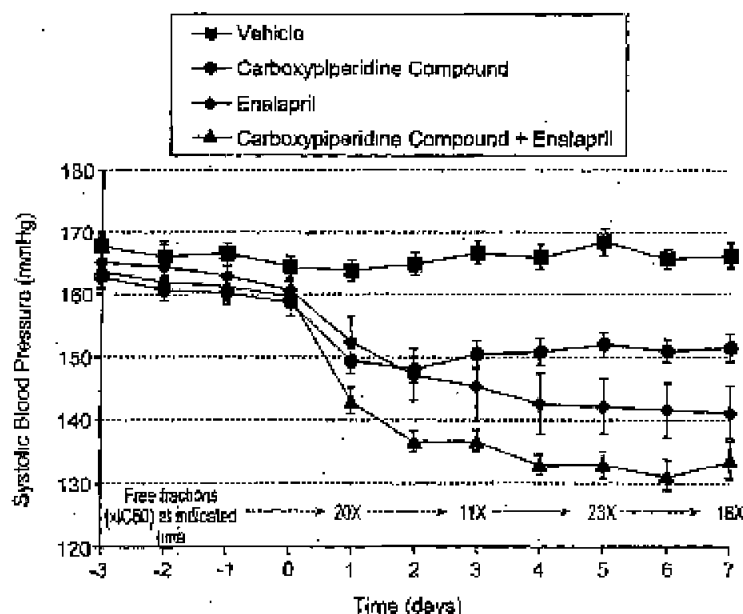
[Continued on next page]

(54) Title: PYRAZOLO[4,3-D]PYRIMIDIN-5-YL)DERIVATIVE USED AS PDES INHIBITORS



(I)

(57) Abstract: The present invention comprises (I) 1-(1-(2-ethoxyethyl-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-4H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid and its salts. The invention further comprises pharmaceutical compositions, methods of treatment, and synthetic methods relating to Formula (I). Formula (I) is used to inhibit the PDES enzyme.



WO 2007/054778 A1

WO 2007/054778 A1



Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

16

PYRAZOLO[4,3-D]PYRIMIDIN-5-YL) DERIVATIVE USED AS PDE5 INHIBITORS

FIELD OF THE INVENTION

5 The present invention relates generally to 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid and its salts. The present invention further relates to pharmaceutical compositions comprising this compound or its salts, methods of treatment employing this compound or its salts, and methods of preparing this
10 compound or its salts. In general, the compound and its salts inhibit the cyclic guanylate monophosphate-specific phosphodiesterase type 5 ("PDE5") enzyme.

BACKGROUND OF THE INVENTION

15 Hypertension is a condition associated with, among other physiological problems, an increased risk of stroke, myocardial infarction, atrial fibrillation, heart failure, peripheral vascular disease and renal impairment. Despite the numerous drugs available in various pharmacological categories to treat hypertension and related physiological problems, not all patients respond to such drugs as effectively or as safely as desired. Additional therapeutic agents for the treatment of hypertension and/or related conditions are still needed.

20 One class of therapeutic agents reported in the literature as useful for the treatment of hypertension are inhibitors of the PDE5 enzyme ("PDE5 inhibitors"). In general, vascular endothelial cells secrete nitric oxide which acts on vascular smooth muscle cells and leads to the activation of guanylate cyclase and the accumulation of cyclic guanosine monophosphate ("cGMP"). The accumulation of cGMP causes the muscles to relax and the blood vessels to
25 dilate, leading to a reduction in blood pressure. The cGMP is inactivated by hydrolysis to guanosine 5'-monophosphate ("GMP") by cGMP-specific phosphodiesterases. One cGMP-phosphodiesterase involved in the inactivation of cGMP is the PDE5 enzyme. Inhibitors of the PDE5 enzyme decrease the rate of cGMP hydrolysis. This reduction in cGMP hydrolysis potentiates the actions of nitric oxide leading to a lowering of blood pressure.

30 Compounds that are PDE5 inhibitors have been reported in the literature. For example, WO2005049616 reports one class of pyrazolo[4,3-d]pyrimidinyl compounds. WO2005049617 reports another class of pyrazolo[4,3-d]pyrimidinyl compounds. WO2004096810 reports another class of pyrazolo[4,3-d]pyrimidinyl compounds. EP 1348707 reports another class of pyrazolo[4,3-d]pyrimidinyl compounds.

35 The identification of additional compounds that are PDE5 inhibitors is desirable. Such compounds can be used to treat subjects suffering from or susceptible to hypertension and/or related physiological problems and further expand the range of treatment options available for such subjects.

7

SUMMARY OF THE INVENTION

In one embodiment, the invention comprises 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid and its pharmaceutically acceptable salts.

5 In another embodiment, the invention comprises a pharmaceutical composition comprising 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a pharmaceutically-acceptable carrier.

10 In another embodiment, the invention comprises a pharmaceutical composition comprising 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, one or more additional therapeutic agents, and a pharmaceutically acceptable carrier.

15 In another embodiment, the invention comprises methods for treating a condition in a subject by administering to a subject a therapeutically effective amount of 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof. Conditions that can be treated in accordance with the present invention include cardiovascular conditions, metabolic conditions, central nervous system conditions, pulmonary conditions, sexual dysfunction, pain, and renal dysfunction.

20 In another embodiment, the invention comprises methods for treating a condition in a subject by administering to a subject a therapeutically effective amount of 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, one or more additional therapeutic agents, and a pharmaceutically acceptable carrier. Conditions that can be treated in accordance with the present invention include cardiovascular conditions, metabolic conditions, central nervous system conditions, pulmonary conditions, sexual dysfunction, pain, and renal dysfunction.

25 In another embodiment, the invention comprises use of 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, for the manufacture of a medicament for the treatment of a condition in a subject. Such conditions include cardiovascular conditions, metabolic conditions, central nervous system conditions, pulmonary conditions, sexual dysfunction, pain, and renal dysfunction.

30 In another embodiment, the invention comprises methods for making 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

35

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows a graph illustrating the effect on blood pressure of repeated oral administration of 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid (1 mg/kg daily oral dose), alone and in combination with enalapril, in a conscious spontaneous hypertensive rat model

40

26

Figure 2 shows a graph illustrating the effect on 24-hour urinary cGMP of repeated oral administration of 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1*H*-pyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid (1 mg/kg daily oral dose), alone and in combination with enalapril, in a conscious spontaneous hypertensive rat model.

5

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

This detailed description of embodiments is intended only to acquaint others skilled in the art with Applicants' inventions, its principles, and its practical application so that others skilled in the art may adapt and apply the inventions in their numerous forms, as they may be best suited to the requirements of a particular use. These inventions, therefore, are not limited to the

10 embodiments described in this specification, and may be variously modified.

A. Abbreviations and Definitions

- As used in reference to ¹H NMR, the symbol "δ" refers to a ¹H NMR chemical shift.
- 15 As used in reference to ¹H NMR, the abbreviation "br" refers to a broad ¹H NMR signal.
- As used in reference to ¹H NMR, the abbreviation "d" refers to a doublet ¹H NMR peak.
- As used in reference to ¹H NMR, the abbreviation "m" refers to a multiplet ¹H NMR peak.
- As used in reference to ¹H NMR, the abbreviation "q" refers to a quartet ¹H NMR peak.
- As used in reference to ¹H NMR, the abbreviation "s" refers to a singlet ¹H NMR peak.
- 20 As used in reference to ¹H NMR, the abbreviation "t" refers to a triplet ¹H NMR peak.
- The abbreviation "BSA" refers to bovine serum albumin.
- The abbreviation "CDI" refers to carbodilimide.
- The abbreviation "DMSO" refers to dimethylsulfoxide.
- The abbreviation "DBAD" refers to dibenzylazodicarboxylate.
- 25 The abbreviation "EDTA" refers to ethylenediaminetetraacetic acid.
- The abbreviation "HEPES" refers to 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid.
- The abbreviation "HRMS" refers to High Resolution Mass Spectroscopy (electrospray ionisation positive scan).
- The abbreviation "iPrOAc" refers to isopropyl acetate.
- 30 The abbreviation "LCMS" refers to Liquid Chromatography Mass Spectroscopy.
- The abbreviation "m/z" refers to a Mass spectrum peak.
- The abbreviation "NaN(TMS)₂" refers to sodium hexamethyldisilazide.
- The abbreviation "pfu" refers to plaque-forming units.
- The abbreviation "Pt/C" refers to platinum on carbon.
- 35 The abbreviation "PMSF" refers to phenylmethylsulfonyl fluoride.
- The abbreviation "SPA" refers to scintillation proximity assay.
- The abbreviation "THF" refers to tetrahydrofuran.
- The abbreviation "Tris-HCl" refers to Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride.

sat

The term "cGMP-mediated condition" refers to any condition mediated by cGMP, whether through direct regulation by cGMP, or through indirect regulation by cGMP as a component of a signalling pathway.

5 The term "PDE5-mediated condition" refers to any condition mediated by the PDE5 enzyme.

The term "hypertensive subject" refers to a subject having hypertension, suffering from the effects of hypertension or susceptible to a hypertensive condition if not treated to prevent or control such hypertension.

10 The term "pharmaceutically acceptable carrier" refers to a carrier that is compatible with the other ingredients of the composition and is not deleterious to the subject. Such carriers may be a pharmaceutically acceptable material, composition or vehicle, such as a liquid or solid filler, diluent, excipient, solvent or encapsulating material, involved in carrying or transporting a chemical agent. The preferred composition depends on the method of administration.

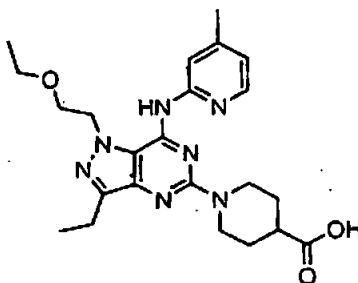
15 The term "therapeutically effective amount" refers to that amount of drug or pharmaceutical agent that will elicit the biological or medical response of a tissue, system or animal that is being sought by a researcher or clinician.

20 The term "treatment" (and corresponding terms "treat" and "treating") includes palliative, restorative, and preventative treatment of a subject. The term "palliative treatment" refers to treatment that eases or reduces the effect or intensity of a condition in a subject without curing the condition. The term "preventative treatment" (and the corresponding term "prophylactic treatment") refers to either preventing the onset of a preclinically evident condition altogether or preventing the onset of a preclinical evident stage of a condition in a subject. The term "restorative treatment" refers to treatment that halts the progression of, reduces the pathologic manifestations of, or entirely eliminates a condition in a subject.

25.

B. Carboxypiperidine Compound

In one embodiment, the present invention comprises the compound having the structure:



30 and the salts (particularly the pharmaceutically-acceptable salts) of the compound. The corresponding name of this compound is 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid. Unless otherwise stated, this compound, all tautomeric forms of the compound, and the pharmaceutically-acceptable salts of the compound and its tautomeric forms are collectively referred to in this application as the

"Carboxypiperidine Compound". The Carboxypiperidine Compound is useful, for example, as an inhibitor of the PDE5 enzyme.

In one embodiment, the present invention is directed to the free acid form of the Carboxypiperidine Compound.

5 In another embodiment, the present invention is directed to the pharmaceutically acceptable salts of the Carboxypiperidine Compound.

WO2004096810 reports a genus of compounds that generically embraces the Carboxypiperidine Compound. Although WO2004096810 provides examples of specific compounds within the genus, it does not disclose the Carboxypiperidine Compound itself. The Carboxypiperidine Compound, however, possesses at least one or more different properties relative to the specific compounds described in WO2004096810. These properties include, for example, efficacy (e.g., greater *in vitro*, *ex vivo*, and/or *in vivo* potency), safety (e.g., greater selectivity and/or lower toxicity), pharmacokinetic properties (e.g., C_{max} , longer half-life and/or lower clearance), and manufacturing properties (e.g., ease of synthesis and/or availability of starting materials).

C. Salts

As noted above, the Carboxypiperidine Compound may be in either the free acid form or in a salt form. Different salt forms of the Carboxypiperidine Compound may have different physical properties relative to each other. Accordingly, selection of the specific salt form of the Carboxypiperidine Compound potentially can impact, for example, compound stability (such as over a range of temperatures and/or humidities), compound solubility, and other compound physical properties that can affect a drug product. In addition, salts of the Carboxypiperidine Compound generally will have greater aqueous solubility than the corresponding free acid form.

25 Where the salt of the Carboxypiperidine Compound is administered to a human or animal subject (as opposed to, for example, use for *in vitro* testing), the salt preferably is a pharmaceutically acceptable salt. The term "pharmaceutically acceptable salt" refers to a salt that is generally considered suitable for human consumption (particularly a non-toxic salt). Pharmaceutically acceptable salts include base addition salts and acid addition salts of the corresponding free acid. These salts typically may be prepared by conventional means from the free acid of the Carboxypiperidine Compound.

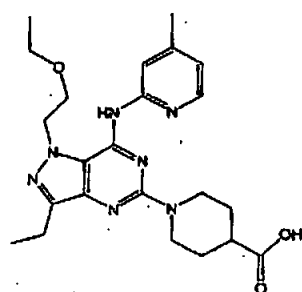
35 Illustrative base addition salts of the Carboxypiperidine Compound include metallic salts and organic salts. Metallic salts include alkali metal (group Ia) salts (such as lithium, sodium and potassium salts), alkaline earth metal (group IIa) salts (such as calcium and magnesium salts), and other physiological acceptable metal salts (such as aluminum and zinc salts). Organic salts include salts made from secondary, tertiary and quaternary amines (such as tromethamine, diethylamine, triethylamine, ethanolamine, diethanolamine, triethanolamine, ethylenediamine, N,N'-dibenzylethylenediamine, meglumine (N-methylglucamine), procaine, chlorprocaine, and choline) and salts made from cationic amino acids (such as arginine, lysine and histidine).

Examples of suitable acid addition salts include, hydrochloride, hydrobromide, hydrofluoride, hydroiodide, borate, fluoroborate, phosphate, hydrogen phosphate, dihydrogen phosphate, glycerophosphate, hexafluorophosphate, metaphosphate, nitrate, bicarbonate, carbonate, bisulphate, sulfate, dodecylsulfate, sulfonate, methanesulfonate, ethanesulfonate, benzenesulfonate, toluenesulfonate, trifluoromethanesulfonate, toluenesulfonate, 2-hydroxyethanesulfonate, cyclohexylaminosulfonate, 2-naphthalesulfonate, camphorsulfonate, acetate, adipate, anthranilate, aspartate, ascorbate, alginate, trifluoroacetate, phenylacetate, benzoate, p-hydroxybenzoate, besylate, butyrate, β -hydroxybutyrate, camphorate, camesate, citrate, embonate, edisylate, esylate, formate, fumarate, gluconate, digluconate, glycolate, glucamate, glucuronate, gluceptate, heptanoate, glycoheptanoate, hexanoate, hibenzate, isethionate, isothionate, lactate, lactobionate, malate, maleate, mandelate, mesylate, nicotinate, orotate, oxalate, palmitate, pamoate, panthothenate, pectinate, picrate, pivalate, propionate, cyclopentanepropionate, 3-phenylpropionate, pyruvate, saccharate, salicylate, stearate, succinate, sulfanilate, tartrate, galactarate, tosylate, uronate, galacturonate, thiocyanate, and undecanoate.

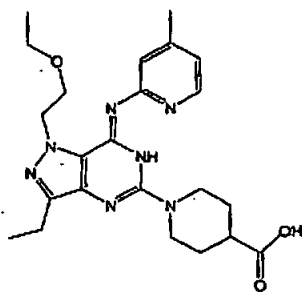
For a review on suitable salts, see "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002).

D. Tautomers

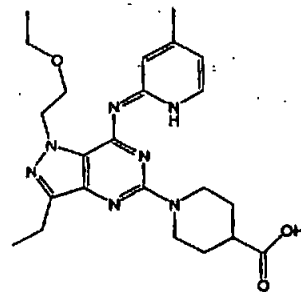
As used in this application, the term Carboxypiperidine Compound (as well as the corresponding structure) is intended to embrace all tautomeric isomers of 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid. Representative tautomeric isomers of the Carboxypiperidine Compound are shown below:



Tautomer (1)



Tautomer (2)



Tautomer (3)

E. Methods of Treatment

The present invention further comprises methods for treating a condition in a subject having or susceptible to having such a condition by administering to the subject a therapeutically-effective amount of the Carboxypiperidine Compound. In one embodiment, the treatment is

preventative treatment. In another embodiment, the treatment is palliative treatment. In still another embodiment, the treatment is restorative treatment.

In another embodiment, the condition is a PDE5-mediated condition.

5 In another embodiment, the condition is a cGMP-mediated condition. A condition in which, for instance, insufficient cGMP is a major component, and whose production or action is modulated in response to the PDE5 enzyme, would therefore be considered a disorder mediated by cGMP.

10 In another embodiment, the condition is selected from the group consisting of cardiovascular conditions, metabolic conditions, central nervous system conditions, pulmonary conditions, sexual dysfunction, pain and renal dysfunction.

15 In another embodiment, the condition is a cardiovascular condition selected from the group consisting of hypertension (including essential hypertension, pulmonary hypertension, pulmonary arterial hypertension, secondary hypertension, isolated systolic hypertension, hypertension associated with diabetes, hypertension associated with atherosclerosis, and renovascular hypertension); complications associated with hypertension (including vascular organ damage, congestive heart failure, angina, stroke, glaucoma and impaired renal function); valvular insufficiency; stable, unstable and variant (Prinzmetal) angina; peripheral vascular disease; myocardial infarct; stroke (including stroke recovery); thromboembolic disease; restenosis; arteriosclerosis; atherosclerosis; angiostenosis after bypass; angioplasty (including
20 percutaneous transluminal angioplasty and percutaneous transluminal coronary angioplasty); hyperlipidemia; hypoxic vasoconstriction; vasculitis (including Kawasaki's syndrome); heart failure (including congestive heart failure, decompensated heart failure, systolic heart failure, diastolic heart failure, left ventricular heart failure, right ventricular heart failure, and left ventricular hypertrophy); Raynaud's phenomenon; preeclampsia; pregnancy-induced high blood
25 pressure; cardiomyopathy; and arterial occlusive disorders.

In another embodiment, the condition is hypertension.

In another embodiment, the condition is pulmonary hypertension.

In another embodiment, the condition is pulmonary arterial hypertension.

In another embodiment, the condition is heart failure.

30 In another embodiment, the condition is diastolic heart failure.

In another embodiment, the condition is systolic heart failure.

In another embodiment, the condition is angina.

In another embodiment, the condition is thrombosis.

In another embodiment, the condition is stroke (including stroke recovery).

35 In another embodiment, the condition is a condition associated with endothelial dysfunction (including conditions selected from the group consisting of atherosclerotic lesions, myocardial ischaemia, peripheral ischaemia, valvular insufficiency, pulmonary arterial hypertension, angina, clots, vascular complications after vascular bypass, vascular dilation, vascular permeabilisation, and heart transplantation).

73

In another embodiment, the condition is a metabolic condition selected from the group consisting of Syndrome X; diabetes (including type I and type II diabetes); insulin resistance; syndromes of insulin resistance (including insulin receptor disorders, Rabson-Mendenhall syndrome, leprechaunism, Kobberling-Dunnigan syndrome, Seip syndrome, Lawrence syndrome, Cushing syndrome, acromegaly, pheochromocytoma, glucagonoma, primary aldosteronism, somatostatinoma, Lipoatrophic diabetes, β -cell toxin induced diabetes, Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis and Idiopathic Addison's disease); impaired glucose tolerance; diabetic complications (including diabetic gangrene, diabetic arthropathy, diabetic nephropathy, diabetic glomerulosclerosis, diabetic dermatopathy, diabetic neuropathy, peripheral diabetic neuropathy, diabetic cataract, and diabetic retinopathy); hyperglycemia; and obesity.

In another embodiment, the condition is insulin resistance.

In another embodiment, the condition is nephropathy.

In another embodiment, the condition is a central nervous system condition selected from the group consisting of vascular dementia; craniocerebral trauma; cerebral infarct; cerebrovascular accident, dementia; concentration disorders; Alzheimer's disease; Parkinson's disease; amyotrophic lateral sclerosis; Huntington's disease; multiple sclerosis; Creutzfeldt-Jacob disease; anxiety; depression; sleep disorders; and migraine.

In another embodiment, the condition is Alzheimer's disease.

In another embodiment, the condition is Parkinson's disease.

In another embodiment, the condition is amyotrophic lateral sclerosis.

In another embodiment, the condition is a concentration disorder.

In another embodiment, the condition is a pulmonary condition selected from the group consisting of asthma; acute respiratory distress; cystic fibrosis; chronic obstructive pulmonary disease; bronchitis; and chronic reversible pulmonary obstruction.

In another embodiment, the condition is pain. In another embodiment, the condition is acute pain. Examples of acute pain include acute pain associated with injury or surgery. In another embodiment, the condition is chronic pain. Examples of chronic pain include neuropathic pain (including postherpetic neuralgia and pain associated with peripheral, cancer or diabetic neuropathy), carpal tunnel syndrome, back pain (including pain associated with herniated or ruptured intervertebral discs or abnormalities of the lumbar facet joints, sacroiliac joints, paraspinal muscles or the posterior longitudinal ligament), headache, cancer pain (including tumour related pain such as bone pain, headache, facial pain or visceral pain) or pain associated with cancer therapy (including postchemotherapy syndrome, chronic postsurgical pain syndrome, post radiation syndrome, pain associated with immunotherapy, or pain associated with hormonal therapy), arthritic pain (including osteoarthritis and rheumatoid arthritis pain), chronic post-surgical pain, post herpetic neuralgia, trigeminal neuralgia, HIV neuropathy, phantom limb pain, central post-stroke pain and pain associated with chronic alcoholism, hypothyroidism, uremia, multiple sclerosis, spinal cord injury, Parkinson's disease, epilepsy and vitamin deficiency. In another embodiment, the condition is nociceptive pain (including pain from central nervous system trauma, strains/sprains, burns, myocardial infarction and acute

gil

- pancreatitis, post-operative pain (pain following any type of surgical procedure); posttraumatic pain, renal colic, cancer pain and back pain). In another embodiment, the condition is pain associated with inflammation (including arthritic pain (such as osteoarthritis and rheumatoid disease pain), ankylosing spondylitis, visceral pain (including inflammatory bowel disease, functional bowel disorder, gastro-esophageal reflux, dyspepsia, irritable bowel syndrome, functional abdominal pain syndrome, Crohn's disease, ileitis, ulcerative colitis, dysmenorrhea, cystitis, pancreatitis and pelvic pain). In another embodiment, the condition is pain resulting from musculo-skeletal disorders (including myalgia, fibromyalgia, spondylitis, sero-negative (non-rheumatoid) arthropathies, non-articular rheumatism, dystrophinopathy, glycogenolysis, polymyositis and pyomyositis). In another embodiment, the condition is selected from the group consisting of heart and vascular pain (including pain caused by angina, myocardial infarction, mitral stenosis, pericarditis, Raynaud's phenomenon, scleroderma and skeletal muscle ischemia). In another embodiment, the condition is selected from the group consisting of head pain (including migraine such as migraine with aura and migraine without aura), cluster headache, tension-type headache mixed headache and headache associated with vascular disorders; orofacial pain, including dental pain, otic pain, burning mouth syndrome and temporomandibular myofascial pain).

- In another embodiment, the condition is sexual dysfunction (including sexual dysfunction selected from the group consisting of impotence (organic or psychic); male erectile dysfunction; clitoral dysfunction; sexual dysfunction after spinal cord injury; female sexual arousal disorder; female sexual orgasmic dysfunction; female sexual pain disorder; and female hypoactive sexual desire disorder).

In another embodiment, the condition is male erectile dysfunction.

- In another embodiment, the condition is renal dysfunction (including renal dysfunction selected from the group consisting of acute renal failure, chronic renal failure; nephropathy (such as diabetic nephropathy); tubulointerstitial disorders; glomerulopathy; and nephritis. In another embodiment, the condition is a cancer condition selected from the group consisting of cancerous cachexia; tumor metastasis and neoplasia.

In another embodiment, the condition is osteoporosis.

- In another embodiment, the condition is a gastrointestinal condition selected from the group consisting of nutcracker oesophagus; anal fissure; disorders of gut motility; irritable bowel syndrome and haemorrhoids. In another embodiment, the condition is a urologic condition selected from the group consisting of bladder outlet obstruction; incontinence and benign prostatic hyperplasia.

- In another embodiment, the condition is a skin condition, selected from psoriasis; urticaria and skin necrosis.

In another embodiment, the condition is an ophthalmic condition selected from retinal disease; macular degeneration and glaucoma.

In another embodiment, the condition is nitrate intolerance.

- In another embodiment, the condition is baldness.

In another embodiment, the condition is a gynecologic condition selected from the group consisting of dysmenorrhoea (primary and secondary); infertility and premature labor. In another embodiment, the condition is secondary dysmenorrhoea.

In another embodiment, the present invention further comprises methods for inducing weight loss or maintenance of weight loss in a subject by administering to the subject a therapeutically-effective amount of the Carboxypiperidine Compound.

F. Subjects

The Carboxypiperidine Compound (including the corresponding methods of treatment and pharmaceutical compositions) are suitable for use with, for example, mammalian subjects such as humans, other primates (e.g., monkeys, chimpanzees), companion animals (e.g., dogs, cats, horses), farm animals (e.g., goats, sheep, pigs, cattle), laboratory animals (e.g., mice, rats), and wild and zoo animals (e.g., wolves, bears, deer). In one embodiment, the subject is a mammalian subject. In another embodiment, the subject is a human.

G. Hypothesized Mechanism

Without being held to a particular theory, it is hypothesized that the Carboxypiperidine Compound is an inhibitor of the PDE5 enzyme. It is further hypothesized that the Carboxypiperidine Compound inhibits the action of the PDE5 enzyme leading to an increase in intracellular cGMP levels. This increase in intracellular cGMP levels reduces intracellular calcium signaling, which in turn results in vascular smooth muscle relaxation and a reduction in blood pressure.

H. Administration and Dosing

The Carboxypiperidine Compound is generally administered in a therapeutically effective amount. In one embodiment, the Carboxypiperidine Compound is administered in a PDE5 enzyme inhibiting amount. The Carboxypiperidine Compound can be administered by any suitable route in the form of a pharmaceutical composition adapted to such a route, and in a dose effective for the treatment intended. Therapeutically effective doses of the Carboxypiperidine Compound required to prevent or arrest the progress of, or to treat the medical condition, are readily ascertained by one of ordinary skill in the art using preclinical and clinical approaches familiar to the medicinal arts.

The dosage regimen for the compounds and/or compositions containing the compounds is based on a variety of factors, including the type, age, weight, sex and medical condition of the patient; the severity of the condition; the route of administration; and the activity of the particular compound employed. Thus the dosage regimen may vary based on the specific situation. Dosage levels from about 0.001 mg to about 100 mg of Carboxypiperidine Compound per kilogram of body weight per day are useful in the treatment of the above-indicated conditions. In one embodiment, the total daily dose of the Carboxypiperidine Compound (administered in single or divided doses) is typically from about 0.001 mg/kg to about 20 mg/kg (i.e., mg compound/kg

76

body weight). In another embodiment, the total daily dose of the Carboxypiperidine Compound is from about 0.005 mg/kg to about 10 mg/kg. In another embodiment, the total daily dose is from about 0.005 mg/kg to about 5 mg/kg. In another embodiment, the total daily dose is from about 0.01 mg/kg to about 1 mg/kg. These dosages are based on an average human subject having a weight of about 65 kg to about 75 kg. A physician will readily be able to determine doses for subjects whose weight falls outside of this range, such as infants. The administration of the Carboxypiperidine Compound can be repeated a plurality of times in a day (typically no greater than 4 times) to achieve the desired daily dose.

For convenience the Carboxypiperidine Compound can be administered in a unit dosage form. If desired, multiple doses per day of the unit dosage form can be used to increase the total daily dose. The unit dosage form, for example, may be a tablet or capsule containing about 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 250 or 500 mg of the Carboxypiperidine Compound. In one embodiment, the unit dosage form contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the Carboxypiperidine Compound. In another embodiment, the unit dosage form contains from about 0.05 mg to about 250 mg of the Carboxypiperidine Compound. In another embodiment, the unit dosage form contains from about 0.1 mg to about 100 mg of the Carboxypiperidine Compound. In another embodiment, the unit dosage form contains from about 0.5 mg to about 50 mg of the Carboxypiperidine Compound.

I. Use in the Preparation of a Medicament

In another embodiment, the present invention comprises the Carboxypiperidine Compound for use as a medicament (such as a unit dosage tablet or unit dosage capsule).

The present invention further comprises the use of the Carboxypiperidine Compound for the manufacture of a medicament (such as a unit dosage tablet or unit dosage capsule) to treat one or more of the conditions previously identified in the above sections discussing methods of treatment. In one embodiment, the condition is hypertension.

J. Pharmaceutical Compositions

For the treatment of the conditions referred to above, the Carboxypiperidine Compound can be administered as the free acid compound *per se*. In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound can be administered as one or more pharmaceutically acceptable salts of the free acid compound *per se*. In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound can be administered as a mixture of the free acid compound *per se* and one or more pharmaceutically acceptable salts of the free acid compound *per se*.

The present invention further comprises pharmaceutical compositions comprising the Carboxypiperidine Compound. In one embodiment, the pharmaceutical composition comprises the Carboxypiperidine Compound in the free acid form. In another embodiment, the pharmaceutical composition comprises one or more pharmaceutically acceptable salts of the Carboxypiperidine Compound. In another embodiment, the pharmaceutical composition

comprises a mixture of the Carboxypiperidine Compound in the free acid form and one or more pharmaceutically acceptable salts of the Carboxypiperidine Compound. In one embodiment, the pharmaceutical composition comprises the Carboxypiperidine Compound and at least one pharmaceutically-acceptable carrier. The carrier can be a solid, a liquid, or both, and may be formulated with the Carboxypiperidine Compound as a unit dosage form, for example, a tablet, which can contain from 0.05% to 95% by weight of the Carboxypiperidine Compound. Other pharmacologically active substances can also be present.

The Carboxypiperidine Compound may be administered by any suitable route, preferably in the form of a pharmaceutical composition adapted to such a route, and in a dose effective for the treatment intended. The Carboxypiperidine Compound and corresponding compositions, for example, may be administered orally, rectally, parenterally, or topically.

Oral administration of a solid dosage form may be, for example, presented in discrete units, such as hard or soft capsules, pills, cachets, lozenges, or tablets, each containing a predetermined amount of at least one compound of the present invention. In another embodiment, the oral administration may be in a powder or granule form. In another embodiment, the oral dose form is sub-lingual, such as, for example, a lozenge. In such solid dosage forms, the Carboxypiperidine Compound is ordinarily combined with one or more adjuvants. In the case of capsules, tablets, and pills, the dosage forms also may comprise buffering agents or may be prepared with enteric coatings.

In another embodiment, oral administration may be in a liquid dose form. Liquid dosage forms for oral administration include, for example, pharmaceutically acceptable emulsions, solutions, suspensions, syrups, and elixirs containing inert diluents commonly used in the art (e.g., water). Such compositions also may comprise adjuvants, such as wetting, emulsifying, suspending, flavoring (e.g., sweetening), and/or perfuming agents.

In another embodiment, the present invention comprises a parenteral dose form. "Parenteral administration" includes, for example, subcutaneous injections, intravenous injections, intraperitoneally, intramuscular injections, intrasternal injections, and infusion. Injectable preparations (e.g., sterile injectable aqueous or oleaginous suspensions) may be formulated according to the known art using suitable dispersing, wetting agents, and/or suspending agents.

In another embodiment, the present invention comprises a topical dosage form. "Topical administration" includes, for example, transdermal administration, such as via transdermal patches or iontophoresis devices, intraocular administration, or intranasal or inhalation administration. Compositions for topical administration also include, for example, topical gels, sprays, ointments, and creams. A topical formulation may include a compound which enhances absorption or penetration of the active ingredient through the skin or other affected areas. When the compounds of this invention are administered by a transdermal device, administration will be accomplished using a patch either of the reservoir and porous membrane type or of a solid matrix variety. Formulations suitable for topical administration to the eye include, for example, eye drops wherein the compound of this invention is dissolved or suspended in suitable carrier.

28

For intranasal administration or administration by inhalation, the active compounds of the invention are conveniently delivered in the form of a solution or suspension from a pump spray container that is squeezed or pumped by the patient or as an aerosol spray presentation from a pressurized container or a nebulizer, with the use of a suitable propellant.

- 5 In another embodiment, the present invention comprises a rectal dosage form. Such rectal dose form may be in the form of, for example, a suppository.

Other carrier materials and modes of administration known in the pharmaceutical art may also be used. Pharmaceutical compositions of the invention may be prepared by any of the well-known techniques of pharmacy, such as effective formulation and administration procedures.

- 10 The above considerations in regard to effective formulations and administration procedures are well known in the art and are described in standard textbooks. Formulation of drugs is discussed in, for example, Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1975; Liberman, et al., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; and Kibbe, et al., Eds., Handbook of Pharmaceutical Excipients:
15 (3rd Ed.), American Pharmaceutical Association, Washington, 1999.

K. Combinations and Combination Therapy

The Carboxypiperidine Compound also can be administered in combination with other therapeutic agents to treat the various conditions previously discussed above. The

- 20 Carboxypiperidine Compound and the other therapeutic agent(s) may be administered simultaneously (either in the same dosage form or in separate dosage forms) or sequentially. Accordingly, in one embodiment, the present invention comprises methods for treating a condition in a subject having or susceptible to having such a condition by administering to the subject a therapeutically-effective amount of the Carboxypiperidine Compound and one or more
25 additional therapeutic agents. In another embodiment, the present invention comprises a pharmaceutical composition comprising the Carboxypiperidine Compound, one or more additional therapeutic agents, and a pharmaceutically acceptable carrier.

In one embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be administered with aspirin.

- In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with
30 one or more diuretics. Examples of suitable diuretics include hydrochlorothiazide (such as MICROZIDE™ and ORETIC™), hydroflumethiazide (such as SALURON™), bumetanide (such as BUMEX™), furosemide (such as FURASEM™), metolazone (such as ZAROXOLYN™), chlorothiazide (such as DIURIL™, ESIDRIX™ and HYDRODIURIL™), triamterene (such as DYRENUM™), ethacrynic acid (such as EDECRIN™), chlorthalidone (such as HYGROTON™),
35 furosemide (such as LASIX™), indapamide (such as LOZOL™), and amiloride (such as MIDAMOR™ and MODURETIC™).

- In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more angiotensin converting enzyme inhibitors. Examples of suitable angiotensin converting enzyme inhibitors include quinapril (such as ACCUPRIL™), perindopril (such as
40 ACEON™), captopril (such as CAPOTEN™), enalapril (such as VASOTEC™), ENALAPRILAT™,

29

ramipril (such as ALTACE™), cilazapril, delapril, fosenopril (such as MONOPRIL™), zofenopril, indolapril, benazepril (such as LOTENSIN™), lisinopril (such as PRINIVIL™ and ZESTRIL™), spirapril, trandolapril (such as MAVIK™), perindopril, pentopril, moexipril (such as UNIVASC™), fasidotril, S-allylmercaptocaptopril, and piroperil.

- 5 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more angiotensin II receptor blockers. Examples of suitable angiotensin II receptor blockers include candesartan (such as ATACAND™), eprosartan (such as TEVETEN™), irbesartan (such as AVEPRO™), losartan (such as COZAAR™), olmesartan, olmesartan medoxomil (such as BENICAR™), tasosartan, telmisartan (such as MICARDIS™), valsartan
10 (such as DIOVAN™), zolasartan, FI-6828K, RNH-6270, UR-7198, Way-126227, KRH-594, TAK-536, BRA-657, and TA-608.

- In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more calcium channel blockers. Examples of suitable calcium channel blockers include nifedipine (such as ADALAT™, ADALAT CC™ and PROCARDIA™), verapamil (such as
15 CALAN™, COVERA-HS™, ISOPTIN SR™ and VERELAN™), diltiazem (such as CARDIZEM™, CARDIZEM CD™, CARDIZEM LA™, CARDIZEM SR™, DILACOR™, TIAMATE™ and TIAZAC™), isradipine (such as DYNACIRC™ and DYNACIRC CR™), amlodipine (such as NORVASC™), felodipine (such as PLENDIL™), nisoldipine (such as SULAR™), bepridil (such as VASCOR™), vatanidipine, clevidipine, lercanidipine, diltiazem, and NNC-55-0398.

- 20 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more beta blockers. Examples of suitable beta blockers include timolol (such as BLOCARDEN™), carteolol (such as CARTROL™), carvedilol (such as COREG™), nadolol (such as CORGARD™), propranolol (such as INNOPRAN XL™), betaxolol (such as KERLONE™), penbutolol (such as LEVATOL™), metoprolol (such as LOPRESSOR™ and TOPROL-XL™),
25 atenolol (such as TENORMIN™), pindolol (such as VISKENT™), and bisoprolol.

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more alpha blockers. Examples of suitable alpha blockers include prazosin, doxazosin (such as CARDURA™), phenoxybenzamine (such as DIBENZYLINE™), terazosin (such as HYTRIN™), CDRI-93/478 and CR-2991.

- 30 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more alpha-beta blockers. An example of a suitable alpha-beta blocker is labetalol (such as NORMODYNE™ or TRANDATE™).

- In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more aldosterone receptor antagonists. Examples of suitable aldosterone receptor
35 antagonists include eplerenone (such as INSPRA™) and spironolactone (such as ALDACTONE™).

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more renin inhibitors. Examples of suitable renin inhibitors include aliskiren (SPP 100), SPP-500/600 and YS-004-39.

70

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more central antiadrenergics. Examples of suitable central antiadrenergics includes methyldopa (such as ALDOMET™), clonidine (such as CATAPRES™ or CATAPRES-TTS™), guanfacine (such as TENEX™), and guanabenz (such as WYTENSIN™).

5 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more glycosides / inotropic agents. An example of a suitable glycoside / inotropic agent is digoxin (such as LANOXIN™).

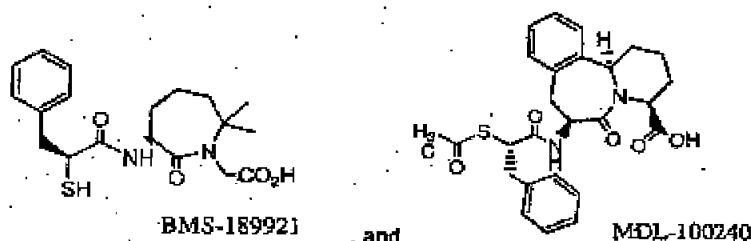
In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more human B-type natriuretic peptides. An example of a suitable human B-type natriuretic peptide is nesiritide (such as NATRECOR™).

10 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more organic nitrates or nitric oxide donors. "Nitric oxide donor" refers to a compound that donates, releases and/or directly or indirectly transfers a nitrogen monoxide species, and/or stimulate the endogenous production of nitric oxide or endothelium-derived relaxing factor (EDRF) in vivo and/or elevate endogenous levels of nitric oxide or EDRF in vivo. It also includes compounds that are substrates for nitric oxide synthase. Examples of suitable nitric oxide donors include S-nitrosothiols, nitrites, nitrates, N-oxo-N-nitrosamines, SPM 3672, SPM 5185, SPM 5186 and analogues thereof, sodium nitroprusside, nitroglycerin, isosorbide dinitrate, isosorbide mononitrate, molsidomine, SIN-1 and substrates of the various isozymes of nitric oxide synthase.

20 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more bradykinin agonists.

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more soluble guanylate cyclase activators. An example of a suitable soluble guanylate cyclase activator is BAY-41-8543.

25 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more neutral endopeptidase inhibitors. Examples of suitable neutral endopeptidase inhibitors include omapatrilat, fasidotril, mixanpril, sampatrilat, Z13752A,



30 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more endothelin antagonists. Examples of suitable endothelin antagonists include ambrisentan, darusentan, J-104132, SPP-301, TBC-3711, YM-62899, YM-91746 and BMS-183884.

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. Examples of suitable 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors include fluvastatin (such as

LESCOL™), atorvastatin (such as LIPITOR™), lovastatin (such as ALTOCOR™ or MEVACOR™), pravastatin (such as PRAVACHOL™), rosuvastatin (such as CRESTOR™), and simvastatin (such as ZOCOR™).

5 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with niacin or one or more nicotinic acid derivatives. Examples of suitable niacin or nicotinic acid derivatives include NIACOR™, NIASPAN™, NICOLAR™, and SLO-NIACIN™.

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more fibric acid derivatives. Examples of suitable fibric acid derivatives include clofibrate (such as ATROMID-S™), gemfibrozil (such as LOPID™), and fenofibrate (such as TRICOR™).

10 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more bile acid sequestrants. Examples of suitable bile acid sequestrants include colestipol (such as COLESTID™), cholestyramine (such as LOCHOLEST™, PREVALITE™, QUESTRAN™, and QUESTRAN LIGHT™), colestesvelam (such as WELCHOL™).

15 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more cholesterol absorption inhibitors. An example of a suitable cholesterol absorption inhibitor is ezetimibe (such as ZETIA™).

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more cholesteryl ester transport protein inhibitors. An example of a suitable cholesteryl ester transport protein inhibitor is torcetrapib.

20 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more apical sodium-dependent bile acid cotransporter inhibitors. Examples of suitable apical sodium-dependent bile acid cotransporter inhibitors include SD-5613, AZD7806 and 264W94.

25 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more alpha glucosidase inhibitors. Examples of suitable alpha glucosidase inhibitors include miglitol (such as GLYSET™) and acarbose (such as PRECOSE™).

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more biguanides. Examples of suitable biguanides include rosiglitazone (such as AVANDAMET™) and metformin (such as GLUCOPHAGE™ and GLUCOPHAGE XR™).

30 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more insulins. Examples of suitable insulins include HUMALOG™, HUMALOG 50/50™, HUMALOG 75/25™, HUMULIN 50/50™, HUMALIN 75/25™, HUMALIN L™, HUMALIN N™, HUMALIN R™, HUMALIN R U-500™, HUMALIN U™, ILETIN II LENTE™, ILETIN II NPH™, ILETIN II REGULAR™, LANTUS™, NOVOLIN 70/30™, NOVILIN N™, NOVILIN R™, 35 NOVOLOG™, VELOSULIN BR™, and EXUBERA™.

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more meglitinides. Examples of suitable meglitinides include repaglinide (such as PRANDIN™) and nateglinide (such as STARLIX™).

40 In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more sulfonylureas. Examples of suitable sulfonylureas include glimepiride (such as

32

AMARYL™), glyburide (such as DIABETA™, GLYNASE PRESTAB™ or MICRONASE™), and glipizide (such as GLUCOTROL™ and GLUCOTROL XL™).

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more thiazolidinediones. Examples of suitable thiazolidinediones include pioglitazone (such as ACTOS™) and rosiglitazone (such as AVANDIA™).

In another embodiment, the Carboxypiperidine Compound may be co-administered with one or more alpha-2-delta ligands. Examples of suitable alpha-2-delta ligands include gabapentin, pregabalin (such as LYRICA™), [(1R,5R,6S)-6-(aminomethyl)bicyclo[3.2.0]hept-6-yl]acetic acid, 3-(1-aminomethyl-cyclohexylmethyl)-4H-[1,2,4]oxadiazol-5-one, C-[1-(1H-tetrazol-5-ylmethyl)-cycloheptyl]-methylamine, (3S,4S)-(1-aminomethyl-3,4-dimethyl-cyclopentyl)-acetic acid, (1 α ,3 α ,5 α)-(3-amino-methyl-bicyclo[3.2.0]hept-3-yl)-acetic acid, (3S,5R)-3-aminomethyl-5-methyl-octanoic acid, (3S,5R)-3-amino-5-methyl-heptanoic acid, (3S,5R)-3-amino-5-methyl-nonanoic acid and (3S,5R)-3-amino-5-methyl-octanoic acid), (2S,4S)-4-(3-Chlorophenoxy)proline, and (2S,4S)-4-(3-Fluorobenzyl)proline.

L. Kits

The present invention further comprises kits that are suitable for use in performing the methods of treatment described above. In one embodiment, the kit comprises a first dosage form comprising the Carboxypiperidine Compound and a container for the first dosage form. In another embodiment, the kit comprises a first dosage form comprising the Carboxypiperidine Compound and a second dosage form comprising a second therapeutic agent.

In another embodiment, the kit comprises a first dosage form comprising the Carboxypiperidine Compound and a second dosage form comprising an angiotensin converting enzyme inhibitor.

In another embodiment, the kit comprises a first dosage form comprising the Carboxypiperidine Compound and a second dosage form comprising an angiotensin II receptor antagonist.

In another embodiment, the kit comprises a first dosage form comprising the Carboxypiperidine Compound and a second dosage form comprising an aldosterone receptor antagonist.

In another embodiment, the kit comprises a first dosage form comprising the Carboxypiperidine Compound and a second dosage form comprising a nitric oxide donor.

M. Compound Synthesis

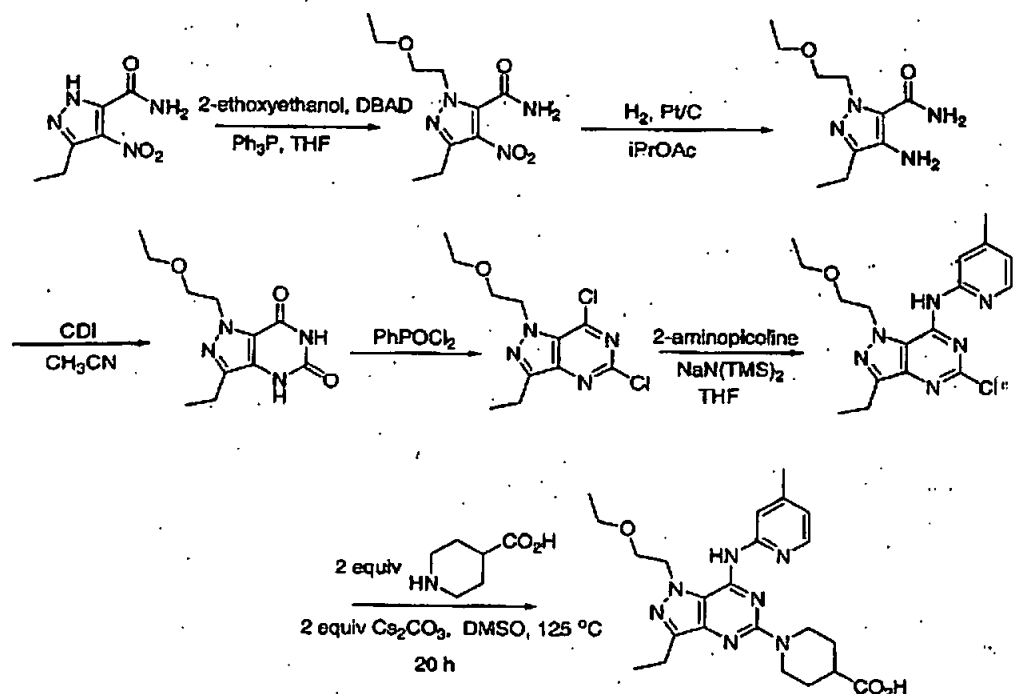
The Carboxypiperidine Compound may be prepared using the methods illustrated in the synthetic schemes and the experimental procedures described below. The general synthetic schemes are presented for purposes of illustration and are not intended to be limiting. The starting materials used to prepare the Carboxypiperidine Compound are commercially available or may be prepared by routine methods well known to those of ordinary skill in the art (such as

33

those methods disclosed in standard reference books such as the COMPENDIUM OF ORGANIC SYNTHETIC METHODS, Vol. I-VI (published by Wiley-Interscience)).

Scheme 1

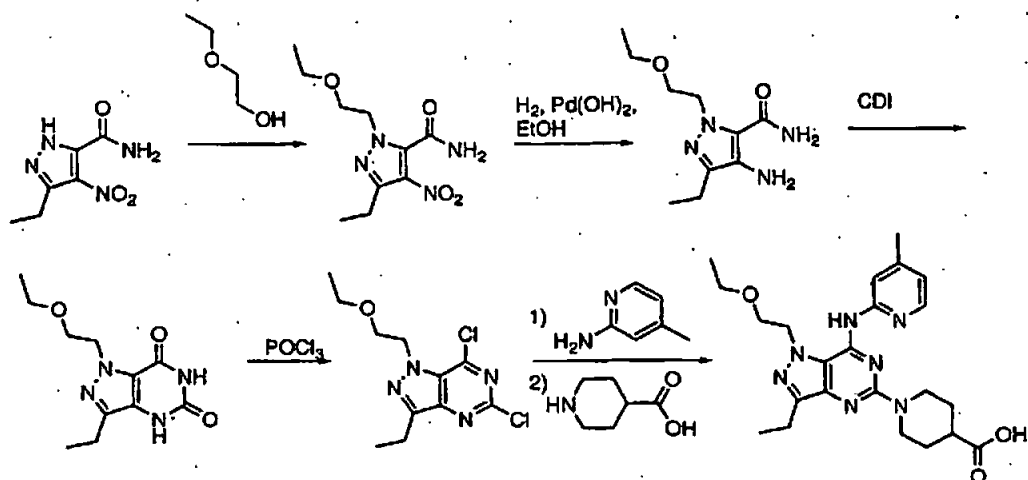
- 5 Scheme 1 outlines a general procedure for the preparation of the free acid of the Carboxypiperidine Compound.



Scheme 2

- 10 Scheme 2 outlines an alternative general procedure for the preparation of the free acid of the Carboxypiperidine Compound.

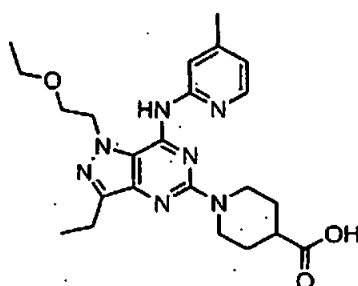
34



The following examples illustrate the synthesis of the free acid of the Carboxypiperidine

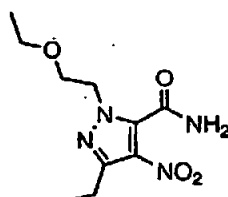
5 Compound:

EXAMPLE 1



10 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid

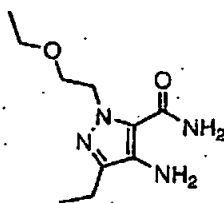
Step 1: Preparation of 1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-4-nitro-1H-pyrazole-5-carboxamide



15 A 1L flask was charged with 3-ethyl-4-nitropyrazole-5-carboxamide (prepared as described in EP 1176142 at page 18) (15.0 g, 81 mmol), triphenylphosphine (25.6 g, 97.8 mmol), and tetrahydrofuran (120 mL). The resulting mixture was cooled by placing the flask in a 0 °C bath and 2-ethoxyethanol (9.5 ml, 98 mmol) was added to the flask. A solution of di-tert-butyl

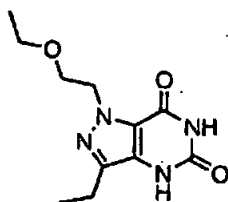
azodicarboxylate (22.5 g, 97.8 mmol) in tetrahydrofuran (90 mL) was then added to the flask over a period of 2.5 hours. The mixture was stirred with cooling for an additional hour and then warmed to room temperature and stirred for one additional hour. The mixture was again cooled to 0 °C, treated with 6M hydrochloric acid (40 ml), and heated to 40 °C for one hour. The mixture was partially concentrated and extracted between ethyl acetate and water. The aqueous layer was back-extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with water, washed with brine, dried over magnesium sulfate, filtered and then concentrated. The resulting viscous oil was treated with 2-propanol and this mixture was then concentrated. The resulting material was treated with 2-propanol and heated. Upon cooling, the resulting crystals were filtered, rinsed with cold 2-propanol, and dried to afford 16.5 g of the title compound.

Step 2: Preparation of 4-amino-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazole-5-carboxamide



1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-4-nitro-1H-pyrazole-5-carboxamide from step 1 (15.0 g, 58 mmol), 5% Platinum-on-carbon (0.75 g), and isopropyl acetate (150 mL) were combined and the mixture was stirred under 80 psi of hydrogen for about 50 hours. The mixture was then filtered through celite, the celite was rinsed with acetonitrile, and the filtrate was concentrated. The material eventually crystallized to give 13.7 g as a hydrate of the title compound.

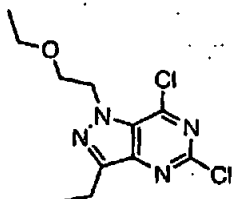
Step 3: 1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine-5,7(4H,6H)-dione



A mixture of carbonyldiimidazole (12.3 g, 76.1 mmol) in acetonitrile (123 mL) was warmed to 50 °C. The 4-amino-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazole-5-carboxamide prepared in step 3 (13.2 g, 58 mmol) was added to the mixture over a period of one hour and the temperature of the mixture was increased to 75 °C during the addition. The mixture was then cooled and stirred overnight. The mixture was cooled in an ice bath and filtered. The filter cake was rinsed with water and dried to provide 12.8 g of the title compound.

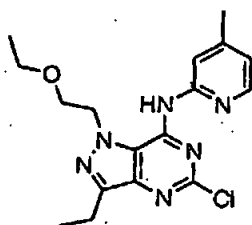
36

Step 4: Preparation of 5,7-dichloro-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine



- A mixture of 1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine-5,7(4H,6H)-dione from step 3 (25.2 g, 100 mmol) was treated with PhPOCl_2 (195 g, 1000 mmol) and heated, under N_2 , with stirring at 135 °C for 20 h. The mixture was cooled and then heated at 140 °C for an additional 20 h. The mixture was cooled and slowly added to an ice (600 g)/water (200 mL) mixture. This was stirred for 3 h and the resulting solid was collected by filtration and rinsed with water (2 x 100 mL). The solid was suspended in ethyl acetate (300 mL). Water (200 mL) was added and the pH adjusted to 1-2. Then 10% NaHCO_3 (125 mL) was added (resulting in pH ~7) and the layers were separated. The organic layer was successively washed with water (400 mL) and saturated sodium chloride solution (150 mL). The organic solution was then dried, and concentrated to provide 23 g of the title compound.

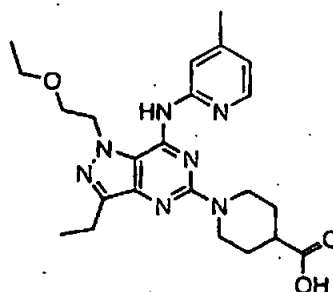
- Step 5: Preparation of N-[5-chloro-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-yl]-4-methylpyridin-2-amine



- A mixture of 2-amino-4-picoline (4.32 g, 40 mmol) and 5,7-dichloro-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine from step 4 (5.78 g, 20 mmol) was treated with THF (25 mL) and cooled to 0 °C. The mixture was stirred and treated with 1 M $\text{LiN}(\text{TMS})_2$ in THF (40 mL, 40 mmol) at a rate such that the temperature was kept below 5 °C. The mixture was stirred for 30 min and was then treated with 10 % citric acid solution until pH 6-7 was achieved. The mixture was partially concentrated under reduced pressure. The mixture was then stirred at 5 °C for 1 h. The resulting solid was collected by suction filtration and washed with water (40 mL). The solid was dried in a vacuum oven at a temperature less than 60 °C to afford 7.0 g of the title compound.

37

Step 6: Preparation of 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid

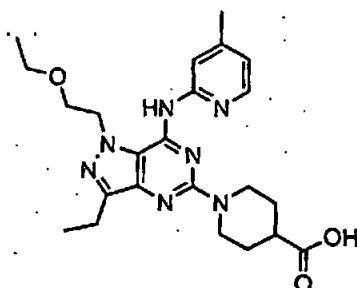


A mixture of N-[5-chloro-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-yl]-4-methylpyridin-2-ylamine from step 5 (5.42 g, 166 mmol), isonipecotic acid (85.9 g, 665 mmol), cesium carbonate (162 g, 498 mmol), and DMSO (55 mL) was heated, with stirring, at 125 °C. After 20 h, the mixture was cooled to 20 °C and water (165 mL) was added. The mixture was stirred for 15 min and was then treated with ethyl acetate (55 mL). The layers were separated and the aqueous was treated with another portion of ethyl acetate (55 mL). The layers were separated again and the aqueous layer was taken to pH ~ 5 using 6 M HCl. After stirring for 1 hour, the resulting solid was filtered, washed with water (20 mL) and dried *in vacuo*, to give 5.5 g of the title compound. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.10 (t, 3 H), 1.30 (t, 3 H), 1.49-1.60 (m, 2 H), 1.84-1.95 (m, 2 H), 2.32-2.36 (m, 3 H), 2.52-2.57 (m, 1 H), 2.78 (q, 2 H), 2.99-3.08 (m, 2 H), 3.52 (q, 2 H), 3.78 (t, 2 H), 4.45-4.53 (m, 2 H), 4.56-4.64 (m, 2 H), 6.91 (d, 1 H), 8.05 (s, 1 H), 8.18 (d, 1 H), 9.63 (s, 1 H), 12.18 (s, 1 H). LCMS *m/z* 454.

Alternatively, a mixture of N-[5-chloro-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-7-yl]-4-methylpyridin-2-ylamine from step 5 can be combined with isonipecotic acid (between 1 to 10 equivalents) and a base and heated between 100-125° C in a solvent until the reaction is complete. Suitable bases include cesium carbonate, sodium carbonate and potassium carbonate. Suitable solvents include DMSO and N,N-dimethylformamide. Upon cooling, water can be added and the basic solution extracted (between 1 to 3 times) with an organic solvent such as ethyl acetate. The remaining basic layer is acidified to pH 5 with HCl. The mixture is stirred for approximately 1 hour. The solid is filtered off, washed with water, and dried *in vacuo* to provide the title compound.

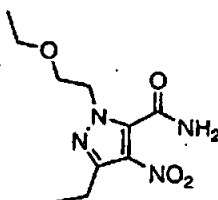
EXAMPLE 2

28



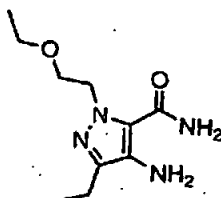
1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid

5 Step 1: Preparation of 1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-4-nitro-1H-pyrazole-5-carboxamide



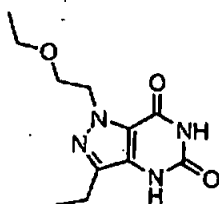
1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-4-nitro-1H-pyrazole-5-carboxamide was prepared according to step 1, Example 1.

10 Step 2: Preparation of 4-amino-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazole-5-carboxamide



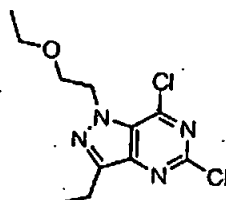
A mixture of 1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-4-nitro-1H-pyrazole-5-carboxamide from step 1 (5.70 g, 22 mmol) and palladium hydroxide (1.0 g) in ethanol (110 mL) was treated with ammonium formate (7.01 g, 111 mmol) in four unequal portions at about 10 minute intervals. The resulting mixture was heated under reflux for two hours and then cooled. The mixture was filtered through celite and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography on silica gel using a mixture of ethyl acetate and hexane as the eluent to provide 2.45 g of the title compound. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.17 (t, 3 H), 1.21-1.32 (m, 3 H), 2.60 (q, 2 H), 3.53 (q, 2 H), 3.79-3.95 (m, 2 H), 4.38-4.52 (m, 2 H). MS (ESI) m/z 227.

20 Step 3: 1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine-5,7(4H,6H)-dione



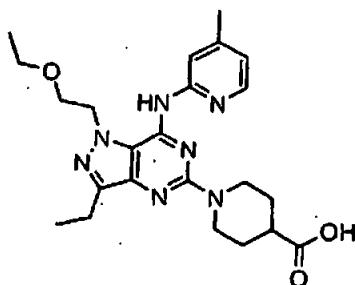
A mixture of 4-amino-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazole-5-carboxamide from step 2 (2.44 g, 10.8 mmol) in N,N-dimethylformamide (40 mL) was treated with carbonyldiimidazole (1.92 g, 11.9 mmol) and heated at 80 °C overnight. The mixture was concentrated *in vacuo* and the residue was purified by column chromatography on silica gel using a mixture of ethyl acetate and hexane as the eluent to provide 1.04 g of the title compound. MS (ESI) *m/z* 253.

Step 4: Preparation of 5,7-dichloro-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine



A mixture of the 1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine-5,7(4H,6H)-dione prepared in step 3 (7.2 g) and phosphorus oxychloride (200 mL) with one drop of N,N-dimethylformamide was heated at reflux overnight. The mixture was cooled and the phosphorus oxychloride was evaporated under reduced pressure. Ice was added to the resulting residue and then the mixture was extracted with chloroform. The organic layers were dried over magnesium sulfate, filtered, and evaporated to provide 2.09 g of 5,7-dichloro-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine as an oil which solidified upon standing. LCMS *m/z* 289.

Step 5: Preparation of 1-(1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-7-(4-methylpyridin-2-ylamino)-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)piperidine-4-carboxylic acid



The 5,7-dichloro-1-(2-ethoxyethyl)-3-ethyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidine prepared in step 4 (1 mmol), 2-amino-4-picoline (2 mmol), N,N-diisopropylethylamine (3 mmol), and N-methylpyrrolidone (1 mL) were added to each of two reaction vessels. Each vessel was

MD

irradiated in a CEM Discover microwave for 15 minutes at 150 °C. Isonipecotic acid (3 mmol) was added to each reaction vessel and the resulting mixture irradiated for 15 minutes at 180 °C. The contents of the two reaction vessels were combined. Water and ethyl acetate was added to the mixture and the mixture was shaken. Hydrochloric acid (1M) was added to the mixture and the mixture was shaken again. The layers were separated. The organic layer was washed with water, hydrochloric acid (1M) was added, and the layers were separated. The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered, and evaporated. The pH of the aqueous layer was raised to about six by adding saturated sodium carbonate and the aqueous layer was then extracted with ethyl acetate. The organic layer was dried over magnesium sulfate, filtered, added to the above organic residue and evaporated. The solution was purified by RP-HPLC on a Varian Dynamax C-18 column (250x4.1mm) with a gradient of 10-95% acetonitrile/water (hydrochloric acid) over 15 minutes in two batches. Fractions were combined and evaporated to afford 0.26 g of the title compound. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 1.10 (t, 3 H), 1.30 (t, 3 H), 1.49-1.60 (m, 2 H), 1.84-1.95 (m, 2 H), 2.32-2.36 (m, 3 H), 2.52-2.57 (m, 1 H), 2.78 (q, 2 H), 2.99-3.08 (m, 2 H), 3.52 (q, 2 H), 3.78 (t, 2 H), 4.45-4.53 (m, 2 H), 4.56-4.64 (m, 2 H), 6.91 (d, 1 H), 8.05 (s, 1 H), 8.18 (d, 1 H), 9.63 (s, 1 H), 12.18 (s, 1 H). LCMS m/z 454.

Protocols

N. Potency and Selectivity Assays

Method 1: Human Platelet PDE5 Enzyme Inhibition Scintillation Proximity Assay

An *in vitro* assay can be used to evaluate the inhibition of PDE5 enzyme activity by a test compound. As described more specifically below, this assay measures the PDE5 IC₅₀ value for the test compound (i.e., the concentration of the test compound required to inhibit by 50% the PDE5 enzyme-catalyzed hydrolysis of cGMP to GMP relative to the activity of uninhibited controls).

The PDE5 enzyme for use in the assay can be obtained from human platelets by appropriate modification of the method of Thompson, WJ *et al.*; Biochemistry 18(23), 5228-5237, 1979, as described by Ballard SA *et al.*; J. Urology 159(6), 2164-2171, 1998. The PDE5 enzyme isolated from human platelets can be used to catalyze the hydrolysis of [³H]cGMP (Amersham Biosciences) to 5' nucleotide [³H]GMP. The [³H]GMP binds to yttrium silicate SPA beads (Amersham Biosciences) and is detected by scintillation counting. More specifically, the effect of the test compound at different concentrations can be evaluated in the assay by contacting the compound with a fixed amount of PDE5 enzyme in the presence of substrate (cGMP or cAMP in a 3:1 ratio unlabelled to [³H]-labelled). Scintillation counting can be used as described above to determine relative PDE5 enzyme activity. The inhibition of PDE5 enzyme activity is then calculated relative to total PDE5 enzyme activity of uninhibited controls.

40 PDE5 IC₅₀ Assay: 96-well microtiter plate format

Reagents

Buffer A: 20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.4Buffer B: 2 mg/ml BSA in Buffer A (enzyme buffer)cGMP substrate: Final concentration of 500 nM in assay

- 5 The amount of ³H-labeled substrate added depends upon the specific activity of [³H]cGMP, and the cGMP substrate is diluted with a 10 mM stock of cold cGMP in Buffer A for a final substrate concentration of 500 nM in the assay.

PDE enzyme: Prepared in Buffer B. The dilution factor is determined by enzyme activity.SPA beads: 20 mg/ml suspension prepared in dH₂O.

10

	<u>Positive Control</u>	<u>Negative Control</u>	<u>Standard/Test compound</u>
	2 μ l 100% DMSO	2 μ l 100% DMSO	2 μ l Standard/Test compound
	25 μ l Buffer A	25 μ l Buffer A	25 μ l Buffer A
	25 μ l Enzyme	25 μ l Buffer B	25 μ l Enzyme
15	50 μ l Substrate	50 μ l Substrate	50 μ l Substrate
	50 μ l SPA to stop	50 μ l SPA to stop	50 μ l SPA to stop

- 20 Stocks of standard and test compounds are prepared at 5 mM in 100% DMSO. The compound is serially diluted in a dilution plate using a 10-point 1/2 log dilution format. 2 μ l of the compound dilution is added in duplicate to the wells of the assay plate. 2 μ l of 100% DMSO are added to designated control wells. 25 μ l of Buffer A are added to all wells. 25 μ l of Buffer B are added to the negative control wells. 25 μ l of enzyme are added to the remaining wells. 50 μ l of substrate are added to each well. Plates are sealed and incubated for 60 minutes on a plate shaker at 30 C. 50 μ l of SPA beads are added to stop the reaction. The plates are again sealed.
- 25 and shaken for 15 minutes to allow the beads to bind the GMP product. The beads are allowed to settle for 30 minutes and then read on a NXT TopCount scintillation counter. Data are analyzed with a curve fitting application for plate-based screening. Percent inhibition in this assay is calculated as follows:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{(\text{mean maximum} - \text{compound value})}{(\text{mean maximum} - \text{mean minimum})} \right] \times 100.$$

- 30 The IC₅₀ value is determined from sigmoid dose-response curves of enzyme activity versus compound concentration.

The Carboxypiperidine Compound was tested in accordance with Method 1. The corresponding PDE5 IC₅₀ values measured are reported in Table A.

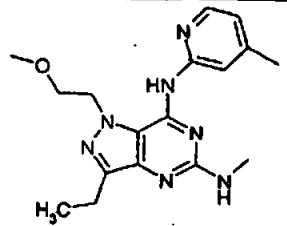
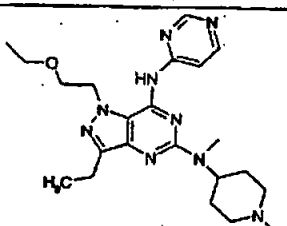
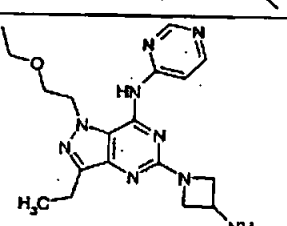
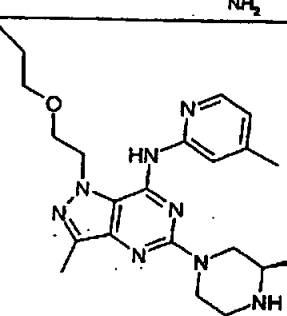
Table A

RUN NO.	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
1	0.050
2	0.044
AVERAGE:	0.047

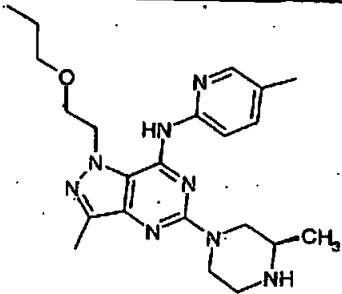
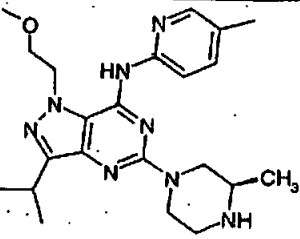
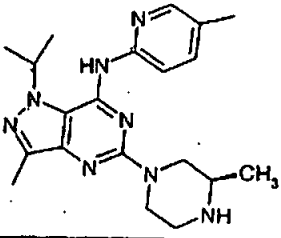
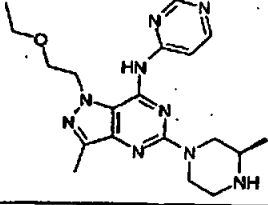
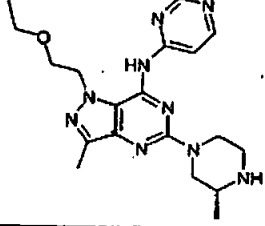
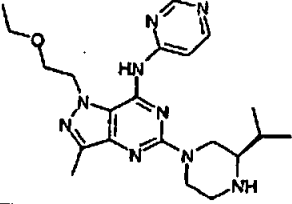
Compounds previously disclosed in examples from WO2004098810 were tested in accordance with Method 1. The corresponding PDE5 IC₅₀ values measured are reported in Table B.

5

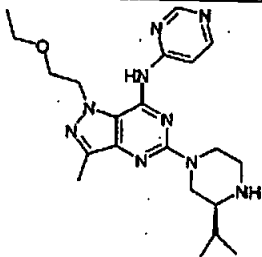
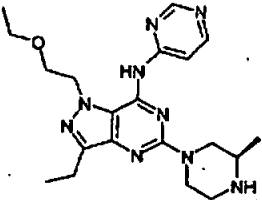
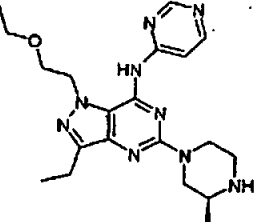
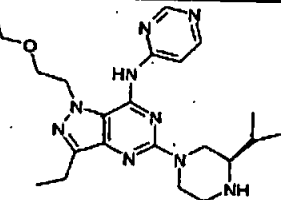
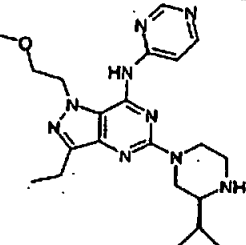
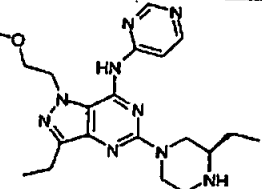
Table B

WO2004098810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
1		16.2
2		0.48
3		43.8
4		8.84

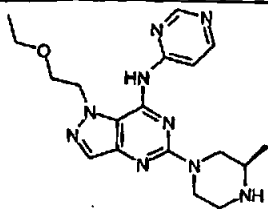
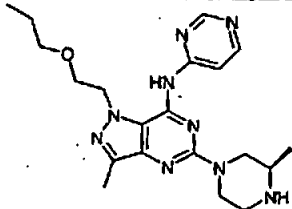
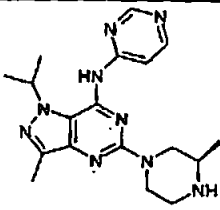
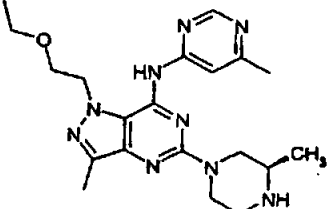
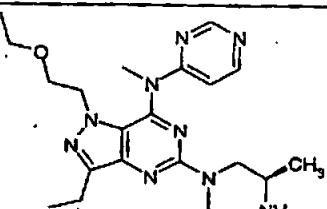
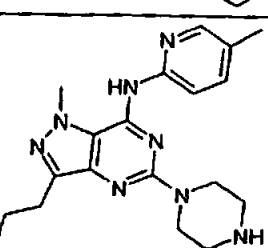
203

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
7		6.03
8		6.95
9		508
11		0.29
12		1.74
13		19.1

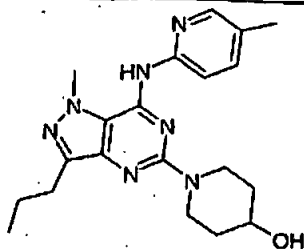
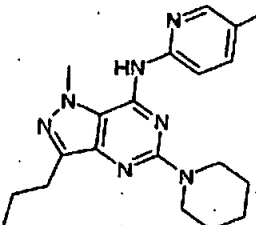
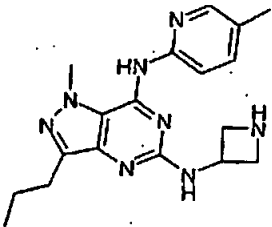
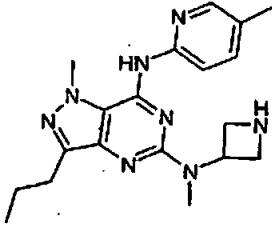
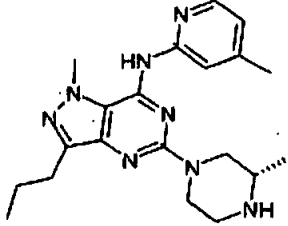
JML

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
14		42.1
15		0.09
16		0.98
17		22.4
18		25.8
19		0.49

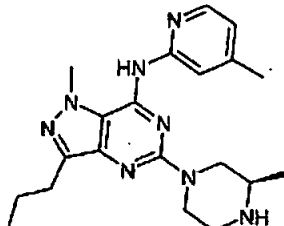
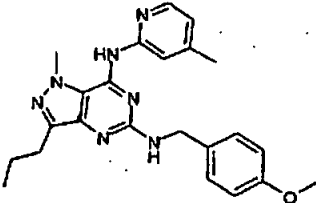
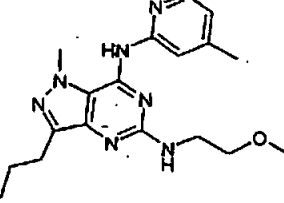
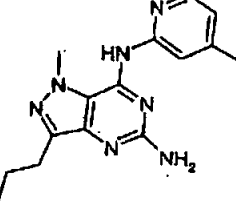
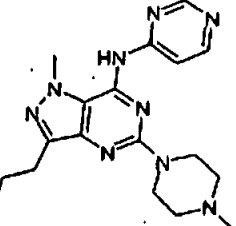
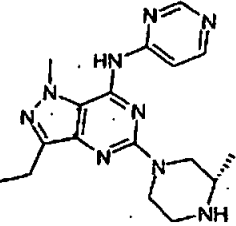
V/S

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
21		2.04
23		0.39
24		37.7
26		1.83
28		47.9
34		50.2

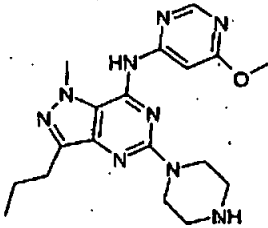
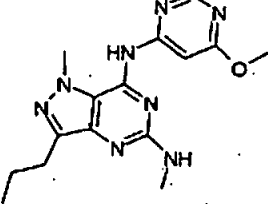
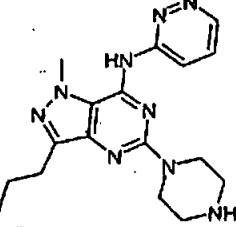
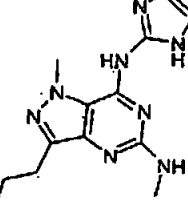
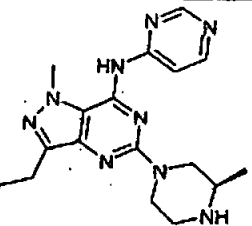
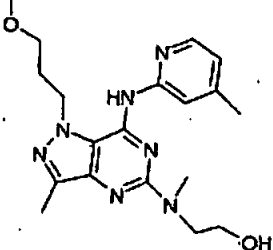
26

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
35		737
36		1450
37		>10,000
38		>10,000
39		456

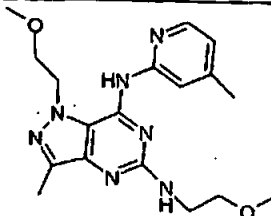
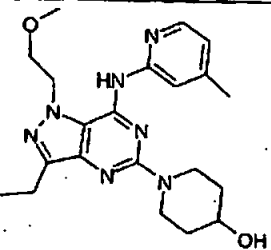
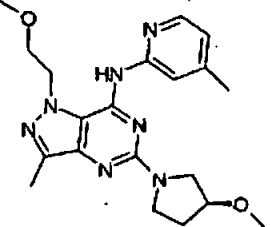
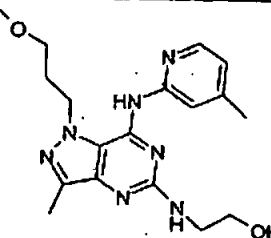
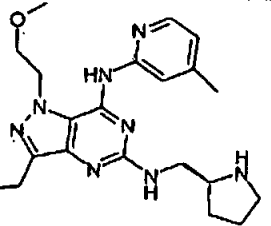
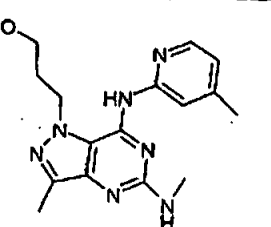
WAX

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
40		334
71		152
72		177
77		>10,000
80		1940
81		118

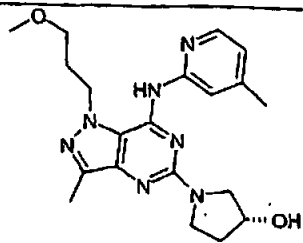
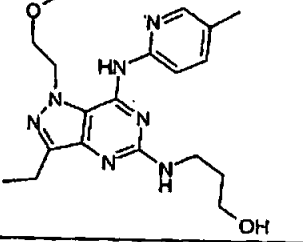
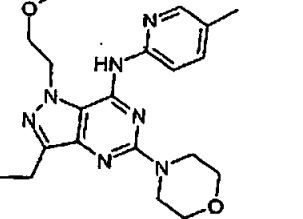
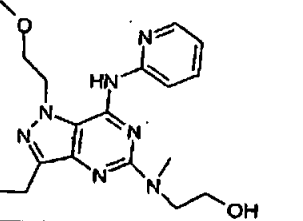
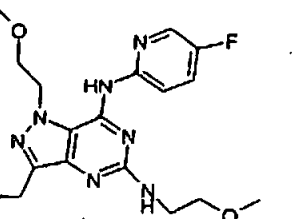
48

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
83		134
84		247
88		>100
90		1550
91		22.6
92		26.5

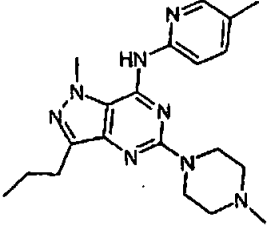
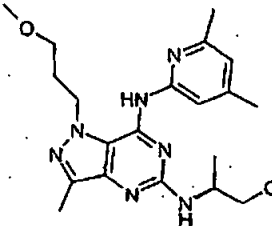
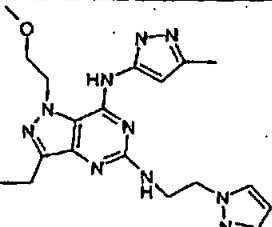
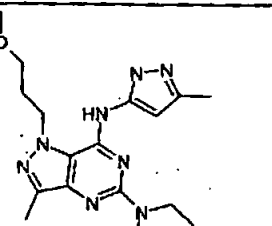
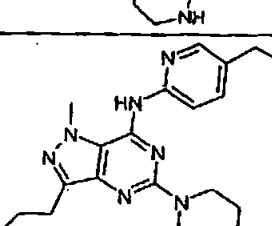
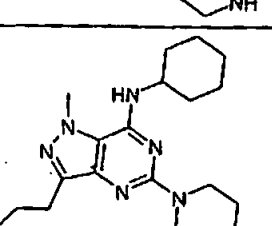
vda

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
93		31.1
94		43.2
95		76.0
96		87.9
98		231
99		239

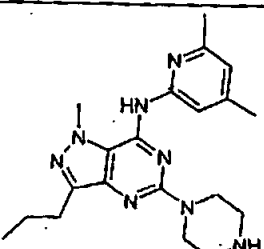
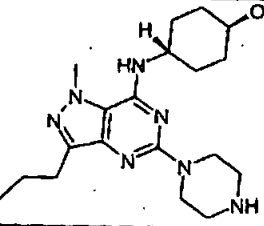
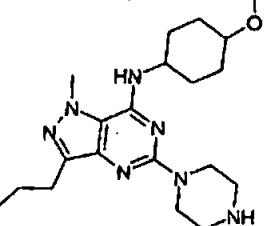
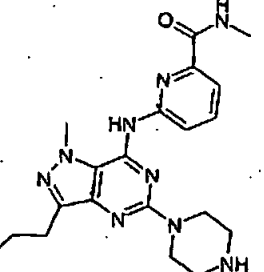
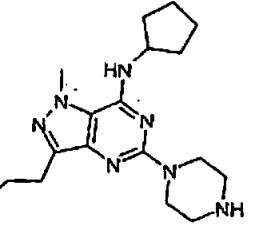
50

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
100		67.2
103		76.6
108		778
109		27.3
110		513

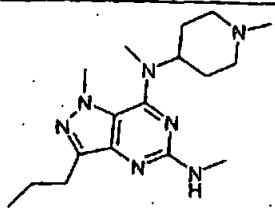
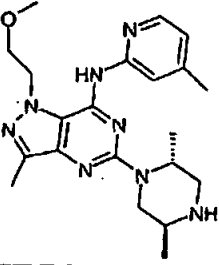
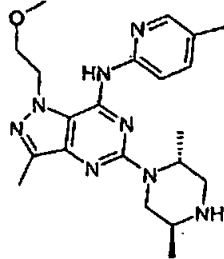
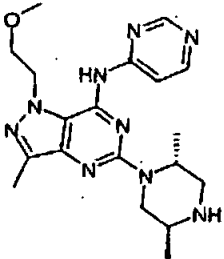
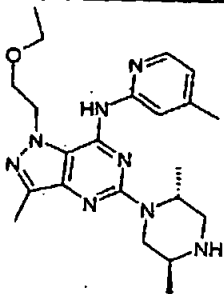
g

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
113		1250
114		60.6
115		220
116		1760
123		248
124		78.2

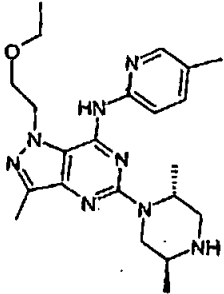
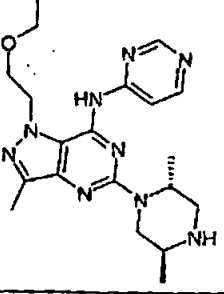
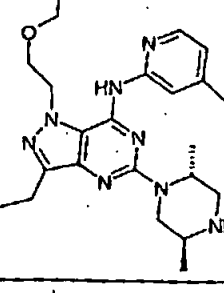
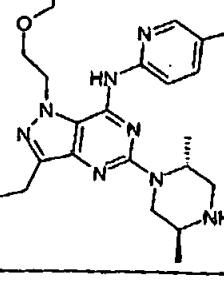
52

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
125		182
126		2230
127		7580
128		1390
129		139

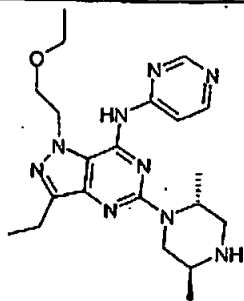
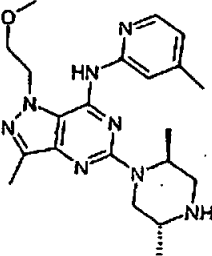
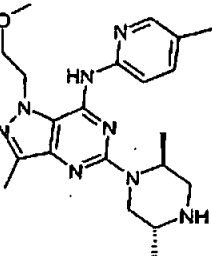
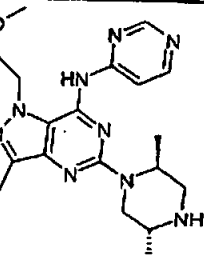
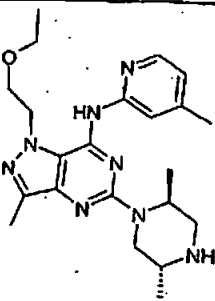
53

WO2004098810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
130		>10,000
133		4.45
134		6.57
135		0.92
136		1.09

57

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
137		1.43
138		0.33
139		0.55
140		1.95

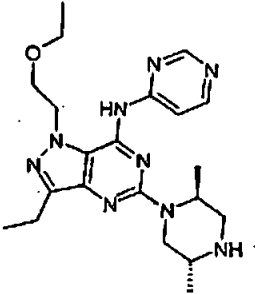
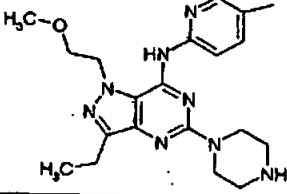
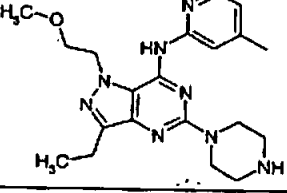
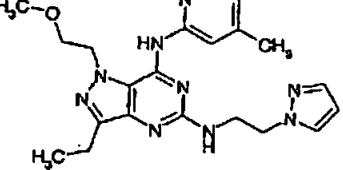
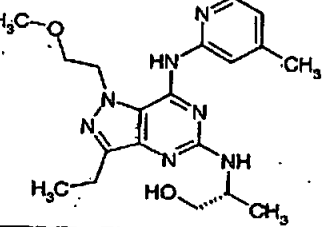
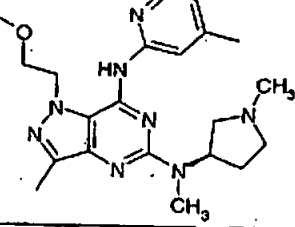
57

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
141		0.15
142		22.7
143		81.2
144		5.34
145		7.15

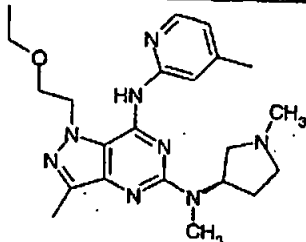
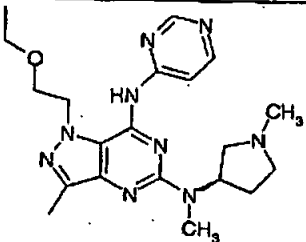
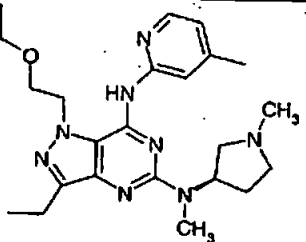
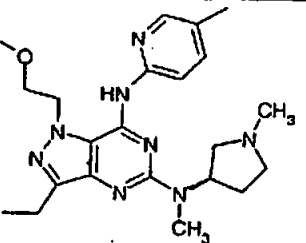
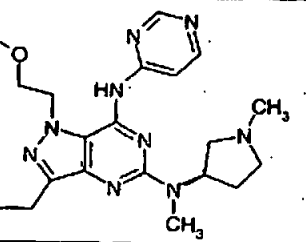


WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
146		32.1
147		2.46
148		4.39
149		34.8

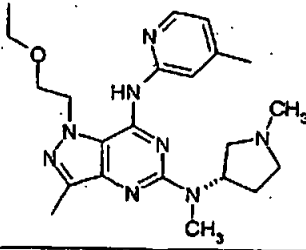
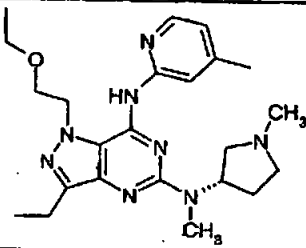
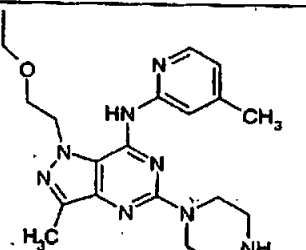
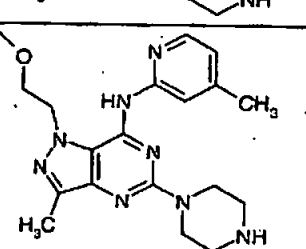
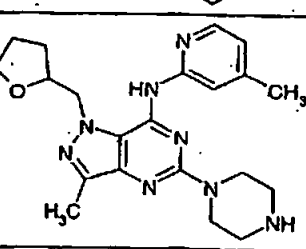
5

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
150		1.83
151		22.0
152		12.1
153		19.5
154		12.6
155		13.4

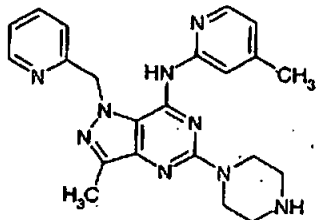
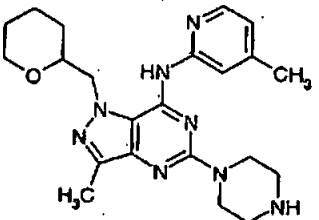
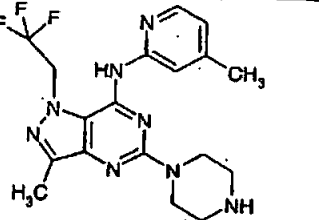
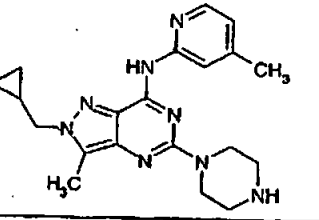
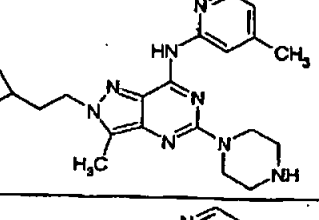
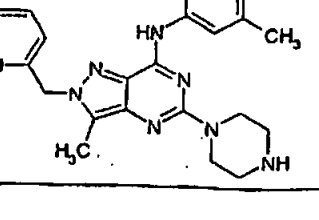
56

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDES IC ₅₀ (nM)
156		1.80
157		16.7
158		0.71
159		16.3
160		7.22

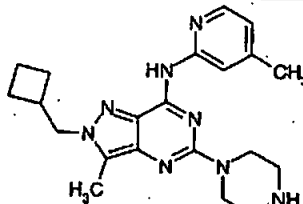
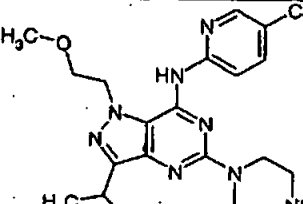
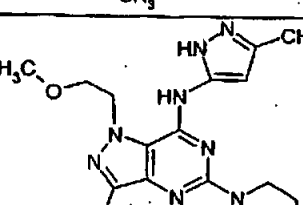
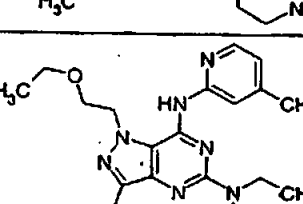
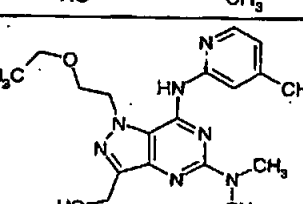
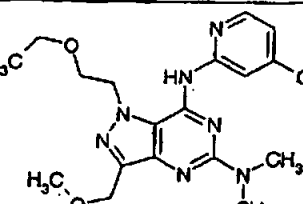
gd

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
161		0.50
162		0.24
164		3.46
165		10.5
166		11.5

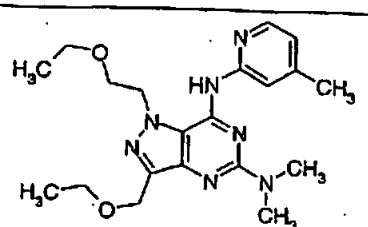
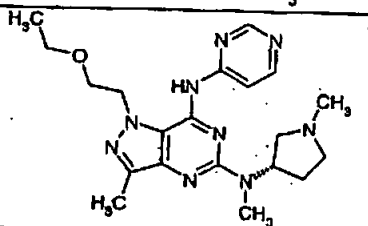
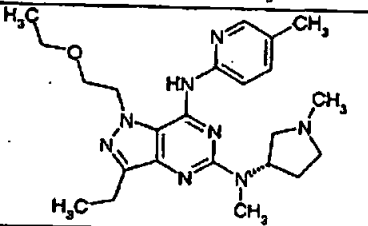
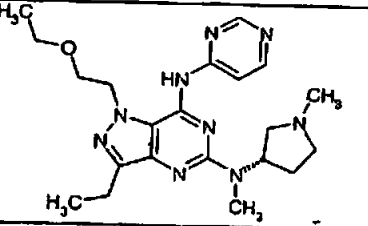
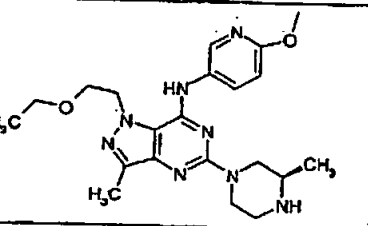
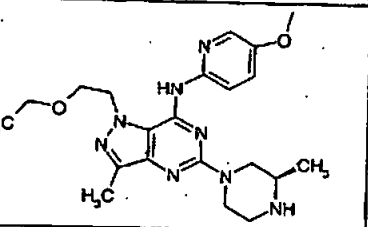
60

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
167		2.95
168		0.81
170		2100
173		396
174		432
176		274

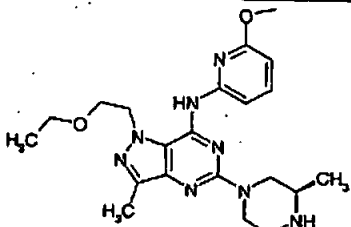
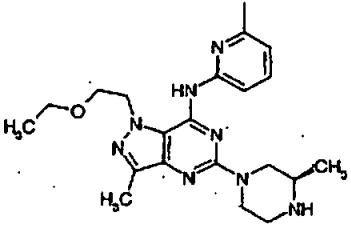
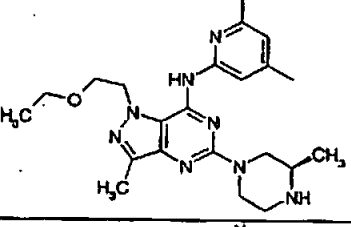
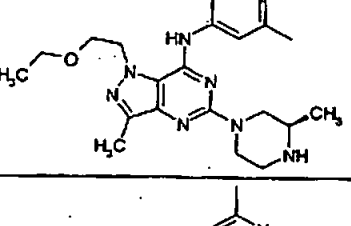
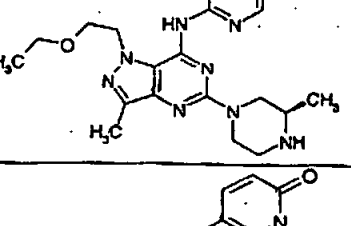
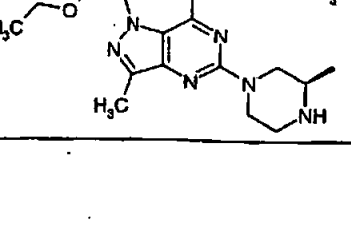
61

WO2004098810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
177		535
179		18.3
180		341
181		0.39
182		4.03
185		1.30

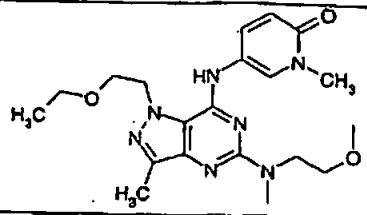
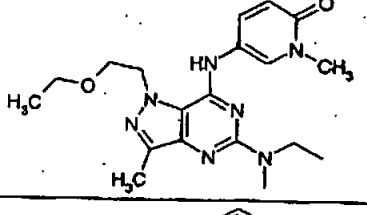
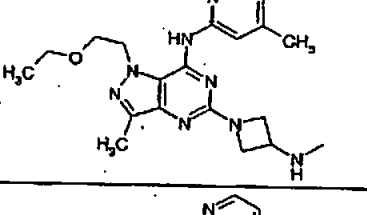
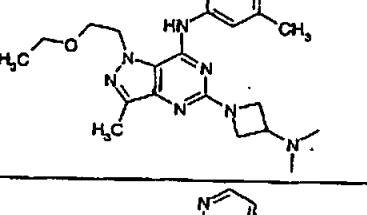
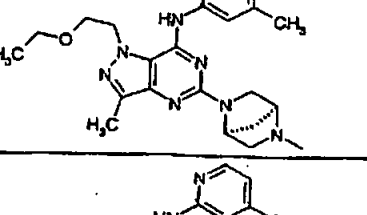
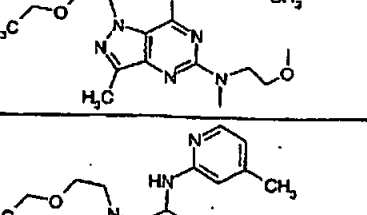
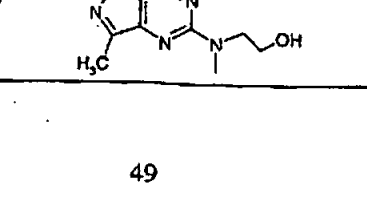
C2

WO2004098810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
188		0.47
191		0.24
192		3.06
193		1.01
194		0.56
195		0.96

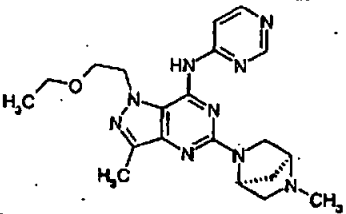
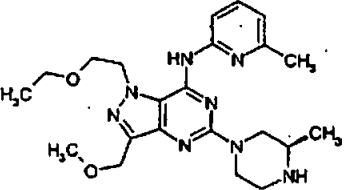
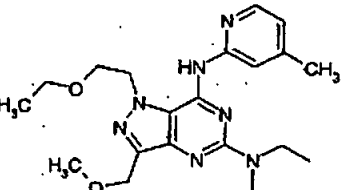
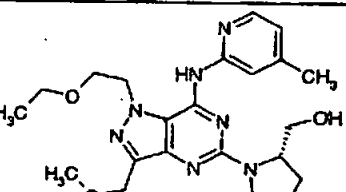
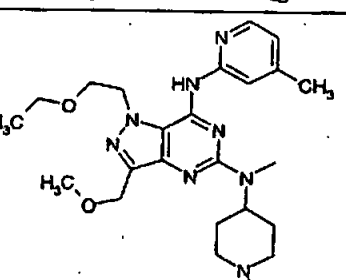
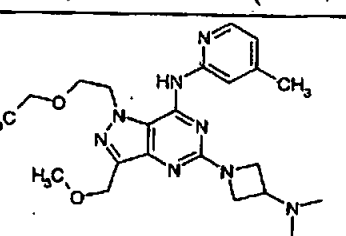
V3

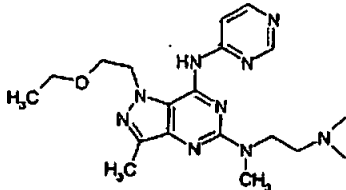
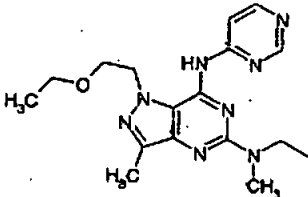
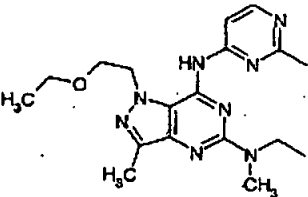
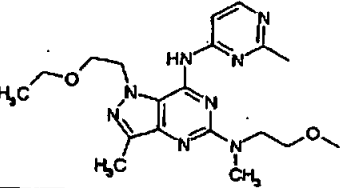
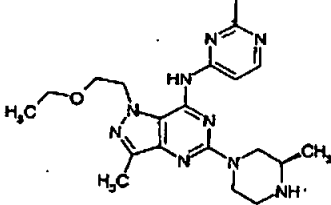
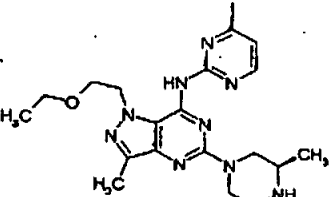
WO2004098810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
196		0.56
197		1.76
198		10.0
199		3.13
200		4.70
201		25.9

CH

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
202		5.46
203		0.63
204		24.1
205		6.24
206		6.09
207		1.55
208		0.71

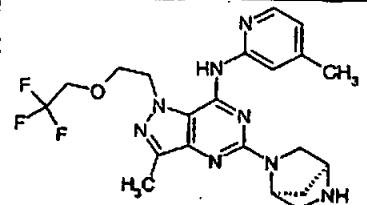
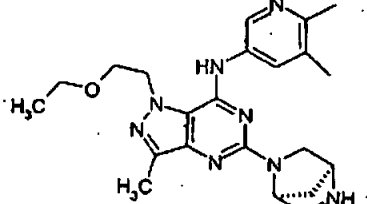
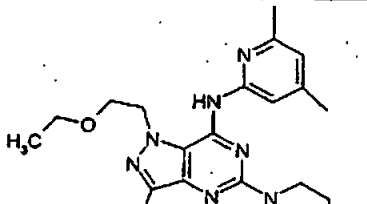
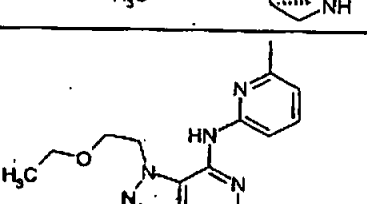
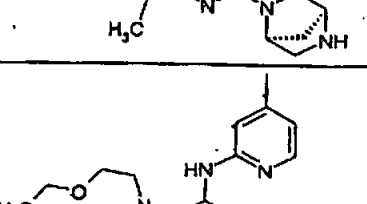
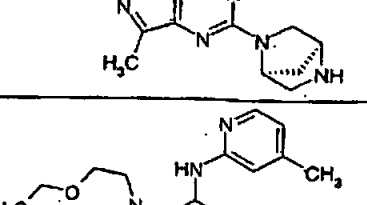
67

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
210		82.7
211		1.57
212		0.13
213		0.42
214		0.37
215		5.30

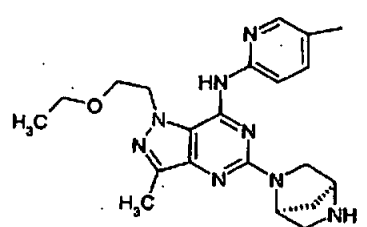
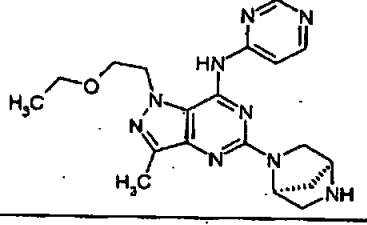
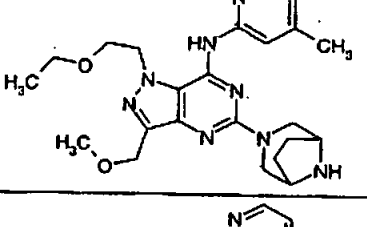
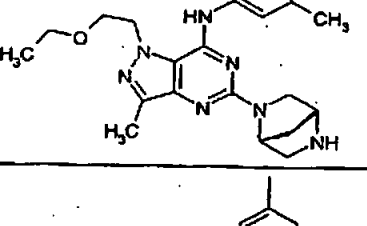
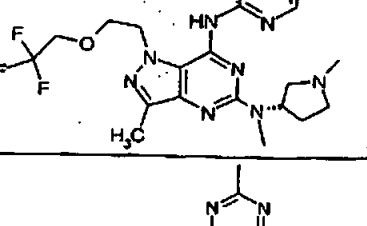
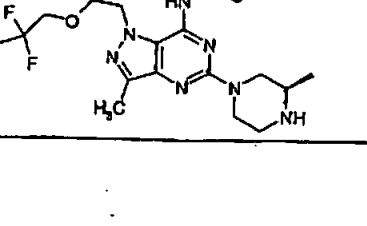
WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
216		60.9
217		2.55
218		11.5
219		41.0
220		3.60
221		35.4

[Handwritten mark]

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
222		10.1
225		1.33
226		0.83
227		0.35
228		3.09
229		1.61

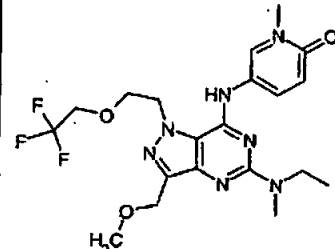
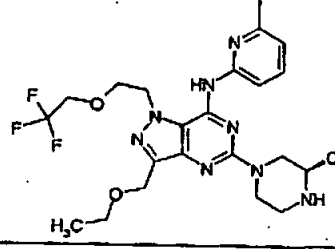
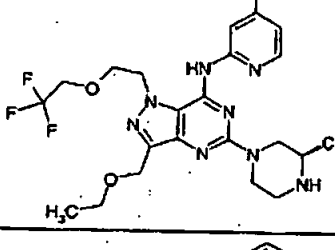
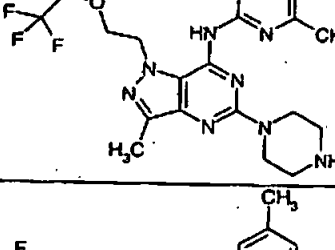
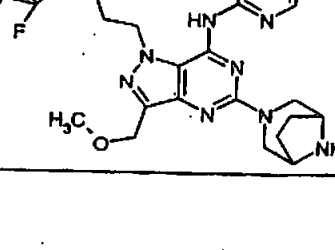
WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
231		10.3
233		3.85
234		8.79
235		>100
236		2.51
237		0.67

Cal

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
240		>100
241		48.7
242		0.62
244		2.54
245		1.55
246		4.46

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
248		0.30
249		0.16
250		2.37
251		0.25
252		2.81
253		1.20

91

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
254		0.59
255		1.43
256		3.82
258		1.99
259		3.74

WO2004096810 EXAMPLE NO.	STRUCTURE	METHOD 1: PDE5 IC ₅₀ (nM)
261		0.57
262		0.93
263		0.27

Method 1A: Alternative Human Platelet PDE5 Enzyme Inhibition Scintillation Proximity Assay

- 5 The PDE5 IC₅₀ of a test compound also can be measured in an alternative *in vitro* assay that varies from Method 1 as described below:

PDE5 IC₅₀ Assay: 96-well microtiter plate format

Reagents

- 10 Buffer A: 20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂ pH 7.4
Buffer B: 2 mg/ml BSA in Buffer A (enzyme buffer)
cGMP substrate: Final concentration of 50 nM in assay

The amount of ³H-labeled substrate added depends upon the specific activity of [³H]cGMP, and it is diluted in Buffer A.

- 15 PDE enzyme: Prepared in Buffer B. The dilution factor is determined by enzyme activity.
SPA beads: 4 mg/ml suspension prepared in dH₂O.

Positive Control

Negative Control

Standard/Test compound

	3 μ l 100% DMSO	3 μ l 100% DMSO	3 μ l Standard/Test compound
	27 μ l Buffer A	27 μ l Buffer A	27 μ l Buffer A
	30 μ l Enzyme	30 μ l Buffer B	30 μ l Enzyme
	30 μ l Substrate	30 μ l Substrate	30 μ l Substrate
5	30 μ l SPA to stop	30 μ l SPA to stop	30 μ l SPA to stop

Stocks of standard and test compound are prepared at 2 mM in 100% DMSO. The test compound is serially diluted in a dilution plate using a 10-point 1/5 log dilution format such that the starting concentration in the assay is 2 μ M for an initial IC₅₀ screen; confirmatory IC₅₀s are done using a 10-point 1/3 log dilution. 27 μ l of Buffer A are added to the wells of the assay plates. From the dilution plate, 3 μ l of diluted compound is delivered in duplicate or 3 μ l of 100 % DMSO (for positive and negative controls) are added. 30 μ l of enzyme are added. For the negative control wells, Buffer B is substituted in place of the enzyme. 30 μ l of labeled substrate are added to all wells.

After incubating for 60 minutes at room temperature, the reaction is stopped with the addition of 30 μ l of the yttrium silicate beads. These beads are dense and require constant agitation while being added to the plate. The plates are sealed and shaken on a plate shaker for fifteen minutes to allow the beads to bind the GMP product.

After allowing the beads to settle for 30 minutes, plates are read on a NXT TopCount scintillation counter and the data are analyzed as follows. Percent inhibition values are calculated using the means of the 0% and 100% controls on each plate. The estimates of the 4-parameters of the logistic, sigmoid dose-response model are then calculated using the well-level percent inhibition value for the compound. The formula for the four-parameter logistic model may be expressed as $Y = (a - d) / (1 + (X / c)^b) + d$, where Y is the response; X is the concentration, a is the lower asymptote (minimum response), d is the upper asymptote (maximum response), c is the model IC₅₀ (in the same units as X), and b is the slope (as described in De Lean, A., P. J. Munson, and D. Rodbard ("Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves." Am. J. Physiol. 235(2): E97-E102, 1978). These estimates are used to calculate the concentration that corresponds to 50% inhibition.

The Carboxypiperidine Compound was tested in accordance with Method 1a. The corresponding PDE5 IC₅₀ values measured are reported in Table C.

Table C

RUN NO.	METHOD 1A: PDE5 IC ₅₀ (nM)
1	0.051
2	0.051
3	0.039
4	0.045

Preparation of the Retina: Allow the eyes to thaw until soft and until the cornea and lens are clear. While supporting the eye with the cornea uppermost, make a small incision through the conjunctiva below the level of the iris. The incision should be sufficient to allow the humor to escape through the cut. Using fine scissors, cut around the cornea to enable it to be lifted off as a flap. Using a small hook, engage the lens and gently pull it out of orbit, taking care not to pull out the retina at the same time. Allow the retina to drop down of its own accord to the base of the orbit.

- 5
- 10 Lift the retina with care and locate the optic nerve. Cut through the optic nerve and transfer the retina to a small dish containing a few ml of homogenisation buffer. Gently float the retina out on the surface of the buffer and remove any obvious pigmented material from the iris. Place the retina in a second dish with clean buffer to remove last traces of pigment and then transfer to a 50ml Corning Costar centrifuge tube (Sigma) and keep on ice.

- PDE6 Isolation and Purification from Retina: Allow 2mls of the homogenisation buffer per bovine retina and 1ml per retina for dog and human. Homogenise using hand-held homogeniser 3 x 5 second bursts cooling on ice between each burst. Filter homogenate through two layers of surgical gauze. Spin at 100,000g for 60 minutes at 4°C. Filter cytosol either through a 0.22µm Steril-D pack if there is sufficient volume or through a 0.22µm syringe-end filter (e.g., Millex®-GV). Run through FPLC (Pharmacia FPLC LKB/Frac -100, Pharmacia) or aliquot and store in liquid nitrogen as needed.
- 15
- 20

Method 2A: Alternative Human Retina PDE6 Enzyme Inhibition Scintillation Proximity Assay (SPA)

- 25 The inhibition of PDE6 enzyme activity by a test compound also can be measured in accordance with the *in vitro* assay of Method 1A, but instead using semi-purified PDE6 enzyme isolated from human, bovine or canine retina in place of PDE5 enzyme. This assay measures the PDE6 IC₅₀ value for the test compound (i.e., the concentration of the test compound required to inhibit by 50% the PDE6 enzyme-catalyzed hydrolysis of [³H]cGMP to the 5' nucleotide
- 30 [³H]GMP relative to the activity of uninhibited controls). [³H]GMP binds to yttrium silicate SPA beads and is detected by scintillation counting.

Method 3: Human Recombinant PDE11 Enzyme Inhibition Scintillation Proximity Assay (SPA)

- 35 The inhibition of PDE11 enzyme activity by a test compound can be measured in accordance with the *in vitro* assay of Method 1, but instead using PDE11 enzyme expressed in Sf9 insect cells in place of PDE5 enzyme. This assay measures the PDE11 IC₅₀ value for the test compound (i.e., the concentration of the test compound required to inhibit by 50% the PDE11 enzyme-catalyzed hydrolysis of [³H]cGMP to the 5' nucleotide [³H]GMP relative to the activity of uninhibited controls). [³H]GMP binds to yttrium silicate SPA beads and is detected by
- 40 scintillation counting.

PDE11 Expression and Purification:

5 (a) Expression: Infect 200ml of Sf9 insect cells (Invitrogen, Carlsbad, CA) (1×10^6 /ml) with a multiplicity of infection of 2 using a baculovirus expression vector containing transposed PDE-11A1 (SEQ ID NO: 1) (pFastBac system, Invitrogen) (4×10^7 pfu/ml). Incubate at 27°C with 220rpm shaking for 48 hours. Harvest the infected cells by pelleting at 2000rpm for 10 minutes at 4°C. Store the infected cell pellet at -80 °C until ready for purification. Resuspend the thawed cell pellets to 1×10^7 cells/ml (=20ml buffer consisting of 20mM Hepes (pH7.2), 1mM EDTA, 20mM sucrose, 150mM NaCl and protease inhibitor tablets). Mix thoroughly and allow to stand on ice

10 for 10 minutes. Sonicate for 5 x 5 seconds, on ice. Spin the mixture at 12,000 rpm for 10 minutes at 4°C in SS34. Store the insoluble pellet at -80°C, and proceed to the purification of the soluble material.

(b) Purification: Prepare the column (1.0 cm diameter, Kontes) by rinsing the empty column twice with TBS. Then mix beads (Anti-FLAG M2 Agarose, Sigma) with TBS and add to the column – allow the beads to settle. Wash the column with 3 column volumes of 0.1M glycine (pH3.5). Then wash the column with 5 column volumes of TBS (do not allow to run dry). Apply the extract to the column and allow the extract to enter by gravity flow. Reapply the flow-through. Wash the column with 15 column volumes of TBS. Elute the protein with 5 x 1ml aliquots of

20 FLAG peptide (Sigma) (i.e., 100ug/ml in TBS). Elute the remaining protein with 1ml 0.1M glycine, and immediately add 25ul 1M Tris pH8 to neutralize.

Method 3A: Alternative Human Recombinant PDE11 Enzyme Inhibition Scintillation Proximity Assay (SPA)

25 The inhibition of PDE11 enzyme activity by a test compound also can be measured in accordance with the *in vitro* assay of Method 1A, but instead using PDE11 enzyme expressed in Sf9 insect cells in place of PDE5 enzyme. This assay measures the PDE11 IC_{50} value for the test compound (i.e., the concentration of the test compound required to inhibit by 50% the

30 PDE11 enzyme-catalyzed hydrolysis of [^3H]cGMP to the 5' nucleotide [^3H]GMP relative to the activity of uninhibited controls). [^3H]GMP binds to yttrium silicate SPA beads and is detected by scintillation counting.

The Carboxypiperidine Compound was tested in accordance with Method 2, Method 2A, Method 3, and Method 3A. The corresponding PDE6 and PDE11 IC_{50} values measured are reported in Table E.

40

Table E

RUN NO.	METHOD 2: PDE6 IC ₅₀ (nM)	METHOD 2A: PDE6 IC ₅₀ (nM)	METHOD 3: PDE11 IC ₅₀ (nM)	METHOD 3A: PDE11 IC ₅₀ (nM)
1	4.01	5.12	19.5	14.3
2	3.89	2.43	20.0	16.5
3		4.88		16.8
4		2.12		26.0
5		5.74		28.4
6		3.72		19.6
AVERAGE:	3.95	3.74	19.8	19.7

Compounds previously disclosed in examples from WO2004098810 were tested in accordance with Method 2, Method 2A, Method 3, and Method 3A. The corresponding PDE6 and PDE11 IC₅₀ values measured are reported in Table F.

Table F

WO2004098810 EXAMPLE NO.	METHOD 2: PDE6 IC ₅₀ (nM)	METHOD 2a: PDE6 IC ₅₀ (nM)	METHOD 3: PDE11 IC ₅₀ (nM)	METHOD 3a: PDE11 IC ₅₀ (nM)
245	250		390	
246	657		4320	
248	9.92		316	
249	5.10		1180	
250	221		3120	
251	9.51		1862	
252	307		874	
253	100		312	
254	188		2880	
255	207		937	
256	275		913	
258	198		215	
259	204		199	
261	58.8	110	426	585
262	47.7	66.3	471	608
263	25.3	30.6	316	384

* * *

- 10 Additional assays that can be used to evaluate the effectiveness of a test compound include Method 4, Method 4A, Method 5 and Method 6 described below:

Method 4: Aortic Ring Assay

- 15 An *ex vivo* assay can be used to measure the direct relaxation of a rat aortic ring exposed to a test compound. As more specifically described below, a test compound that inhibits PDE5 activity elicits a relaxation of the aortic ring by enhancing the cGMP signal (i.e., by

inhibiting PDE5 enzyme-catalyzed hydrolysis of cGMP to GMP) evoked when the aortic ring is exposed to a stable exogenous nitric oxide donor, such as diethyltriamine NONOate (diazene-1-lum-1, 2-diolate, also known as "DETA-NO"). The assay measures the EC₅₀ value for the test compound (i.e., the concentration of the test compound which produces 50% of the maximum possible effective response for the test compound).

Male Sprague-Dawley rats (250-350g) are asphyxiated using CO₂ gas and their thoracic aortas carefully excised and placed in Krebs buffer. The aortas are then carefully dissected free of connective tissue and divided into 8 sections, each 3-4mm in length.

Aortic rings are suspended between parallel stainless steel wires in a water jacketed (37°C), 15 mL tissue bath under a resting tension of 1 gram. Tension is measured using isometric tension transducers and recorded using Ponemah tissue platform system. Each preparation is allowed to equilibrate for at least 60 minutes prior to compound testing. During this time, the tissues are also incubated with 200 µM NG-monomethyl L-arginine ("L-NMMA"), and the incubation media changed every 15 to 20 minutes (L-NMMA is added after each wash to maintain the final concentration at 200µM in each tissue bath).

Following the equilibration period, baseline tensions are recorded for each tissue. The vasoconstrictor response to phenylephrine (1 µM) is assessed and when the response to phenylephrine reaches a maximum, vascular reactivity is subsequently assessed by a challenge of acetylcholine (1 µM). Following another washout period, a second baseline value is recorded after adding the vasoconstrictor noradrenaline (25 nM) to each bath and incubating the tissues for a time period (about 15 minutes) sufficient for the tissues to achieve a stable tone. An exogenous nitric oxide drive is supplied using the stable nitric oxide donor, DETA-NO. The concentration of DETA-NO is titrated (cumulatively in half-log increments) to achieve approximately 5 to 15% relaxation of the noradrenaline-evoked precontraction. Cumulative concentration-response curves are constructed in a single ring, typically using 5 doses/ ring and allowing 15 minutes between each addition.

Method 4A: Alternative Aortic Ring Assay

Method 4 can be modified to provide an alternative protocol for measuring the direct relaxation of rat aortic rings exposed to a test compound. This alternative method varies from Method 4 as described below:

For the alternative method, the endothelium is first removed by gently rubbing the lumen of the vessel together between the fingers prior to preparing the rings (denuded rings). The resting tension is set at 2 grams and the vasoconstrictor response to a maximal concentration of phenylephrine (1 µM) is assessed, followed (after a washout period) by two further exposures to 300 nM of phenylephrine. The concentration-response relationship to noradrenaline is constructed in each tissue over concentration range 0.1 to 300 nM. After another washout period,

the tissues are constricted with an EC₅₀ concentration of noradrenaline for compound testing.

Method 5: Culex™ Assay

- 5 The effect of a test compound on systemic arterial blood pressure can be evaluated in a conscious pre-cannulated spontaneously hypertensive rat ("SHR") model. This assay is conducted using an automated blood sampler ("ABS") system. The Culex™ ABS system (Bioanalytical System, Inc., West Lafayette, IN) comprises a laptop computer, four control units and metabolic cages. This ABS system allows for the collection of multiple blood samples from a single rat without causing undue stress to the animal. In addition, the ABS system allows for the collection of urine samples that can be potentially used for biomarker identifications. Through this approach, efficacy and standard pharmacokinetic studies are conducted in the conscious unrestrained SHR rats simultaneously to define the relationship between plasma free drug concentration or potential biomarker(s) and pharmacological effect (reduction of mean arterial blood pressure).
- 10 SHR rats at 12 to 16 weeks of age, weighing about 300g, undergo surgical cannulation of both jugular veins and the right carotid artery. After surgical recovery, animals are placed in the Culex™ cages and tethered to a movement-responsive arm with a sensor that controls cage movement when the animal moves to prevent the catheters from being twisted. Connections are made between the right jugular catheter and the Culex™ sterile tubing set for blood sampling, and the left jugular catheter for compound administration, and the catheter in the right carotid artery is connected to a pressure transducer for monitoring blood pressure. To keep the patency of the catheters, the right jugular cannula is maintained by the "tend" function of the Culex™ that flushes the catheter with 20 μ L heparin saline (10 units/mL) every 12 minutes or between sampling events, and the left jugular cannula is filled with heparin saline (20 units/mL). The patency of the right carotid cannula is maintained by slow infusion of heparin saline either directly into the extend tubing when blood pressure is not recorded or through the pressure transducer during the blood pressure monitoring. Animals are allowed to acclimate for at least two hours before compound evaluation. The test compound may be administered intravenously or by oral gavage. Blood sampling protocols (sampling time and volume) are programmed using the Culex™ software. The total amount of blood withdrawn from each animal will not exceed 750 μ L/24 hrs and 10 mL/kg within two weeks. Heart rate, blood pressure, and drug concentration are monitored. Systemic arterial blood pressure and heart rate are recorded by PONEMAH (Gould Instrument System, Valley View, OH), a pressure transducer through a data acquisition system for recording blood pressure and heart rate, for 6 to 24 hours based on experimental protocol. Mean arterial blood pressure (primary endpoint) is analyzed for assessing the efficacy of the compound.
- 15
20
25
30
35

Blood samples are analyzed for measuring plasma drug concentration, using the LC/MS/MS method described below, and for evaluating potential biomarkers.

LC/MS/MS Method

Sample Preparation: Plasma samples (50 μ L unknown, control or blank) are mixed with 10 μ L acetonitrile:water or a standard solution of the test compound and 150 μ L of internal standard solution (100 ng/mL of the test compound in acetonitrile). The mixture is centrifuged at 3000 rpm for 5 min, and 125 μ L of the supernatant transferred to a 96 well plate. The solvent is evaporated under a stream of nitrogen and the residue is reconstituted with 80 μ L acetonitrile/0.1% aqueous formic acid (20:80 v/v).

A 20 μ L volume of each prepared sample is injected onto a Phenomenex Synergi 4 μ m MAX-RP 2.0 x 75 mm column and eluted at 0.4 mL/min using gradient elution from 0.1% aqueous formic acid (mobile phase A) to acetonitrile (mobile phase B). The gradient program consists of initial application of 90% mobile phase A, followed by a linear gradient to 75% mobile phase B from 0.2 to 1.15 min after injection and held at 75% mobile phase B until 2.0 min. The mobile phase was linearly changed back to 90% mobile phase A from 2.00 to 2.10 minutes, and the next injection took place at 3.00 min. Detection was performed by mass spectrometry using positive ion electrospray (ESI) with multiple reaction monitoring of the transitions m/z 454.00 (MH⁺ the test compound) $\rightarrow$ m/z 408.00, m/z 466.24 (MH⁺ the test compound) $\rightarrow$ 409.33. The ion spray voltage is set at 5000. A calibration curve is constructed by using peak area ratios of the analyte relative to the internal standard. Subject concentrations are determined by inverse prediction from their peak area ratios against the calibration curve.

20 Method 6: Implantation of Radio Transmitters and Subsequent Blood Pressure Screening by Telemetry in Spontaneously Hypertensive Rats

The effect of a test compound on systemic arterial blood pressure can be evaluated in a spontaneously hypertensive rat ("SHR") model using telemetry. SHR Rats are anesthetized with isoflurane gas via an isoflurane anesthesia machine that is calibrated to deliver isoflurane over a range of percentages as oxygen passes through the machine's inner chambers. The animals are placed in an induction chamber and administered isoflurane at 4-5% to reach a surgical plane of anesthesia. They are then maintained at 1-2% during the surgical procedure via a nose cone, with isoflurane delivered via a smaller isoflurane anesthesia device on the surgical table.

Following administration of anesthesia, the rats are implanted with transmitters using aseptic procedures with commercially available sterile radio-telemetry units (Data Sciences, International, Roseville, MN 55113-1136). Prior to surgery the surgical field is shaved, scrubbed with Dial™ brand antimicrobial solution (containing 4% chlorhexidine gluconate and 4% isopropyl alcohol) followed by an application of iodine (10%) spray solution. A 2.5 to 3.0 cm laparotomy is preformed and the radio-telemetry units implanted into the abdomen, with the catheter tip inserted into the abdominal aorta. Baby Weitlaner retractors are used to retain soft tissue. A 1 cm section of the abdominal aorta is partially dissected and that section cross-clamped briefly, punctured with a 21-gauge needle and the transmitter catheter tip introduced into the vessel and secured by a single 4.0 silk suture anchored to the adjacent psoas muscle. The transmitter body is then inserted into the abdominal cavity and simultaneously secured to the abdominal muscle

81

wall while closing with running 4.0 silk suture. The skin layer is closed with subdermal continuous 4.0 absorbable suture. A subcutaneous (s.c.) administration of marcaine followed by a topical application of iodine is administered into and around the suture line, respectively, upon closing. All rats receive a postoperative injection of buprenorphine @ 0.05mg/kg, s.c. before regaining consciousness. A typical dose volume for a 0.300kg rat will be 0.050ml. The rats must be fully recovered from their operative anesthesia before the administration of buprenorphine. They then receive the same dose once daily for 2 consecutive days, unless the animal demonstrates that it is in compromising postoperative pain.

Following surgery, the rats are returned to their cages and housed individually on solid bottom caging with paper bedding. A period of no less than 7 days is allowed for recovery before experimental procedures are initiated. It has been observed that the rats are typically hypertensive for several days following surgery and return to "normotensive" levels by approximately the 7th day post-surgery. They are fed standard rat chow and water ad libitum throughout the experimental time line.

Test compounds are administered intragastrically (i.g.) via gavage, using of a stainless steel, 2½ inch, 18 gauge gavage needle with a ball end. For single daily dosing, the target volume is 3.33 ml/kg, i.g. The dose volume for the test compound is approximately 1 ml/ rat. The vehicles in which the test compound is administered is methylcellulose (0.5%) + Tween 80 (0.1%) in 50mM citrate buffer pH=5.0.

Blood pressure data will be obtained using Data Sciences International's data acquisition program (Version 3.0). Blood pressure samples are recorded at 1.5-3 minute intervals for a 5 second duration 24 hours per day for the entire study. This data is processed by Data Science's data analysis software into averages of a desired time intervals. All other data reduction is performed in Microsoft Excel™ spreadsheets.

O. Toxicity Assays

Method 7: Micronucleus Assay

An *in vitro* micronucleus assay can be used to determine the mutagenic potential of a test compound. This assay detects chromosome abnormalities resulting from exposure to a test compound by measuring the formation of small membrane-bound DNA fragments such as micronuclei in the cytoplasm of interphase cells.

The assay is conducted using Chinese hamster ovary (CHO) cells under different test conditions in the absence and presence of metabolic activation. Concordance in outcomes between this screening assay and *in vitro* cytogenetics is around 85%. Direct (-S9) testing is conducted using 24 hour or 3 hour continuous treatments, whereas testing with metabolic activation (+S9) involves a 3 hour treatment. Clastogenicity is indicated by an increase in numbers of micronucleated cells in the first interphase after exposure (in cytokinesis-blocked binucleated cells). The results are compared to the level of cytotoxicity (measured by the

proportion of binucleated cells) a test compound produces. To demonstrate validity of the test, negative (vehicle-treated) and positive (a known responder) controls are required to respond within established historical ranges.

- 5 Negative - A negative result identifies no genotoxic hazard defined by the assay's specific endpoint (ex. negative *in vitro* micronucleus). A test compound displaying a negative response has not fulfilled specific evaluation criteria for the assay which may include one or both of the following: 1) a reproducible concentration dependent increase in the specific assay endpoint when compared to a negative (vehicle) control and/or 2) one or more test concentrations
- 10 achieving a minimum fold increase in the specific endpoint over controls.

- Positive - A positive result identifies a genotoxic hazard defined by the assay's specific endpoint (ex. positive *in vitro* micronucleus). A test compound displaying a positive response has fulfilled specific evaluation criteria for the assay which may include one or both of the following: 1) a
- 15 reproducible concentration dependent increase in the specific assay endpoint when compared to a negative (vehicle) control and/or 2) one or more test concentrations achieving a minimum fold increase in the specific endpoint over controls.

- Equivocal - An equivocal result is reserved for situations where the test compound has been evaluated in a valid assay test or tests (i.e. assay acceptability criteria satisfactory), but fails to display a negative or positive result as defined by established evaluation criteria. This may convey the presence of a weak positive response that requires additional repeat testing or eventual confirmatory testing case-by-case.
- 20

- Inconclusive - An inconclusive result is reserved for situations where the test compound has been evaluated in an invalid assay test (i.e. assay acceptability criteria unsatisfactory for technical reasons, ex. negative or positive controls fail to respond appropriately). Repeat testing is recommended in order to establish a valid assay test result.
- 25

- 30 The Carboxypiperidine Compound was tested in accordance with Method 7 and yielded an equivocal result.

Compounds previously disclosed in examples from WO2004096810 that were tested in accordance with Method 7. The corresponding micronucleus assay results are reported in Table G.

35

Table G

WO2004096810 EXAMPLE NO.	METHOD 7: MICRONUCLEUS ASSAY
261	Positive
262	Equivocal
263	Positive

- 5 Additional assays that can be used to evaluate the toxicity of a test compound (e.g., where the micronucleus assay yields an equivocal result) include Method 8, Method 9, and Method 10 described below:

Method 8: In Vitro Structural Chromosome Aberration in Human Peripheral Lymphocytes

- 10 An *in vitro* structural chromosome aberration assay can be used to evaluate a test compound for its ability to induce structural and numerical chromosome aberrations in the presence and absence of mammalian metabolic activation in human peripheral lymphocytes.

Concentration calculations are based on the corresponding moiety factor of 1.000. The test compound is dissolved and diluted in DMSO, which will serve as the vehicle control at a volume equivalent to that used to deliver the test compound (1% final concentration).

- 15 Heparinized human peripheral venous blood from a healthy male volunteer are added to culture medium, followed by addition of phytohemagglutinin M (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) to stimulate the cellular division of lymphocytes. The primary cultures are incubated for at least 46 hours prior to treatment with the test compound.

The following positive control is utilized:

20

Table 1. Positive Controls

Positive Control	Metabolic Activation	Test Compound	
		Incubation Time (hours)	Concentration (µg/mL)
Cyclophosphamide (CP)	+	3	10
Mitomycin C (MMC)	-	3	0.4
Mitomycin C (MMC)	-	24	0.1

The following treatments are utilized:

25

Table 2: Treatment Conditions

Treatment	Test Compound Incubation Time (hours)	Metabolic Activation (S9)	Harvest Time (hours)
(1) 3-Hr +S9	3	+	24
(2) 3-Hr - S9	3	-	24
(3) 24-Hr - S9	24	-	24

The following dose levels are selected for the assay:

8/11

Table 3. Dose Levels

Treatment	Concentrations ($\mu\text{g/mL}$)
(1) 3-Hr +S9	100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700
(2) 3-Hr - S9	100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700
(3) 24-Hr - S9	50, 75, 100, 200, 250, 300, 350, 400

Single cultures of cells for each concentration and a vehicle control are dosed. Cell cultures are exposed to 0.1 $\mu\text{g/mL}$ Colcemid[®] (Ciba, Switzerland) for 2 hours prior to harvest. Cells are harvested by centrifugation, swelled in a hypotonic solution and then fixed in a methanol:glacial acetic acid fixative solution. The fixed cell suspension is dropped onto wet microscope slides, dried, and stained with Giemsa. For each concentration of drug tested, at least 2 slides per culture are prepared.

10 Cytotoxicity is measured by an assessment of chromosome morphology and the inhibition of mitosis (mitotic index). A mitotic index is determined for all treatment conditions by scoring 1000 cells per condition for the proportion of metaphase cells.

15 The maximum concentration selected for scoring chromosome aberrations is the highest dose at which a sufficient number of analyzable metaphase cells are expected. If possible, the highest dose selected would suppress the mitotic index by approximately 50%, but not greater than 70% reduction.

20 At least one concentration under each test condition is selected for analysis along with the concurrent vehicle and positive control. The slides are not analyzed in a blinded fashion. At the discretion of the study director, additional test concentrations may be evaluated after the initial evaluation has been completed to provide further clarification of an effect (i.e., an increase or absence of aberrations).



The highest test concentration selected for analysis should meet 1 of the following criteria: (1) produces approximately a 50% reduction of the mitotic index compared to the vehicle controls, (2) shows evidence of incomplete solubility, or (3) is equivalent to the maximum concentration of 5000 µg/mL or 10 mM (whichever is lower). When possible, 100 acceptable diploid metaphase cells from each culture are evaluated for chromosome damage. An exception to this is an apparent increase in the frequency of abnormal cells during data collection (i.e., > 10 aberrant cells are tallied in the first 50 acceptable cells) in which case further analysis is discontinued. Metaphase cells selected for analysis must be intact (i.e., have 46±2 chromosomes), and have a minimum of overlapping chromosomes. In addition, the chromosomes should appear elongated such that the individual arms and centromeric regions can be readily identified. Each metaphase cell is classified as normal or abnormal with the type(s) and number of abnormalities present per cell recorded. For abnormal cells, the stage X and Y vernier co-ordinates of the slide are recorded. Structural chromosome aberrations are classified as chromatid break (Ct brk), chromatid fragments (Ct Frg), chromatid damage including exchanges, rings, dicentric and translocations (R), chromosome breaks (CsBrk), chromosome fragments (Cs Frg) and multiple breaks (M). In addition, cells with pulverized chromosomes (PV) are collected in the total aberration tally. Cells that contained gaps are recorded but not included in the total aberration tally. Numerical chromosome aberrations are determined for each treatment condition and the concurrent vehicle controls by evaluating the number of polyploid and endoreduplicated cells. The polyploidy indices are obtained by scoring when possible 1000 metaphase cells/culture while tabulating the number of metaphase cells that are polyploid or endoreduplicated.

A Fisher's Exact 1-tailed test on the total number of aberrant cells from each treatment group compared to the total aberrant cells from the negative controls are used as the statistical analysis.⁵ A p-value ≤0.05 is considered to be statistically significant.

An assay is considered valid if the following criteria are met:

1. Positive control induces a statistically significant increase in the percentage of cells with chromosome aberrations when compared to the concurrent vehicle control and the induced frequencies are comparable to published or historical data.
2. Vehicle control cultures have ≤ 3% of cells with aberrations or a percentage considered comparable to published or historical data.
3. Approximately 50% inhibition of mitotic index is observed at the highest dose level. This requirement is not applicable to test compounds for which no apparent cytotoxicity could be achieved at the maximum soluble concentration or highest allowable dose.

80

Method 9: Seven Day Oral Gavage Toxicity Study in the Male SD/IGS Rat

The toxicity of a test compound can be evaluated in a rat model. This study determines the potential toxicity of and systemic exposure to test compounds, when administered by oral gavage, once daily, for 7 consecutive days, to 6 to 8 week old male Charles River SD/IGS rats weighing between 175g and 200g. This study is conducted using the Xybion Path/Tox System (Xybion Medical Systems Corporation, Cedar Knolls, NJ).

The test compound is dosed orally once for 7 days by gavage at a volume of 10 mL/kg of body weight. The test compound is administered to 3 groups of rats (n=5) getting doses of 30 mg/kg/day, 100 mg/kg/day, and 500 mg/kg/day, respectively. A control group (n=5) receives vehicle (0.5% Methylcellulose (w/v) and 0.1% Polysorbate 80 (v/v) in 50 mM phosphate buffer). The oral route is used because it is the intended route of exposure in humans. The appropriate amount of test compound is suspended in 0.5% methylcellulose (w/v) and 0.1% polysorbate 80 (v/v) in 50 mM citrate buffer. The dosing suspension pH is maintained between 3 and 9.

Every animal is serially bled at 1, 3, 8, and 24 hours post dose on Day 1. Urine is collected approximately 24 hours for metabolic analysis. Survival and morbidity observations are conducted once daily during the pre treatment period. Clinical signs are observed daily, 1- 3 hours post dose. Animals are euthanized via exsanguination after 7 days. Animals found dead are refrigerated and necropsied at the earliest possible time (within working hours). Terminal body weights, blood samples and organ weights are not taken from animals found dead. Moribund/unscheduled/scheduled animals that are sacrificed are taken immediately to necropsy, and body weights, blood samples, and all clinical pathology samples except for urine samples are taken.

Various tissues (adrenal, femur bone, brain, cecum, colon, duodenum, epididymis, heart, ileum, jejunum, kidney, liver, pancreas, biceps femoris skeletal muscle, spleen, stomach, testis, thymus, thyroid, lumbar spinal cord, and mesenteric lymph node) will be weighed, flash frozen stained and fixed. After macroscopic examination, tissues collected with gross abnormalities are retained in formalin. All tissues collected with gross abnormalities are processed and examined microscopically by the pathologist. Tissues are trimmed, embedded, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin and examined microscopically by the pathologist at the pathologist's discretion. Bone marrow smears are prepared and stained with Wright's stain. To elucidate the nature of an individual animal's tissue change, additional tissue collection, sectioning, staining, and microscopic examination is conducted as requested by the pathologist.

Clinical observations, body weights, gross necropsy observations, and histopathologic findings are directly entered into the Xybion Path/Tox System.

Method 10: BioLum Ames Gene Mutation Assay

A *Salmonella* mutagenicity test (also known as the Ames test) can be used to determine the mutagenic potential of a test compound. This assay measures the mutation rate of bacteria

that are exposed to a test compound. See, for example, Ames, B.N., Durston, W.E., Yamasaki, E. and Lee, F.D. (1973) Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **70**, 2281-2285). Some carcinogens become activated when they are enzymatically transformed to an electrophilic species capable of covalently binding to DNA. In the Ames assay, S9 (9000g supernatant) fractions are prepared from the livers of rats pretreated with phenobarbital (PB)/5,6-benzoflavone (BF) or Aroclor 1254 to induce such drug metabolizing enzyme activity.

The BioLum Ames assay is a higher throughput screening version of the standard bacterial (Ames) gene mutation assay. To demonstrate validity of the test, negative (vehicle-treated) and positive (a known responder) controls are required to respond within established historical ranges.

Negative - A negative result identifies no genotoxic hazard defined by the assay's specific endpoint (ex. negative *in vitro* micronucleus). A test compound displaying a negative response has not fulfilled specific evaluation criteria for the assay which may include one or both of the following: 1) a reproducible concentration dependent increase in the specific assay endpoint when compared to a negative (vehicle) control and/or 2) one or more test concentrations achieving a minimum fold increase in the specific endpoint over controls.

Positive - A positive result identifies a genotoxic hazard defined by the assay's specific endpoint (ex. positive *in vitro* micronucleus). A test compound displaying a positive response has fulfilled specific evaluation criteria for the assay which may include one or both of the following: 1) a reproducible concentration dependent increase in the specific assay endpoint when compared to a negative (vehicle) control and/or 2) one or more test concentrations achieving a minimum fold increase in the specific endpoint over controls.

Equivocal - An equivocal result is reserved for situations where the test compound has been evaluated in a valid assay test or tests (*i.e.* assay acceptability criteria satisfactory), but fails to display a negative or positive result as defined by established evaluation criteria. This may convey the presence of a weak positive response that requires additional repeat testing or eventual confirmatory testing case-by-case.

Inconclusive - An inconclusive result is reserved for situations where the test compound has been evaluated in an invalid assay test (*i.e.* assay acceptability criteria unsatisfactory for technical reasons, ex. negative or positive controls fail to respond appropriately). Repeat testing is recommended in order to establish a valid assay test result.

P. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Study

Method 11: Single Dose Pharmacokinetics and Oral Bioavailability in Male Sprague-Dawley Rat Following Intravenous and Oral Administration

An *in vivo* model can be used to evaluate the single dose pharmacokinetic properties and absolute oral bioavailability of a test compound. As described more specifically below, a test compound is administered to Sprague-Dawley (SD) rats either intravenously or orally in a crossover study design and the resulting pharmacokinetic properties and oral bioavailability are measured.

Male rats are administered a 2.0 mg/kg dose orally ($n=2$) by gavage as a suspension (0.5% methylcellulose/0.1% Tween 80 in distilled water). After a 72 hour wash-out period, the same rats were administered 2.0 mg/kg dose bolus intravenously ($n=2$) as a solution (70% PEG 400/20% 0.05 M Citrate Buffer pH 3/10% Ethanol). Serial blood samples (for plasma) are collected from each rat over a 24 hour post dose for each route. Plasma concentrations of test compound are determined using a LC/MS/MS method with a lower limit of quantitation (LLOQ) of 1.2 (for -534) ng/mL. Pharmacokinetic parameters of a test compound are determined from the plasma concentration-time data using non-compartmental methods.

LC/MS/MS: 1) Column: Hyperso; AQUASIL C-18 2.1x20mm, 3.0 μ m; 2) Mobile phase: Aqueous Water with 0.1% Formic Acid, Organic: Acetonitrile; Ionization: +ESI (API 4000), MRM: m/z 494.4 $\rightarrow$ m/z 394.0 (Example 261 in WO2004096810), m/z 509.44 $\rightarrow$ m/z 409.80 (Example 263 in WO2004096810), m/z 495.33 $\rightarrow$ m/z 395.20 (Example 262 in WO2004096810). The detection limits are 0.12 ng/mL (Example 261 in WO2004096810), 1.3 ng/mL (Example 263 in WO2004096810) and 0.11 ng/mL (Example 262 in WO2004096810).

Watson (Version 6.4.0.04) is used to calculate mean test compound concentrations, corresponding standard deviations (SD), and percent coefficient of variation (%CV), and to estimate pharmacokinetic parameters (derived by noncompartmental methods) and associated statistics (mean, SD & CV%) if applicable. (Since $n=2$, no SD or CV calculated?).

Concentrations below the limit of quantitation (BLO) are reported as zero (0) and are used in the evaluation of mean concentrations and the estimation of AUC. The peak plasma concentration (C_{max}) and the time to reach peak concentration (t_{max}) are recorded directly from individual plasma concentration-time profiles. The terminal log-linear phase of the plasma concentration-time curve is identified by linear regression of data points. The terminal half-life ($t_{1/2}$) is calculated as $\ln(2)$ divided by absolute value of the slope of the terminal log-linear phase.

The area under the plasma concentration-time curve from time zero to time of the last quantifiable concentration (t) [$AUC_{(0-t)}$] is determined using the linear trapezoidal method. The area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity [$AUC_{(0-\infty)}$] is determined as $AUC_{(0-t)}$ plus the extrapolated area. The extrapolated area is determined by dividing the last observed plasma concentration by the slope of the terminal log-linear phase. Systemic plasma

clearance (CL) is calculated as $\text{dose}/AUC_{(0-\infty)}$ while the volume of distribution at steady state (V_{dss}) is calculated as $CL \times MRT$, where MRT (mean residence time) is defined as $AUMC_{(0-\infty)}/AUC_{(0-\infty)}$. The absolute PO bioavailability (F) is calculated as a ratio of the dose-normalized $AUC_{(0-\infty)}$ of individual animal after PO administration to the dose-normalized $AUC_{(0-\infty)}$ of individual animal after IV administration given the crossover study design. The peak plasma concentration (C_{max}), the time to reach peak concentration (t_{max}), the terminal half-life ($t_{1/2}$), the area under the

plasma concentration-time curve from time zero to infinity [$AUC_{(0-\infty)}$], the volume of distribution at steady state (V_{dss}), the systemic plasma clearance (CL), and the absolute PO bioavailability (F) are shown in Table C.

- 5 The Carboxypiperidine Compound was tested in accordance with Method 11 and the results are reported in Table H. Compounds previously disclosed in examples from WO2004096810 were tested in accordance with Method 11. Results for these compounds are also are reported in Table H.

Table H Summary of Mean PK Parameters

Compound	Route	Dose (mg/kg)	N	C _{max} (ng/mL)	t _{max} (hr)	t _{1/2} (hr)	AUC (0-∞) (ng·hr/mL)	V _{dss} (L/kg)	CL (mL/min/kg)	F (%)
Carboxypiperidine Compound	iv	2	2			6.3	17500	0.715	1.9	
	po	2	3	1360±216	0.5±0.2	5.7±0.2	9070±2300			51.8±13.1
WO2004096810, Example 281	iv	2	2			6.4	18017	0.564	1.75	
	po	2	2	2351	0.67	6.7	20040			105
WO2004096810, Example 262	iv	2	2			5.5	440	6.11	76.9	
	po	2	2	87.1	0.67	3.4	280			63.9
WO2004096810, Example 263	iv	2	2			4.5	555	5.07	60.1	
	po	2	2	102	0.33	3.8	329			60.0

91

O. Biological Protocols—Coadministration with Angiotensin Converting Enzyme InhibitorMethod 12: SHR Rat Combination Therapy

A study was conducted to assess the effect of repeated oral dosing of the Carboxypiperidine Compound on blood pressure lowering and whether co-administration of the Carboxypiperidine Compound and the angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril could result in further blood pressure lowering. The study consisted of treating spontaneously hypertensive rats (SHR) telemetered as described in Method F with the Carboxypiperidine Compound (1 mg/kg once daily oral) and enalapril (0.007% in drinking water) alone and in combination for 7 days (Figure 1) (n=12/group). The Carboxypiperidine Compound reduced blood pressure from a pre-dose baseline value in comparison to a vehicle treated group by 11 ± 1 mmHg on day 1. The reduction in blood pressure was sustained for the 7-day period, remaining 9 ± 1 mmHg below the pre-dose baseline on day 7.

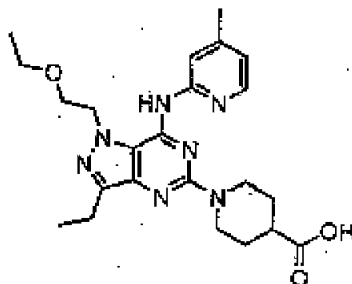
Enalapril also reduced blood pressure from a pre-dose baseline value in comparison to a vehicle treated group with a maximal reduction of 22 ± 2 mmHg on day 7. The combination of the Carboxypiperidine Compound plus enalapril reduced blood pressure more than blood pressure was reduced by each agent alone on all days.

Changes in the urinary cGMP mechanistic biomarker were assessed over the 24-hour period on day 9. cGMP was elevated in a 0-24 hour urine collection in both the Carboxypiperidine Compound and the Carboxypiperidine Compound + enalapril combination groups in comparison to the vehicle treated group (Figure 2) (n=12/group).

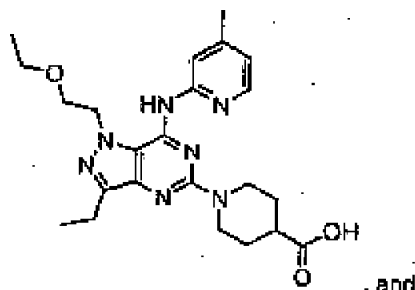
All documents mentioned in this application are expressly incorporated by reference as if fully set forth at length. When introducing elements of the present invention or the preferred embodiment(s) thereof; the articles "a", "an", "the" and "said" are intended to mean that there are one or more of the elements. The terms "comprising", "including" and "having" are intended to be inclusive and mean that there may be additional elements other than the listed elements.

We claim:

1. A compound, and pharmaceutically acceptable salts of the compound, having the structure:



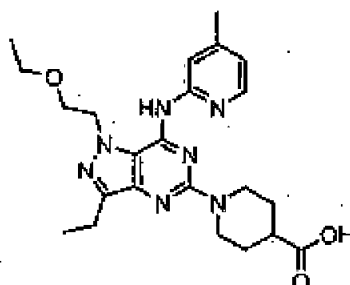
2. The compound of claim 1 that is a free acid.
3. The pharmaceutically acceptable salts of the compound of claim 1.
4. A pharmaceutical composition comprising a compound, or a pharmaceutically acceptable salt of the compound, having the structure:



a pharmaceutically-acceptable carrier,

5. The pharmaceutical composition of claim 4 comprising a free acid of the compound.
6. The pharmaceutical composition of claim 4 comprising a pharmaceutically acceptable salt of the compound.
7. The pharmaceutical composition of claim 4 further comprising an angiotensin-converting enzyme inhibitor.
8. The pharmaceutical composition of claim 4 further comprising an angiotensin II receptor antagonist.

9. A method of treating a condition in a subject, the method comprising administering to the subject a therapeutically-effective amount of a compound, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, having the structure:



wherein the condition is selected from the group consisting of a cardiovascular condition, a metabolic condition, a central nervous system condition, a pulmonary condition, sexual dysfunction, pain and renal dysfunction.

10. The method of claim 9 wherein the condition is a cardiovascular condition.

11. The method of claim 10 wherein the cardiovascular condition is hypertension.

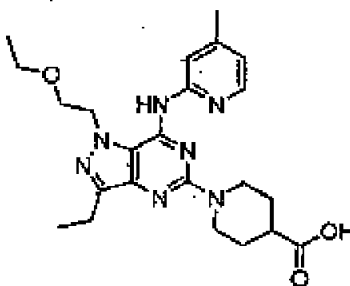
12. The method of claim 10 wherein the cardiovascular condition is heart failure.

13. The method of claim 10 wherein the cardiovascular condition is angina.

14. The method of claim 9 further comprising administering a therapeutically-effective amount of an angiotensin converting enzyme inhibitor to the subject.

15. The method of claim 9 further comprising administering a therapeutically-effective amount of an angiotensin II receptor antagonist to the subject.

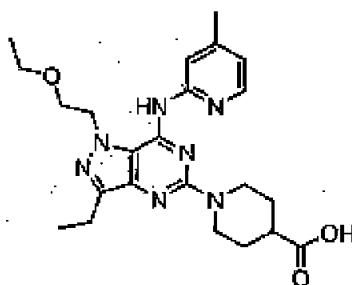
16. Use of a compound, or a pharmaceutically acceptable salt thereof, having the structure:



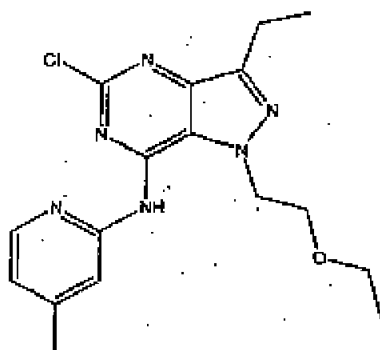
in the manufacture of a medicament for the treatment of a condition selected from the group consisting of cardiovascular conditions, metabolic conditions, central nervous system conditions, pulmonary conditions, sexual dysfunction, pain and renal dysfunction.

AM

17. The use of claim 16 wherein the condition is a cardiovascular condition.
18. The use of claim 17 wherein the cardiovascular condition is hypertension.
19. The use of claim 17 wherein the cardiovascular condition is heart failure.
20. The use of claim 18 wherein the cardiovascular condition is angina.
21. A method of preparing a first compound having the structure:



The method comprising contacting a second compound having the structure :



with isonipecotic acid to provide the first compound.

as

1/2

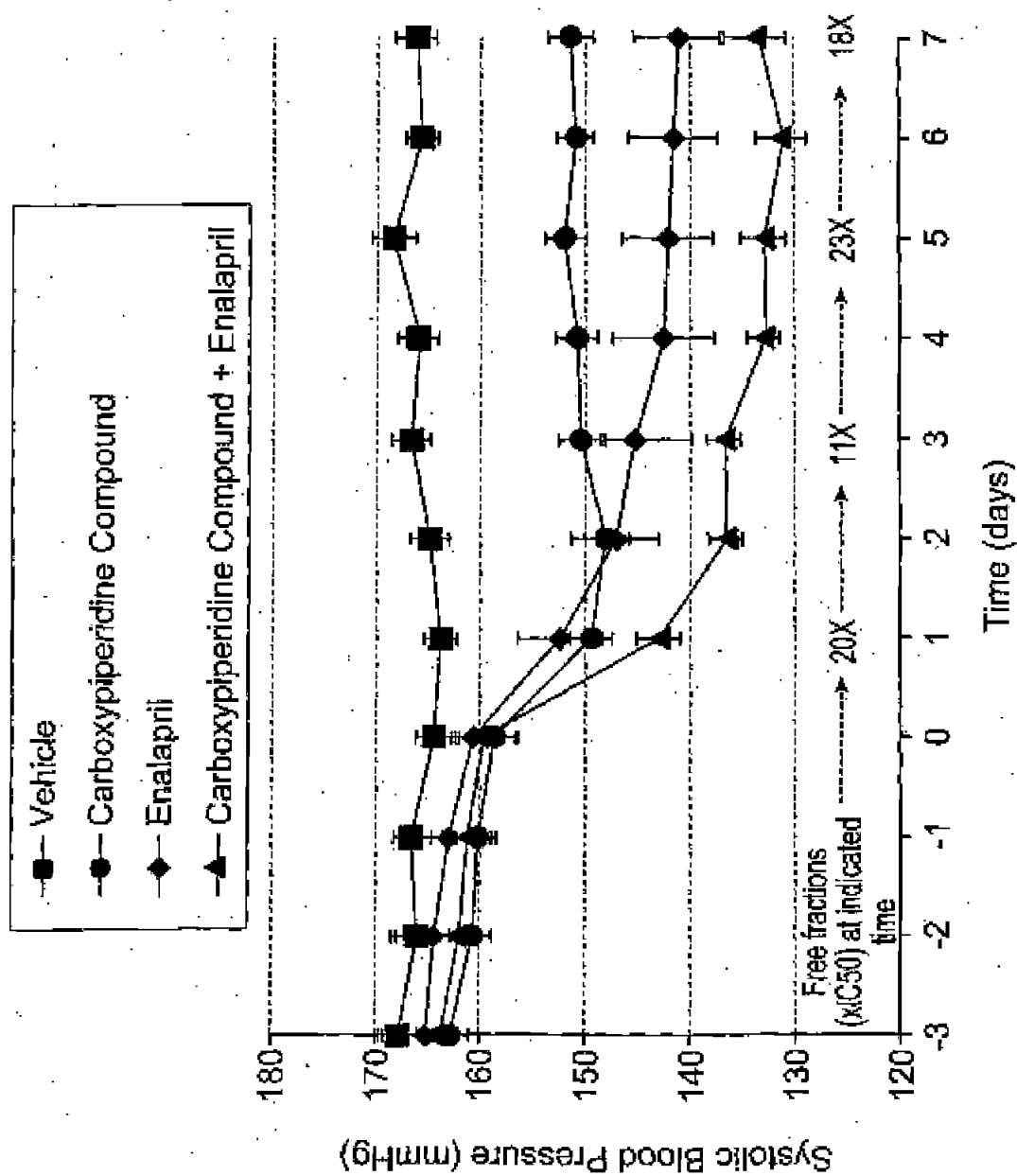


FIG. 1

96

2/2

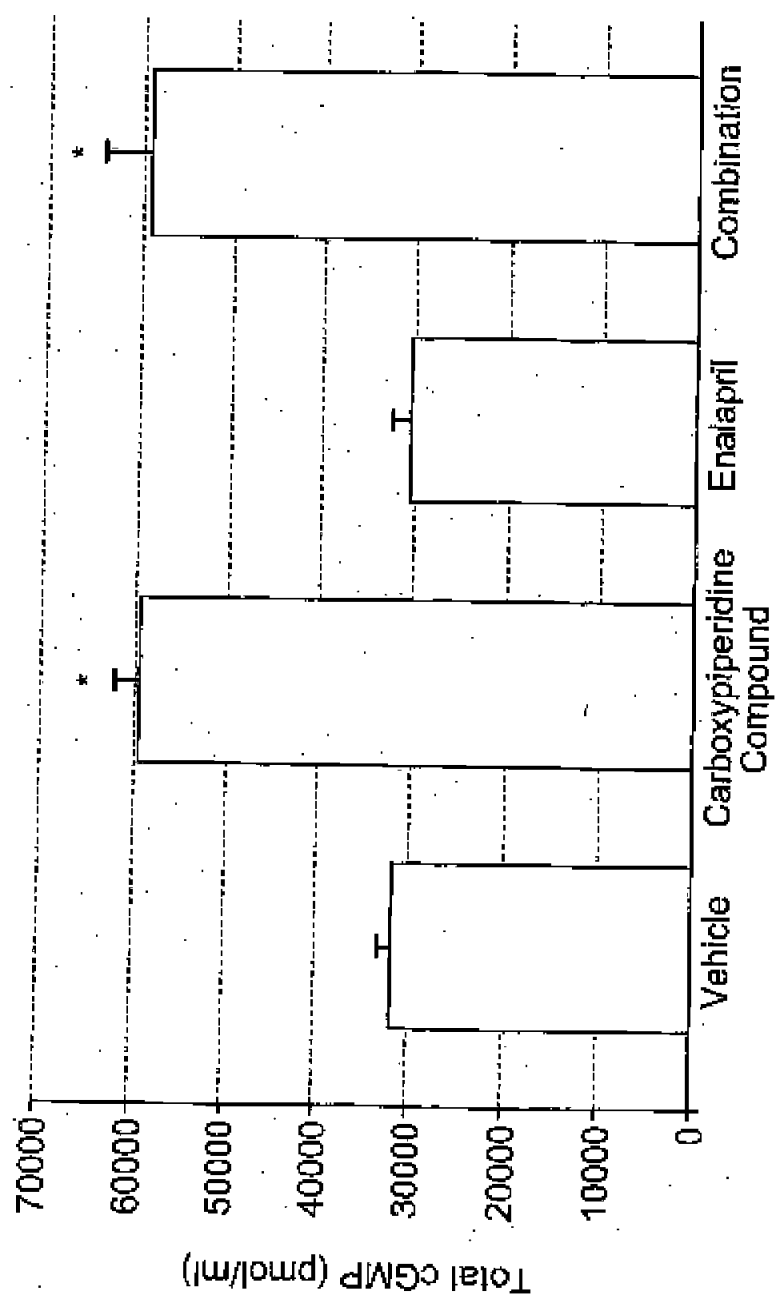


FIG. 2

SEQ ID NO 1.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc

<120> 1-(1-(2-ETHOXYETHYL)-3-ETHYL-7-(4-METHYLPYRIDIN-2-YLAMINO)-1H-PYR
AZOLO[4,3-D]PYRIMIDIN-5-YL)PIPERIDINE-4-CARBOXYLIC ACID AND SALTS
THEREOF

<130> PC033153A

<150> 60/735320

<151> 2005-11-10

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 1518

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggactaca aggacgacga cgacaaggga tcccgggtccg agatgtcccc aaagtgcagt	60
gctgatgctg agaacagttt caaagaaagc atggagaaat catcactc cgactggcta	120
ataaataaca gcattgctga gctggttgct tcaacaggcc ttccagtga catcagtgat	180
gcctaccagg atccgcgctt tgatgcagag gcagaccaga tatctggttt tcacataaga	240
tctgttcttt gtgtccctat ttggaatagc aaccaccaa taattggagt ggctcaagt	300
ttaaacagac ttgatgggaa accttttgat gatgcagatc aacgactttt tgaggctttt	360
gtcatctttt gtggacttgg catcaacaac acaattatgt atgatcaagt gaagaagtcc	420
tgggccaagc agtctgtggc tcttgatgtg ctatcatacc atgcaacatg ttcaaaagct	480
gaagttgaca agtttaaggc agccaacatc cctctggtgt cagaacttgc catcgatgac	540
attcattttg atgacttttc tctcgacgtt gatgccatga tcacagctgc tctccggatg	600
ttcatggagc tggggatggt acagaaattt aaaattgact atgagacact gtgtaggtgg	660
cttttgacag tgaggaaaaa ctatcggatg gttctatacc acaactggag acatgccttc	720
aacgtgtgtc agctgatgtt cgcgatgtta accactgctg gggttcaaga cattctgacc	780
gaggtggaaa ttttagcggg gattgtggga tgcctgtgtc atgacctga ccacagggga	840
accaacaatg ccttccaagc taagagtggc tctgccctgg cccaactcta tggaacctct	900
gctaccttgg agcatcacca tttcaaccac gccgtgatga tccttcaaag tgagggtcac	960
aatatctttg ctaacctgtc ctccaaggaa tatagtgacc ttatgcagct tttgaagcag	1020
tcaatatttg caacagacct cacgctgtac tttgagagga gaactgaatt ctttgaactt	1080
gtcagtaaag gagaatacga ttggaacatc aaaaaccatc gtgatataatt tcgatcaatg	1140
ttaatgacag cctgtgacct tggagccgtg accaaaccgt gggagatctc cagacaggtg	1200

1/6

SEQ ID NO 1.ST25.txt

gcagaacttg taaccagtga gttcttcgaa caaggagatc gggagagatt agagctcaaa	1260
ctcactcctt cagcaatttt tgatcggaa cggaggatg aactgcctcg gttgcaactg	1320
gagtggattg atagcatctg catgcctttg tatkaggcac tggatgaagg caacgtgaaa	1380
ctgaagccga tgctagattc agtagctaca aacagaagta agtgggaaga gctacaccaa	1440
aaacgactgc tggcctcaac tgcctcatcc tcctcccctg ccagtgttat ggtagccaag	1500
gaagacagga actaataa	1518

ÁCIDO 1-(1-(2-ETOXIETIL)-3-ETIL-7-(4-METILPIRIDIN-2-ILAMINO)-1H-PIRAZOLO[4,3-D]PIRIMIDIN-5-IL)PIPERIDINA-4-CARBOXÍLICO Y LAS SALES DEL MISMO

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere generalmente al ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4- carboxílico y las sales del mismo. La presente invención además se refiere a las composiciones farmacéuticas que comprenden este compuesto o sus sales, los procedimientos de tratamiento que emplean este
10 compuesto o sus sales, y los procedimientos de preparación de este compuesto o sus sales. En general, el compuesto y sus sales inhiben la enzima fosfodiesterasa de tipo 5 ("PDE5") específica de monofosfato de guanilato cíclico.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La hipertensión es una afección asociada a, entre otros problemas fisiológicos, un riesgo incrementado de accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, fibrilación atrial, insuficiencia cardíaca, enfermedad vascular periférica y disfunción renal. A pesar de los numerosos fármacos disponibles
20 en diversas categorías farmacológicas para tratar hipertensión y problemas fisiológicos relacionados, no todos los pacientes responden a tales fármacos con la eficacia o con la seguridad que desea. Todavía son necesarios agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de hipertensión y/o afecciones relacionadas.

25 Una clase de agentes terapéuticos reseñados en la bibliografía como útiles para el tratamiento de hipertensión son inhibidores de la enzima PDE5 ("inhibidores de la PDE5"). En general, las células endoteliales vasculares

secretan óxido nítrico que actúa sobre las células del músculo liso vascular y conduce a la activación de la guanilato ciclasa y la acumulación del monofosfato de guanosina cíclico ("cGMP"). La acumulación de cGMP provoca que los músculos se relajen y los vasos sanguíneos se dilaten, conduciendo a una reducción en la presión sanguínea. El cGMP se inactiva por la hidrólisis a 5'-monofosfato de guanosina ("GMP") mediante fosfodiesterasas específicas de cGMP. Una cGMP-fosfodiesterasa implicada en la inactivación de cGMP es la enzima PDE5. Los inhibidores de la enzima PDE5 disminuyen la velocidad de la hidrólisis de cGMP. Esta reducción en la hidrólisis de cGMP potencia las acciones de óxido nítrico que conduce a la reducción de la presión sanguínea.

Los compuestos que son inhibidores de la PDE5 se han reseñado en la bibliografía. Por ejemplo, el documento WO 2005049616 reseña una clase de compuestos de pirazolo[4,3-d]pirimidinilo. El documento WO 2005049617 reseña otra clase de compuestos de pirazolo[4,3-d]pirimidinilo. El documento WO 2004096810 reseña otra clase de compuestos de pirazolo[4,3-d]pirimidinilo. El documento EP 1348707 reseña otra clase de compuestos de pirazolo[4,3-d]pirimidinilo.

Es deseable la identificación de compuestos adicionales que son inhibidores de la PDE5. Tales compuestos se pueden usar para tratar sujetos que padecen o son susceptibles de hipertensión y/o problemas fisiológicos relacionados y además amplían el intervalo de opciones de tratamiento disponibles para tales sujetos.

SUMARIO DE LA INVENCION

En una realización, la invención comprende el ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico y sus sales farmacéuticamente aceptables.

101

En otra realización, la invención comprende una composición farmacéutica que comprende el ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención comprende una composición farmacéutica que comprende el ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, uno o más agentes terapéuticos adicionales, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención comprende procedimientos para tratar una afección en un sujeto mediante la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Las afecciones que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen afecciones cardiovasculares, afecciones metabólicas, afecciones del sistema nervioso central, afecciones pulmonares, disfunción sexual, dolor, y disfunción renal.

En otra realización, la invención comprende procedimientos para tratar una afección en un sujeto mediante la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz del ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, uno o más agentes terapéuticos adicionales, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las afecciones que se pueden tratar de acuerdo con la presente invención incluyen afecciones cardiovasculares, afecciones metabólicas, afecciones del sistema nervioso central, afecciones pulmonares, disfunción sexual, dolor, y

disfunción renal.

En otra realización, la invención comprende el uso del ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo ,
5 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección en un sujeto. Tales afecciones incluyen afecciones cardiovasculares, afecciones metabólicas, afecciones del sistema nervioso central, afecciones pulmonares, disfunción sexual, dolor, y disfunción renal.

En otra realización, la invención comprende procedimientos para
10 fabricar el ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1. muestra un gráfico que ilustra el efecto sobre la presión
15 sanguínea de la administración oral repetida del ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico (1 mg/kg de dosis oral al día), solo y en combinación con enalapril, en un modelo de rata hipertensa consciente espontánea.

20 La figura 2 muestra un gráfico que ilustra el efecto sobre el cGMP urinario de 24 horas de la administración oral repetida del ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico (1 mg/kg de dosis oral al día), solo y en combinación con enalapril, en un modelo de rata hipertensa consciente espontánea.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta descripción detallada de realizaciones pretende solamente informar a

103

otros expertos en la técnica de las invenciones de los solicitantes, sus principios, y su aplicación práctica de manera que otros expertos en la técnica puedan adaptar y aplicar las invenciones en sus numerosas formas, como se puedan adaptar mejor a los requerimientos de un uso particular. Por lo tanto, estas invenciones, no se limitan a las realizaciones descritas en esta memoria descriptiva, y se pueden modificar de diversas maneras.

A. Abreviaturas y definiciones

Como se usa en referencia a ^1H RMN, el símbolo " δ " se refiere al desplazamiento químico de ^1H RMN.

10 Como se usa en referencia a ^1H RMN, la abreviatura "br" se refiere a una señal de ^1H RMN ancha.

Como se usa en referencia a ^1H RMN, la abreviatura "d" se refiere a un pico de ^1H RMN doblete.

15 Como se usa en referencia a ^1H RMN, la abreviatura "m" se refiere a un pico de ^1H RMN multiplete.

Como se usa en referencia a ^1H RMN, la abreviatura "c" se refiere a un pico de ^1H RMN cuartete.

Como se usa en referencia a ^1H RMN, la abreviatura "s" se refiere a un pico de ^1H RMN singlete.

20 Como se usa en referencia a ^1H RMN, la abreviatura "t" se refiere a un pico de ^1H RMN triplete.

La abreviatura "BSA" se refiere a albúmina sérica bovina.

La abreviatura "CDI" se refiere a carbodiimida.

La abreviatura "DMSO" se refiere a dimetilsulfóxido.

25 La abreviatura "DBAD" se refiere a dibencilazodicarboxilato.

La abreviatura "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminatetraacético.

La abreviatura "HEPES" se refiere a ácido 4-(2-hidroxietil)-1-

104

piperazinaetanosulfónico.

La abreviatura "EMAR" se refiere a espectroscopía de masas de alta resolución (barrido positivo de ionización por electropulverización).

La abreviatura "iPrOAc" se refiere a acetato de isopropilo.

5 La abreviatura "CLEM" se refiere a espectroscopía de masas acoplado a cromatografía líquida.

La abreviatura "m/z" se refiere a pico de espectro de masas.

La abreviatura "NaN(TMS)₂" se refiere a hexametildisilazida de sodio.

La abreviatura "ufp" se refiere a unidades formadoras de placas.

10 La abreviatura "Pt/C" se refiere a platino sobre carbono.

La abreviatura "PMSF" se refiere a fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

La abreviatura "SPA" se refiere a ensayo de proximidad de centelleo.

La abreviatura "THF" se refiere a tetrahidrofurano.

La abreviatura "Tris-HCl" se refiere a clorhidrato de
15 Tris(hidroximetil)aminometano.

El término "afección mediada por c-GMP" se refiere a cualquier afección mediada por cGMP, o bien a través de regulación directa por cGMP, o a través de la regulación indirecta por cGMP como un componente de una ruta de señalización.

20 El término "afección mediada por la PDE-5" se refiere a cualquier afección mediada por la enzima PDE5.

El término "sujeto hipertenso" se refiere a un sujeto que tiene hipertensión, que padece los efectos de hipertensión o es susceptible a una afección hipertensa si no se trata para prevenir o controlar tal hipertensión.

25 El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un vehículo que es compatible con los otros ingredientes de la composición y no es perjudicial al sujeto. Tales vehículos pueden ser un material, composición o

109

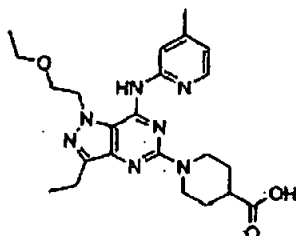
vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulador líquido o sólido, implicado en el porte o transporte de un agente químico. La composición preferida depende del procedimiento de administración.

- 5 El término "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de fármaco o agente farmacéutico que provocará la respuesta biológica médica de un tejido, sistema o animal que se está buscando por un investigador o clínico.

- El término "tratamiento" (y los términos correspondientes "tratar" y "tratando") incluye tratamiento paliativo, restaurador, y preventivo de un sujeto. El término "tratamiento paliativo" se refiere al tratamiento que calma o reduce el efecto o intensidad de una afección en un sujeto sin curar la afección. El término "tratamiento preventivo" (y el término correspondiente "tratamiento profiláctico" se refiere a o bien prevenir la aparición de una afección
- 15 preclínicamente evidente en conjunto o prevenir la aparición de una fase preclínicamente evidente de una afección en un sujeto. El término "tratamiento restaurador" se refiere al tratamiento que detiene la progresión de, reduce las manifestaciones patológicas de, o elimina completamente una afección en un sujeto.

20 **B. Compuesto de carboxipiperidina**

En una realización, la presente invención comprende el compuesto que tiene la estructura:



y las sales (particularmente las sales farmacéuticamente aceptables) del compuesto. El nombre correspondiente de este compuesto es el ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico. Salvo que se establezca otra cosa, este compuesto,

5 todas las formas tautómeras del compuesto, y las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto y sus formas tautómeras se refieren de forma colectiva en esta solicitud como el "compuesto de carboxipiperidina". El compuesto de carboxipiperidina es útil, por ejemplo, como un inhibidor de la enzima PDE5.

10 En una realización, la presente invención se refiere a la forma de ácido libre del compuesto de carboxipiperidina.

En otra realización, la presente invención se refiere a las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de carboxipiperidina.

El documento WO 2004096810 reseña un género de compuestos que

15 abarca genéricamente el compuesto de carboxipiperidina. Aunque el documento WO 2004096810 proporciona ejemplos de compuestos específicos dentro del género, no describe el propio compuesto de carboxipiperidina. Sin embargo, el compuesto de carboxipiperidina, posee al menos una o más propiedades diferentes con relación a los compuestos

20 específicos descritos en el documento WO 2004096810. Estas propiedades incluyen, por ejemplo, las propiedades de eficacia (por ejemplo, mayor potencia *in vitro*, *ex vivo*, y/o *in vivo*), de seguridad (por ejemplo, mayor selectividad y/o menor toxicidad), farmacocinética (por ejemplo., $C_{\text{máx}}$, semivida más larga y/o menor eliminación), y propiedades de fabricación (por

25 ejemplo, facilidad de síntesis y/o disponibilidad de materiales de partida).

C. Sales

Como se ha indicado anteriormente, el compuesto de carboxipiperidina

puede estar o bien en la forma de ácido libre o en forma de una sal. Las formas de sales diferentes del compuesto de carboxipiperidina pueden tener diferentes propiedades físicas relativas entre sí. De acuerdo con lo anterior, la selección de la forma de sal específica del compuesto de carboxipiperidina

5 potencialmente puede tener impacto sobre, por ejemplo, la estabilidad del compuesto (tal como sobre un intervalo de temperaturas y/o humedades), la solubilidad del compuesto, y otras propiedades físicas del compuesto que pueden afectar al producto fármaco. Además, las sales del compuesto de carboxipiperidina en general tendrán mayor solubilidad acuosa que la forma

10 de ácido libre correspondiente.

Cuando la sal del compuesto de carboxipiperidina se administra a un ser humano o sujeto animal (en oposición a, por ejemplo, uso para ensayo *in vitro*), la sal preferiblemente es una sal farmacéuticamente aceptable. El término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que

15 generalmente se considera adecuada para consumo humano (particularmente una sal no tóxica). Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de base y sales de adición de ácido del ácido libre correspondiente. Estas sales típicamente se pueden preparar mediante medios convencionales a partir del ácido libre del compuesto de carboxipiperidina.

20 Las sales de adición de base ilustrativas del compuesto de carboxipiperidina incluyen las sales metálicas y las sales orgánicas. Las sales metálicas incluyen sales de metal alcalino (grupo Ia) (tales como sales de litio, sodio y potasio), sales de metal alcalino térreo (grupo IIa) (tales como sales de calcio y magnesio), y otras sales de metales fisiológicamente aceptables (tales

25 como sales de aluminio y de cinc). Las sales orgánicas incluyen las sales hechas a partir de aminas secundarias, terciarias y cuaternarias (tales como trometamina, dietilamina, trietilamina, etanolamina, dietanolamina,

108

trietanolamina, etilendiamina, N,N'-dibenciletilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), procaína, cloroprocaína, y colina) y las sales preparadas a partir de aminoácidos catiónicos (tales como arginina, lisina e histidina).

Los ejemplos de las sales de adición de ácido adecuadas incluyen,

5 clorhidrato, bromhidrato, fluorhidrato, yodhidrato, borato, fluoroborato, fosfato, fosfato ácido, fosfato diácido, glicerofosfato, hexafluorofosfato, metafosfato, nitrato, bicarbonato, carbonato, bisulfato, sulfato, dodecilsulfato, sulfonato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, toluenosulfonato, trifluorometanosulfonato, toluenosulfonato, 2-hidroxietanosulfonat ,

10 ciclohexilaminosulfonato, 2-naftalenosulfonato, alcanforsulfonato, acetato, adipato, antranilato, aspartato, ascorbato, algenato, trifluoroacetato, fenilacetato, benzoato, p-hidroxibenzoato, besilato, butirato, β -hidroxibutirato, alcanforato, camsilato, citrato, embonato, edisilato, esilato, formiato, fumarato, gluconato, digluconato, glicolato, glucamato, glucuronato, gluceptat ,

15 heptanoato, glicoheptanoato, hexanoato, hibenzato, isetionato, isotionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, nicotinato, orotato, oxalato, palmitato, pamoato, pantotenato, pectinato, picrato, pivalato, propionato, ciclopentanopropionato, 3-fenilpropionato, piruvato, sacarato, salicilato, estearato, succinato, sulfanilato, tartrato, galactarato, tosilato,

20 uronato, galacturonato, tiocianato, y undecanoato.

Para una revisión sobre sales adecuadas, véase "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" por Stahl y Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, 2002).

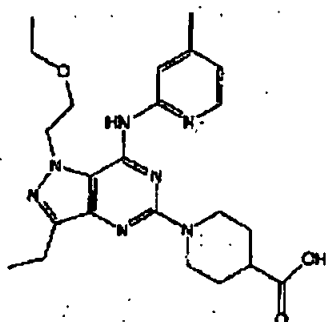
25 D. Tautómeros

Como se usa en esta solicitud, el término compuesto de carboxipiperidina (así como la estructura correspondiente) pretende abarcar

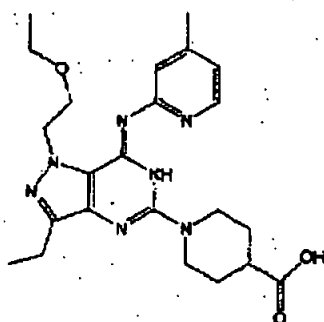
109

todos los isómeros tautómeros del ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico. Los isómeros tautómeros representativos del compuesto de carboxipiperidina se muestran más adelante:

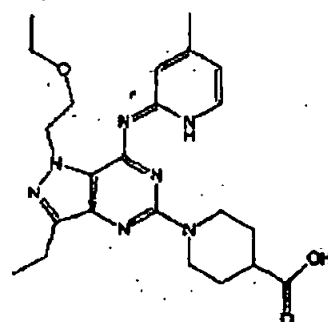
5



Tautómero (1)



Tautómero (2)



Tautómero (3)

E. Procedimientos de tratamiento

10 La presente invención comprende además procedimientos para tratar una afección en un sujeto que tiene o es susceptible de tener tal afección mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de carboxipiperidina. En una realización, el tratamiento es tratamiento preventivo. En otra realización, el tratamiento es tratamiento
15 paliativo. En todavía otra realización, el tratamiento es tratamiento restaurador.

En otra realización, la afección es una afección mediada por la PDE5.

En otra realización, la afección es una afección mediada por cGMP. Una afección en la que, por ejemplo, el cGMP insuficiente es un componente
20 principal, y cuya producción o acción se modula en respuesta a la enzima

10

PDE5, por lo tanto se consideraría un trastorno mediado por el cGMP.

En otra realización, la afección se selecciona del grupo constituido por afecciones cardiovasculares, afecciones metabólicas, afecciones del sistema nervioso central, afecciones pulmonares, disfunción sexual, dolor, y disfunción renal.

En otra realización, la afección es una afección cardiovascular seleccionada entre el grupo constituido por hipertensión (incluyendo hipertensión esencial, hipertensión pulmonar, hipertensión arterial pulmonar, hipertensión secundaria, hipertensión sistólica aislada, hipertensión asociada a diabetes, hipertensión asociada a aterosclerosis, e hipertensión renovascular); complicaciones asociadas a hipertensión (incluyendo daño de los órganos vasculares, insuficiencia cardíaca congestiva, angina, accidente cerebrovascular, glaucoma y alteración de la función renal); insuficiencia valvular; angina estable, inestable y variante (Prinzmetal); enfermedad vascular periférica; infarto de miocardio; accidente cerebrovascular (incluyendo recuperación de accidente cerebrovascular); enfermedad tromboembólica; reestenosis; arterioesclerosis; aterosclerosis; angioestenosis después de derivación; angioplastia (incluyendo angioplastia transluminal percutánea y angioplastia coronaria transluminal percutánea); hiperlipidemia; vasoconstricción hipóxica; vasculitis (incluyendo síndrome de Kawasaki); insuficiencia cardíaca (incluyendo insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca descompensada, insuficiencia cardíaca sistólica, insuficiencia cardíaca diastólica, insuficiencia cardíaca del ventrículo izquierdo, insuficiencia cardíaca del ventrículo derecho, e hipertrofia del ventrículo izquierdo); fenómeno de Raynaud; preeclampsia; presión sanguínea alta inducida por el embarazo; cardiomiopatía; y trastornos oclusivos arteriales.

En otra realización, la afección es hipertensión.

En otra realización, la afección es hipertensión pulmonar.

En otra realización, la afección es hipertensión arterial pulmonar.

En otra realización, la afección es insuficiencia cardíaca.

5 En otra realización, la afección es insuficiencia cardíaca diastólica.

En otra realización, la afección es insuficiencia cardíaca sistólica.

En otra realización, la afección es angina.

En otra realización, la afección es trombosis.

En otra realización, la afección es accidente cerebrovascular
10 (incluyendo recuperación de accidente cerebrovascular).

En otra realización, la afección es una afección asociada a disfunción
endotelial (incluyendo afecciones seleccionadas entre el grupo constituido por
lesiones ateroscleróticas, isquemia miocárdica, isquemia periférica,
insuficiencia valvular, hipertensión arterial pulmonar, angina, coágulos,
15 complicaciones vasculares después de derivación vascular, dilatación
vascular, reperfusión vascular, y trasplante cardíaco).

En otra realización, la afección es una afección metabólica
seleccionada entre el grupo constituido por Síndrome X; diabetes (incluyendo
diabetes de tipo I y tipo II); resistencia a la insulina; síndromes de resistencia a
20 insulina (incluyendo trastornos de receptor de insulina, síndrome de Rabson-
Mendenhall, leprechaunismo, síndrome de Kobberling-Dunnigan, síndrome de
Seip, síndrome de Lawrence, síndrome de Cushing, acromegalia,
feocromocitoma, glucagonoma, aldosteronismo primario, somatostatina,
diabetes lipoatrófica, diabetes inducida por toxinas de células β , enfermedad
25 de Grave, tiroiditis de Hashimoto y enfermedad de Addison idiopática);
alteración de la tolerancia a glucosa; complicaciones diabéticas (incluyendo
gangrena diabética, artropatía diabética, nefropatía diabética,

112

glomeruloesclerosis diabética, dermatopatía diabética, neuropatía diabética, neuropatía diabética periférica, catarata diabética, y retinopatía diabética); hiperglucemia y obesidad.

En otra realización, la afección es resistencia a insulina.

5 En otra realización, la afección es nefropatía.

En otra realización, la afección es una afección del sistema nervioso central seleccionada entre el grupo constituido por demencia vascular; trauma craneoencefálico; infarto cerebral; accidente cerebrovascular, demencia; trastornos de concentración; enfermedad de Alzheimer; enfermedad de
10 Parkinson; esclerosis amiot lateral; enfermedad de Huntington; esclerosis múltiple; enfermedad de Creutzfeld-Jacob; ansiedad; depresión; trastorno del sueño; y migraña.

En otra realización, la afección es enfermedad de Alzheimer.

En otra realización, la afección es enfermedad de Parkinson.

15 En otra realización, la afección es esclerosis amiot lateral.

En otra realización, la afección es un trastorno de concentración.

En otra realización, la afección es una afección pulmonar seleccionada entre el grupo constituido por asma; insuficiencia respiratoria aguda; fibrosis
cística; enfermedad pulmonar obstructiva crónica; bronquitis; y obstrucción
20 pulmonar reversible crónica.

En otra realización, la afección es dolor. En otra realización, la afección es dolor agudo. Los ejemplos de dolor agudo incluyen dolor agudo asociado a lesión o cirugía. En otra realización, la afección es dolor crónico. Los ejemplos de dolor crónico incluyen dolor neuropático (incluyendo neuralgia
25 postherpética y dolor asociado a neuropatía periférica, de cáncer o diabética), síndrome de túnel carpiano, dolor de espalda (incluyendo dolor asociado a discos intervertebrales herniados o rotos o anomalías de las articulaciones

de las facetas lumbares, articulaciones sacroilíacas, músculos paraespinales el ligamento longitudinal posterior), cefalea, dolor de cáncer (incluyendo dolor relacionado con tumor tal como dolor óseo, cefalea, dolor facial o dolor visceral) o dolor asociado a terapia de cáncer (incluyendo síndrome después de la quimioterapia, síndrome de dolor postquirúrgico crónico, síndrome después de radiación, dolor asociado a inmunoterapia, o dolor asociado a terapia hormonal), dolor artrítico (incluyendo dolor de osteoartritis y dolor de artritis reumatoide), dolor postquirúrgico crónico, neuralgia postherpética, neuralgia trigeminal, neuropatía de VIH, dolor del miembro fantasma, dolor después de accidente cerebrovascular central y dolor asociado a alcoholismo crónico, hipotiroidismo, uremia, esclerosis múltiple, dolor de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, epilepsia y deficiencia de vitaminas. En otra realización, la afección es dolor nociceptivo (incluyendo dolor de trauma del sistema nervioso central, distensiones/esguinces, quemaduras, infarto de miocardio y pancreatitis aguda, dolor post-operativo (dolor después de cualquier tipo de procedimiento quirúrgico), dolor post-traumático, cólico renal, dolor de cáncer y dolor de espalda). En otra realización, la afección es dolor asociado a inflamación (incluyendo dolor artrítico (tal como dolor por osteoartritis y dolor de enfermedad reumática), espondilitis anquilosante, dolor visceral (incluyendo enfermedad inflamatoria del intestino, trastorno del intestino funcional, reflujo gastroesofágico, dispepsia, síndrome del intestino irritable, síndrome de dolor abdominal funcional, enfermedad de Crohn, ileitis, colitis ulcerosa, dismenorrea, cistitis, pancreatitis y dolor pélvico). En otra realización, la afección es dolor que se produce por trastornos músculo-esqueléticos (incluyendo mialgia, fibromialgia, espondilitis, artropatías sero-negativas (no reumatoides), reumatismo no articular, distrofinopatía, glicogenolisis, polimiositis y

7/21

piomiositis). En otra realización, la afección se selecciona entre el grupo constituido por dolor cardíaco y vascular (incluyendo dolor provocado por angina, infarto de miocardio, estenosis mitral, pericarditis, fenómeno de Raynaud, esclerodoma e isquemia del músculo esquelético). En otra realización, la afección se selecciona entre el grupo constituido por dolor de cabeza (incluyendo migraña tal como migraña con aura y migraña sin aura), migraña en racimo, migraña de tipo tensión mezclada con migraña y migraña asociada a trastornos vasculares; dolor orofacial, incluyendo dolor dental, dolor ótico, síndrome de la boca ardiente y dolor miofacial temporomandibular).

En otra realización, la afección es disfunción sexual (incluyendo disfunción sexual seleccionada entre el grupo constituido por impotencia (orgánica o psíquica); disfunción eréctil masculina; disfunción del clítoris; disfunción sexual después de lesión de la médula espinal; trastorno de excitación sexual femenina; disfunción orgásmica sexual femenina; trastorno de dolor sexual femenino; y trastorno del deseo sexual hipoactivo femenino).

En otra realización, la afección es disfunción eréctil masculina.

En otra realización, la afección es disfunción renal (incluyendo disfunción renal seleccionada entre el grupo constituido por insuficiencia renal aguda, insuficiencia renal crónica; nefropatía (tal como nefropatía diabética); trastornos túbulo intersticial; glomerulopatía; y nefritis. En otra realización, la afección es una afección de cáncer seleccionada entre el grupo constituido por caquexia cancerosa; metástasis de tumores y neoplasia.

En otra realización, la afección es osteoporosis.

En otra realización, la afección es una afección gastrointestinal seleccionada entre el grupo constituido por esófago en cascanueces; fisura anal; trastornos de la motilidad del intestino; síndrome del intestino irritable y

115

hemorroides. En otra realización, la afección es una afección urológica seleccionada entre el grupo constituido por obstrucción de la salida de la vejiga; incontinencia e hiperplasia prostática benigna.

5 En otra realización, la afección es una afección de piel, seleccionada entre psoriasis, urticaria y necrosis de la piel.

En otra realización, la afección es una afección oftálmica seleccionada entre enfermedad retinal; degeneración macular y glaucoma.

En otra realización, la afección es intolerancia a nitratos.

En otra realización, la afección es calvicie.

10 En otra realización, la afección es una afección ginecológica seleccionada entre el grupo constituido por dismenorrea (primaria y secundaria); infertilidad y parto prematuro. En otra realización, la afección es dismenorrea secundaria.

15 En otra realización, la presente invención comprende además procedimientos para inducir pérdida de peso o mantenimiento de pérdida de peso en un sujeto mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de carboxipiperidina.

F. Sujetos

20 El compuesto de carboxipiperidina (incluyendo los procedimientos de tratamiento correspondientes y las composiciones farmacéuticas) es adecuado para uso con, por ejemplo, sujetos mamíferos tales como seres humanos, otros primates (por ejemplo, monos, chimpancés), animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, caballos), animales de granja (por
25 ejemplo cabras, ovejas, cerdos, ganado vacuno), animales de laboratorio (por ejemplo, ratones, ratas), y animales salvajes y de zoológico (por ejemplo, lobos, osos, ciervo). En una realización, el sujeto es un sujeto mamífero. En

116

otra realización, el sujeto es un ser humano.

G. Mecanismo hipotético

Sin mantener ninguna teoría particular, se formula la hipótesis de que el compuesto de carboxipiperidina es un inhibidor de la enzima PDE5. Además se formula la hipótesis de que el compuesto de carboxipiperidina inhibe la acción de la enzima PDE5 que conduce a un incremento en los niveles de cGMP intracelular. Este incremento en los niveles de cGMP intracelular reduce la señalización de calcio intracelular, que a su vez da como resultado el relajamiento del músculo liso vascular y una reducción de la presión sanguínea.

H. Administración y dosificación

El compuesto de carboxipiperidina se administra en general en una cantidad terapéuticamente eficaz. En una realización, el compuesto de carboxipiperidina se administra en una cantidad inhibidora de la enzima PDE5. El compuesto de carboxipiperidina se puede administrar mediante cualquier vía adecuada en la forma de una composición farmacéutica adaptada a dicha vía, y en una dosis eficaz para el tratamiento propuesto. Las dosis terapéuticamente eficaces del compuesto de carboxipiperidina requeridas para prevenir o detener el progreso de, o para tratar la afección médica, las determinan fácilmente los expertos en la técnica usando planteamientos preclínicos y clínicos familiares en las técnicas medicinales.

El régimen de dosificación para los compuestos y/o composiciones que contienen los compuestos se basa en una diversidad de factores, incluyendo el tipo, edad, peso, sexo y afección médica del paciente; la gravedad de la afección; la vía de administración; y la actividad del compuesto particular

112

empleado. De este modo el régimen de dosificación puede variar basándose en la situación específica. Los niveles de dosificación entre aproximadamente 0,001 mg y aproximadamente 100 mg del compuesto de carboxipiperidina por kg de peso corporal al día son útiles en el tratamiento de las afecciones indicadas anteriormente. En una realización, la dosis diaria total del compuesto de carboxipiperidina (administrado en dosis individuales o divididas) está típicamente entre aproximadamente 0,001 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg (es decir, mg de compuesto/kg de peso corporal). En otra realización, la dosis diaria total del compuesto de carboxipiperidina está entre aproximadamente 0,005 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. En otra realización, la dosis diaria total está entre aproximadamente 0,005 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg. En otra realización, la dosis diaria total está entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg. Estas dosificaciones se basan en un sujeto humano medio que tiene un peso de aproximadamente 65 kg a aproximadamente 75 kg. Un médico será fácilmente capaz de determinar las dosis para sujetos cuyo peso cae fuera de este intervalo, tales como niños. La administración del compuesto de carboxipiperidina se puede repetir una pluralidad de veces en un día (típicamente no mayor que 4 veces) para lograr la dosis diaria deseada.

Por conveniencia el compuesto de carboxipiperidina se puede administrar en una forma de dosificación unitaria. Si se desea, se pueden usar múltiples dosis al día de la forma de dosificación unitaria para incrementar la dosis diaria total. La forma de dosificación unitaria, por ejemplo, puede ser un comprimido o cápsula que contiene aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 175, 200, 250 ó 500 mg del compuesto de carboxipiperidina. En una realización, la forma de dosificación unitaria contiene entre aproximadamente

9/18

0,01 mg y aproximadamente 500 mg del compuesto de carboxipiperidina. En otra realización, la forma de dosificación unitaria contiene entre aproximadamente 0,05 mg y aproximadamente 250 mg del compuesto de carboxipiperidina. En otra realización, la forma de dosificación unitaria
5 contiene entre aproximadamente 0,1 mg y aproximadamente 100 mg del compuesto de carboxipiperidina. En otra realización, la forma de dosificación unitaria contiene entre aproximadamente 0,5 mg y aproximadamente 50 mg del compuesto de carboxipiperidina.

I. Uso en la preparación de un medicamento

10 En otra realización, la presente invención comprende el compuesto de carboxipiperidina para uso como un medicamento (tal como un comprimido de dosificación unitaria o cápsula de dosificación unitaria).

La presente invención además comprende el uso del compuesto de carboxipiperidina para la fabricación de un medicamento (tal como un
15 comprimido de dosificación unitaria o cápsula de dosificación unitaria) para tratar una o más de las afecciones identificadas previamente en las secciones anteriores que describen los procedimientos de tratamiento. En una realización, la afección es hipertensión.

J. Composiciones farmacéuticas

20 Para el tratamiento de las afecciones mencionadas anteriormente, el compuesto de carboxipiperidina se puede administrar en forma del compuesto de ácido libre *per se*. En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede administrar en forma de una o más sales farmacéuticamente
25 aceptables del compuesto de ácido libre *per se*. En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede administrar en forma de una mezcla del compuesto de ácido libre *per se* y una o más sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de ácido libre *per se*.

119

La presente invención, además comprende composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto de carboxipiperidina. En una realización, la composición farmacéutica comprende el compuesto de carboxipiperidina en la forma de ácido libre. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una o más sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de carboxipiperidina. En otra realización, la composición farmacéutica comprende una mezcla del compuesto de carboxipiperidina en la forma de ácido libre y una o más sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de carboxipiperidina. En una realización, la composición farmacéutica comprende el compuesto de carboxipiperidina y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo puede ser un sólido, un líquido, o ambos, y se puede formular con el compuesto de carboxipiperidina en forma de una forma de dosificación unitaria, por ejemplo, un comprimido que puede contener entre 0,05% y 95% en peso del compuesto de carboxipiperidina. Otras sustancias farmacológicamente activas también pueden estar presentes.

El compuesto de carboxipiperidina se puede administrar mediante cualquier vía adecuada, preferiblemente en la forma de una composición farmacéutica adaptada a tal vía, y en una dosis eficaz para el tratamiento pretendido. El compuesto de carboxipiperidina y las composiciones correspondientes, por ejemplo, se pueden administrar por vía oral, rectal, parenteral, o tópica.

La administración oral de una forma de dosificación sólida se puede, por ejemplo, presentar en unidades discretas, tales como cápsulas duras o blandas, píldoras, sellos, pastillas, o comprimidos, conteniendo cada una cantidad predeterminada de al menos un compuesto de la presente invención. En otra realización, la administración oral, puede estar en una forma de polvo

o gránulo. En otra realización, la forma de dosificación oral es sublingual, tal como, por ejemplo, una pastilla. En tales formas de dosificación sólidas, el compuesto de carboxipiperidina se combina ordinariamente con uno o más adyuvantes. En el caso de las cápsulas, comprimidos, y píldoras, las formas de dosificación también pueden comprender agentes de tamponación o se pueden preparar con revestimientos entéricos.

En otra realización, la administración oral puede estar en una forma de dosis líquida. Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen, por ejemplo, emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes, y elixires farmacéuticamente aceptables que contienen diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica (por ejemplo, agua). Tales composiciones también pueden comprender adyuvantes, tales como agentes humectantes, emulsionantes, de suspensión, aromatizantes (por ejemplo, edulcorantes), y / o agentes perfumantes.

En otra realización, la presente invención comprende una forma de dosificación parenteral. La "administración parenteral" incluye, por ejemplo, inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, intraperitonealmente, inyecciones intrasternales e infusión. Las preparaciones inyectables (por ejemplo, suspensiones acuosas u oleaginosas inyectables estériles) se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida usando agentes de dispersión, humectantes, y/o de suspensión adecuados.

En otra realización, la presente invención comprende una forma de dosificación tópica. La "administración tópica" incluye, por ejemplo, la administración transdérmica, tal como mediante parches transdérmicos o dispositivos de iontoforesis, administración intraocular, o administración intranasal o inhalación. Las composiciones para la administración tópica

Pennsylvania, 1975; Liberman, y col., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y., 1980; y Kibbe, y col., Eds, Handbook of Pharmaceutical Excipients (3ª edición), American Pharmaceutical Association, Washington, 1999.

5 K. Combinaciones y terapia de combinación

El compuesto de carboxipiperidina también se puede administrar en combinación con otros agentes terapéuticos para tratar las diversas afecciones descritas previamente antes. El compuesto de carboxipiperidina y el (los) otro (s) agente (s) terapéutico (s) se pueden administrar de manera
10 simultánea (o bien en la misma forma de dosificación o en formas de dosificación separadas) o secuencialmente. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la presente invención comprende procedimientos para tratar una afección en un sujeto que tiene o es susceptible de tener tal afección mediante la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz
15 del compuesto de carboxipiperidina y uno o más agentes terapéuticos adicionales. En otra realización, la presente invención comprende una composición farmacéutica que comprende el compuesto de carboxipiperidina, uno o más agentes terapéuticos adicionales, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 En una realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede administrar con aspirina.

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede co-administrar con uno o más diuréticos. Los ejemplos de diuréticos adecuados incluyen hidroclorotiazida (tales como MICROZIDE TM y ORETIC TM),
25 hidroflumetiazida (tal como SALURON TM), bemetanide (tal como BUMEX TM), torsemide (tal como DEMADEX TM), metolazona (tal como ZAROXOLYN TM), clorotiazida (tal como DIURIL TM, ESIDRIX TM e HYDRODIURIL TM),

123

triamtereno (tal como DYRENIUM TM), ácido etacrínico (tal como EDEGRIN TM), clortalidona (tal como HYGROTON TM), furosemida (tal como LASIX TM), indapamida (tal como LOZOL TM), y amilorida (tal como MIDAMOR TM y MODURETIC TM).

5 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina. Los ejemplos de inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina incluyen quinapril (tal como ACCUPRIL TM), perindopril (tal como ACEON TM), captopril (tal como CAPOTEN TM), enalapril (tal como VASOTEC TM), ENALAPRILAT TM, ramipril (tal como ALTACE TM), cilazapril, delapril, fosenopril (tal como MONOPRIL TM), zofenopril, indolapril, benazepril (tal como LOTENSIN TM), lisinopril (tal como PRINIVIL TM y ZESTRIL TM),
10 espirapril, trandolapril (tal como MAVIK TM), perindep, pentopril, moexipril (tal como UNIVASC TM), fasidotril, S-alilmercaptocaptopril, y pivopril.

15 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más bloqueadores del receptor de angiotensina II. Los ejemplos de bloqueadores del receptor de angiotensina II incluyen candesartan (tal como ATACAND TM), eprosartan (tal como TEVETEN TM), ibesartan (tal como AVEPRO TM), iosartan (tal como COZAAR TM), olmesartan, olmesartan medoxomil (tal como BENICAR TM), tasosartan, telmisartan (tal como MICARDIS TM), valsartan (tal como DIOVAN TM), zolasartan, FI-6828K, RNH-6270, UR-7198, Way-126227, KRH-594, TAK-536, BRA-657, y TA-606.

En otra realización el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más bloqueadores de los canales de calcio. Los
25 ejemplos de los bloqueadores de los canales de calcio adecuados incluyen nifedipina (tal como ADALAT TM, ADALAT CC TM y PROCARDIA TM, verapamil (tal como CALAN TM, COVERA-HS TM, ISOPTIN SR TM y VERELAN TM)

12/11

diltiazem (tal como CARDIZEM TM, CARDIZEM CD TM, CARDIZEM LA TM, CARDIZEM SR TM, DILACOR TM, TIAMATE TM Y TIAZAC TM), isradipina (tal como DYNACIRC TM y DYNACIRC CR TM), amlodipina (tal como NORVASC TM, felodipina (tal como PLENDIL TM), nisoldipina (tal como SULAR TM),
5 bepridil (tal como VASCOR TM), vatanidipina, clevidipina, lercanidipina, diltiazem, y NNC-55-0396.

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede co-administrar con uno o más bloqueadores beta. Los ejemplos de bloqueadores beta adecuados incluyen timolol (tal como BLOCARDEN TM), carteolol (tal como CARTROL TM), carvedilol (tal como COREG TM), nadólol (tal como CORGARD TM), propranolol (tal como INNOPRAN XL TM), betaxolol (tal como KERLONE TM), penbutolol (tal como LEVATOL TM), metoprolol (tal como LOPRESSOR TM y TOPROL-XL TM), atenolol (tal como TENORMIN TM), pindolol (tal como VISKEN TM), y bisoprolol.

15 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede co-administrar con uno o más bloqueadores alfa. Los ejemplos de bloqueadores alfa adecuados incluyen prazosina, doxazosina (tal como CARDURA TM), fenoxibenzamina (tal como DIBENZYLINE TM), terazosin (tal como HYTRIN TM), CDRI-93/478 y CR-2991.

20 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede co-administrar con uno o más bloqueadores alfa - beta. Un ejemplo de un bloqueador alfa - beta adecuado es labetalol (tales como NORMODYNE TM o TRANDATE TM).

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede
25 coadministrar con uno o más antagonistas de los receptores de aldosterona. Los ejemplos de antagonistas de receptores de aldosterona adecuados incluyen eplerenona (tal como INSPRA TM) y espironolactona (tal como

ALDACTONE TM).

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más inhibidores de renina. Los ejemplos de inhibidores de renina adecuados incluyen aliskiren (SPP 100), SPP-500/600 e

5 YS-004-39.

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más antiadrenérgicos centrales. Los ejemplos de antiadrenérgicos centrales adecuados incluyen metildopa (tal como ALDOMET TM), clonidina (tal como CATAPRES TM o CATAPRES-TTS TM),

10 guanfacina (tal como TENEX TM), y guanabenz (tal como WYTENSIN TM).

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más glicósidos / agentes inotrópicos. Un ejemplo de un glicósido / agente inotrópico adecuado es digoxin (tal como LANOXIN TM).

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más péptidos natriuréticos de tipo B humanos. Un

15 ejemplo de un péptido natriurético de tipo B humano es nesiritida (tal como NATRECOR TM).

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más nitratos orgánicos o donantes de óxido nítrico.

20 "Donante de óxido nítrico" se refiere a un compuesto que dona, libera y/o directa o indirectamente transfiere una especie de monóxido de nitrógeno, y/o estimulan la producción endógena de óxido nítrico o del factor relajante derivado de endotelio (EDRF) *in vivo* y/o elevan los niveles endógenos de óxido nítrico o EDRF *in vivo*. También incluye los compuestos que son

25 sustratos para la óxido nítrico sintasa. Los ejemplos de donantes de óxido nítrico adecuados incluyen S-nitrosotioles, nitritos, nitratos, N-oxo-N-nitrosaminas, SPM 3672, SPM 5185, SPM 5186 y análogos de los mismos,

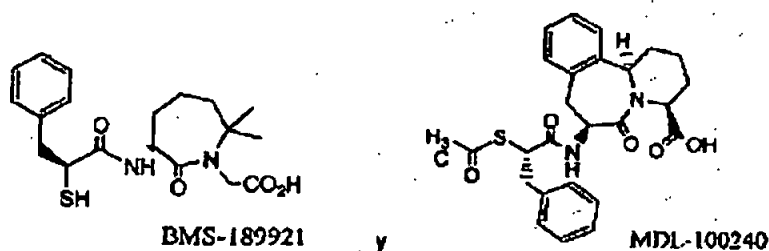
76

nitroprusido de sodio, nitroglicerina, dinitrato de isosórbido, mononitrato d isosórbido, molsidomina, SIN-1 y sustratos de las diversas isoenzimas de la óxido nítrico sintasa.

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede
5 coadministrar con uno o más agonistas de bradiquinina.

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más activadores de la guanilato ciclasa solubles. Un ejemplo de un activador de la guanilato ciclasa soluble adecuado es BAY-41-8543.

10 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más inhibidores de la endopeptidasa neutra. Los ejemplos de inhibidores de la endopeptidasa neutra adecuados incluyen omapatrilat, fasidotril, mixanpril, sampatrilat, Z13752A,



15

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más antagonistas endoteliales. Los ejemplos de antagonistas endoteliales adecuados incluyen ambrisentan, darusentan, J-104132, SPP-301, TBC-3711, YM-62899, YM-91746 y BMS-193884.
20

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa. Los ejemplos de inhibidores de la 3-hidroxi-3-

metilglutaril coenzima A reductasa adecuados incluyen fluvastatina (tales como LESCOL TM), atorvastatina (tal como LIPITOR TM), lovastatina (tal como ALTOCOR TM, o MEVACOR TM), pravastatina (tal como PRAVACHOL TM), rosuvastatina (tal como CRESTOR TM), y simvastatina (tal como ZOCOR TM).

5 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con niacina o uno o más derivados de ácido nicotínico. Los ejemplos de niacina o derivados del ácido nicotínico adecuados incluyen NIACOR TM, NIASPAN TM, NICOLAR TM, y SLO-NIACIN TM.

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede
10 coadministrar con uno o más derivados de ácido fibríco. Los ejemplos de derivados de ácido fibríco adecuados incluyen clofibrato (tal como ATROMID-S TM), gemfibrozil (tal como LOPID TM), y fenofibrato (tal como TRICOR TM).

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más secuestrantes de ácidos biliares. Los ejemplos
15 de secuestrantes de ácidos biliares adecuados incluyen colestipol (tal como COLESTID TM), colestiramina (tal como LOCHOLEST TM, PREVALITE TM, QUESTRAN TM, y QUESTRAN LIGHT TM), colesevelam (tal como WELCHOL TM).

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede
20 coadministrar con uno o más inhibidores de absorción de colesterol. Un ejemplo de un inhibidor de la absorción de colesterol adecuado es ezetimibe (tal como ZETIA TM).

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más inhibidores de la proteína de transporte del
25 colesteril éster. Un ejemplo de un inhibidor de la proteína de transporte del colesteril éster adecuado es torcetrapib.

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se pu de

coadministrar con uno o más inhibidores de cotransportador de ácido biliar dependiente de sodio apical. Los ejemplos de inhibidores de cotransportador de ácido biliar dependiente de sodio apical incluyen SD- 5613, AZD7806 y 264W94.

5 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más inhibidores de la alfa glucosidasa. Los ejemplos de inhibidores de la alfa glucosidasa adecuados incluyen miglitol (tal como GLYSET TM) y acarbosa (tal como PRECOSE TM).

10 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con una o más biguanidas. Los ejemplos de biguanidas adecuados incluyen rosiglitazona (tal como AVANDAMET TM) y metformin (tal como GLUCOPHAGE TM y GLUCOPHAGE XR TM).

15 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con una o más insulinas. Los ejemplos de insulinas adecuadas incluyen HUMALOG TM, HUMALOG 50/50 TM, HUMALOG 75/25 TM, HUMULIN 50/50 TM, HUMALIN 75/25 TM, HUMALIN L TM, HUMALIN N TM, HUMALIN R TM, HUMALIN R U-500 TM, HUMALIN U TM, ILETIN II LENTE TM, ILETIN II NPH TM, ILETIN II REGULAR TM, LANTUS TM, NOVOLIN 70/30 TM, NOVILIN N TM, NOVILIN R TM, NOVOLOG TM, VELOSULIN BR TM, y EXUBERA TM.

20 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con una o más meglitinidas. Los ejemplos de meglitinidas adecuados incluyen repaglinida (tal como PRANDIN TM) y nateglinida (tal como STARLIX TM).

25 En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con una o más sulfonilureas. Los ejemplos de sulfonilureas adecuados incluyen glimepirida (tal como AMARYL TM), gliburida (tal como DIABETA TM, GLYNASE PRESTAB TM o MICRONASE TM), y glipizida (tal

129

como GLUCOTROL TM y GLUCOTROL XL TM).

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con una o más tiazolidindionas. Los ejemplos de tiazolidindionas adecuadas incluyen pioglitazona (tal como ACTOS TM) y rosiglitazona (tal como AVANDIA TM).

En otra realización, el compuesto de carboxipiperidina se puede coadministrar con uno o más ligandos alfa-2-delta. Los ejemplos de ligandos alfa-2-delta adecuados incluyen gabapentina, pregabalina (tal como LYRICA TM), ácido [(1R,5R,6S)-6-(aminometil)biciclo[3.2.0]hept-6-il]acético, 3-(1-aminometil-ciclohexilmetil)-4H-[1,2,4]oxadiazol-5-ona, C-[1-(1H-tetrazol-5-ilmetil)-cicloheptil]metilamina, ácido (3S,4S)-(1-aminometil-3,4-dimetilciclopentil)-acético, ácido (1 α , 3 α ,5 α)-(3-aminometil-biciclo[3.2.0]hept-3-il)-acético, ácido (3S,5R)-3-aminometil-5-metil-octanoico, ácido (3S,5R)-3-amino-5-metil-heptanoico, ácido (3S,5R)-3-amino-5-metil-nonanoico y ácido (3S,5R)-3-amino-5-metil-octanoico, (2S,4S)-4-(3-clorofenoxi)pralina, y (2S,4S)-4-(3-fluorobencil)pralina.

L. Kits

La presente invención comprende además kits que son adecuados para uso en la realización de los procedimientos de tratamiento descritos anteriormente. En una realización, el kit comprende una primera forma de dosificación que comprende el compuesto de carboxipiperidina y un recipiente para la primera forma de dosificación. En otra realización, el kit comprende una primera forma de dosificación que comprende el compuesto de carboxipiperidina y una segunda forma de dosificación que comprende un segundo agente terapéutico.

En otra realización, el kit comprende una primera forma de dosificación que comprende el compuesto de carboxipiperidina y una segunda forma de

130

dosificación que comprende un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina.

En otra realización, el kit comprende una primera forma de dosificación que comprende el compuesto de carboxipiperidina y una segunda forma de dosificación que comprende un antagonista del receptor de angiotensina II.

En otra realización, el kit comprende una primera forma de dosificación que comprende el compuesto de carboxipiperidina y una segunda forma de dosificación que comprende un antagonista de receptor de aldosterona.

En otra realización, el kit comprende una primera forma de dosificación que comprende el compuesto de carboxipiperidina y una segunda forma de dosificación que comprende un donante de óxido nítrico.

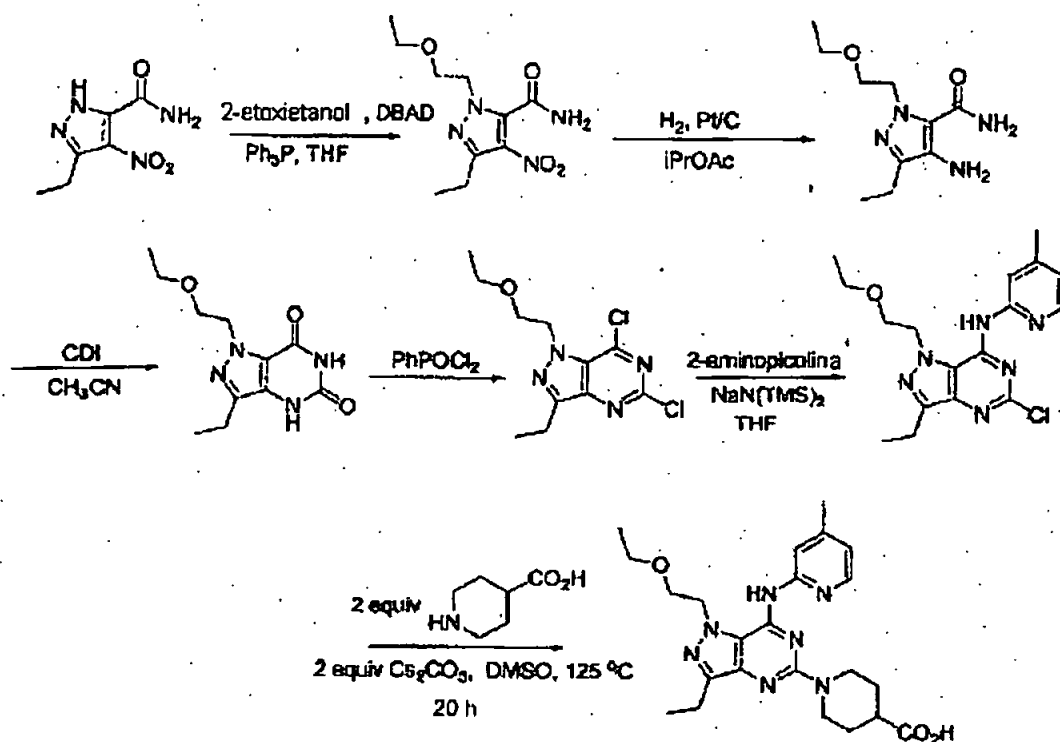
M. Síntesis de compuesto

El compuesto de carboxipiperidina se puede preparar usando los procedimientos ilustrados en los esquemas de síntesis y los procedimientos experimentales descritos a continuación. Los esquemas de síntesis generales se presentan para propósitos de ilustración y no se pretende que sean limitantes. Los materiales de partida usados para preparar el compuesto de carboxipiperidina están comercialmente disponibles o se pueden preparar mediante procedimientos de rutina bien conocidos por los expertos en la técnica (tales como los procedimientos descritos en libros de referencia convencionales tales como COMPENDIUM OF ORGANIC SYNTHETIC METHODS, Vol. I - VI (publicado por Wiley - Interscience)).

Esquema 1

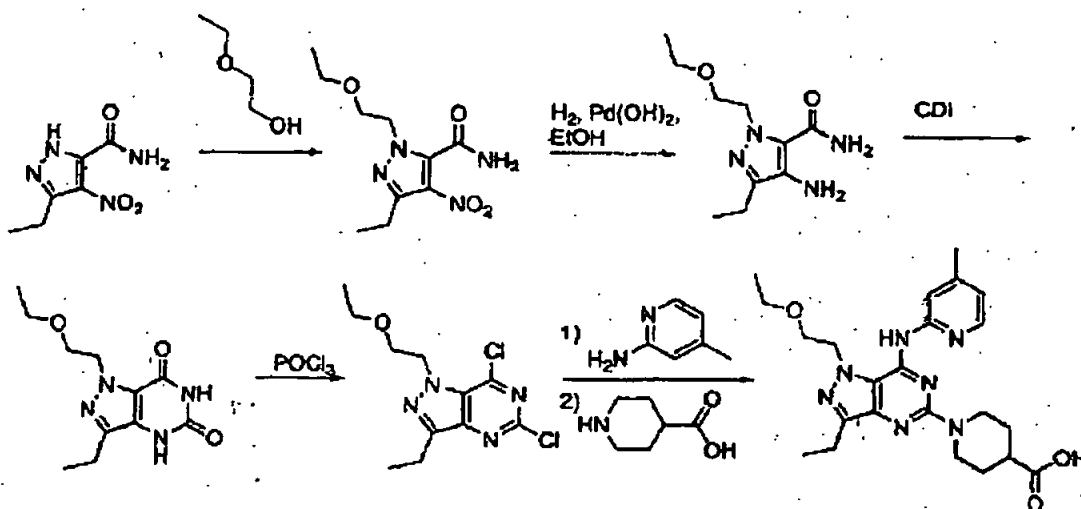
El esquema 1 esboza un procedimiento general para la preparación del ácido libre del compuesto de carboxipiperidina.

B1



Esquema 2

El esquema 2 esboza un procedimiento general alternativo para la preparación del ácido libre del compuesto de carboxipiperidina.

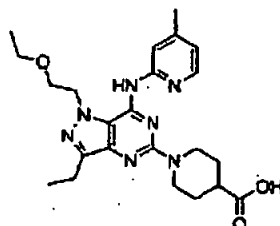


Los siguientes ejemplos ilustran la síntesis del ácido libre del

132

compuesto de carboxipiperidina:

EJEMPLO 1

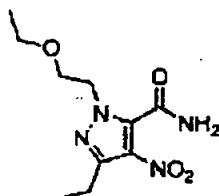


5

Ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico

Etapa 1: Preparación de 1-(2-etoxietil)-3-etil-4-nitro-1H-pirazolo-5-carboxamida

10

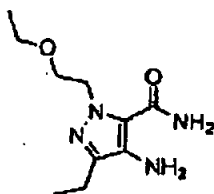


Se cargó un matraz de 1 l con 3-etil-4-nitropirazol-5-carboxamida (preparado como se describe en el documento EP 1176142 en la página 18) (15,0 g; 81 mmoles), trifenilfosfina (25,6 g; 97,8 mmoles), y tetrahidrofurano (120 ml). La mezcla resultante se enfrió colocando el matraz en un baño a 0°C y se añadió 2-etoxietanol (9,5 ml, 98 mmoles) al matraz. Una solución de azodicarboxilato de di-terc-butilo (22,5 g; 97,8 mmoles) en tetrahidrofurano (90 ml) se añadió después al matraz durante un periodo de 2,5 horas. La mezcla se agitó con enfriamiento durante una hora adicional y después se calentó hasta temperatura ambiente y se agitó durante una hora adicional. La mezcla

137

se enfrió de nuevo hasta 0°C, se trató con ácido clorhídrico 6 M (40 ml), y se calentó hasta 40°C durante una hora. La mezcla se concentró parcialmente y se extrajo entre acetato de etilo y agua. La fase acuosa se volvió a extraer con acetato de etilo. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con agua, se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se concentraron después. El aceite viscoso resultante se trató con 2-propanol y esta mezcla se concentró después. El material resultante se trató con 2-propanol y se calentó. Tras el enfriamiento, los cristales resultantes se filtraron, se enjuagaron con 2-propanol frío, y se secaron produciendo 16,5 g del compuesto del título.

Etapa 2: Preparación de 4-amino-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo-5-carboxamida

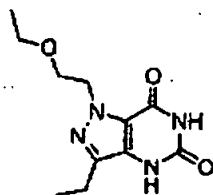


15

Se combinaron 1-(2-etoxietil)-3-etil-4-nitro-1H-pirazol-5-carboxamida de la etapa 1 (15,0 g, 58 mmoles), platino al 5% sobre carbono (0,75 g), y acetato de isopropilo (150 ml) y la mezcla se agitó bajo 80 psi (551,58 kPa) de hidrógeno durante aproximadamente 50 horas. Después la mezcla se filtró a través de celita, se enjuagó la celita con acetonitrilo, y el filtrado se concentró. El material finalmente cristalizó proporcionando 13,7 g en forma de un hidrato del compuesto del título.

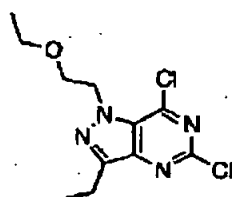
Etapa 3: 1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidina-5,7-(4H,6H)-diona

BH



Se calentó una mezcla de carbonildiimidazol (12,3 g, 76,1 mmoles) en
5 acetonitrilo (123 ml) hasta 50°C. La 4-amino-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo-5-
carboxamida preparada en la etapa 3 (13,2 g, 58 mmoles) se añadió a la
mezcla durante un período de una hora y la temperatura de la mezcla se
incrementó hasta 75°C durante la adición. Después la mezcla se enfrió y se
agitó durante toda una noche. La mezcla se enfrió en un baño de hielo y se
10 filtró. La torta del filtro se enjuagó con agua y se secó proporcionando 12,8 g
del compuesto del título.

Etapas 4: Preparación de 5,7-dicloro-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-
d]pirimidina

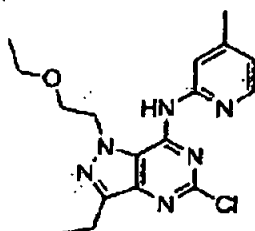


15

Se trató una mezcla de 1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidina-
5,7-(4H,6H)-diona de la etapa 3 (25,2 g, 100 mmoles) con PhPOCl₂ (195 g,
1000 mmoles) y se calentó, en N₂, con agitación a 135°C durante 20 horas. La
20 mezcla se enfrió y después se calentó a 140°C durante 20 horas adicionales.
La mezcla se enfrió y se añadió lentamente a una mezcla de hielo (600 g) /

agua (200 ml). Ésta se agitó durante 3 horas y el sólido resultante se recogió mediante filtración y se enjuagó con agua (2 x 100 ml). El sólido se suspendió con acetato de etilo (300 ml). Se añadió agua (200 ml) y se ajustó el pH a 1 - 2. Después se añadió NaHCO_3 al 10% (125 ml) (dando como resultado un pH de ~ 7) y se separaron las fases. La fase orgánica se lavó sucesivamente con agua (400 ml) y solución saturada de cloruro sódico (150 ml). Después se secó la solución orgánica, y se concentró proporcionando 23 g del compuesto del título.

10 Etapa 5: Preparación de N-[5-cloro-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-il]-4-metilpiridin-2-ilamina

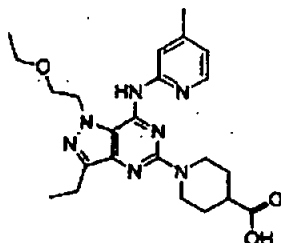


Se trató una mezcla de 2-amino-4-picolina (4,32 g, 40 mmoles) y 5,7-dicloro-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidina de la etapa 4 (5,78 g, 20 mmoles) con THF (25 ml) y se enfrió hasta 0°C. La mezcla se agitó y se trató con $\text{LiN}(\text{TMS})_2$ 1 M en THF (40 ml, 40 mmoles) a una velocidad tal que la temperatura se mantuvo por debajo de 5°C. La mezcla se agitó durante 30 minutos y después se trató con solución de ácido cítrico al 10% hasta que se logró un pH de 6 - 7. La mezcla se concentró parcialmente a presión reducida. Después la mezcla se agitó a 5°C durante 1 hora. El sólido resultante se recogió mediante filtración por succión y se lavó con agua (40 ml). Se secó el sólido en una estufa de vacío a una temperatura menor que

126

60°C produciendo 7,0 gramos del compuesto del título.

Etapa 6: Preparación de ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il-piperidina-4-carboxílico



5

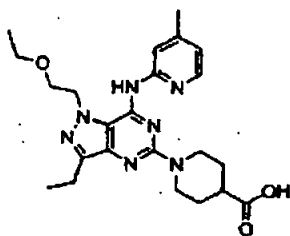
Se calentó una mezcla de N-[5-cloro-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-il]-4-metilpiridin-2-ilamina de la etapa 5 (5,42 g, 166 mmoles), ácido isonipecótico (85,9 g, 665 mmoles), carbonato de cesio (162 g, 498 mmoles), y DMSO (55 ml) con agitación a 125°C. Después de 20 horas, la mezcla se enfrió hasta 20°C y se añadió agua (165 ml). Esta mezcla se agitó durante 15 minutos y después se trató con acetato de etilo (55 ml). Se separaron las fases y la acuosa se trató con otra parte de acetato de etilo (55 ml). Se separaron las fases otra vez y la fase acuosa se llevó hasta pH ~ 5 usando HCl 6 M. Después de agitar durante 1 hora, se filtró el sólido resultante, se lavó con agua (20 ml) y se secó a vacío, proporcionando 5,5 g del compuesto del título. ¹H RMN (DMSO-d₆, 400 MHz): δ 1,10 (t, 3 H), 1,30 (t, 3 H), 1,49 - 1,60 (m, 2 H), 1,84 - 1,95 (m, 2 H), 2,32 - 2,36 (m, 3 H), 2,52 - 2,57 (m, 1 H), 2,78 (c, 2 H), 2,99 - 3,08 (m, 2H), 3,52 (c, 2 H), 3,78 (t, 2 H), 4,45 - 4,53 (m, 2 H), 4,56 - 4,64 (m, 2 H), 6,91 (d, 1 H), 8,05 (s, 1 H), 8,18 (d, 1 H), 9,63 (s, 1 H), 12,18 (s, 1 H). CLEM m/z 454.

20

Como alternativa, una mezcla de N-[5-cloro-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-7-il]-4-metilpiridin-2-ilamina de la etapa 5 (se puede

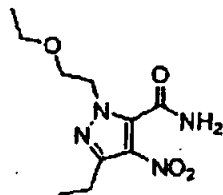
combinar con ácido isonipecótico (entre 1 y 10 equivalentes) y una base y se calentó entre 100 - 125°C en un disolvente hasta que se completa la reacción. Las bases adecuadas incluyen carbonato de cesio, carbonato de sodio y carbonato de potasio. Los disolventes adecuados incluyen DMSO y N,N-dimetilformamida. Tras enfriamiento, se puede añadir agua y la solución básica extraerse (entre 1 y 3 veces) con un disolvente orgánico tal como acetato de etilo. La fase básica restante se acidifica hasta pH 5 con HCl. La mezcla se agita durante aproximadamente 1 hora. El sólido se retira por filtración, se lava con agua, y se seca a vacío proporcionando el compuesto del título.

EJEMPLO 2



15 Ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico

Etapa 1: Preparación de 1-(2-etoxietil)-3-etil-4-nitro-1H-pirazolo-5-carboxamida

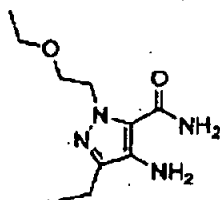


136

1-(2-etoxietil)-3-etil-4-nitro-1H-pirazolo-5-carboxamida se preparó de acuerdo con la etapa 1, del EJEMPLO 1

Etapa 2: Preparación de 4-amino-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo- 5-carboxamida

5

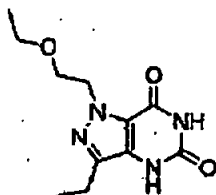


Se trató una mezcla de 1-(2-etoxietil)-3-etil-4-nitro-1H-pirazol-5-carboxamida de la etapa 1 (5,70 g, 22 mmoles) e hidróxido de paladio (1,0 g) en etanol (110 ml) con formiato de amonio (7,01 g, 111 mmoles) en cuatro partes desiguales a aproximadamente intervalos de 10 minutos. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante dos horas y después se enfrió. La mezcla se filtró a través de celita y se concentró. El residuo resultante se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando una mezcla de acetato de etilo y hexano como el eluyente proporcionando 2,45 g del compuesto del título. ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 1,17 (t, 3 H), 1,21 - 1,32 (m, 3 H), 2,60 (c, 2 H), 3,53 (c, 2 H), 3,79 - 3,95 (m, 2 H), 4,38 - 4,52 (m, 2 H). EM (IEP) m/z 227.

Etapa 3: 1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidina-5,7-(4H,6H)-diona

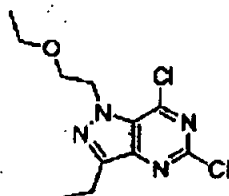
20

13a



Se trató una mezcla de 4-amino-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H- pirazolo- 5-
carboxamida de la etapa 2 (2,44 g, 10,8 mmoles) en N,N-dimetilformamida (40
5 ml) con carbonildiimidazol (1,92 g, 11,9 mmoles) y se calentó a 80°C durante
toda una noche. La mezcla se concentró a vacío y el residuo se purificó
mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice usando una mezcla de
acetato de etilo y hexano como el eluyente proporcionando 1,04 g del
compuesto del título. EM (IEP) m/z 253.

10 Etapa 4: Preparación de 5,7-dicloro-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-
d]pirimidina



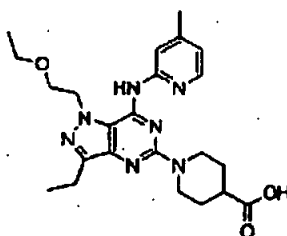
15 Se calentó una mezcla de 1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-
d]pirimidina-5,7-(4H,6H)-diona preparada en la etapa 3 (7,2 g) y oxiclورو d
fósforo (200 ml) con una gota de N,N-dimetilformamida a reflujo durante toda
una noche. La mezcla se enfrió y el oxiclورو de fósforo se evaporó a presión
reducida. Se añadió hielo al residuo resultante y después la mezcla se extrajo
20 con cloroformo. Se secaron las fases orgánicas sobre sulfato de magnesio, se
filtraron y se evaporaron proporcionando 2,09 g de 5,7-dicloro-1-(2-etoxietil)-3-

mlo

etil-1H-pirazolo[4,3- d]pirimidina en forma de un aceite que solidificó tras reposo CLEM m/z 289.

Etapa 5: Preparación de ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3- d]pirimidin-5-il)-piperidina-4-carboxílico

5



Se añadieron la 5,7-dicloro-1-(2-etoxietil)-3-etil-1H-pirazolo[4,3-
d]pirimidina preparada en la etapa 4 (1 mmol), 2-amino-4-picolina (2 mmoles),
10 N,N-diisopropiletilamina (3 mmoles), y N-metilpirrolidona (1 ml) a cada uno de
dos recipientes de reacción. Cada recipiente se irradió en un microondas CEM
Discover durante 15 minutos a 150°C. Se añadió ácido isonipecótico (3
mmoles) a cada recipiente de reacción y la mezcla resultante se irradió
15 durante 15 minutos a 180°C. Se combinaron los contenidos de los dos
recipientes de reacción. Se añadieron agua y acetato de etilo a la mezcla y se
agitó la mezcla. Se añadió ácido clorhídrico (1 M) a la mezcla y la mezcla se
agitó otra vez. Se separaron las fases. Se lavó la fase orgánica con agua, se
añadió ácido clorhídrico (1 M), y se separaron las fases. La fase orgánica se
secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó. El pH de la fase
20 acuosa se incrementó hasta aproximadamente seis mediante la adición d
carbonato sódico saturado y después la fase acuosa se extrajo con acetato de
etilo. La fase orgánica se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró, se añadió
al residuo orgánico anterior y se evaporó. La solución se purificó mediante

RP-HPLC en una columna C-18 Varian Dynamax (250 x 41,4 mm) con un gradiente de 10 - 95% de acetonitrilo / agua (ácido clorhídrico) durante 15 minutos en dos lotes. Las fracciones se combinaron y se evaporaron produciendo 0,26 g del compuesto del título. ^1H RMN ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 1,10 (t, 3 H), 1,30 (t, 3 H), 1,49 - 1,60 (m, 2 H), 1,84 - 1,95 (m, 2 H), 2,32 - 2,36 (m, 3 H), 2,52 - 2,57 (m, 1 H), 2,78 (c, 2 H), 2,99 - 3,08 (m, 2H), 3,52 (c, 2 H), 3,78 (t, 2 H), 4,45 - 4,53 (m, 2 H), 4,56 - 4,64 (m, 2 H), 6,91 (d, 1 H), 8,05 (s, 1 H), 8,18 (d, 1 H), 9,63 (s, 1 H), 12,18 (s, 1 H). CLEM m/z 454.

Protocolos

10 N. Ensayos de potencia y selectividad

Procedimiento 1. Ensayo de proximidad de centelleo de inhibición de la enzima PDE5 de plaquetas humanas

Se puede usar un ensayo *in vitro* para evaluar la inhibición de la actividad de la enzima PDE5 mediante un compuesto de ensayo. Como se describe más específicamente más adelante, este ensayo mide el valor de CI_{50} de PDE5 para el compuesto de ensayo (es decir, la concentración del compuesto de ensayo requerida para inhibir el 50% de la hidrólisis catalizada por la enzima PDE5 de cGMP a GMP con relación a la actividad de controles no inhibidos).

20 La enzima PDE5 para uso en el ensayo se puede obtener a partir de plaquetas humanas mediante la modificación apropiada del procedimiento de Thompson, WJ y col.; Biochemistry 18 (23), 5228 - 5237, 1979, como han descrito Ballard SA y col.; J. Urology 159 (6), 2164 - 2171, 1998. La enzima PDE5 aislada de plaquetas humanas se puede usar para catalizar la hidrólisis
25 de $[^3\text{H}]\text{cGMP}$ (Amersham Biosciences) a 5' nucleótido $[^3\text{H}]\text{GMP}$. El $[^3\text{H}]\text{GMP}$ se une a perlas de SPA de silicato de itrio (Amersham Biosciences) y se detecta mediante conteo de centelleo. Más específicamente, el efecto del

compuesto de ensayo a diferentes concentraciones se puede evaluar en el ensayo poniendo en contacto el compuesto con una cantidad fija de enzima PDE5 en presencia de sustrato (cGMP o cAMP en una relación 3:1 de no marcado a marcado con [^3H]). El conteo de centelleo se puede usar como se ha descrito anteriormente para determinar la actividad relativa de enzima PDE5. La inhibición de la actividad de la enzima PDE5 se calcula después con relación a la actividad de la enzima PDE5 total de los controles no inhibidos.

Ensayo de la CI_{50} de la PDE5: formato de placas de microvaloración de 96 pocillos

10 **Reactivos**

Tampón A: Tris - HCl 20 mM, MgCl_2 5 mM, pH 7,4

Tampón B: BSA 2 mg/ml en tampón A (tampón de enzima)

Sustrato de cGMP: Concentración final de 500 nM en ensayo

La cantidad de sustrato marcado con ^3H añadido depende de la actividad específica de [^3H]cGMP, y el sustrato cGMP se diluye con solución madre 10 mM de cGMP fría en tampón A para una concentración de sustrato final de 500 nM en el ensayo.

Enzima PDE: Preparada en tampón B. El factor de dilución se determina mediante actividad de la enzima.

20 **Perlas de SPA:** 20 mg/ml de suspensión preparada en dH_2O .

<u>Control positivo</u>	<u>Control negativo</u>	<u>Patrón / compuesto de ensayo</u>
2 μl de DMSO al 100%	2 μl de DMSO al 100%	2 μl de patrón / compuesto ensayo
25 μl de Tampón A	25 μl de Tampón A	25 μl de tampón A
25 μl de Enzima	25 μl de Tampón B	25 μl de enzima
25 μl de Sustrato	50 μl de Sustrato	50 μl de sustrato
50 μl de SPA para parar	50 μl de SPA para parar	50 μl de SPA para parar

Las soluciones madre de compuestos de ensayo y del patrón se

preparan a 5 mM en DMSO al 100%. El compuesto se diluye en serie en una placa de dilución usando un formato de dilución semi logarítmico de 10 puntos. Se añaden 2 µl de la dilución del compuesto por duplicado a los pocillos de la placa de ensayo. Se añaden 2 µl de DMSO al 100% a los pocillos de control designados. Se añaden 25 µl de tampón A a todos los pocillos. Se añaden 25 µl de tampón B a los pocillos de control negativos. Se añaden 25 µl de enzima a los pocillos restantes. Se añaden 50 µl de sustrato a cada pocillo. Las placas se sellan e incuban durante 60 minutos sobre un agitador de placas a 30°C. Se añaden 50 µl de perlas de SPA para parar la reacción. Las placas se sellan de nuevo y se agitan durante 15 minutos para permitir que las perlas se unan al producto de GMP. Las perlas se dejan sedimentar durante 30 minutos y después se leen en un contador de centelleo NXT Top Count. Los datos se analizan con una aplicación de ajuste de curva para la selección basada en placas. El porcentaje de inhibición en este ensayo se calcula como sigue:

$$\text{Inhibición (\%)} = \left[\frac{(\text{máximo medio} - \text{valor del compuesto})}{(\text{máximo medio} - \text{mínimo medio})} \right] \times 100.$$

El valor de CI_{50} se determina a partir de curvas de respuesta a la dosis sigmoidales de actividad de enzima contra la concentración de compuesto.

El compuesto de carboxipiperidina se ensayó de acuerdo con el procedimiento 1. Los valores de CI_{50} de PDE5 correspondientes medidos se reseñan en la Tabla A.

Tabla A

Nº de ensayo	Procedimiento 1 CI_{50} de PDE5 (nM)
--------------	---

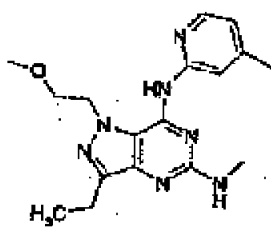
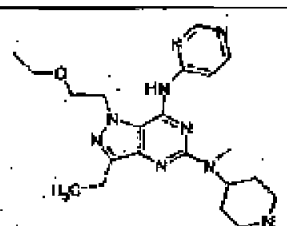
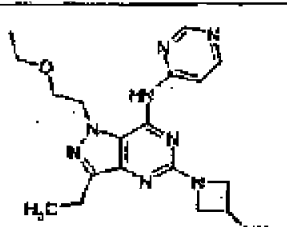
M

1	0,050
2	0,044
Media	0,047

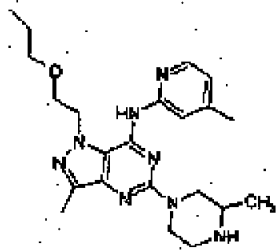
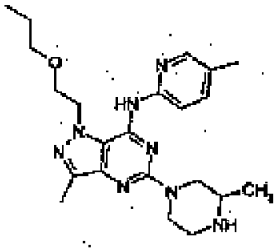
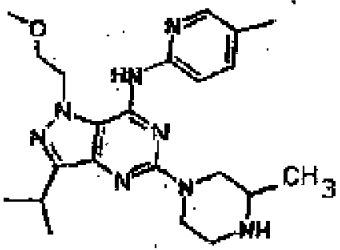
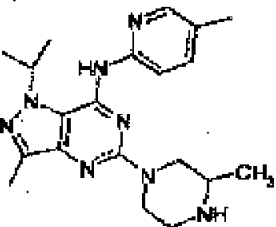
Los compuestos previamente descritos en los ejemplos del documento WO 2004096810 se ensayaron de acuerdo con el procedimiento 1. Los valores de Cl_{50} de PDE5 correspondientes medidos se reseñan en la Tabla B.

5

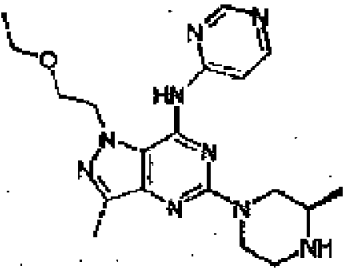
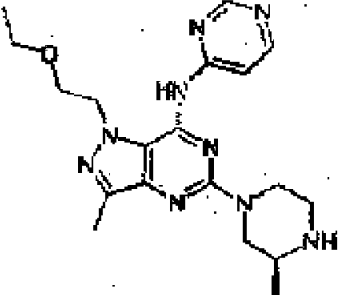
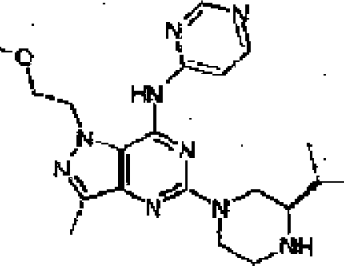
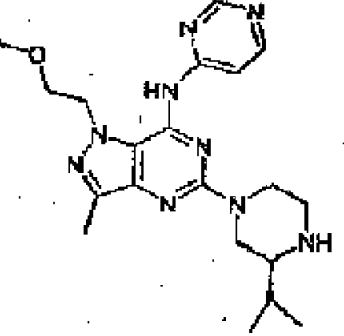
Tabla B

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl_{50} de PDE5 (nM)
1		16,2
2		0,48
3		43,8

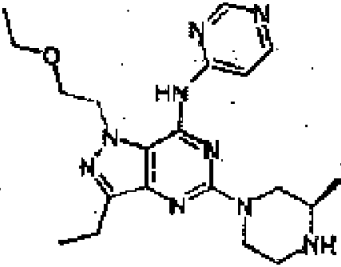
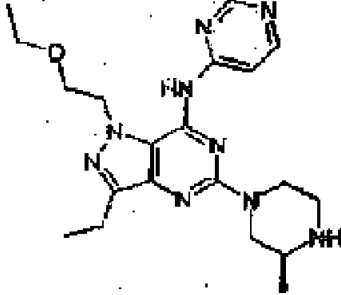
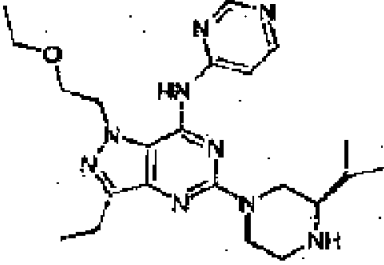
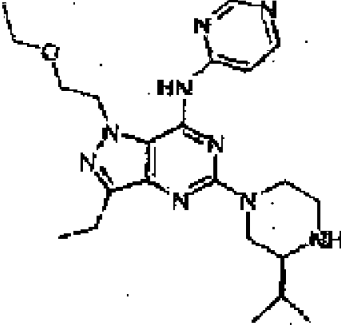
105

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
4		8,84
7		6,03
8		6,95
9		508

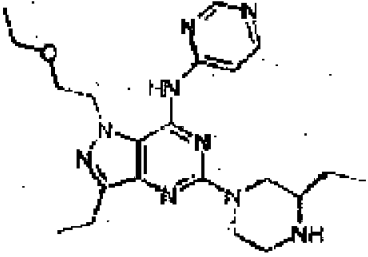
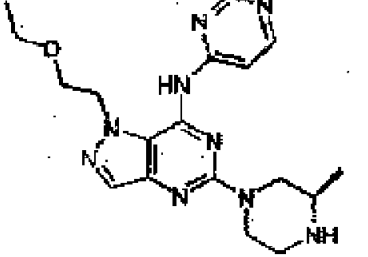
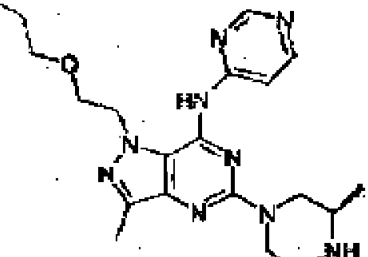
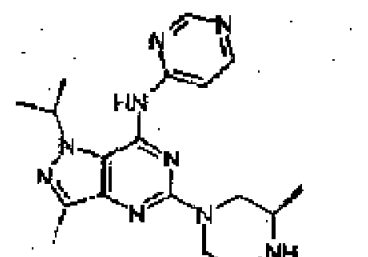
7/16

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
11		0,29
12		1,74
13		19,1
14		42,1

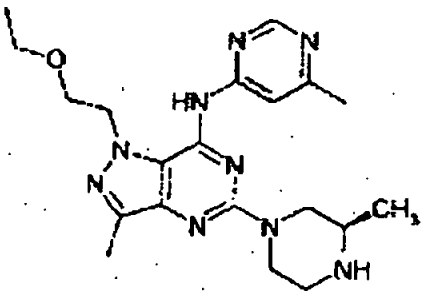
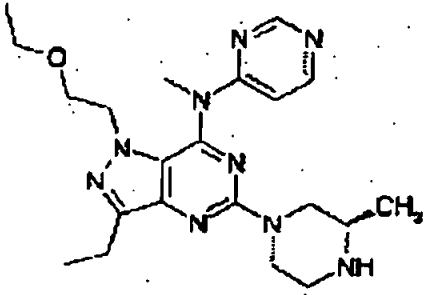
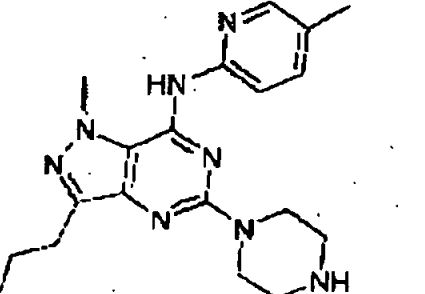
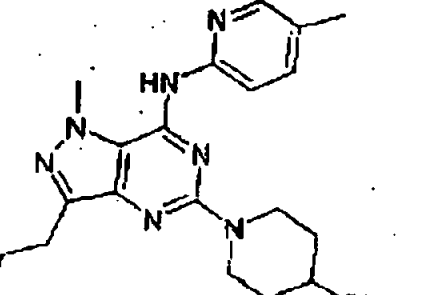
107

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
15		0,09
16		0,98
17		22,4
18		25,8

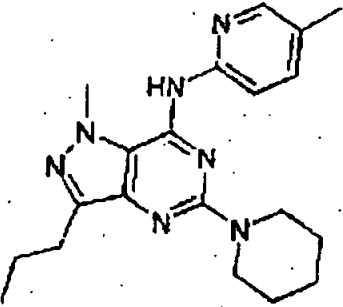
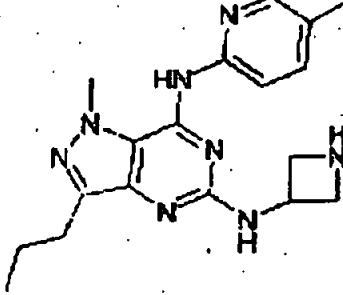
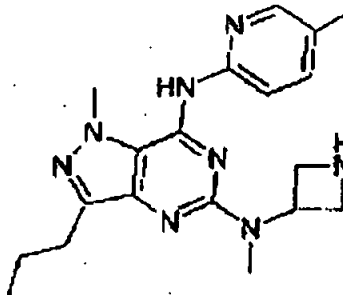
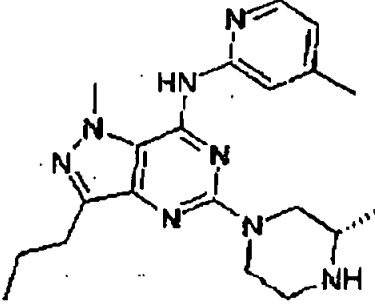
MS

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: CI ₅₀ de PDE5 (nM)
19		0,49
21		2,04
23		0,39
24		37,7

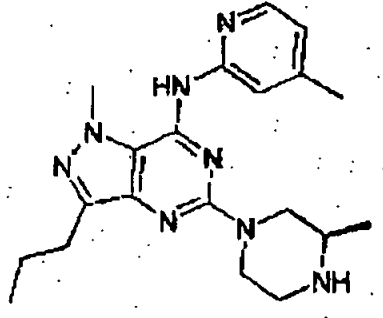
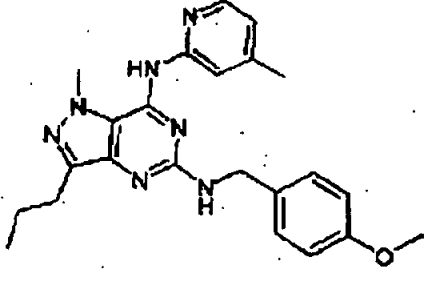
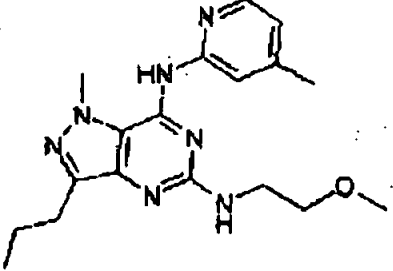
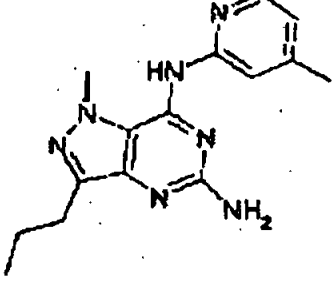
m19

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
26	 <chem>CCN1CCN(C1c2nc3c(ncn3C)C(=O)N(C2)C4=CC=CC=C4C)CC5</chem>	1,83
28	 <chem>CCN1CCN(C1c2nc3c(ncn3C)C(=O)N(C2)C4=CC=CC=C4C)CC5</chem>	47,9
34	 <chem>CCN1CCN(C1c2nc3c(ncn3C)C(=O)N(C2)C4=CC=CC=C4C)CC5</chem>	50,2
35	 <chem>CCN1CCN(C1c2nc3c(ncn3C)C(=O)N(C2)C4=CC=CC=C4C)CC5</chem>	737

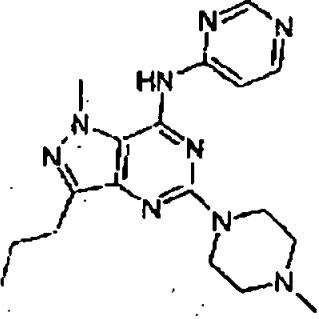
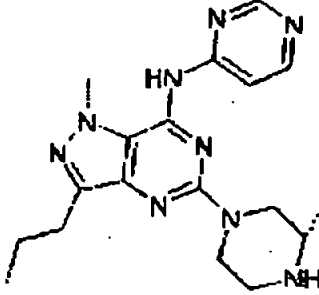
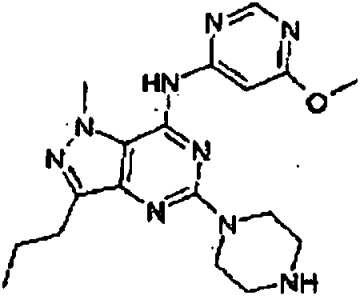
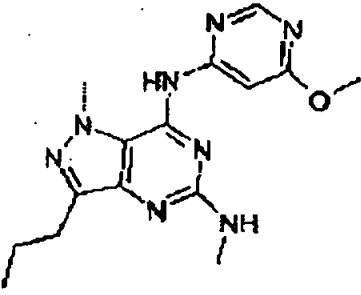
150

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
36		1450
37		> 10.000
38		> 10.000
39		456

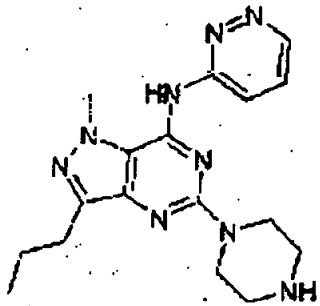
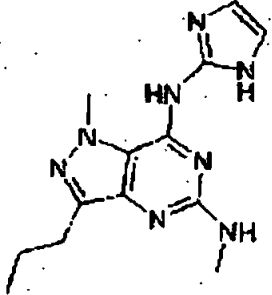
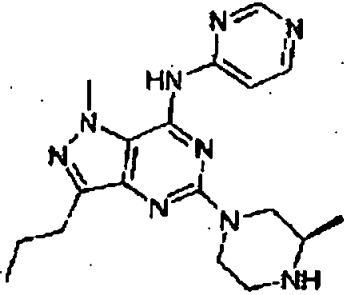
15

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
40		334
71		152
72		177
77		> 10.000

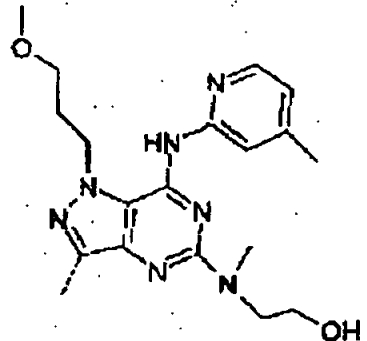
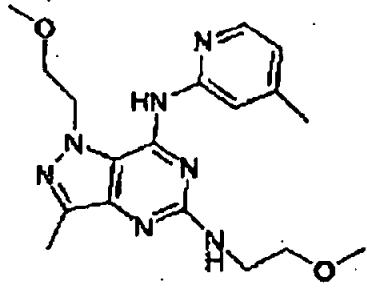
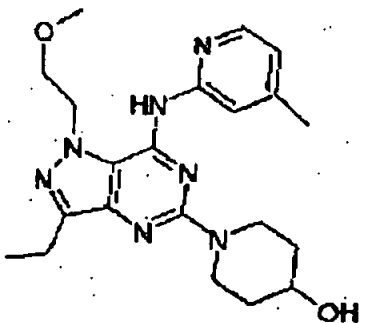
152

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
80		1940
81		118
83		134
84		247

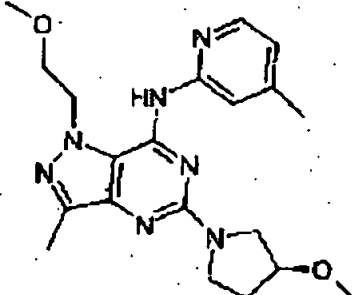
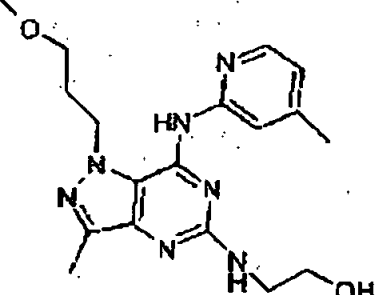
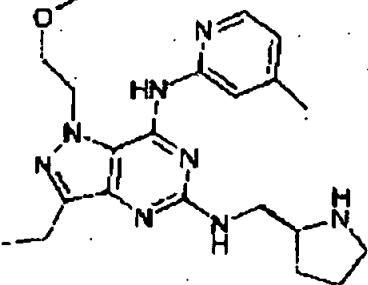
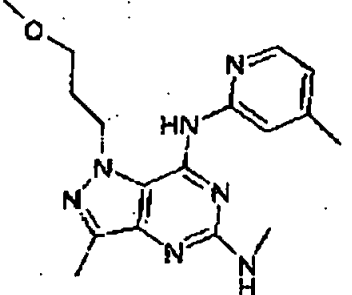
157

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
88	 <chem>CCN1CCN(C1)c2nc3c(ncn3C)C(=N2)C4=CC=CC=N4</chem>	> 100
90	 <chem>CCN1CCN(C1)c2nc3c(ncn3C)C(=N2)C4=CN=CNC4</chem>	1550
91	 <chem>CCN1CCN(C1)c2nc3c(ncn3C)C(=N2)C4=CC=CC=N4</chem>	22,6

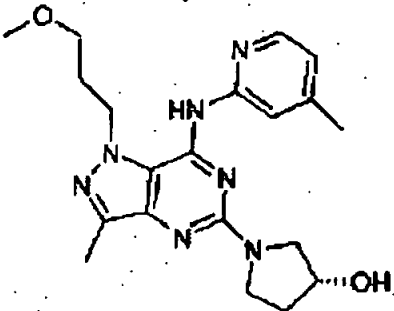
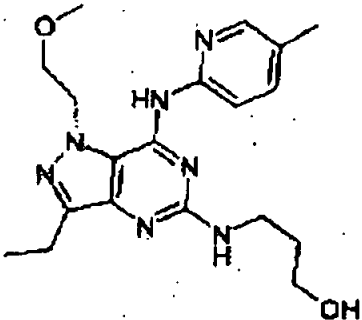
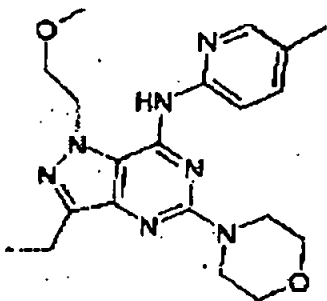
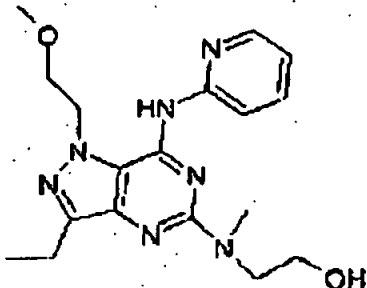
154

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
92	 <chem>COCC1=NC2=C(N1)N=CN2C(=N3C=CC(=C3)N)N(CCCO)C4=CC=CC=C4C</chem>	26,5
93	 <chem>COCCN1=NC2=C(N1)N=CN2C(=N3C=CC(=C3)N)N(CCCOC)C4=CC=CC=C4C</chem>	31,1
94	 <chem>COCC1=NC2=C(N1)N=CN2C(=N3C=CC(=C3)N)N(C4CCN(CC4)CO)C5=CC=CC=C5C</chem>	43,2

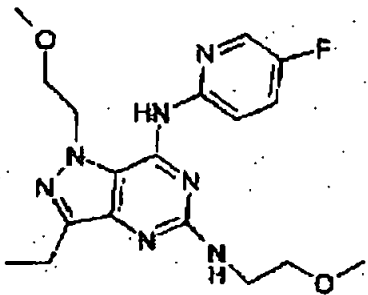
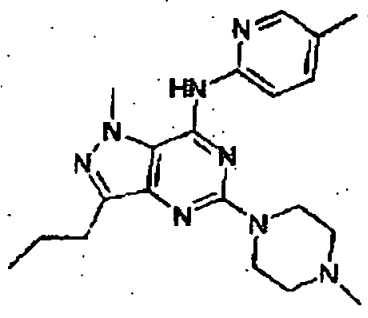
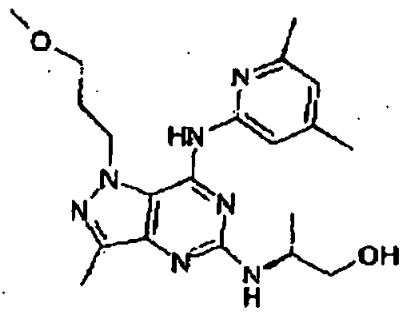
157

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
95		76,0
96		87,9
98		231
99		239

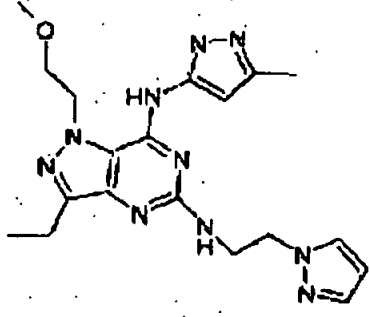
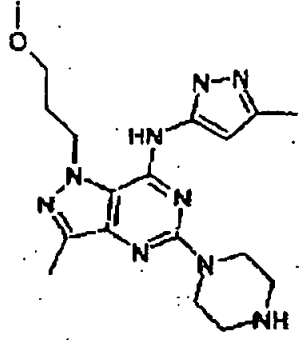
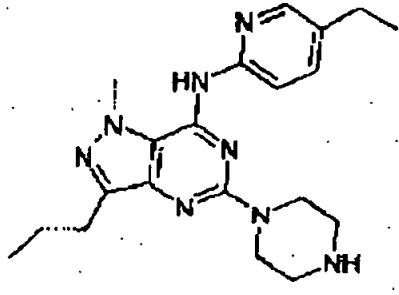
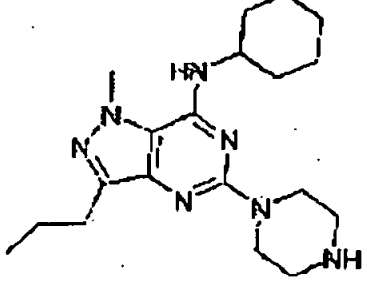
156

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
100		67,2
103		76,6
108		778
109		27,3

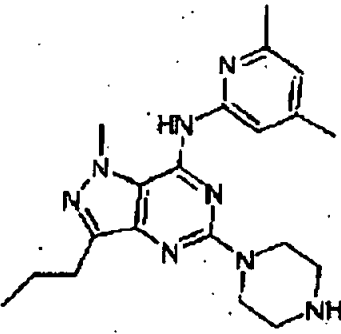
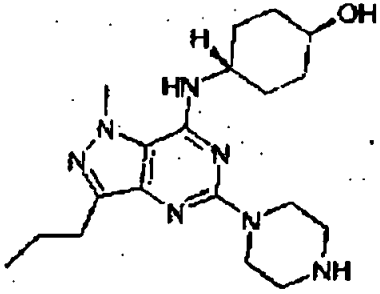
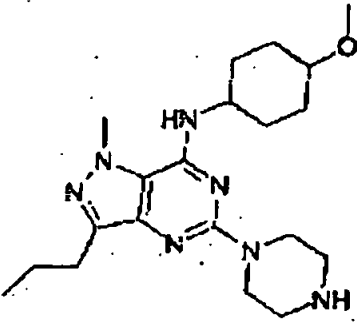
197

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
110	 <chem>COCCNc1nc2c(ncn2COC)nc1Nc3ccc(F)cc3</chem>	513
113	 <chem>CCc1nc2c(ncn2N3CCN(C)CC3)nc1Nc4ccc(C)cc4</chem>	1250
114	 <chem>COCCNc1nc2c(ncn2COC)nc1Nc3ccc(C)cc3NC(C)O</chem>	60,6

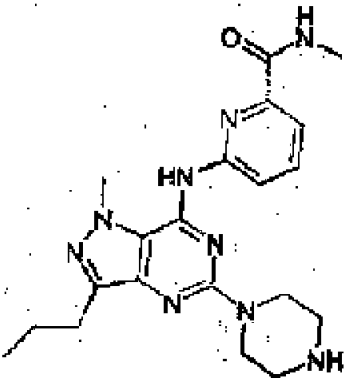
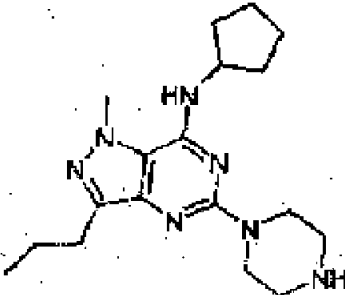
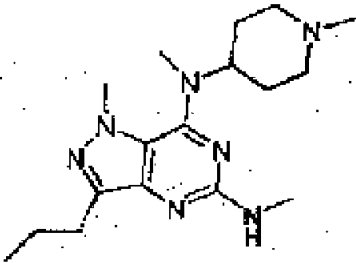
158

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
115		220
116		1760
123		248
124		78,2

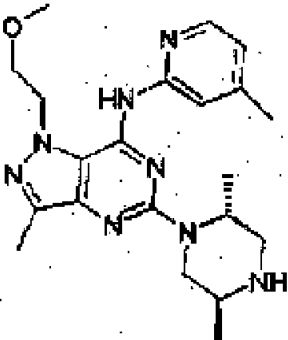
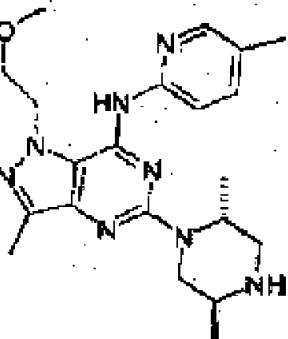
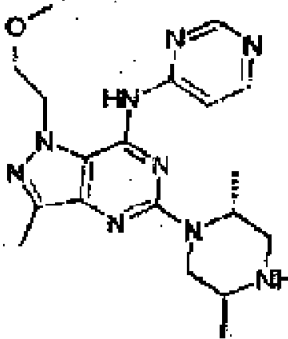
759

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
125		182
126		2230
127		7580

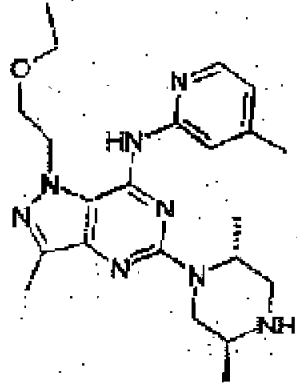
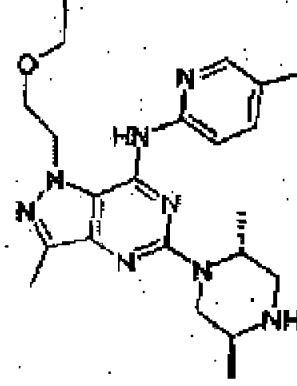
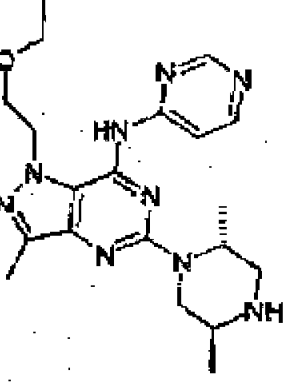
160

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
128		1390
129		139
130		> 10.000

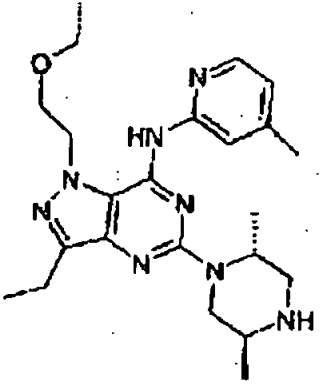
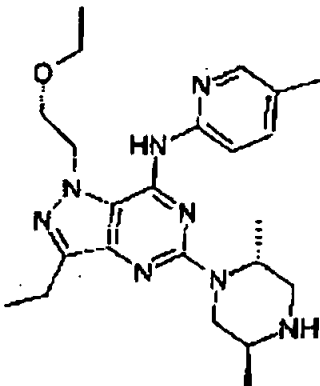
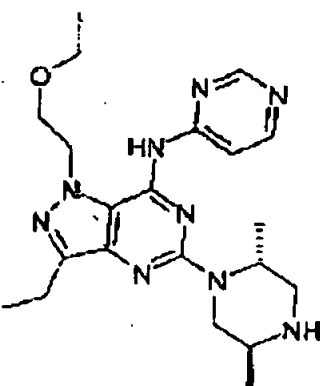
161

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
133		4,45
134		6,57
135		0,92

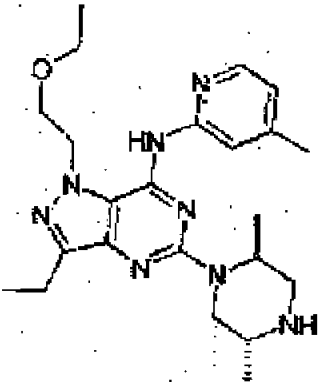
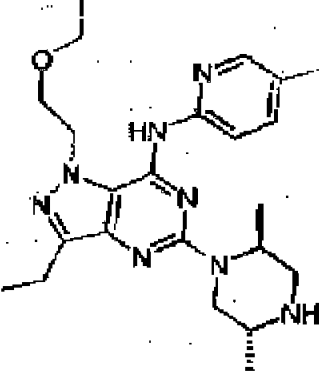
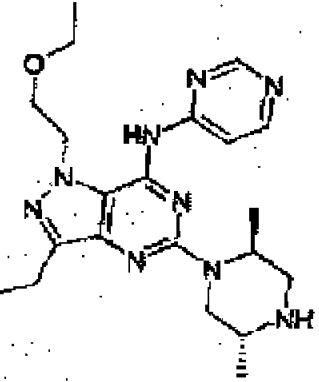
102

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
136		1,09
137		1,43
138		0,33

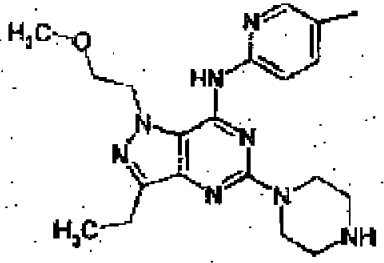
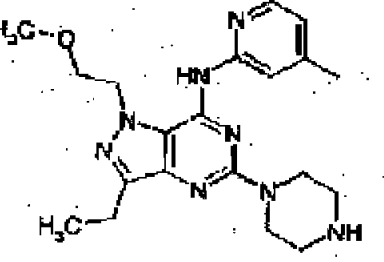
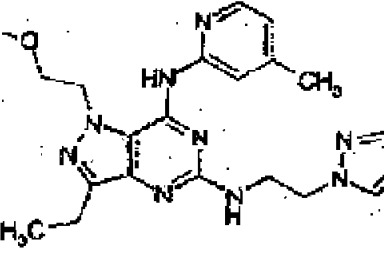
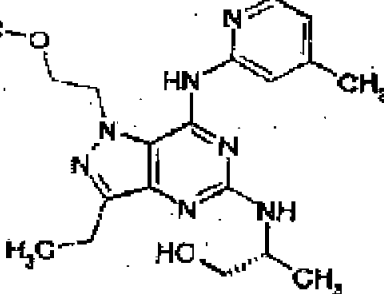
203

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
139		0,55
140		1,95
141		0,15

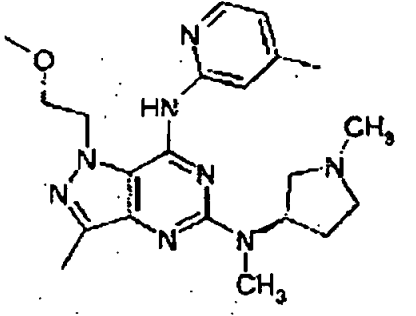
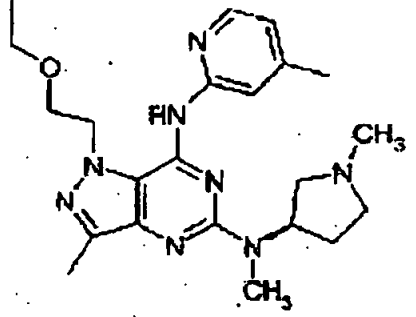
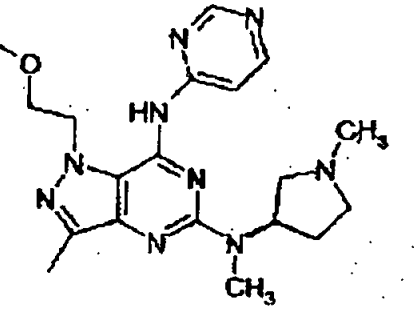
166

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
148		4,39
149		34,8
150		1,83

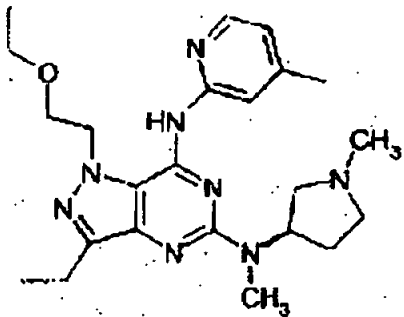
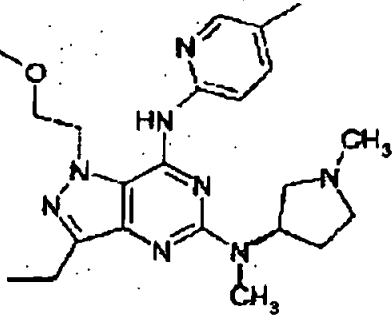
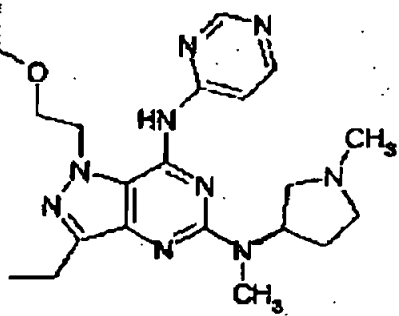
168

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
151	 <chem>CCOCNc1nc2c(ncn2C)nc(C)nc1Nc3cc(C)ccn3</chem>	22,0
152	 <chem>CCOCNc1nc2c(ncn2C)nc(C)nc1Nc3cc(C)ccn3</chem>	12,1
153	 <chem>CCOCNc1nc2c(ncn2C)nc(C)nc1NCCc3ccnnc3</chem>	19,5
154	 <chem>CCOCNc1nc2c(ncn2C)nc(C)nc1NCC(C)O</chem>	12,6

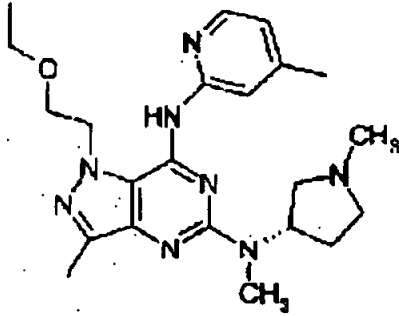
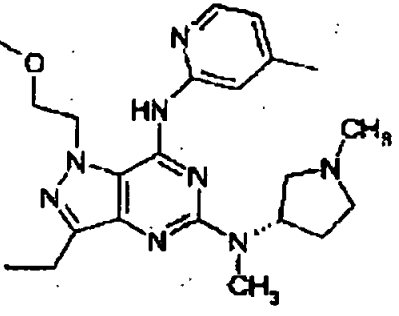
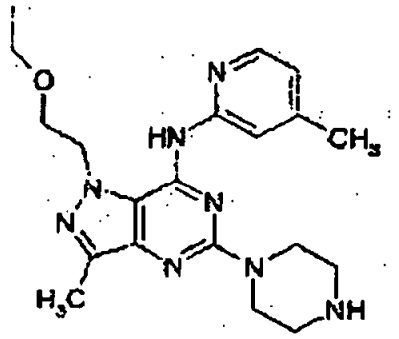
V68

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
155		13,4
156		1,80
157		16,7

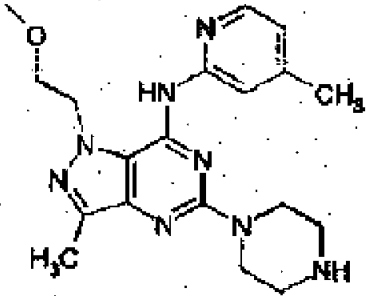
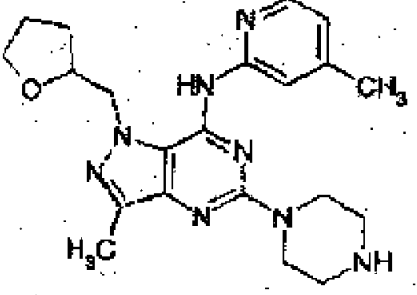
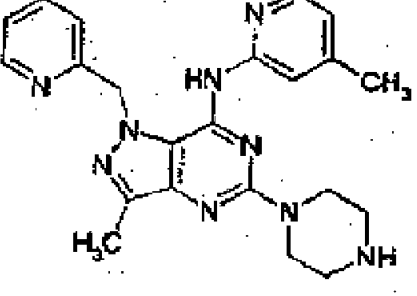
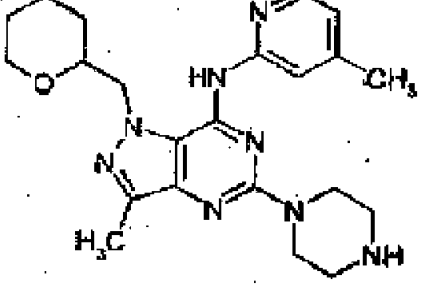
269

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
158		0,71
159		16,3
160		7,22

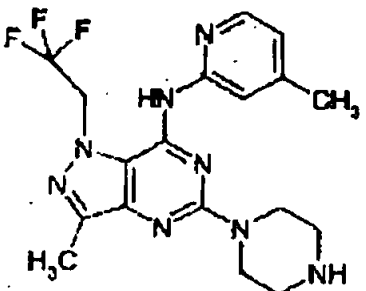
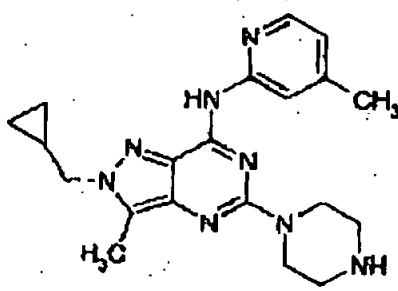
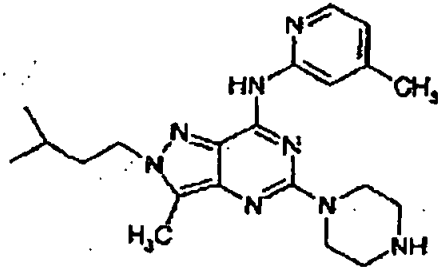
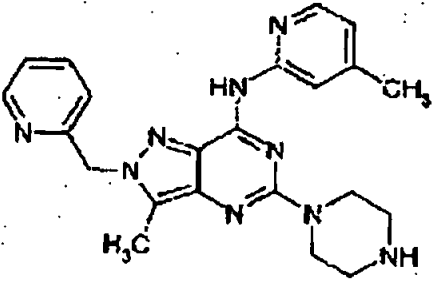
70

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
161		0,50
162		0,24
164		3,46

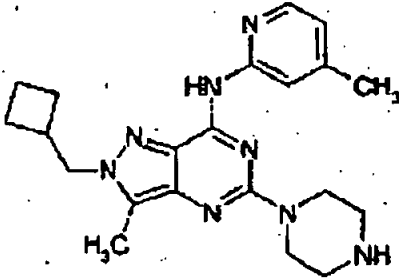
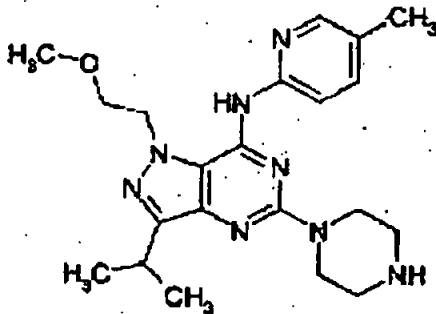
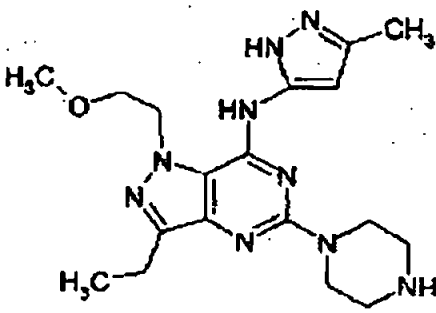
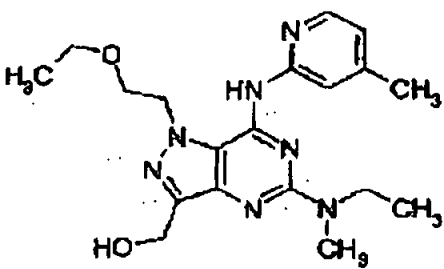
PM

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
165		10,5
166		11,5
167		2,95
168		0,81

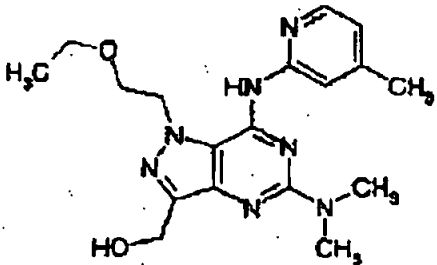
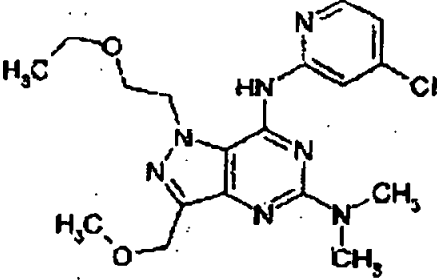
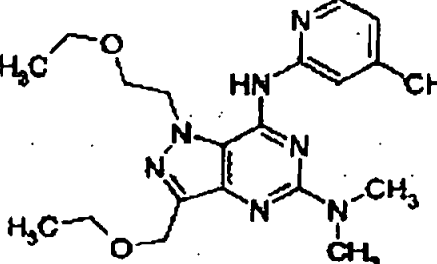
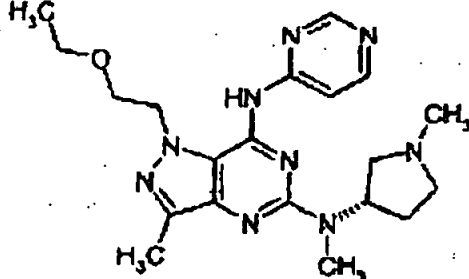
172

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
170		2100
173		396
174		432
176		274

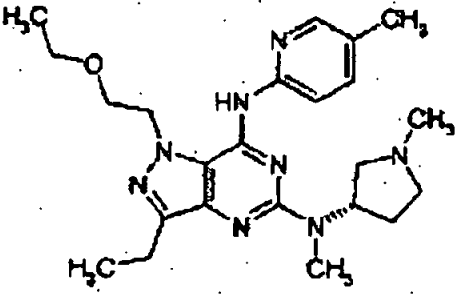
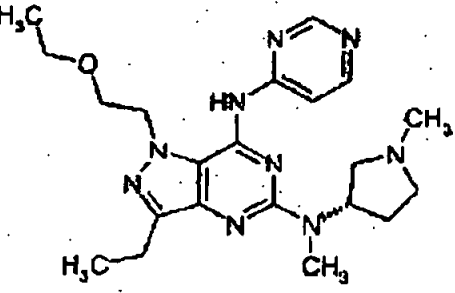
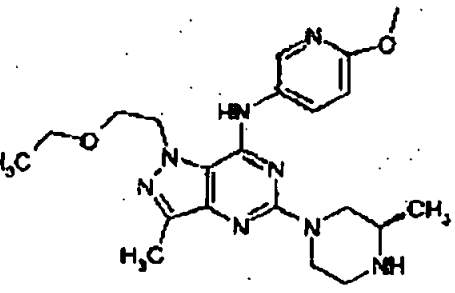
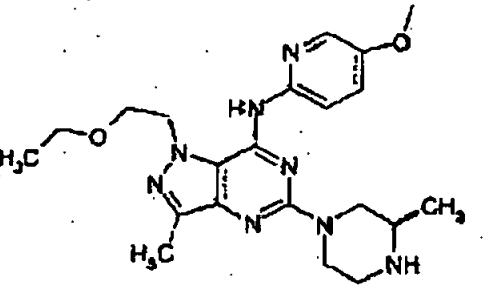
173

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
177		535
179		18,3
180		341
181		0,39

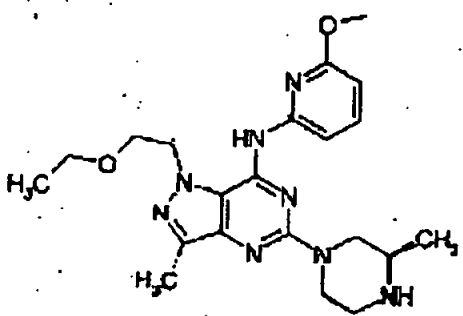
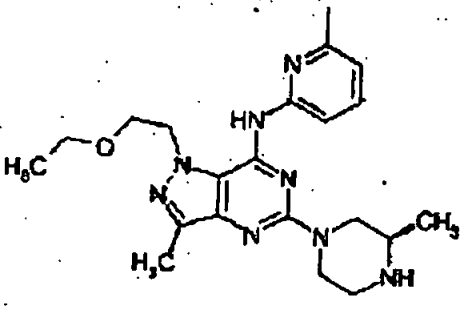
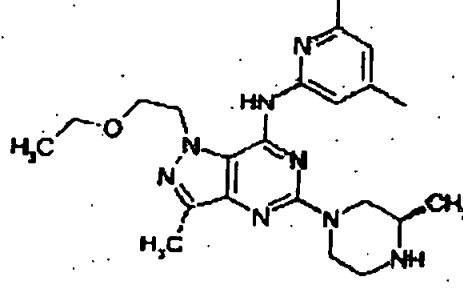
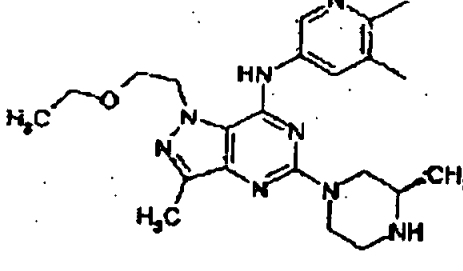
PM

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
182	 <chem>COCCOC1=NC2=C(N1)N(CN(C)C)C(=N2)C(CO)N3C=CC=C(C)N3</chem>	4,03
185	 <chem>COCCOC1=NC2=C(N1)N(CN(C)C)C(=N2)C(COC)N3C=CC=C(C)N3</chem>	1,30
188	 <chem>COCCOC1=NC2=C(N1)N(CN(C)C)C(=N2)C(COCCOC)N3C=CC=C(C)N3</chem>	0,47
191	 <chem>COCCOC1=NC2=C(N1)N(C)C(=N2)C(C)N3C=NC4=C(N3)N=CN=C4N(C)C</chem>	0,24

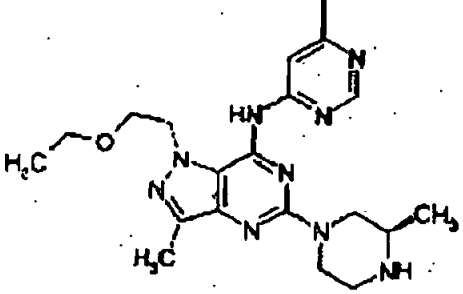
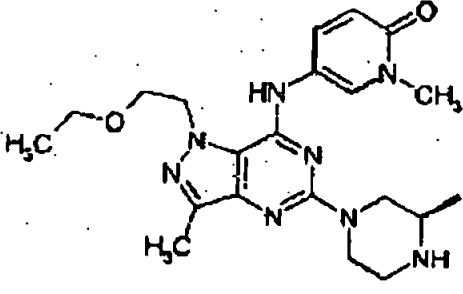
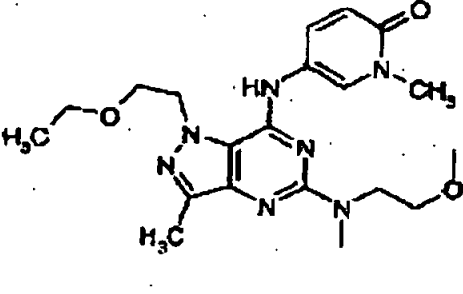
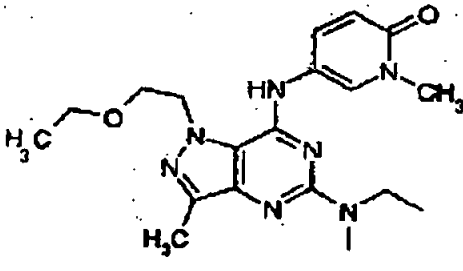
175

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
192	 <chem>COCCOCN1N=C2C(=N1)N(CCN3CCN(C)C3)C(=N2)NC4=CC=C(C)N4</chem>	3,06
193	 <chem>COCCOCN1N=C2C(=N1)N(CCN3CCN(C)C3)C(=N2)NC4=CC=CC=N4</chem>	1,01
194	 <chem>COCCOCN1N=C2C(=N1)N(CCN3CCN(C)CC3)C(=N2)NC4=CC(OC)=CC=N4</chem>	0,56
195	 <chem>COCCOCN1N=C2C(=N1)N(CCN3CCN(C)CC3)C(=N2)NC4=CC=C(OC)N4</chem>	0,96

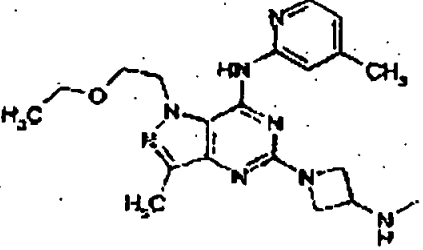
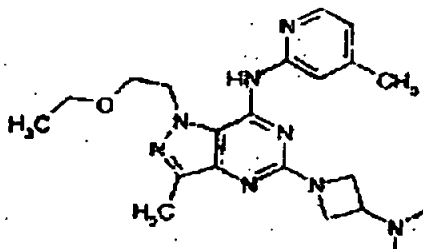
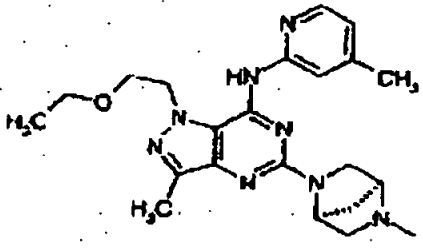
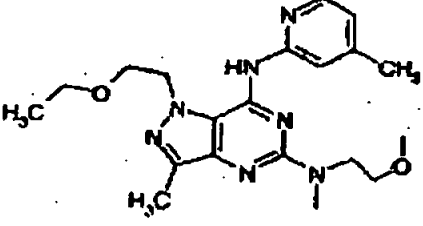
126

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimient 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
196	 <chem>COc1ccc(Nc2nc3c(ncn3C)N(CCN(C)C)nc2C)cc1</chem>	0,56
197	 <chem>COc1ccc(Nc2nc3c(ncn3C)N(CCN(C)C)nc2C)cc1</chem>	1,76
198	 <chem>COc1ccc(Nc2nc3c(ncn3C)N(CCN(C)C)nc2C)cc1</chem>	10,0
199	 <chem>COc1ccc(Nc2nc3c(ncn3C)N(CCN(C)C)nc2C)cc1</chem>	3,13

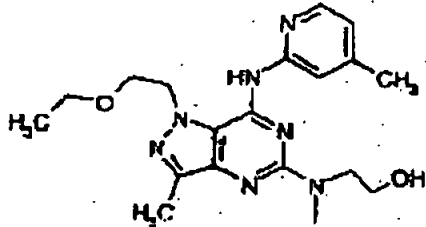
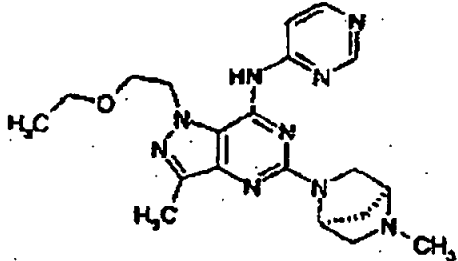
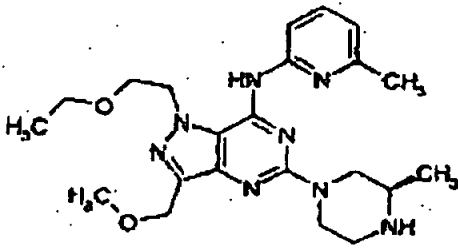
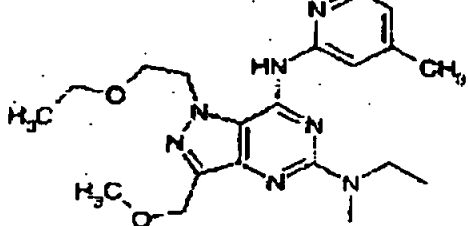
12/2

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
200		4,70
201		25,9
202		5,46
203		0,63

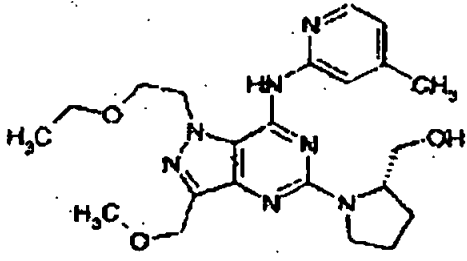
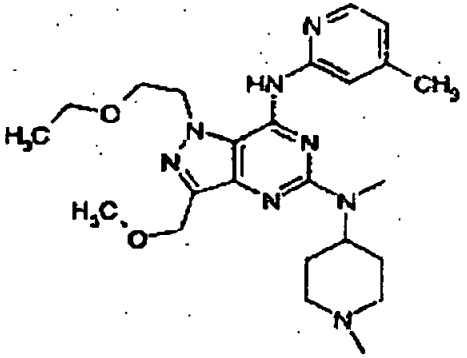
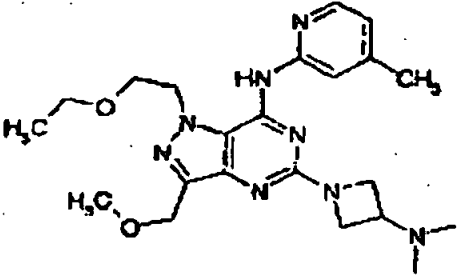
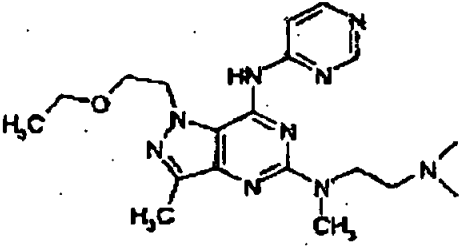
28

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: CI ₅₀ de PDE5 (nM)
204		24,1
205		6,24
206		6,09
207		1,55

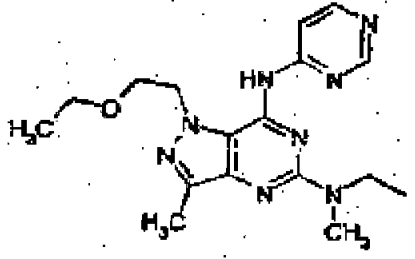
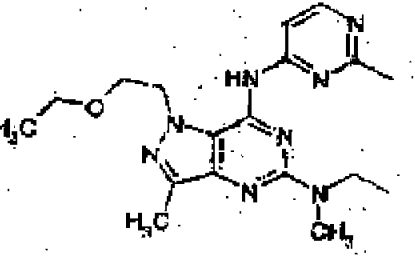
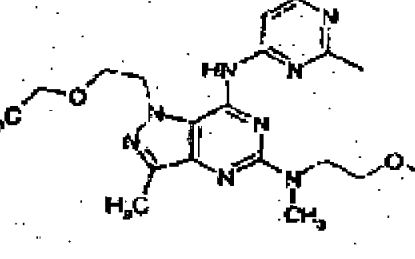
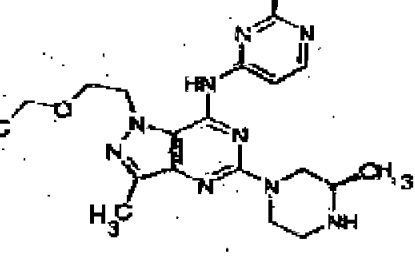
179

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
208		0,71
210		82,7
211		1,57
212		0,13

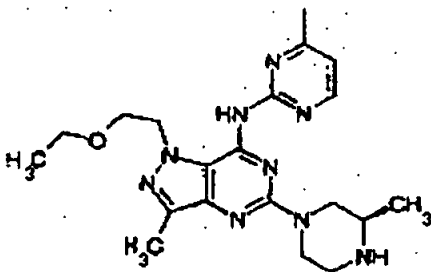
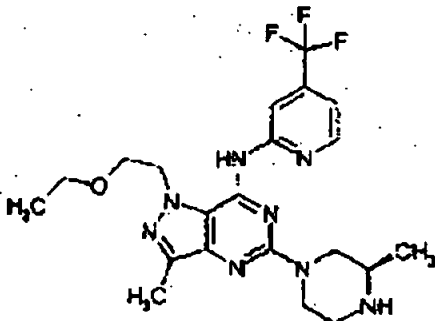
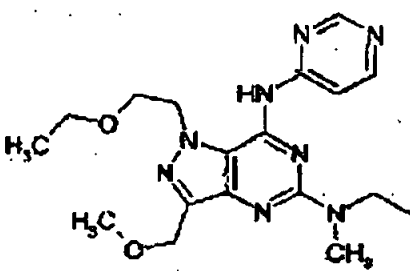
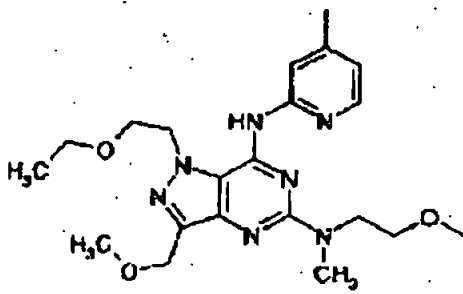
130

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
213		0,42
214		0,37
215		5,30
216		60,9

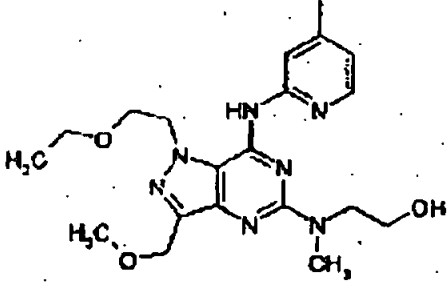
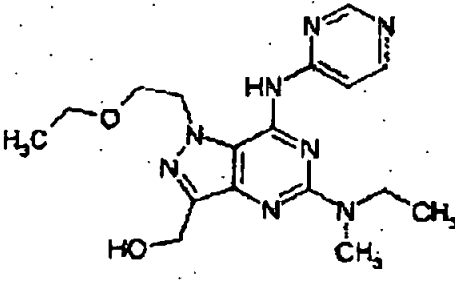
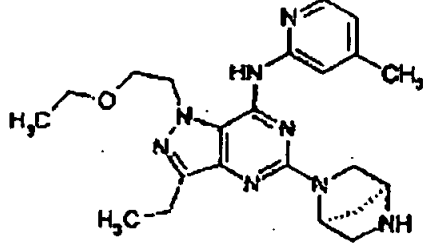
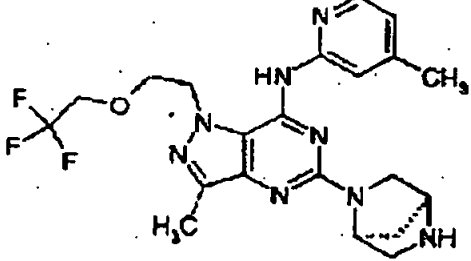
161

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
217		2,55
218		11,5
219		41,0
220		3,60

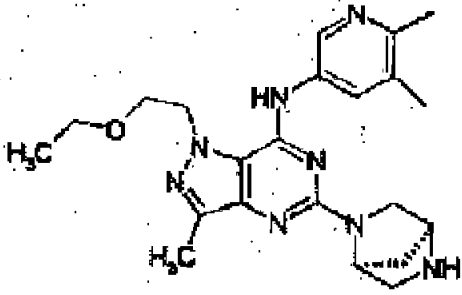
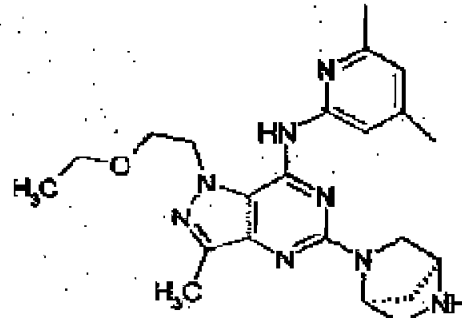
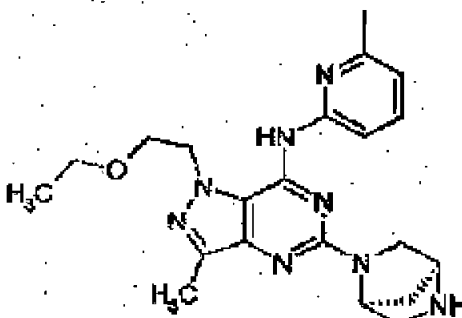
182

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
221		35,4
222		10,1
225		1,33
226		0,83

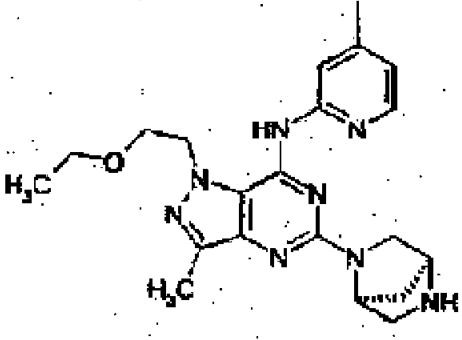
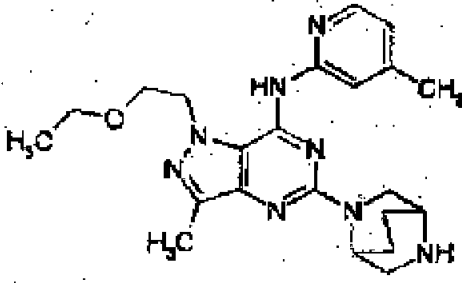
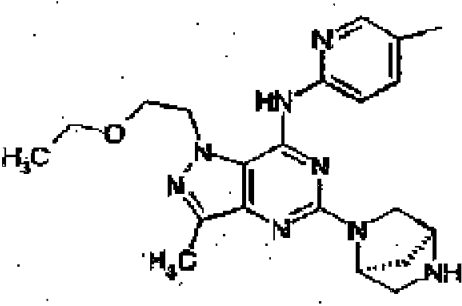
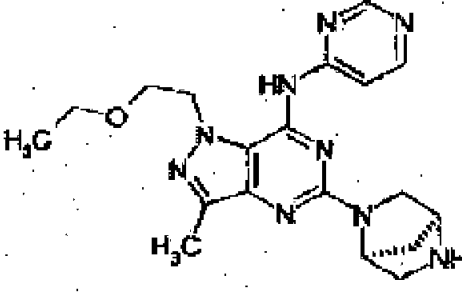
103

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
227		0,35
228		3,09
229		1,61
231		10,3

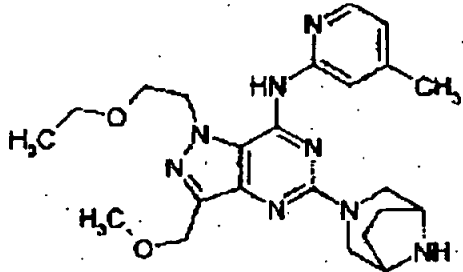
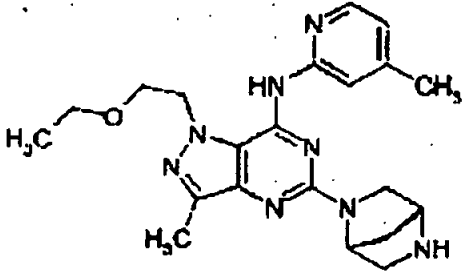
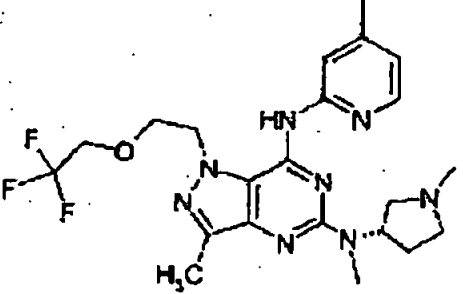
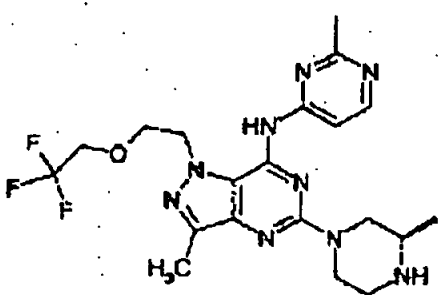
10/2

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
233		3,85
234		8,79
235		> 100

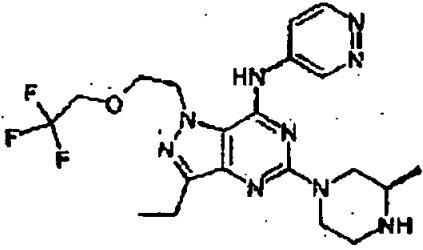
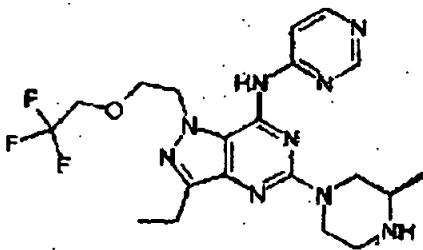
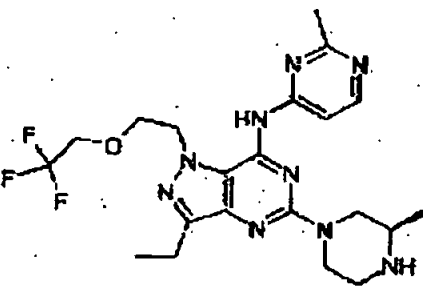
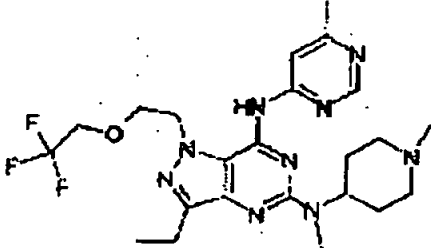
185

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
236		2,51
237		0,67
240		> 100
241		48,7

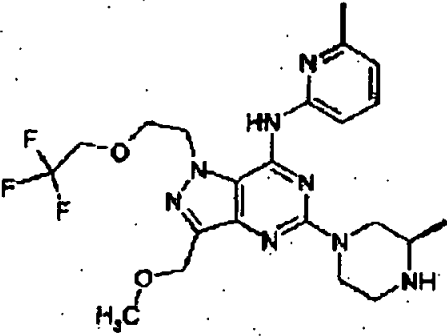
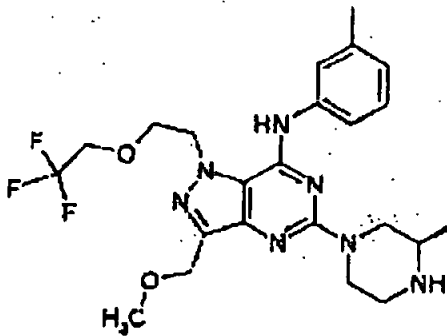
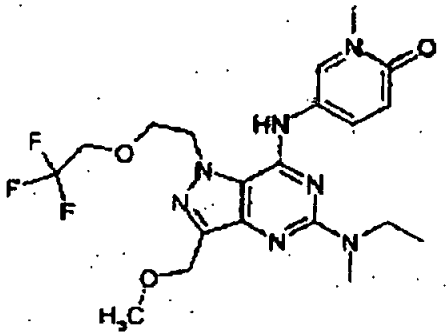
186

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
242		0,62
244		2,54
245		1,55
246		4,46

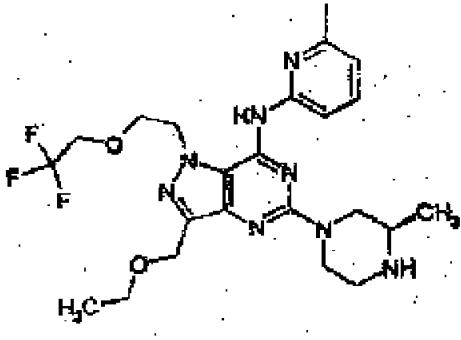
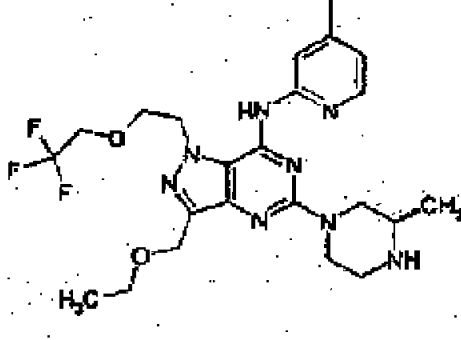
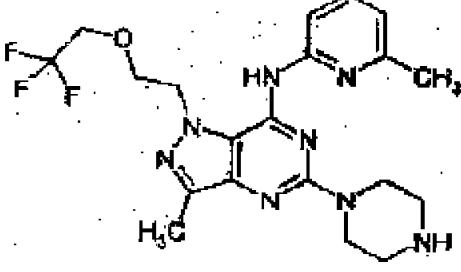
107

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
248		0,30
249		0,16
250		2,37
251		0,25

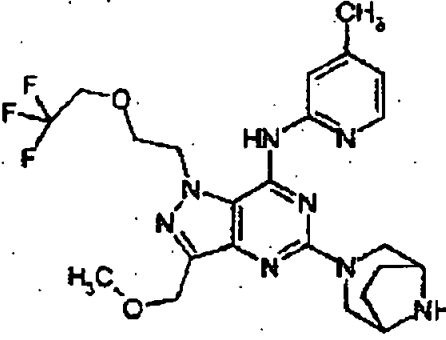
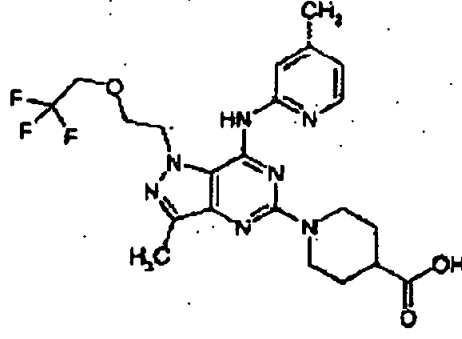
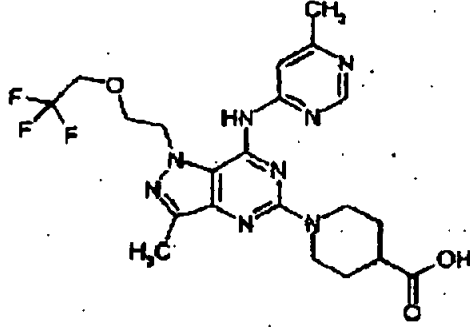
1588

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
252		2,81
253		1,20
254		0,59

189

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
255	 <chem>Cc1ccc(Nc2nc3c(ncn3C4CCNCC4C)nc5c2cnc5COC)cc1COC(F)(F)F</chem>	1,43
256	 <chem>Cc1ccc(Nc2nc3c(ncn3C4CCNCC4C)nc5c2cnc5COC)cc1COC(F)(F)F</chem>	3,82
258	 <chem>Cc1cc(Nc2nc3c(ncn3C4CCNCC4C)nc5c2cnc5C)ccn1COC(F)(F)F</chem>	1,99

100

N° de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
259		3,74
261		0,57
262		0,93

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	ESTRUCTURA	Procedimiento 1: Cl ₅₀ de PDE5 (nM)
263		0,27

Procedimiento 1A: Ensayo alternativo de proximidad de centelleo de inhibición de la enzima PDE5 de plaquetas humanas

- 5 La Cl₅₀ de la PDE5 de un compuesto de ensayo también se puede medir en un ensayo *in vitro* alternativo que varía del procedimiento 1 como se describe más adelante:

Ensayo de la Cl₅₀ de la PDE5 Formato de placas de microvaloración de 96 pocillos

- 10 **Reactivos**

Tampón A: Tris - HCl 20 mM, MgCl₂ 5 mM, pH 7,4

Tampón B: BSA 2 mg/ml en tampón A (tampón de enzima)

Sustrato de cGMP: Concentración final de 50 nM en ensayo

- 15 La cantidad de sustrato marcado con ³H depende de la actividad específica de [³H]cGMP, y se diluye en tampón A.

Enzima PDE: Preparada en tampón B. El factor de dilución se determina mediante actividad de la enzima.

192

Perlas de SPA: 4 mg/ml de suspensión preparada en dH₂O.

	<u>Control positivo</u>	<u>Control negativo</u>	<u>Patrón/ Compuesto de ensayo</u>
	3 µl de DMSO al 100%	3 µl de DMSO al 100%	3 µl de patrón/ compuesto ensayo
	27 µl de Tampón A	27 µl de Tampón A	27 µl de tampón A
5	30 µl de Enzima	30 µl de Tampón B	30 µl de enzima
	30 µl de Sustrato	30 µl de Sustrato	30 µl de sustrato
	30 µl de SPA para parar	30 µl de SPA para parar	30 µl de SPA para parar

Las soluciones madre de compuestos de ensayo se preparan a 2 mM en DMSO al 100%. El compuesto de ensayo se diluye en serie en una placa de dilución usando un formato de dilución 1/5 logarítmico de 10 puntos de manera que la concentración de partida en el ensayo es 2 µM para una selección de la CI_{50} inicial; las CI_{50} confirmatorias se hacen usando una dilución 1/3 logarítmica de 10 puntos. Se añaden 27 µl de tampón A a los pocillos de las placas de ensayo. A partir de la placa de dilución se distribuyen 3 µl de compuesto diluido por duplicado o se añaden 3 µl de DMSO al 100% (para controles positivos y negativos). Se añaden 30 µl de enzima. Para los pocillos de control negativo, se añade el tampón B en lugar de la enzima. Se añaden a todos pocillos 30 µl de sustrato marcado.

Después de incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente, la reacción se para con la adición de 30 µl de perlas de silicato de itrio. Estas perlas son densas y requieren agitación constante mientras se añaden a la placa. Las placas se sellan y se agitan en un agitador de placas durante quince minutos para permitir que las perlas se unan al producto de GMP.

Después de dejar que las perlas sedimenten durante 30 minutos, las placas se leen en un contador de centelleo NXT TopCount y se analizan los datos como sigue. Los valores de porcentaje de inhibición se calculan usando las medias de los controles al 0% y al 100% en cada placa. Las estimaciones de los 4 parámetros del modelo dosis - respuesta logístico, sigmoidal se

193

calculan después usando el valor de inhibición en porcentaje del nivel del pocillo para el compuesto. La fórmula del modelo logístico de cuatro parámetros se puede expresar como $Y = (a - d) / (1 + (X / c)^b) + d$, donde Y es la respuesta, X es la concentración, a es la asíntota inferior (respuesta mínima), d es la asíntota superior (respuesta máxima), c es la CI_{50} del modelo (en las mismas unidades que X), y b es la pendiente (como se describe en De Lean, A., P. J. Munson, y D. Rodbard ("Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves". Am. J. Physiol, 235 (2): E97 - E102, 1978). Estas estimaciones se usan para calcular la concentración que corresponde a un 50% de inhibición.

El compuesto de carboxipiperidina se ensayó de acuerdo con el procedimiento 1A. Los valores de CI_{50} de PDE5 correspondientes medidos se reseñan en la Tabla C.

15

Tabla C

Nº de ejemplo	Procedimiento 1A CI_{50} de PDE5 (nM)
1	0,051
2	0,051
3	0,039
4	0,045
5	0,023
6	0,026

19/11

Media	0,039
-------	-------

Los compuestos previamente descritos en los ejemplos del documento WO 2004096810 se ensayaron de acuerdo con el procedimiento 1A. Los valores de CI_{50} de PDE5 correspondientes medidos se reseñan en la Tabla D.

5

Tabla D

Documento WO 2004096810 Nº de ensayo	Procedimiento 1A CI_{50} de PDE5 (nM)
261	0,115
262	0,0755
263	0,0197

Procedimiento 2: Ensayo de proximidad de centelleo (SPA) de inhibición de la enzima PDE6 de retina humana

10 La inhibición de la actividad de la enzima PDE6 mediante un compuesto de ensayo se puede medir de acuerdo con el ensayo *in vitro* del procedimiento 1, pero usando la enzima PDE6 semipurificada aislada de retina humana, bovina o canina en lugar de la enzima PDE5. Este ensayo mide el valor de la CI_{50} de la PDE6 para el compuesto de ensayo (es decir, la

15 concentración del compuesto de ensayo requerida para inhibir en un 50% la hidrólisis catalizada por la enzima PDE6 de [^3H]GMP al 5' nucleótido [^3H]cGMP con relación a la actividad de los controles no inhibidos). El [^3H]GMP se une a perlas de SPA de silicato de itrio y se detecta mediante conteo de centelleo.

LAS

Purificación de la PDE6: La PDE6 se puede aislar y purificar a partir de lo siguiente: PDE6 de bastones soluble / PDE6 del segmento externo de bastones de ojos de bovinos (Charles River Ltd, Francia); PDE6 de conos de ojos de caninos (LAS); o PDE6 de conos y bastones soluble de ojos humanos (I.I.A.M.).

Tampón de homogeneización

Hepes 20 mM (Sigma) 2,383 gramos

EDTA 1 mM (Sigma) 0,186 gramos

Disolver en 300 ml de HPLC (Acros) o agua desionizada dos veces.

10 PMSF 100 mM (Sigma) 0,174 gramos/10 ml de etanol

Añadir 5 ml de solución de PMSF a tampón lentamente para evitar la precipitación.

Añadir Sacarosa 250 mM (Fisher) 42,78 gramos

Ajustar el volumen a 500 ml, agitar hasta disolución.

15 Ajustar el pH hasta 7,2 usando NaOH 1 M.

Almacenar a 4°C.

Preparación de la retina: Dejar que los ojos se descongelen hasta que estén blandos y hasta que la córnea y cristalino estén transparentes. Mientras que sujeta el ojo de forma que la córnea esté en la parte superior, realizar una

20 pequeña incisión a través de la conjuntiva por debajo del nivel del iris. La incisión debe ser suficiente para permitir que el humor se escape a través del corte. Usando unas tijeras finas, realizar un corte alrededor de la córnea para permitir que se despegue como una solapa. Usando un gancho pequeño, enganchar el cristalino y suavemente sacarlo fuera de la órbita, tener cuidado

25 de no sacar la retina al mismo tiempo. Dejar que la retina se caiga por su propia voluntad hasta la base de la órbita.

Uvaluar la retina con cuidado y localizar el nervio óptico. Cortar a través

yab

del nervio óptico y transferir la retina a una placa pequeña que contiene unos pocos ml de tampón de homogeneización. Suavemente hacer flotar la retina fuera fuera la superficie del tampón y retirar cualquier material pigmentado evidente del iris. Colocar la retina en una segunda placa con tampón de
5 limpieza para retirar las últimas pequeñas cantidades de pigmento y después transferir a un tubo de centrifuga de 50 ml Coming Costar (Sigma) y mantenerlo en hielo.

Aislamiento y purificación de la PDE6 de la retina: Dejar 2 ml del tampón de homogeneización por retina de bovinos y 1 ml por retina de perro y
10 de ser humano. Homogeneizar usando un homogeneizador de mano con ráfagas 3 x 5 segundos enfriando en hielo entre cada ráfaga. Filtrar el homogenato a través de dos capas de gasa quirúrgica. Centrifugar a 100.000 g durante 60 minutos a 4°C. Filtrar el citosol o bien a través de un paquete Steril-D de 0,22 μ m si existe suficiente volumen o a través de filtro terminado
15 en jeringa de 0,22 μ m (por ejemplo Millex ® GV). Procesar a través de FPLC (Pharmacia FPLC/Frac-100, Pharmacia) o dividir en alícuotas y almacenar en nitrógeno líquido según se necesite.

Procedimiento 2A: Ensayo alternativo de proximidad de centelleo (SPA) de inhibición de la enzima PDE6 de retina humana

20 La inhibición de la actividad de la enzima PDE6 mediante un compuesto de ensayo se puede medir de acuerdo con el ensayo *in vitro* del procedimiento 1A, pero usando la enzima PDE6 semipurificada aislada de retina humana, bovina o canina en lugar de la enzima PDE5. Este ensayo mide el valor de la CI_{50} de la PDE6 para el compuesto de ensayo (es decir, la
25 concentración del compuesto de ensayo requerida para inhibir en un 50% la hidrólisis catalizada por la enzima PDE6 de [^3H]cGMP al 5' nucleótido [^3H]GMP con relación a la actividad de los controles no inhibidos). El [^3H]GMP

se une a perlas de SPA de silicato de itrio y se detecta mediante conteo de centelleo.

Procedimiento 3: Ensayo de proximidad de centelleo (SPA) de inhibición de la enzima PDE11 recombinante humana

- 5 La inhibición de la actividad de la enzima PDE11 mediante un compuesto de ensayo se puede medir de acuerdo con el ensayo *in vitro* del procedimiento 1, pero usando la enzima PDE11 expresada en células de insecto Sf9 en lugar de la enzima PDE5. Este ensayo mide el valor de la CI_{50} de la PDE11 para el compuesto de ensayo (es decir, la concentración del compuesto de ensayo
- 10 requerida para inhibir en un 50% la hidrólisis catalizada por la enzima PDE11 de [^3H]cGMP al 5' nucleótido [^3H]GMP con relación a la actividad de los controles no inhibidos). El [^3H]GMP se une a perlas de SPA de silicato de itrio y se detecta mediante conteo de centelleo.

Expresión y purificación de la PDE11

- 15 (a) Expresión: Infectar 200 ml de células de insecto Sf9 (Invitrogen, Carlsbad, CA) (1×10^6 /ml) con una multiplicidad de infección de 2 usando un vector de expresión de baculovirus que contiene PDE-11A1 transpuesta (SEQ ID N°: 1) (sistema pFastBac, Invitrogen) (4×10^7 ufp/ml). Incubar a 27°C con agitación a 220 rpm durante 48
- 20 horas. Recoger las células infectadas mediante sedimentación centrifugando a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Almacenar el sedimento de células infectadas a -80°C hasta que esté listo para purificación. Resuspender los sedimentos de las células descongelados a 1×10^7 células/ml (= 20 ml de tampón constituido
- 25 por Hepes 20 mM (pH 7,2), EDTA 1 mM, sacarosa 20 mM, NaCl 150 mM y comprimidos de inhibidor de la proteasa). Mezclar completamente y dejar en reposo en hielo durante 10 minutos.

Sonicar 5 veces durante 5 segundos, en hielo. Centrifugar la mezcla a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4°C en SS34. Almacenar el sedimento insoluble a -80°C, y proceder a la purificación del material soluble.

- 5 (b) Purificación. Preparar la columna (1,0 cm de diámetro, Kontes) mediante enjuagado de la columna vacía dos veces con TBS. Después mezclar las perlas (Anti-FLAG M2 Agarosa, Sigma) con TBS y añadir a la columna - dejar que las perlas sedimenten. Lavar la columna con 3 volúmenes de columna de glicina 0,1 M (pH 3,5).
- 10 Después lavar la columna con 5 volúmenes de columna de TBS (no dejar que se procese en seco). Aplicar el extracto a la columna y dejar que el extracto entre por flujo de gravedad. Volver a aplicar el flujo a través de la columna. Lavar la columna con 15 volúmenes de columna de TBS. Eluir la proteína con 5 alícuotas de 1 ml de
- 15 péptido FLAG (Sigma) (es decir, 100 µg/ml en TBS). Eluir la proteína restante con 1 ml de glicina 0,1 M, e inmediatamente añadir 25 µl de Tris 1 M pH 8 para neutralizar.

Procedimiento 3A: Ensayo alternativo de proximidad de centelleo (SPA)

20 de inhibición de la enzima PDE11 recombinante humana

- La inhibición de la actividad de la enzima PDE11 mediante un compuesto de ensayo se puede medir de acuerdo con el ensayo *in vitro* del procedimiento 1A, pero usando la enzima PDE11 expresada en células de insecto Sf9 en lugar de la enzima PDE5. Este ensayo mide el valor de la CI_{50}
- 25 de la PDE11 para el compuesto de ensayo (es decir, la concentración del compuesto de ensayo requerida para inhibir en un 50% la hidrólisis catalizada por la enzima PDE11 de [^3H]cGMP al 5' nucleótido [^3H]GMP con relación a la

actividad de los controles no inhibidos). El [^3H]GMP se une a perlas de SPA de silicato de itrio y se detecta mediante conteo de centelleo.

El compuesto de carboxipiperidina se ensayó de acuerdo con el procedimiento 2, procedimiento 2A, procedimiento 3, y procedimiento 3A. Los valores de Cl_{50} de la PDE6 y PDE11 correspondientes medidos se reseñan en la tabla E.

Tabla E

Nº de ensayo	Procedimiento 2: Cl_{50} de la PDE6 (nM)	Procedimiento 2 A: Cl_{50} de la PDE6 (nM)	Procedimiento 3: Cl_{50} de la PDE11(nM)	Procedimiento 3A: Cl_{50} de la PDE11(nM)
1	4,01	5,12	19,5	14,3
2	3,89	2,43	20,0	16,5
3		4,88		16,8
4		2,12		26,0
5		5,74		28,4
6		3,72		19,6
MEDIA	3,95	3,74	19,8	19,7

10

Los compuestos previamente descritos en los ejemplos del documento WO 2004096810 se ensayaron de acuerdo con el procedimiento 2, procedimiento 2 A, procedimiento 3 y procedimiento 3A. Los valores de Cl_{50} de PDE6 y PDE11 correspondientes medidos se reseñan en la Tabla F.

15

Tabla F

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	Procedimiento 2: Cl ₅₀ de la PDE6 (nM)	Procedimiento 2 A: Cl ₅₀ de la PDE6 (nM)	Procedimiento 3: Cl ₅₀ de la PDE11(nM)	Procedimiento 3A: Cl ₅₀ de la PDE11(nM)
245	250		390	
246	657		4320	
248	9,92		316	
249	5,10		1190	
250	221		3120	
251	9,51		1862	
252	307		874	
253	100		312	
254	188		2880	
255	207		937	
256	275		913	
258	198		215	
259	204		199	
261	58,8	110	426	585
262	47,7	66,3	471	608

201

263	25,3	30,6	316	384
-----	------	------	-----	-----

Los ensayos adicionales que se pueden usar para evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo incluyen el procedimiento 4, procedimiento 4A, procedimiento 5 y procedimiento 6 descritos más adelante:

5 Procedimiento 4: Ensayo de anillo de aorta.

Se puede usar un ensayo *ex vivo* para medir el relajamiento directo de un anillo de aorta de rata expuesto a un compuesto de ensayo. Como se describe más adelante más específicamente, un compuesto de ensayo que inhibe la actividad de la PDE5 induce un relajamiento del anillo de la aorta
10 potenciando la señal de cGMP (es decir, mediante la inhibición de la hidrólisis catalizada por la enzima PDE5 de cGMP a GMP) provocada cuando el anillo de la aorta se expone a un donante de óxido nítrico exógeno estable, tal como dietiltriamina NONOato (diazén-1-*io*-1,2-diolato, también conocido como "DETA-NO"). El ensayo mide el valor de la CE₅₀ para el compuesto de ensayo
15 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que produce un 50% de la respuesta eficaz posible máxima para el compuesto de ensayo).

Se asfixiaron ratas macho Sprague-Dawley (250 - 350 g) usando gas CO₂ y se extrajeron cuidadosamente sus aortas torácicas y se colocaron en tampón de Krebs. Las aortas se diseccionaron cuidadosamente sin tejido
20 conectivo y se dividieron en 8 secciones, cada una de 3 - 4 mm de longitud.

Se suspendieron los anillos de la aorta entre cables de acero inoxidable paralelos en un baño de tejidos de 15 ml, con camisa de agua (37°C) bajo una tensión en reposo de 1 gramo. La tensión se mide usando transductores de tensión isométrica y se registraron usando un sistema de plataforma de tejido
25 Ponemah. Se deja que cada preparación se equilibre durante al menos 60

902

minutos antes de ensayar el compuesto. Durante este tiempo, los tejidos también se incuban con NG-monometil L-arginina 200 μ M ("L-NMMA"), y se cambió el medio de incubación cada 15 a 20 minutos (L-NMMA se añade después de cada lavado para mantener la concentración final a 200 μ M en cada baño de tejido).

Después del período de equilibrio, las tensiones iniciales se registran para cada tejido. Se determina la respuesta vasoconstrictora a fenilefedrina (1 μ M) y cuando la respuesta a fenilefedrina alcanza un máximo, se determina posteriormente la reactividad vascular mediante una estimulación de acetilcolina (1 μ M). Después de otro período de lavado, se registra un segundo valor inicial después de la adición de la noradrenalina vasoconstrictora (25 μ M) a cada baño y se incuban los tejidos durante un período de tiempo (aproximadamente 15 minutos) suficiente para que los tejidos alcancen un tono estable. Se suministra un estímulo de óxido nítrico exógeno usando el donante de óxido nítrico estable, DETA-NO. La concentración de DETA-NO se valora (de forma acumulada en incrementos semilogarítmicos) para lograr aproximadamente 5 a 15% de relajamiento de la preconstricción provocada por noradrenalina. Las curvas de concentración - respuesta acumulativas se construyen en un solo anillo, usando típicamente 5 dosis /anillo y dejando 15 minutos entre cada adición.

Procedimiento 4A: Ensayo alternativo de anillo de aorta.

El procedimiento 4 se puede modificar para proporcionar un protocolo alternativo para medir el relajamiento directo de los anillos de la aorta de rata expuestos a un compuesto de ensayo. El procedimiento alternativo varía del procedimiento 4 como se describe más adelante:

Para el procedimiento alternativo, se retira primero el endotelio mediante fricción cuidadosa del lumen del vaso conjuntamente entre los

dedos antes de preparar los anillos (anillos desnudos). La tensión en reposo se fija a 2 gramos y se determina la respuesta vasoconstrictora a una concentración máxima de fenilefrina (1 μ M), seguido (después de un período de lavado) de dos exposiciones adicionales a fenilefrina 300 nM. La relación
5 concentración - respuesta a noradrenalina se construye en cada tejido en el intervalo de concentración de 0,1 a 300 nM. Después de otro período de lavado, los tejidos se encogen con una concentración CE_{90} de noradrenalina para ensayar el compuesto.

Procedimiento 5: Ensayo Culex TM

10 El efecto de un compuesto de ensayo sobre la presión sanguínea arterial sistémica se puede evaluar en un modelo de rata hipertensa espontáneamente ("SHR") precanulada consciente. Este ensayo se lleva a cabo usando un sistema muestreador de sangre automatizado ("ABS"). El sistema ABS Culex TM (Bioanalytical System, Inc., West Lafayette, IN)
15 comprende un ordenador portátil, cuatro unidades de control y jaulas metabólicas. Este sistema ABS permite la recogida de múltiples muestras de sangre a partir de una sola rata sin provocar estrés excesivo al animal. Además, el sistema ABS permite la recogida de muestras de orina que se pueden usar potencialmente para identificaciones de biomarcador. Mediante
20 este planteamiento, se llevan a cabo estudios farmacocinéticos convencionales y de eficacia en ratas SHR conscientes no reprimidas de manera simultánea para definir la relación entre la concentración de fármaco libre en plasma o biomarcador (es) potencial (es) y el efecto farmacológico (reducción de la presión sanguínea arterial media).

25 Las ratas SHR de 12 a 16 semanas de edad, de peso aproximadamente 300 g, se someten a canulación quirúrgica de ambas venas yugulares y la arteria carótida derecha. Después de la recuperación

quirúrgica, los animales se colocan en las jaulas Culex™ y se atan a un brazo de sensibilidad al movimiento con un sensor que controla el movimiento de la jaula cuando el animal se mueve para evitar que los catéteres se tuerzan. Las conexiones se realizan entre el catéter de la yugular derecha y el entubado estéril Culex™ fijado para el muestreo de sangre, y el catéter de la yugular izquierda para la administración de compuesto, y el catéter en la arteria carótida derecha se conecta a un transductor de presión para controlar la presión sanguínea. Para mantener la evidencia de los catéteres, la cánula de la yugular derecha se mantiene por la función "de servicio" del Culex™ que enjuaga el catéter con 20 µl de solución salina de heparina (10 unidades/ml) cada 12 minutos o entre los episodios de muestreo, y la cánula de la yugular izquierda se carga con solución salina de heparina (20 unidades/ml). La evidencia de la cánula de la carótida derecha se mantiene mediante una infusión lenta de la solución salina de heparina o bien directamente en el entubado de extensión cuando la presión sanguínea no se registra o mediante el transductor de presión durante el control de la presión sanguínea. Se deja que los animales se aclimaten durante al menos dos horas antes de la evaluación del compuesto. El compuesto de ensayo se puede administrar por vía intravenosa o mediante sonda oral. Los protocolos de muestreo de sangre (tiempo y volumen de muestreo) se programan usando el software Culex™. La cantidad total de sangre extraída de cada animal no excederá de 750 µl/24 horas y 10 ml/kg en dos semanas. Se controlan el ritmo cardíaco, presión sanguínea, y concentración de fármaco. Se registran la presión sanguínea arterial sistémica y ritmo cardíaco mediante PONEMAH (Gould Instrument System, Valley View, OH), un transductor de presión mediante un sistema de adquisición de datos para registrar la presión sanguínea y ritmo cardíaco, durante 6 a 24 horas basándose en el protocolo experimental. La presión

205

sanguínea arterial media (punto final principal) se analiza para determinar la eficacia del compuesto.

Se analizan las muestras de sangre para medir la concentración de fármaco en plasma, usando el procedimiento CL/EM/EM descrito más adelante, y para evaluar los potenciales biomarcadores.

Procedimiento CL/EM/EM

Preparación de muestras: Se mezclan muestras de plasma (50 µl sin conocer, control o blanco) con 10 µl de acetonitrilo:agua o una solución patrón del compuesto de ensayo y 150 µl de solución patrón interna (100 ng/ml del compuesto de ensayo en acetonitrilo). La mezcla se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos, y se transfieren 125 µl del sobrenadante a una placa de 96 pocillos. El disolvente se evapora en una corriente de nitrógeno y el residuo se reconstituye con 80 µl de acetonitrilo/ácido fórmico acuoso al 0,1% (20:80 v/v).

Un volumen de 20 µl de cada muestra preparada se inyecta en una columna Phenomenex Synergi 4 µm MAX-RP 2,0 x 75 mm y se eluyó a 0,4 ml/min usando elución en gradiente desde ácido fórmico acuoso al 0,1% (fase móvil A) a acetonitrilo (fase móvil B). El programa de gradiente consta de aplicación inicial de fase móvil A al 90%, seguido de un gradiente lineal hasta fase móvil B al 75% desde 0,2 a 1,15 minutos después de la inyección y se mantuvo en la fase móvil B al 75% hasta 2,0 minutos. La fase móvil se cambió linealmente otra vez hasta fase móvil A al 90% desde 2,00 a 2,10 minutos, y la siguiente inyección tuvo lugar a 3,00 min. La detección se realizó mediante espectrometría de masas usando ionización por electropulverización (IEP) de ion positivo con un control de reacción múltiple de las transiciones m/z 454,00 (MH + el compuesto de ensayo) → m/z 408,00, m/z 466,24 (MH + el compuesto de ensayo) → 409,33. El voltaje de pulverización iónica se fija a 5000. Se construye una curva de calibración usando relaciones de las áreas

206

de los picos del analito con relación al patrón interno. Las concentraciones sujetos se determinan mediante una predicción inversa a partir de sus relaciones de las áreas de los picos contra la curva de calibración.

5 Procedimiento 6: Implante de radio transmisores y posterior selección de la presión sanguínea mediante telemetría en ratas hipertensas espontáneamente

El efecto de un compuesto de ensayo sobre la presión sanguínea arterial sistémica se puede evaluar en un modelo de rata hipertensa espontáneamente ("SHR") usando telemetría. Las ratas SHR se anestesian con gas isoflurano mediante una máquina de anestesia de isoflurano que se calibra para distribuir isoflurano en un intervalo de porcentajes a medida que el oxígeno pasa a través de las cámaras internas de la máquina. Los animales se colocan en una cámara de inducción y se administra isoflurano al 4 - 5% para alcanzar un plano quirúrgico de anestesia. Después se mantienen al 1 - 10 2% durante el procedimiento quirúrgico mediante un cono nasal, distribuyéndose el isoflurano mediante un dispositivo de anestesia de isoflurano más pequeño en la mesa quirúrgica.

Después de la administración de la anestesia, a las ratas se les implantan transmisores usando procedimientos asepticos con unidades de radio telemetría, estériles disponibles en el medio (Data Sciences, 20 Internacional, Roseville, MN 55113 - 1136). Antes de cirugía se afeita el campo quirúrgico, se friega con solución antimicrobiana de la marca Dial™ (que contiene gluconato de clorhexidina al 4% y alcohol isopropílico al 4%) seguido de una aplicación de una solución pulverización de yodo (10%). Se realiza una laparotomía de 2,5 a 3,0 cm y las unidades de radio-telemetría se 25 implantan en el abdomen, con la punta del catéter insertada en la aorta abdominal. Se usan retractores Baby Weitlaner para retener el tejido blando.

Una sección de 1 cm de la aorta abdominal se disecciona parcialmente y esa sección se pinza de manera cruzada brevemente, se perfora con una aguja de calibre 21 y la punta del catéter del transmisor se introduce en el vaso y se asegura mediante una sola sutura con hilo de seda 4,0 anclada al músculo psoas adyacente. Después el cuerpo del transmisor se inserta en la cavidad abdominal y se asegura simultáneamente a la pared del músculo abdominal mientras se cierra con sutura continua con hilo de seda 4,0. La capa de piel se cierra con sutura absorbible 4,0 continua subdérmica. Una administración subcutánea (s. c.) de marciana seguida de una aplicación tópica de yodo se administra en y alrededor de la línea de sutura, respectivamente, tras el cierre. Todas las ratas reciben una inyección postoperatoria de buprenorfina a 0,05 mg/kg s. c. antes de que recupere la conciencia. Un volumen de dosis típico para una rata de 0,300 kg será 0,050 ml. Las ratas se deben recuperar completamente de su anestesia operativa antes de la administración de buprenorfina. Después reciben la misma dosis una vez al día durante dos días consecutivos, salvo que el animal muestre que está en un dolor postoperativo comprometedor.

Después de la cirugía, las ratas se vuelven a sus jaulas y se alojan individualmente en una jaula de fondo sólido con lecho de papel. Se deja un período de no menos de 7 días para la recuperación antes de que se inicien los procedimientos experimentales. Se ha observado que las ratas son típicamente hipertensas durante varios días después de la cirugía y vuelven a niveles de "tensión normal" aproximadamente el 7º día después de la cirugía. Se alimentan con comida de pienso de rata convencional y agua a voluntad a lo largo del tiempo experimental.

Los compuestos de ensayo se administran por vía intragástrica (i. g) mediante sonda nasofaríngea, usando una aguja de sonda nasofaríngea de

acero inoxidable, de 2,5 pulgadas (6,35 cm) de calibre 18 con un extremo en bola. Para la dosificación diaria individual, el volumen diario es 3,33 ml/kg. i. g. El volumen de dosis para el compuesto de ensayo es aproximadamente 1 ml/rata. Los vehículos en los que el compuesto de ensayo se administra es metilcelulosa (0,5%) + Tween 80 (0,1%) en tampón citrato 50 mM pH = 5,0.

Los datos de presión sanguínea se obtendrán usando el programa de adquisición de datos de Data Sciences International (Versión 3.0). Las muestras de presión sanguínea se registran a intervalos de 1,5 - 3 minutos durante una duración de 5 segundos 24 horas al día durante el estudio entero.

- 10 Estos datos se procesan mediante el software de análisis de datos de Data Science en promedios de los intervalos de tiempo deseados. Toda la otra reducción de datos se realiza en hojas de cálculo Microsoft Excel™.

O. Ensayos de toxicidad

Procedimiento 7: Ensayos de micronúcleos

- 15 Un ensayo de micronúcleos *in vitro* se puede usar para determinar el potencial mutagénico de un compuesto de ensayo. Este ensayo detecta anomalías de cromosomas que se producen por la exposición a un compuesto de ensayo midiendo la formación de pequeños fragmentos de ADN unidos a membrana tales como micronúcleos en el citoplasma de células de interfase.
- 20

- El ensayo se lleva a cabo usando células de ovario de hámster chino (CHO) en diferentes condiciones de ensayo en ausencia y presencia de activación metabólica. La concordancia de resultados entre este ensayo de selección y la citogenética *in vitro* es aproximadamente el 85%. El ensayo directo (-S9) se lleva a cabo usando tratamientos continuos de 24 horas o 3 horas, mientras que el ensayo con activación metabólica (+S9) implica un tratamiento de 3 horas. La clastogenicidad se indica mediante un incremento
- 25

en el número de células micronucleadas en la primera interfase después de exposición (en células binucleadas con citocinesis bloqueada). Los resultados se comparan con el nivel de citotoxicidad (medida por la proporción de células binucleadas) que produce un compuesto de ensayo. Para demostrar la validez del ensayo, se requieren controles negativos (tratado con vehículo) y positivos (un respondedor conocido) que respondan dentro intervalos históricos establecidos.

Negativo - Un resultado negativo se identifica con ausencia de peligro genotóxico definido por el punto final del ensayo específico (por ejemplo, micronúcleo *in vitro* negativo). Un compuesto de ensayo que muestra una respuesta negativa no ha cumplido el criterio de evaluación específico para el ensayo que puede incluir uno o ambos de lo siguiente: 1) un incremento reproducible dependiente de la concentración en el punto final de ensayo específico cuando se compara con un control negativo (vehículo) y/o 2) una o más concentraciones de ensayo que logran un número de veces de incremento mínimo en el punto final específico sobre los controles.

Positivo - Un resultado positivo se identifica con un peligro genotóxico definido mediante el punto final de ensayo específico (por ejemplo, micronúcleo *in vitro* positivo). Un compuesto de ensayo que muestra una respuesta positiva ha cumplido el criterio de evaluación específico para el ensayo que puede incluir uno o ambos de lo siguiente: 1) un incremento reproducible dependiente de la concentración en el punto final de ensayo específico cuando se compara con un control negativo (vehículo) y/o 2) una o más concentraciones de ensayo que logran un número de veces de incremento mínimo en el punto final específico sobre los controles.

Equívoco - Un resultado equívoco se reserva para situaciones en las que el compuesto de ensayo se ha evaluado en una prueba o pruebas de

ensayo válido (s) (es decir, criterios de aceptabilidad de ensayo satisfactorios), pero no muestra un resultado negativo o positivo como se define mediante criterios de evaluación establecidos. Esto puede acarrear la presencia de una respuesta positiva débil que requiere ensayo repetido adicional o ensayo confirmatorio eventual caso por caso.

No concluyente - Un resultado no concluyente se reserva para situaciones en las que el compuesto de ensayo se ha evaluado en una prueba de ensayo no válido (es decir, criterios de aceptabilidad de ensayo no satisfactorios por razones técnicas, por ejemplo los controles negativos o positivos no responden de manera apropiada). Se recomienda ensayo de repetición con el fin de establecer un resultado de prueba de ensayo válido.

El compuesto de carboxipiperidina se ensayó de acuerdo con el procedimiento 7 y produjo un resultado equívoco.

Los compuestos descritos anteriormente en los ejemplos del documento WO 2004096810 se ensayaron de acuerdo con el procedimiento 7. Los resultados del ensayo de micronúcleo correspondientes se reseñan en la tabla G.

Tabla G

Nº de ejemplo del documento WO 2004096810	Procedimiento 7: Ensayo de micronúcleo
261	Positivo
262	Equívoco
263	Positivo

211

Los ensayos adicionales que se pueden usar para evaluar la toxicidad de un compuesto de ensayo (por ejemplo, cuando el ensayo de micronúcleo produce un resultado equivoco) incluyen el procedimiento 8, procedimiento 9, y procedimiento 10 descritos más adelante:

Procedimiento 8: Aberración estructural de cromosomas *in vitro* en linfocitos periféricos humanos

- 10 Se puede usar un ensayo de aberración estructural de cromosomas *in vitro* para evaluar en un compuesto de ensayo la capacidad para inducir aberraciones estructurales y numéricas de cromosomas en presencia y ausencia de activación metabólica de mamíferos en linfocitos periféricos humanos.
- 15 Los cálculos de concentración se basan en el factor del resto correspondiente de 1,000. El compuesto de ensayo se disuelve y se diluye en DMSO, que servirá como el control de vehículo a un volumen equivalente al que se usa para administrar el compuesto de ensayo (concentración final al 1%).
- 20 Se añade sangre de vena periférica humana heparinizada de un voluntario masculino sano a medio de cultivo, seguido de la adición de fitohemaglutinina M (Sigma Chemical Co., Saint Louis, Missouri) para estimular la división celular de linfocitos. Los cultivos primarios se incuban durante al menos 46 horas antes del tratamiento con el compuesto de ensayo.
- 25 Se utiliza el siguiente control positivo:

Tabla 1. Controles positivos

7/2

Control Positivo	Activación metabólica	Tiempo de incubación del compuesto de ensayo (horas)	Concentración (µg/ml)
Ciclofosfamida (CP)	+	3	10
Mitomicina C (MMC)	-	3	0,4
Mitomicina C (MMC)	-	24	0,1

Se utilizan los siguientes tratamientos:

Tabla 2. Condiciones de tratamiento

Tratamiento	Tiempo de incubación del compuesto de ensayo (horas)	Activación metabólica (S9)	Tiempo de recogida (horas)
(1) 3-Hr +S9	3	+	24
(2) 3-Hr -S9	3	-	24
(2) 24-Hr -S9	24	-	24

5

Se seleccionan para el ensayo los siguientes niveles de dosis:

Tabla 3. Niveles de dosis

Tratamiento	Concentraciones (µg/ml)
(1) 3-Hr +S9	100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700

213

(2) 3-Hr -S9	100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700
(3) 24-Hr -S9	50, 75, 100, 200, 250, 300, 350, 400

Se administran dosis de cultivos individuales de células para cada concentración y un control de vehículo. Los cultivos de células se exponen a 0,1 µg/ml de Colcemid ® (Ciba, Suiza) durante dos horas antes de la recolección. Las células se recogen mediante centrifugación, se hinchan en una solución hipotónica y después se fijan en una solución fijadora de metanol:ácido acético glacial. La suspensión de células fijadas se deposita por goteo en portaobjetos de microscopio húmedos, se secan, y se tiñen con Giemsa. Para cada concentración de fármaco ensayado, se preparan al menos 2 portaobjetos por cultivo.

La citotoxicidad se mide mediante una determinación de morfología de cromosoma y de la inhibición de mitosis (índice mitótico). Se determina un índice mitótico para todas las condiciones de tratamiento puntuando 1000 células por condición para la proporción de células en metafase.

La concentración máxima seleccionada para la puntuación de aberraciones de cromosomas es la dosis mayor a la que se espera un número suficiente de células en metafase analizables. Si es posible, la dosis mayor seleccionada suprimiría el índice mitótico en una reducción de aproximadamente 50%, pero no superior al 70%.

Al menos una concentración en cada una de las condiciones de ensayo se selecciona para análisis junto con el vehículo de manera simultánea y control positivo. Los portaobjetos no se analizan de una manera ciega. A la discreción del director del estudio, las concentraciones de ensayo adicionales se pueden evaluar después de que la evaluación inicial se haya completado

7/14

para proporcionar la clarificación adicional de un efecto (es decir, incremento o ausencia de aberraciones).

La concentración de ensayo más alta seleccionada para análisis debe cumplir 1 de los siguientes criterios: (1) produce aproximadamente una
5 reducción de un 50% del índice mitótico comparada con los controles de vehículo, (2) muestra evidencia de solubilidad incompleta, o (3) es equivalente a la concentración máxima de 5000 µg/ml o 10 mM (la que sea menor). Cuando es posible, se evalúa en 100 células en metafase diploides aceptables de cada cultivo el daño en cromosomas. Una excepción a esto es
10 un incremento aparente en la frecuencia de células anormales durante la recogida de datos (es decir, > 10 células aberrante se cuentan en las primeras 50 células aceptables) en este caso se interrumpe el análisis posterior. Las células en metafase seleccionadas para análisis deben estar intactas (es decir, tienen 46 ± 2 cromosomas), y tienen un mínimo de superposición de
15 cromosomas. Además, los cromosomas deben aparecer alargados de manera que los brazos individuales y regiones centroméricas se puedan identificar fácilmente. Cada célula en metafase se clasifica como normal o anormal con el (los) tipo (s) y número de anomalías presentes por célula registrada. Para las células anormales, se registran las coordenadas X e Y vernier de la
20 platinadel portaobjetos. Las aberraciones estructurales de cromosomas se clasifican como rotura de cromátida (Ct brk), fragmentos de cromátida (Ct Frg), daño de cromátida incluyendo intercambios, anillos, dicéntricos y translocaciones (R), roturas de cromosomas (Cs Brk), fragmentos de cromosomas (Cs Frg) y roturas múltiples (M). Además, las células con
25 cromosomas pulverizados (PV) se recogen en el número de aberraciones totales. Las células que contienen huecos se registran pero no se incluyen en el número de aberraciones totales. Las aberraciones de cromosomas

215

numéricas se determinan para cada condición de tratamiento y los controles de vehículo simultáneos mediante la evaluación del número de células poliploides y endorreduplicadas. Los índices de poliploidia se obtienen puntuando cuando sea posible 1000 células en metafase / cultivo mientras se
5 tabula el número de células en metafase que son poliploides o endorreduplicadas.

Un ensayo de 1 cola exacto de Fisher sobre el número total de células aberrantes de cada grupo tratamiento comparado con las células aberrantes totales de los controles negativos se usa como análisis estadístico. ⁵ Un valor
10 de $p \leq 0,05$ se considera que es estadísticamente significativo.

Se considera un ensayo válido si se cumplen los siguientes criterios:

1. El control positivo induce un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de células con aberraciones de cromosomas
15 cuando se compara con el control de vehículo simultáneo y las frecuencias inducidas son comparables con los datos publicados o históricos.

2. Cultivos de control de vehículo tienen $\leq 3\%$ de células con aberraciones o un porcentaje considerado comparable con los datos
20 publicados o históricos.

3. Aproximadamente un 50% de inhibición de índice mitótico se observa al nivel de dosis más alto. Este requerimiento no es aplicable a compuestos de ensayo para los que no se podría lograr citotoxicidad aparente a la
25 concentración máxima soluble o dosis permisible más alta.

Procedimiento 9: Estudio de toxicidad d sonda oral de siete días en la

7/16

rata SD/IGS macho

La toxicidad de un compuesto de ensayo se puede evaluar en un modelo de rata. Este estudio determina la potencial toxicidad de y una exposición sistémica a los compuestos de ensayo, cuando se administra mediante sonda oral, una vez al día, durante 7 días consecutivos, a ratas macho de 6 a 8 semanas de edad Charles River SD/IGS que pesan entre 175 g y 200 g. Este estudio se lleva a cabo usando el sistema Xybion path/Tox (Xybion Medical Systems Corporation, Cedar Knolls, NJ).

El compuesto de ensayo se dosifica por vía oral una vez durante 7 días por sonda nasofaríngea a un volumen de 10 ml/kg de peso corporal. El compuesto de ensayo se administra a 3 grupos de ratas (n = 5) consiguiendo dosis de 30 mg/kg/día, 100 mg/kg/día, y 500 mg/kg/día, respectivamente. Un grupo de control (n = 5) recibe vehículo (metilcelulosa al 0,5% (p/v) y Polisorbato 80 al 0,1% (v/v) en tampón fosfato 50 mM). La vía oral se usa debido a que es la vía propuesta de exposición en seres humanos. La cantidad apropiada de compuesto de ensayo se suspende en metilcelulosa al 0,5% (p/v) y polisorbato 80 al 0,1% (v/v) en tampón citrato 50 mM. El pH de la suspensión de dosificación se mantiene entre 3 y 9.

Cada animal se desangra en serie a 1, 3, 8 y 24 horas después de la dosis el día 1. Se recoge orina aproximadamente 24 horas para análisis metabólico. Las observaciones de supervivencia y mortalidad se llevan a cabo una vez al día durante el período de pretratamiento. Los signos clínicos se observan diariamente, 1 - 3 horas después de la dosis. Los animales se sacrifican mediante exanguinación después de 7 días. Los animales encontrados muertos se refrigeran y se les hace la necropsia en el tiempo más temprano posible (dentro de las horas de trabajo). No se recogen los pesos corporales terminales, muestras de sangre y pesos de de los animales

7/17

encontrados muertos. Los animales moribundos/n programados/programados que se sacrifican se toman inmediatamente para necropsia, y se recogen los pesos corporales, muestras de sangre, y todas las muestras de patología clínica excepto las muestras de orina.

- 5 Se pesarán diversos tejidos (adrenal, hueso de fémur, cerebro, ciego, colon, duodeno, epidídimo, corazón, íleon, yeyuno, riñón, hígado, páncreas, músculo esquelético femoral del bíceps, bazo, estómago, testículos, tim, tiroides, médula espinal lumbar, y ganglio linfático mesentérico), se ultracongelan, se tiñen y se fijan. Después de examen macroscópico, los
- 10 tejidos recogidos con grandes anomalías se mantienen en formalina. Todos los tejidos recogidos con grandes anomalías se procesan y se examinan microscópicamente por el patólogo. Los tejidos se cortan, se incrustan, se seccionan, y se tiñen con hematoxilina y eosina y se examinan microscópicamente por el patólogo a la discreción del patólogo. Se preparan
- 15 frotis de médula ósea y se tiñen con tinte de Wright. Para aclarar la naturaleza del cambio de tejido de animales individuales, se lleva a cabo la recogida de tejido adicional, corte en secciones, tinción y examen microscópico según requiera el patólogo.

Las observaciones clínicas, pesos corporales, observaciones de

20 necropsia, y hallazgos histopatológicos se introducen directamente en el Sistema Xybion Path/Tox:

Procedimiento 10: Ensayo de mutación de genes BioLum Ames

- Un ensayo de mutagenicidad de *Salmonella* (también conocido como el ensayo Ames) se puede usar para determinar el potencial mutagénico de un
- 25 compuesto de ensayo. Este ensayo mide la tasa de mutación de las bacterias que se exponen a un compuesto de ensayo. Véase, por ejemplo, Ames, B. N., Durston, W. E., Yamasaki, E. y Lee, F. D. (1973) Carcinogens are mutagens:

218

a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl Acad Sci USA, 70, 2281 - 2285). Algunos carcinógenos se hacen activos cuando se transforman enzimáticamente en una especie electrófila capaz de unirse covalentemente a ADN. En el ensayo
5 Ames, se preparan fracciones S9 (sobrenadante de 9000 g) a partir de los hígados de ratas pretratadas con fenobarbital (PB)/5,6-benzoflavona (BF) o Aroclor 1254 para inducir la actividad de la enzima que metaboliza tal fármaco.

El ensayo de BioLum Ames es una versión de selección de mayor
10 rendimiento del ensayo de mutación de genes bacterianos (Ames) convencional. Para demostrar la validez del ensayo, se requieren controles negativos (tratados con vehículo) y positivos (un respondedor conocido) que responde dentro de intervalos históricos establecidos.

Negativo - Un resultado negativo se identifica con la ausencia de
15 peligro genotóxico definido por el punto final del ensayo específico (por ejemplo, micronúcleo *in vitro* negativo). Un compuesto de ensayo que muestra una respuesta negativa que no ha cumplido el criterio de evaluación específico para el ensayo que puede incluir uno o ambos de lo siguiente: 1) un incremento reproducible dependiente de la concentración en el punto final de
20 ensayo específico cuando se compara con un control negativo (vehículo) y/o 2) una o más concentraciones de ensayo que logran un número de veces de incremento mínimo en el punto final específico sobre los controles.

Positivo - Un resultado positivo se identifica con un peligro genotóxico definido mediante el punto final de ensayo específico (por ejemplo,
25 micronúcleo *in vitro* positivo). Un compuesto de ensayo que muestra una respuesta positiva ha cumplido el criterio de evaluación específico para el ensayo que puede incluir uno o ambos de lo siguiente: 1) un incremento

219

reproducible dependiente de la concentración en el punto final de ensayo específico cuando se compara con un control negativo (vehículo) y/o 2) una o más concentraciones de ensayo que logran un número de veces de incremento mínimo en el punto final específico sobre los controles.

- 5 Equívoco - Un resultado equívoco se reserva para situaciones en las que el compuesto de ensayo se ha evaluado en una prueba o pruebas de ensayo válido (es decir, criterios de aceptabilidad de ensayo satisfactorios), pero no muestra un resultado negativo o positivo como se define mediante criterios de evaluación establecidos. Esto puede acarrear la presencia de una
- 10 respuesta positiva débil que requiere ensayo repetido adicional o ensay confirmatorio eventual caso por caso.

- No concluyente - Un resultado no concluyente se reserva para situaciones en las que el compuesto de ensayo se ha evaluado en una prueba de ensayo no válido (es decir, criterios de aceptabilidad de ensayo no
- 15 satisfactorios por razones técnicas, por ejemplo los controles negativos o positivos no responden de manera apropiada). Se recomienda ensayo de repetición con el fin de establecer un resultado de prueba de ensayo válido.

P. Estudio de farmacocinética/Farmacodinámica

- 20 Procedimiento 11. Farmacocinética de dosis individual y biodisponibilidad oral en rata macho Sprague - Dawley después de administración intravenosa y oral.

- Se puede usar un modelo *in vivo* para evaluar las propiedades farmacocinéticas de una dosis individual y la biodisponibilidad oral absoluta de
- 25 un compuesto de ensayo. Como se describe más específicamente a continuación, se administra un compuesto de ensayo a ratas Sprague - Dawl y (SD) o bien por vía intravenosa u oral en un diseño de estudio de

sobrecruzamiento y se miden las propiedades farmacocinéticas resultantes y la biodisponibilidad oral se miden.

A ratas macho se les administran una dosis por vía oral de 2,0 mg/kg (n = 2) mediante sonda nasofaríngea en forma de una suspensión (metilcelulosa al 0,5%/Tween 80 al 0,1% en agua destilada). Después de 72 horas de periodo de lavado, a las mismas ratas se les administra una dosis embolada de 2,0 mg/kg por vía intravenosa (n = 2) en forma de una solución (PEG 400 al 70%/ tampón citrato 0,05 M al 20% pH 3/etanol al 10%). Se recogen muestras de sangre en serie (para plasma) de cada rata durante 24 horas después de la dosis para cada vía. Las concentraciones en plasma del compuesto de ensayo se determinan usando un procedimiento CL/EM/EM con un límite inferior de cuantificación (LLOQ) de 1,2 (para -534) ng/ml. Los parámetros farmacocinéticos de un compuesto de ensayo se determinan a partir de los datos de concentración en plasma - tiempo usando procedimientos no compartamentales.

CL/EM/EM: 1) Columna: Hyperso; columna AQUASIL C-18 2,1 x 20 mm, 3,0 µm; 2) fase móvil: Acuosa agua con ácido fórmico al 0,1%, Orgánica: acetonitrilo; ionización: +IEP (IPA 4000), MRM: m/z 494,4 → m/z 394,0 (ejemplo 261 en el documento WO 2004096810), m/z 509,44 → m/z 409,80 (ejemplo 263 en el documento WO 2004096810), m/z 495,33 → m/z 395,20 (ejemplo 262 en el documento WO 2004096810). Los límites de detección son 0,12 ng/ml (ejemplo 261 del documento WO 2004096810), 1,3 ng/ml (ejemplo 263 del documento WO 2004096810) y 0,11 ng/ml (ejemplo 262 del documento WO 2004096810).

Watson (versión 6.4.0.04) se usa para calcular las concentraciones medias del compuesto de ensayo, las desviaciones típicas (SD) correspondientes, y porcentaje de coeficiente de variación (%CV), y para

estimar parámetros farmacocinéticos (derivados mediante procedimientos no compartamentales) y parámetros estadísticos asociados (media, SD y % CV) si es aplicable. (Ya que $n = 2$, no se calcula ni la SD ni CV?). Las concentraciones por debajo del límite de cuantificación (BLQ) se reseñan como cero (0) y se usan en la evaluación de las concentraciones medias y la estimación de AUC. La concentración en plasma máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y el tiempo para alcanzar la concentración máxima ($t_{m\acute{a}x}$) se registran directamente a partir de los perfiles de concentración en plasma - tiempos individuales. La fase lineal logarítmica terminal de la curva concentración en plasma - tiempo se identifica mediante regresión lineal de los puntos de datos. La semivida terminal ($t_{1/2}$) se calcula como $\ln(2)$ dividido por un valor absoluto de la pendiente de la fase lineal logarítmica terminal. El área bajo la curva concentración en plasma - tiempo desde el tiempo cero hasta el tiempo de la última concentración cuantificable (t) [$AUC_{(0-t)}$] se determina usando el procedimiento trapezoidal lineal. El área bajo la curva concentración en plasma - tiempo desde el tiempo cero hasta infinito [$AUC_{(0-\infty)}$] se determina como $AUC_{(0-t)}$ más el área extrapolada. El área extrapolada se determina dividiendo la última concentración en plasma observada por la pendiente de la fase lineal logarítmica terminal. La eliminación del plasma sistémica (CL) se calcula como la dosis/ $AUC_{(0-\infty)}$ mientras que el volumen de distribución en el estado estacionario (V_{dss}) se calcula como $CL \times MRT$, donde MRT (tiempo de residencia medio) se define como $AUMC_{(0-\infty)}/AUC_{(0-\infty)}$. La biodisponibilidad PO absoluta (F) se calcula como una relación entre la $AUC_{(0-\infty)}$ normalizada por la dosis del animal individual después de la administración Po y la $AUC_{(0-\infty)}$ normalizada por la dosis del animal individual después de la administración IV dada por el diseño del estudio de sobrecruzamiento. La concentración en plasma máxima ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo para alcanzar la concentración máxima ($t_{m\acute{a}x}$),

la semivida terminal ($t_{1/2}$), el área bajo la curva concentración en plasma - tiempo desde el tiempo cero hasta infinito [$AUC_{(0-\infty)}$], el volumen de la distribución en el estado estacionario (V_{dss}), la eliminación del plasma sistémica (CL), y la biodisponibilidad PO absoluta (F) se muestran en la tabla

5 C.

El compuesto de carboxipiperidina se ensayó de acuerdo con el procedimiento 11 y los resultados se reseñan en la tabla H. Los compuestos previamente descritos en los ejemplos del documento WO 2004096810 se ensayaron de acuerdo con el procedimiento 11. Los

10 resultados de estos compuestos también se muestran en la tabla H.

223

Tabla H. Resumen de los parámetros PK medios

Compuesto	Vía	Dosis (mg/kg)	N	C _{max} (ng/ml)	t _{max} (hr)	t _{1/2} (hr)	AUC (0-∞) (ng·hr/ml)	V _{dss} (l/kg)	CL (ml/min/kg)	F (%)
Compuesto de carboxipiperidina	iv	2	2			6.3	17500	0,715	1,9	
	po	2	3	1380±216	0,5±0,2	5,7±0,2	8070±2300			51,8±13,1
Ejemplo 251 del documento WO2004096810	iv	2	2			6.4	18017	0,584	1,75	
	po	2	2	2351	0,67	6.7	20040			105
Ejemplo 252 del documento WO2004096810	iv	2	2			5,5	440	6,11	75,3	
	po	2	2	87,1	0,67	3,4	280			63,9
Ejemplo 263 del documento WO2004096810	iv	2	2			4,5	555	6,07	80,1	
	po	2	2	102	0,33	3,8	329			60,0

Q. Protocolos biológicos - Coadministración con el inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina

Procedimiento 12: Terapia de combinación de ratas SHR

Se llevó a cabo un estudio para determinar el efecto de la dosificación oral repetida del compuesto de carboxipiperidina sobre la reducción de la presión sanguínea y si la coadministración del compuesto de carboxipiperidina y el inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina enalapril podría dar como resultado una reducción adicional de la presión sanguínea. El estudio consistía en el tratamiento de ratas hipertensas espontáneamente (SHR) telemedidas como se describe en el procedimiento F con el compuesto de carboxipiperidina (1 mg/kg una vez al día por vía oral) y enalapril (0,007% en agua de bebida) solos y en combinación durante 7 días (figura 1) (n = 12/grupo). El compuesto de carboxipiperidina reducía la presión sanguínea a partir de un valor inicial antes de la dosis en comparación con un grupo tratado con vehículo en 11 ± 1 mm de Hg ($1,47 \pm 0,13$ kPa) el día 1. La reducción de la presión sanguínea se mantuvo durante el período de 7 días permaneciendo 9 ± 1 mm de Hg ($1,20 \pm 0,13$ kPa) por debajo del valor inicial antes de la dosis el día 7.

El enalapril también reducía la presión sanguínea respecto a un valor inicial antes de la dosis en comparación con un grupo tratado con vehículo con una reducción máxima de 22 ± 2 mm de Hg ($2,93 \pm 0,27$ kPa) el día 7. La combinación del compuesto de carboxipiperidina más enalapril reducía la presión sanguínea más de lo que cada agente en solitario reducía la presión sanguínea todos los días.

Los cambios en el biomarcador mecanístico de cGMP urinario se determinaron durante el período de 24 horas el día 9. El cGMP estaba elevado en una recogida de orina d 0 - 24 horas tanto en el grupo del

compuesto de carboxipiperidina como en el grupo de la combinación del compuesto de carboxipiperidina + enalapril en comparación con el grupo tratado con vehículo (Figura 2) (n = 12/grupo).

Todos los documentos mencionados en esta solicitud se incorporan expresamente por referencia si se mostraran en su totalidad. Cuando se introducen elementos de la presente invención o de la / las realización (ones) preferidas de la misma, los artículos "uno (a) (os) (as)", "el (la) (los) (las)" y "dicho (a) (os) (as)" pretenden significar que hay uno u más elementos. Los términos "comprendiendo", "incluyendo" y "teniendo" pretenden ser inclusivos y significan que pueden haber elementos adicionales distintos de los elementos enumerados.

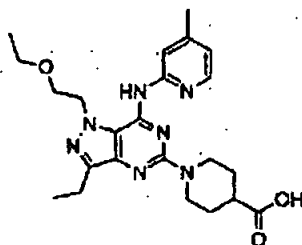
276

Habiendo descrito la invención como antecede se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

Reivindicaciones:

5 Los inventores reivindican:

1. Un compuesto, y las sales farmacéuticamente aceptables d l compuesto que tiene la estructura

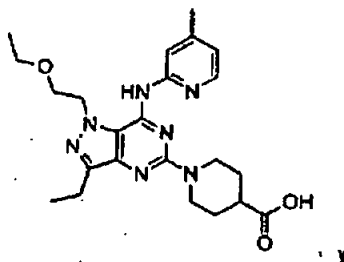


10

2. El compuesto de la reivindicación 1 que es un ácido libre.
3. Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la reivindicación 1.

15

4. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, que tiene la estructura:



un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 que comprende un ácido libre del compuesto.

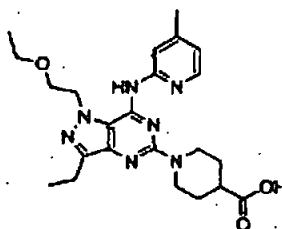
5 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 que comprende una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto.

7. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 que comprende además un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina.

10

8. La composición farmacéutica de la reivindicación 4 que comprende además un antagonista del receptor de la angiotensina II.

9. Un procedimiento de tratamiento de una afección en un sujeto,
15 comprendiendo el procedimiento la administración al sujeto de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



en la que la afección se selecciona entre el grupo constituido por una afección
20 cardiovascular, una afección metabólica, una afección del sistema nervioso central, una afección pulmonar, disfunción sexual, dolor y disfunción renal.

10. El procedimiento de la reivindicación 9 en el que la afección es una

afección cardiovascular.

11. El procedimiento de la reivindicación 10 en el que la afección cardiovascular es hipertensión.

5

12. El procedimiento de la reivindicación 10 en el que la afección cardiovascular es insuficiencia cardíaca.

13. El procedimiento de la reivindicación 10 en el que la afección cardiovascular es angina.

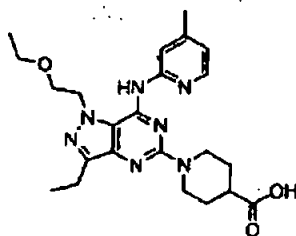
10

14. El procedimiento de la reivindicación 9 que comprende además la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina al sujeto.

15

15. El procedimiento de la reivindicación 9 que comprende además la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista d l receptor de la angiotensina II al sujeto.

20 16. Uso de un compuesto, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que tiene la estructura:



en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una

afección seleccionada entre el grupo constituido por afecciones cardiovasculares, afecciones metabólicas, afecciones del sistema nervioso central, afecciones pulmonares, disfunción sexual, dolor y disfunción renal.

5 17. El uso de la reivindicación 16 en el que la afección es una afección cardiovascular.

18. El uso de la reivindicación 17 en el que la afección cardiovascular es hipertensión.

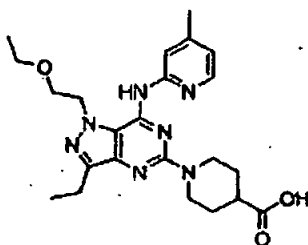
10

19. El uso de la reivindicación 18 en el que la afección cardiovascular es insuficiencia cardíaca.

15

20. El uso de la reivindicación 17 en el que la afección cardiovascular es angina.

21. Un procedimiento de preparación de un primer compuesto que tiene la estructura

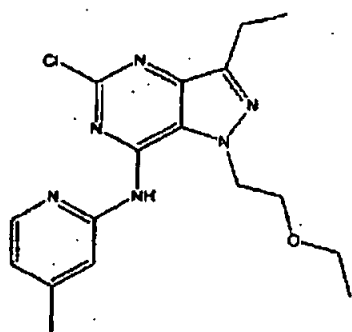


20 Comprendiendo el procedimiento poner en contacto un segundo compuesto que tiene la estructura

PC 33153A

132

220



con ácido isonipecótico para proporcionar el primer compuesto.

RESUMEN

La presente invención comprende el ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico y sus sales. La invención además comprende las composiciones farmacéuticas, los procedimientos de tratamiento, y los procedimientos de síntesis que se refieren al ácido 1-(1-(2-etoxietil)-3-etil-7-(4-metilpiridin-2-ilamino)-1H-pirazolo[4,3-d]pirimidin-5-il)piperidina-4-carboxílico y sus sales.

232

FIGURA 1

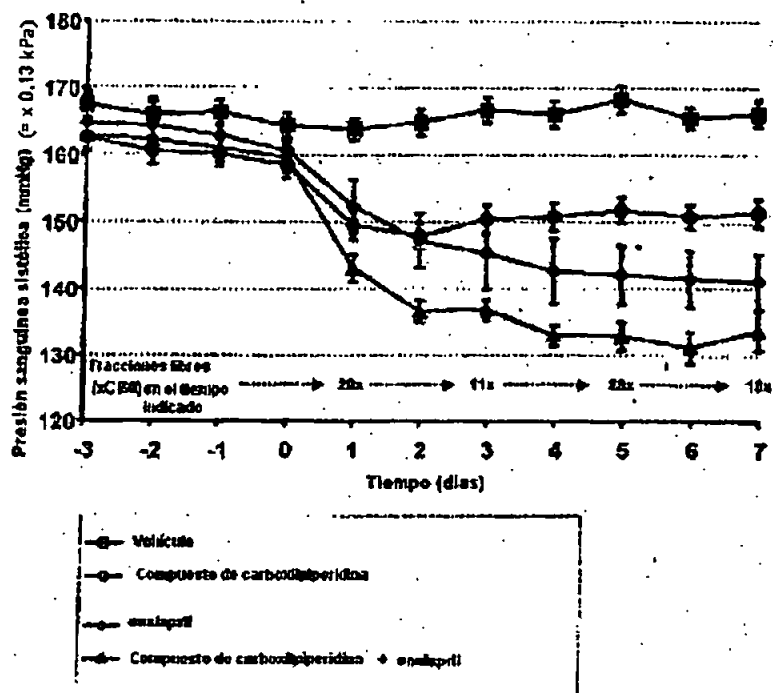
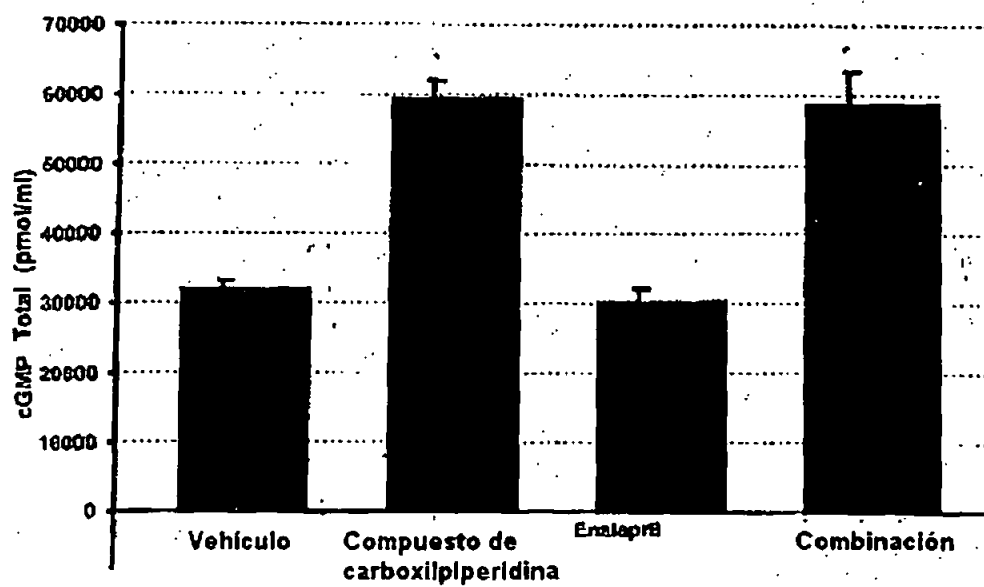


FIGURA 2



LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Pfizer
- <120> ÁCIDO 1-(1-(2-ETOXIETIL)-3-ETIL-7-(4-METILPIRIDIN-2-ILAMINO)-1H-PIRAZOLO[4,3-D]PIRIMIDIN-5-IL)PIPERIDINA-4-CARBOXÍLICO Y LAS
- 5 SALES DEL MISMO
- <130> PC33153A
- <150> 60/735320
- <151> 10 - 11 - 2005
- <160> 1
- 10 <170> patentIn Versión 3.3
- <210>
- <201> 1
- <211> 1518
- <212> ADN
- 15 <213> Homo sapiens

<400> 1
 atggactaca aggacgacga cgacaaggga tccgggtccg agatgtcccc aaagtgcagt 60
 gctgatgctg agaacagttt caaagaaagc atggagaaat catcatactc cgactggcta 120
 ataaataaca gcattgctga gctgggtgct tcaacaggcc tccagtgaa catcagtgar 180
 gcctaccagg atccgcgctt tgatgcagag gcagaccaga tatctggttt tcacataaga 240
 tctgttcttt gtgtccctat ttggaatagc aaccacccaa taattggagt ggctcaagtg 300
 ttaaacagac tggatgggaa accctttgat gatgcagatc aacgactttt tggagctttt 360
 gtcactcttt gtggactcgg catcaacaac acaattatgt atgatcaagt gaagaagtc 420
 tgggccaaagc agtctgtggc tcttgatgtg ctatcatacc atgcaacatg tcaaaagct 480
 gaagttgaca agtttaaggc agccaacatc cctctgggtg cagaacttgc catcgatgac 540
 attcattttg atgacttttc tctcgacgtt gatgccatga tccagctgc tctccggatg 600
 ttcacggagc tggggatggt acagaaattt aaattgact atgagacact gtgtagggtg 660
 cttttgacag tgaggaaaaa ctatcggatg gttctctacc acaactggag acatgccttc 720
 aacgtgtgtc agctgatgtt cgcgatgta accactgctg ggtttcaaga catcthgac 780
 gaggtggaaa ttttagcgtt gattgtggga tgcctgtgtc atgacctga ccacagggga 840
 accaacaatg ccttccaagc taagagtggc totgccttg cccaactcta tggaaacctt 900
 gctaccttg agcatacca ttccaaccac gccgtgatga tcttcaang tgagggtcac 960
 aatattcttg ctaacctgtc cccaaggaa tatagtgacc ttatgcagct tctgaagcag 1020
 tcaatatttg caacagacct cagctgtac tttagagga gaactgaatl ccttgaactl 1080
 gtcagttaag gagaatacga ttggaacatc aaaaaccatc gtgatattt tcatcaatg 1140

 ttaatgacag cctgtgacct tggagccgtg accasacctg gggagatctc cagacaggtg 1200
 gcagaacttg taaccagtga gttcttcgaa caaggagatc gggagagatt agagctcaa 1260
 ctactcctt cagcaatttt tgatcggaa cggagagatg aactgcctcg gttgcaactg 1320
 gagtggattg atagcatctg catgccttg tatcaggcac tggtaagggt caacgtgaaa 1380
 ctgaagccga tgcctagattc agtagctaca aacagaagta agtgggaaga gctacaccaa 1440
 aaacgactgc tggcctcaac tgcctcatcc tctccctcg ccagtggtat ggtagccaag 1500
 gaagacagga actaataa 1518

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference PC33153A	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/IB2006/003132	International filing date (day/month/year) 31/10/2006	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 10/11/2005
Applicant PFIZER PRODUCTS INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out 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))

b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title:

☐ the text is approved as submitted by the applicant

☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

PYRAZOLO [4,3-D] PYRIMIDIN-5-YL) DERIVATIVE USED AS PDE5 INHIBITORS

5. With regard to the abstract,

☐ the text is approved as submitted by the applicant

☒ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2006/003132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07D487/04 A61K31/505 A61P9/12 A61P13/12 A61P25/00 A61P43/00		
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) C07D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 2006/046135 A2 (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC [US]; ACKER BRAD ALAN [US]; HUGHES ROBE) 4 May 2006 (2006-05-04) page 49; claim 1; examples 1,3	1-21
A	WO 2004/096810 A (PFIZER LTD [GB]; BELL ANDREW SIMON [GB]; BROWN DAVID GRAHAM [GB]; FOX) 11 November 2004 (2004-11-11) cited in the application page 102; claims 1,5; example 94	1-21
A	WO 2005/049617 A (PFIZER LTD [GB]; BELL ANDREW [GB]; BROWN DAVID [GB]; BULL DAVID [GB];) 2 June 2005 (2005-06-02) cited in the application claim 1	1-21
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* 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 document 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 7 February 2007		Date of mailing of the International search report 19/03/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo.nl Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Gettins, Marc

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2006/003132

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2005/049616 A1 (PFIZER LTD [GB]; BELL ANDREW SIMON [GB]; BROWN DAVID GRAHAM [GB]; DACK) 2 June 2005 (2005-06-02) cited in the application claim 1	1-21
A	WO 2005/097799 A1 (PFIZER LTD [GB]; BELL ANDREW SIMON [GB]; BROWN DAVID GRAHAM [GB]; FOX) 20 October 2005 (2005-10-20) claim 1	1-21

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

page 2 of 2

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.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (January 2004)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2006/003132

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006046135	A2	04-05-2006	NONE	
WO 2004096810	A	11-11-2004	AU 2004234158 A1	11-11-2004
			BR PI0409903 A	25-04-2006
			CA 2523831 A1	11-11-2004
			EP 1620437 A1	01-02-2006
			JP 2006524636 T	02-11-2006
			KR 20060007405 A	24-01-2006
			MA 27771 A1	01-02-2006
			MX PA05011643 A	15-12-2005
			NL 1026074 C2	09-08-2005
			NL 1026074 A1	01-11-2004
WO 2005049617	A	02-06-2005	CA 2545196 A1	02-06-2005
			EP 1689752 A1	16-08-2006
			MX PA06005824 A	11-08-2006
WO 2005049616	A1	02-06-2005	AR 046711 A1	21-12-2005
			AU 2004290643 A1	02-06-2005
			CA 2546987 A1	02-06-2005
			CN 1882591 A	20-12-2006
			EP 1689751 A1	16-08-2006
			IS 8406 A	10-04-2006
			MX PA06005914 A	27-06-2006
			NL 1027568 C2	30-11-2005
			NL 1027568 A1	26-05-2005
WO 2005097799	A1	20-10-2005	CA 2562251 A1	20-10-2005
			EP 1742950 A1	17-01-2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-046632-00000-0000
Fecha: 2008-05-08 16:22:03 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTE(IYI) Eve: 378 FASENACIONAL
Act. 411 PRESENTACION Folios: 240

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de 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

☒
☒
☒
☒
☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de 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 ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

☐
☐
☐
☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Edgar Navarro

Firma Responsable

Fecha 08 MAYO 2008

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 242

2020
Bogotá D.C.,

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REINALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER PRODUCTS INC.

REFERENCIA	Radicación No.	8 46632
	Solicitud internacional	PCT/IB2006/003132
	Fecha inicio fase nacional	10/06/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	6128
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

27 MAYO 2008

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpall