

INHIBIDORES DE PDE1

La presente invención se relaciona con determinados inhibidores de la PDE1 humana, con composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos, con métodos de uso de los compuestos para tratar trastornos fisiológicos, y con productos intermedios y procesos útiles en la síntesis de los compuestos.

Las fosfodiesterasas (PDE) son enzimas que regulan los niveles celulares de AMPc y GMPc controlando la velocidad a la que se hidrolizan estos nucleótidos cíclicos. La PDE1, una PDE dependiente del calcio y la calmodulina, es una de al menos 11 familias de PDE conocidas. La PDE1 se expresa en muchos tejidos, incluyendo el cerebro, corazón, pulmón, riñón y músculo liso. Además, la PDE1 se compone de una familia de tres isoformas conocidas, PDE1A, PDE1B y PDE1C.

Los pacientes que sufren de diabetes a menudo desarrollan una forma de enfermedad renal crónica conocida como enfermedad renal diabética (o nefropatía diabética). Se ha estimado que la enfermedad renal diabética puede afectar hasta 40 por ciento de los pacientes diabéticos. Las opciones de tratamiento para la enfermedad renal diabética son limitadas e incluyen el uso de medicamentos que disminuyen la presión arterial, el manejo de los niveles de glucosa en sangre, la dieta y el peso, y la

implementación de actividad física regular. Por lo tanto, existe la necesidad de opciones de tratamiento adicionales para los pacientes que sufren de enfermedad renal crónica, particularmente enfermedad renal diabética.

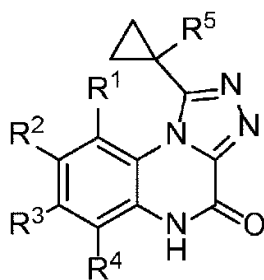
5 La patente de los EE. UU. núm. 8.299.080 describe ciertos derivados de quinoxalina para tratar diversos trastornos tales como disuria e hipertensión. Además, la patente europea núm. 0 040 401 describe ciertas triazoloquinoxalin-4-onas sustituidas que poseen actividad
10 antihipertensiva. Ciertos otros compuestos inhibidores de la PDE1 se describen en WO 2018/039051, WO 2017/139186, WO 2019/032383, WO 2019/156861 y WO 2019/027783.

 Sigue existiendo una necesidad de terapia con inhibidores de PDE1 con un compuesto que exhiba potencia
15 deseable, minimice la inducción de enzimas del citocromo P450 (cyp) en pacientes, y que minimice la toxicidad en los pacientes, p. ej., con respecto a efectos cardíacos no deseados. La presente invención proporciona ciertos compuestos novedosos que son inhibidores de la PDE1 humana.
20 Además, la presente invención proporciona ciertos compuestos novedosos que son inhibidores selectivos de PDE1A, PDE1B y PDE1C humanas en relación con otras PDE humanas, tales como PDE3A, PDE4D y PDE6AB. Además, la presente invención proporciona ciertos compuestos novedosos
25 que pueden tener efectos antihipertensivos y también pueden mejorar el flujo sanguíneo renal. Además, ciertos

compuestos de la presente invención pueden reducir la fibrosis renal.

En consecuencia, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula I:

5



Fórmula I

en donde R^1 , R^2 , y R^3 son cada uno independientemente H, halógeno, o alquilo C1-4
10 opcionalmente sustituido con uno o más halógenos;

R^4 es H, halógeno, alquilo C1-C4 opcionalmente sustituido con uno o más halógenos, ciclopropilo o $\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_3$; y

R^5 es H, alquilo C1-3 opcionalmente sustituido
15 con uno o más halógenos o ciclopropilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

La vía PDE1 se asocia con afecciones y enfermedades como enfermedad renal, enfermedad cardiovascular, hipertensión, hipertensión pulmonar,
20 enfermedad de Parkinson, aterosclerosis, trastornos neurocognitivos, esquizofrenia, déficits cognitivos asociados a la enfermedad de Alzheimer, trastorno del

movimiento, y trastornos por déficit de atención e hiperactividad (Samidurai A, et al., Pharmacol Ther. 2021 octubre; 226: 107858. doi:10.1016/j.pharmthera.2021.107858).

5 En consecuencia, la presente invención también proporciona un método para tratar enfermedad renal crónica, enfermedad renal diabética, lesión renal aguda, hipertensión, hipertensión resistente, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardiovascular aterosclerótica,
10 angina, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, hipertensión pulmonar, accidente cerebrovascular isquémico, déficits cognitivos asociados con esquizofrenia, déficits cognitivos asociados con la enfermedad de Alzheimer, trastorno del movimiento, o trastornos por
15 déficit de atención e hiperactividad en un paciente, que comprende administrar a un paciente que necesita de tal tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de la Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

 Además, esta invención proporciona un compuesto
20 de la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este para usar en tratamiento.

 La invención proporciona además un compuesto de la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este para usar en el tratamiento de la enfermedad renal
25 diabética, enfermedad renal crónica, lesión renal aguda, hipertensión, hipertensión resistente, enfermedad de

Parkinson, enfermedad cardiovascular arteriosclerótica, angina, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, hipertensión pulmonar, accidente cerebrovascular isquémico, déficits cognitivos asociados con esquizofrenia, 5 déficits cognitivos asociados con la enfermedad de Alzheimer, trastorno del movimiento, o trastornos por déficit de atención e hiperactividad.

Además, la invención proporciona el uso de un compuesto de la Fórmula I o una sal farmacéuticamente 10 aceptable de este para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad renal diabética, enfermedad renal crónica, lesión renal aguda, hipertensión, hipertensión resistente, enfermedad de Parkinson, enfermedad cardiovascular arteriosclerótica, angina, 15 infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, hipertensión pulmonar, accidente cerebrovascular isquémico, déficits cognitivos asociados con esquizofrenia, déficits cognitivos asociados con la enfermedad de Alzheimer, trastorno del movimiento, o trastornos por déficit de atención e 20 hiperactividad.

La invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente 25 aceptables. Además, la invención proporciona un proceso para preparar una composición farmacéutica que comprende

mezclar un compuesto de la Fórmula I o una sal farmacéuticamente aceptable de este, con uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Esta invención también abarca intermediarios y procesos novedosos para la síntesis de los compuestos de la Fórmula I.

Como se usa en la presente, los términos “tratar” o “tratamiento” incluyen prohibir, restringir, ralentizar, detener o revertir la progresión o gravedad de un síntoma o trastorno existente.

Como se usa en la presente, el término “paciente” se refiere a un mamífero, tal como un perro o un ser humano, prefiriéndose un ser humano.

Como se usa en la presente, el término “cantidad efectiva” se refiere a la cantidad o dosis de compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, que, después de administrarse al paciente en dosis única o múltiple, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento.

Como se usa en la presente, “alquilo C1-C3” se refiere a metilo, etilo, n-propilo e isopropilo; “alquilo C1-C4” se refiere a metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, e isobutilo.

Como se usa en la presente, “halógeno” se refiere a F, Cl, Br e I. Los ejemplos de alquilo sustituido con

halógeno incluyen trifluorometilo, clorometilo y lo similar.

Un experto en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad efectiva usando técnicas conocidas y mediante la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad efectiva para un paciente, el experto en la técnica considera un número de factores que incluyen, pero no se limitan a: la talla, la edad, y el estado general de salud del paciente; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado de o afectación o la gravedad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicamento concomitante; y otras circunstancias relevantes.

Los compuestos de la presente invención se formulan como composiciones farmacéuticas administradas por cualquier vía que haga que el compuesto sea biodisponible, que incluye las vías oral y parenteral. Con la máxima preferencia, tales composiciones son para administración oral. Tales composiciones farmacéuticas y procesos para preparar las mismas son bien conocidas en la técnica (ver, p. ej., Remington: The Science and Practice of Pharmacy,

L.V. Allen, Editor, 22nd Edition, Pharmaceutical Press, 2012).

Los compuestos para usar de acuerdo con los métodos descritos en la presente pueden administrarse como un único compuesto o una combinación de compuestos. Los compuestos y composiciones descritos en la presente pueden administrarse en métodos de tratamiento como se conoce en la técnica. En consecuencia, diversos compuestos y composiciones de este tipo pueden administrarse junto con dicho método de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, la administración puede comprender administración oral, intravenosa, intraarterial, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, parenteral, transdérmica, intravaginal, intranasal, mucosa, sublingual, tópica, rectal o subcutánea, o cualquier combinación de las mismas.

Los compuestos de la Fórmula I son particularmente útiles en los métodos de tratamiento de la invención, pero se prefieren ciertos grupos, sustituyentes y compuestos. En los párrafos siguientes se describen dichos grupos preferidos, sustituyentes y compuestos. Se entenderá que estas preferencias son aplicables tanto a los métodos de tratamiento como a los nuevos compuestos de la invención.

Se prefiere que R^1 , R^2 , y R^3 sean H.

Se prefiere que R^4 sea alquilo C1-C4.

Se prefiere que R^5 sea alquilo C1-C3.

Se prefiere además que R^4 sea etilo.

Se prefiere además que R^5 sea metilo.

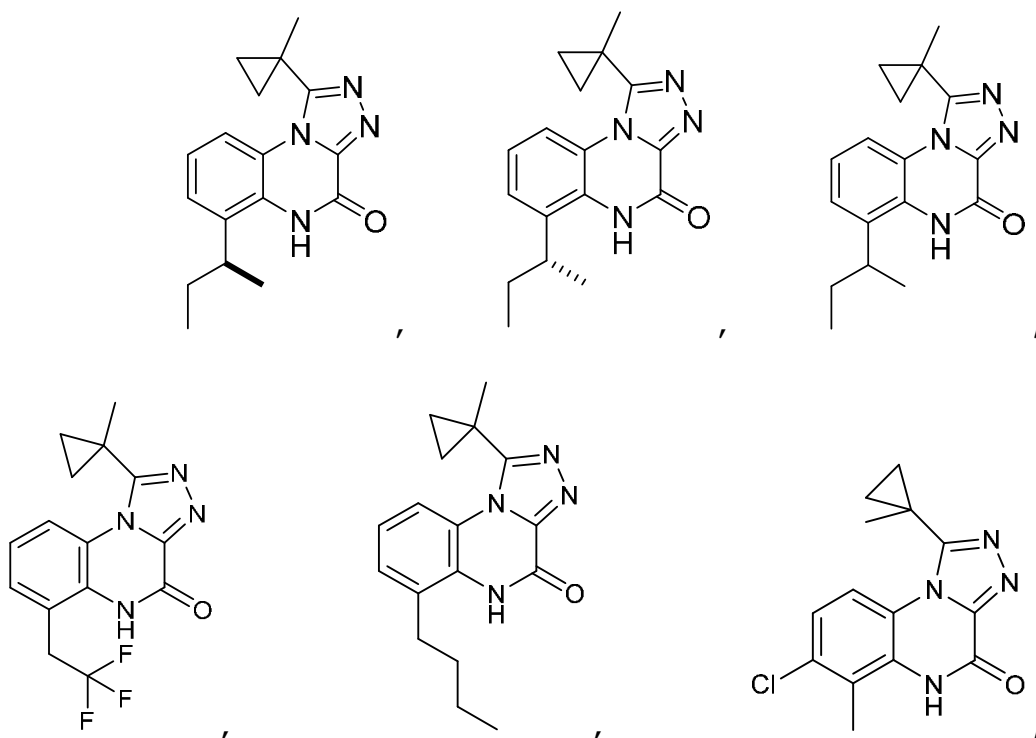
Es aun preferible que los compuestos de la Fórmula I se encuentren en forma de base libre.

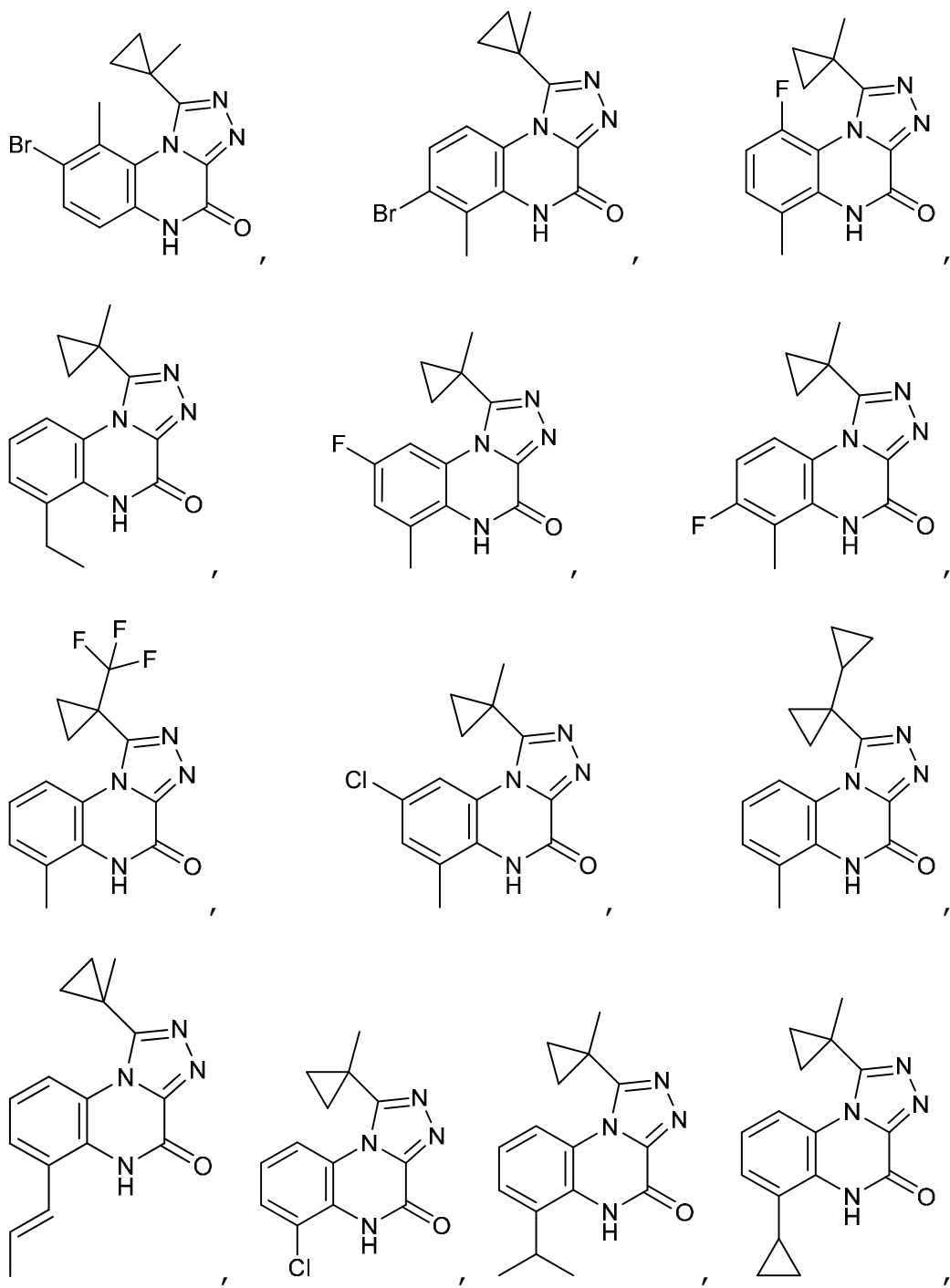
5 Se prefiere especialmente que cuando R^1 , R^2 y R^3 sean H, R^4 sea etilo.

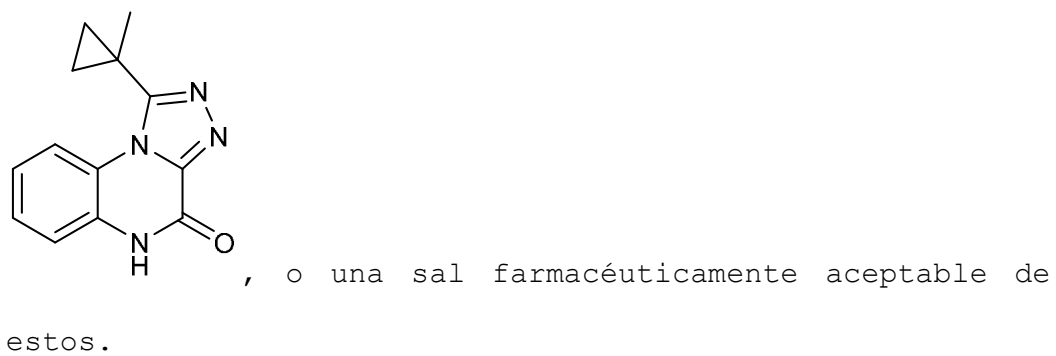
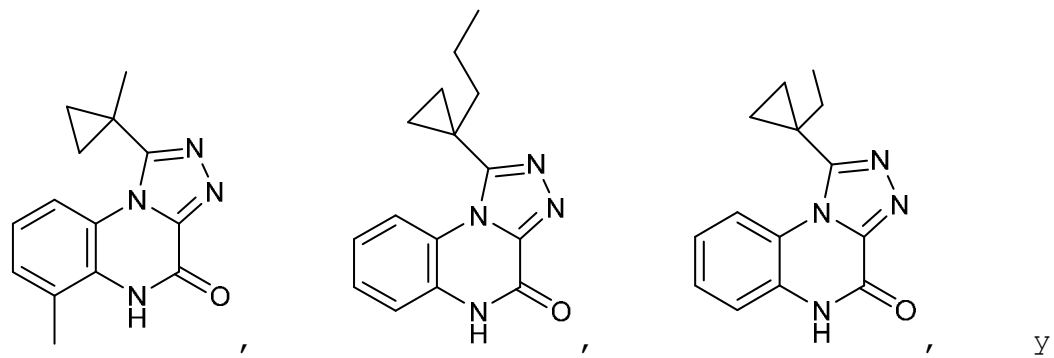
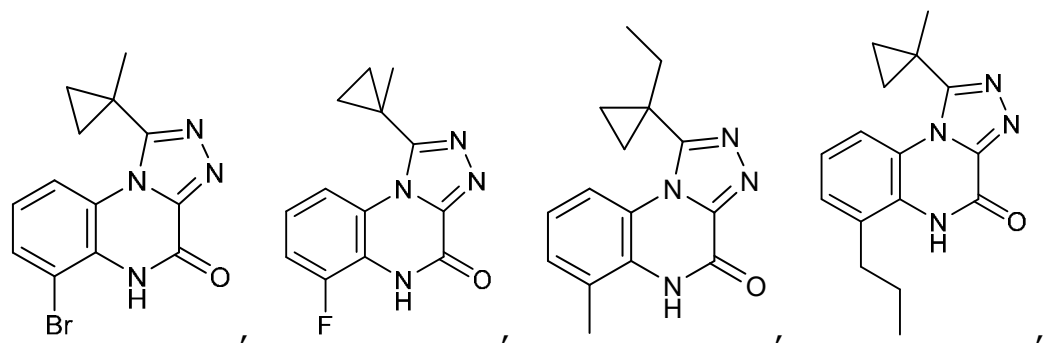
Se prefiere especialmente que cuando R^1 , R^2 , y R^3 sean H, R^5 sea metilo.

10 Se prefiere especialmente que cuando R^4 es etilo, R^5 sea metilo.

Los ejemplos de los compuestos descritos en la presente incluyen:

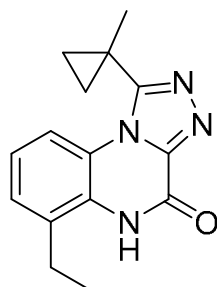






5

El compuesto de la fórmula:



y las sales aceptables de este tienen la máxima preferencia, siendo la base libre del compuesto directamente anterior especialmente la más preferida.

Se puede formar una sal farmacéuticamente
5 aceptable del compuesto de la invención, por ejemplo, mediante la reacción de una base libre adecuada del compuesto de la invención y un ácido farmacéuticamente aceptable adecuado en un disolvente adecuado en condiciones estándar bien conocidas en la técnica. Ver, por ejemplo,
10 Gould, P.L., "Salt selection for basic drugs", *International Journal of Pharmaceutics*, **33**: 201-217 (1986); Bastin, R.J., et al. "Salt Selection and Optimization Procedures for Pharmaceutical New Chemical Entities," *Organic Process Research and Development*, **4**: 427-435 (2000); y Berge, S.M.,
15 et al., "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **66**: 1-19, (1977).

Un experto en la técnica puede separar o resolver los enantiómeros, diastereómeros e isómeros individuales en cualquier momento conveniente de la síntesis de los
20 compuestos de la invención, mediante métodos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (ver, por ejemplo, Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, and E.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of
25 Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Las

designaciones “isómero 1” e “isómero 2” se refieren a los compuestos que se eluyen de la cromatografía quiral en condiciones especificadas, primero y segundo, respectivamente.

5 Ciertas abreviaturas se definen de la siguiente manera: “ACN” se refiere a acetonitrilo; “AcOH” se refiere a ácido acético; “DBU” se refiere a 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno; “DCM” se refiere a diclorometano o cloruro de metileno; “DIPEA” se refiere a
10 N,N-diisopropiletilamina; “DMF” se refiere a N,N-dimetilformamida; “DMSO” se refiere a dimetilsulfóxido; “EDCI” se refiere a 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida “ES/MS” se refiere a la espectrometría de masas de Electrospray; “EtOAc” se refiere
15 a acetato de etilo; “Et₂O” se refiere a éter dietílico; “EtOH” se refiere a etanol; “HMDS” se refiere a hexametildisilazano; “HOBT” se refiere a hidroxibenzotriazol; “IPA” se refiere a isopropanol; “TFA” se refiere a ácido trifluoroacético; “HATU” se refiere a
20 hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio; “LCMS” se refiere a cromatografía líquida-espectrometría de masas; “RBF” se refiere a un frasco de fondo redondo; “TR” se refiere al tiempo de retención; “hr”
25 se refiere a hora o horas; “IC₅₀” se refiere a la

concentración de un agente que produce 50 % de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese agente; “ μmol ” se refiere a micromol o micromoles; “min” se refiere a minuto o minutos; “MeOH” se refiere a metanol o alcohol metílico; “MTBE” se refiere a metil *terc*-butil éter; “Ni-NTA” se refiere a la cromatografía con una fase estacionaria de agarosa funcionalizada con ácido nitrilotriacético como quelante; “ POCl_3 ” se refiere al oxiclورو de fósforo; “RT” se refiere a temperatura ambiente; “SNAr” se refiere a sustitución aromática nucleofílica; “TEA” se refiere a trietilamina; “THF” se refiere a tetrahidrofurano; “Tris” se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol; “U/ml” se refiere a unidades por mililitro; “wt” se refiere al peso; y $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ ” se refiere a acetato de paladio(II).

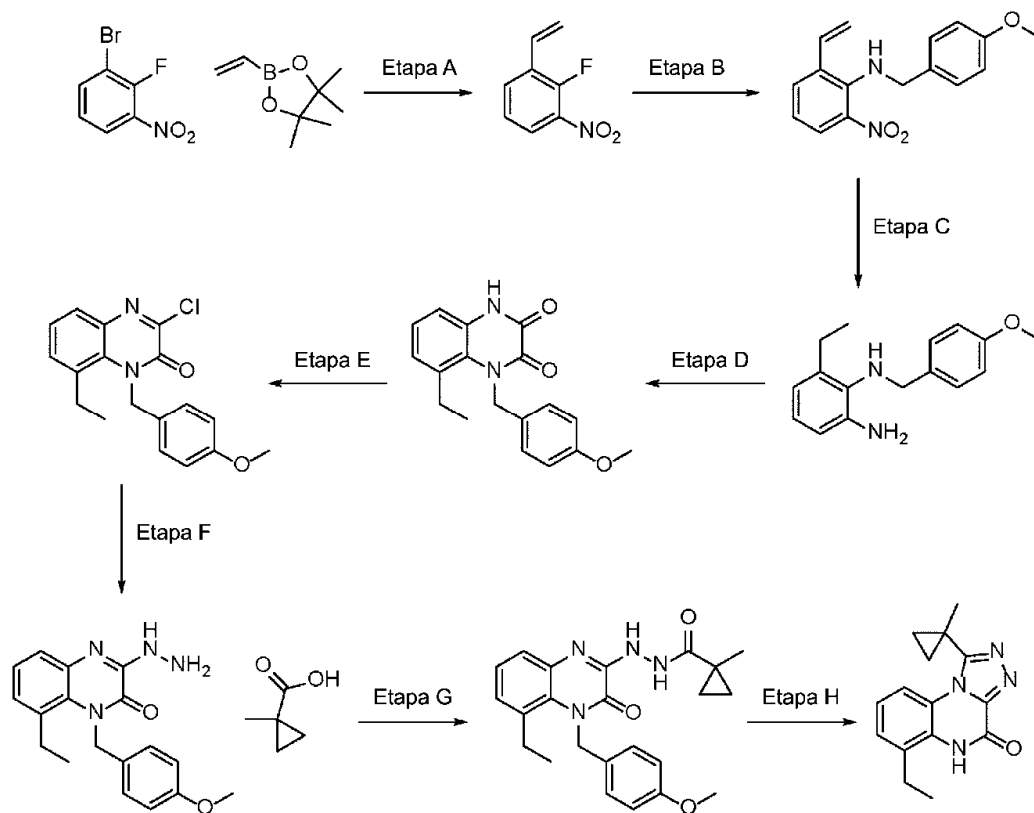
Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante diversos procedimientos conocidos por una persona con experiencia en la técnica, algunos de los cuales se ilustran en los esquemas, preparaciones, y ejemplos más abajo. Un experto en la técnica reconoce que las etapas de síntesis específicas para cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes maneras, o con etapas de diferentes esquemas, para preparar compuestos de la invención. Los productos de cada etapa a continuación pueden recuperarse mediante métodos convencionales bien conocidos en la técnica, que incluyen extracción,

evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización. En los esquemas más abajo, todos los sustituyentes son como se definieron anteriormente, a menos que se indique de cualquier otra

5 manera. Los reactivos y los materiales de partida están fácilmente disponibles para un experto en la técnica. Sin limitar el alcance de la invención, se proporcionan los siguientes esquemas, preparaciones y ejemplos para ilustrar adicionalmente la invención.

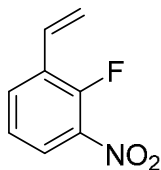
10

Esquema 1



Preparación 1

Síntesis de 2-fluoro-1-nitro-3-vinilbenceno



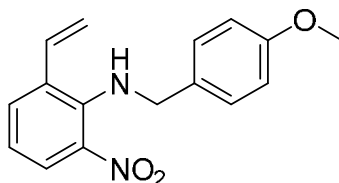
5

Esquema 1, Etapa A: 1-bromo-2-fluoro-3-nitro-benceno (9,500 g, 43,182 mmol;), 4,4,5,5-tetrametil-2-vinil-1,3,2-dioxaborolano (9,976 g, 64,773 mmol), S-Phos (1,772 g, 4,318 mmol) y fosfato de potasio tribásico N-hidratado (18,332 g, 86,364 mmol) se combinaron en una mezcla de 1,4-dioxano (100 ml, 1,171 mol) y agua (10 ml, 555,084 mmol). La mezcla se purgó con nitrógeno durante 30 minutos. Se añadió $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (969,4805 mg, 4,318 mmol), y después se calentó a 80 °C durante el fin de semana. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se vertió a través de un papel de filtro. El filtrado se repartió entre acetato de etilo y salmuera. La solución acuosa se retiró y el material orgánico se lavó 1X con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, y después se redujo a un aceite marrón. El material se purificó sobre gel de sílice usando acetato de etilo/hexanos al 5 % como disolvente para dar un aceite naranja como el compuesto del título (7,2 g, rendimiento cuantitativo).

Preparación 2

Síntesis de N-(4-metoxibencil)-2-nitro-6-vinilanilina

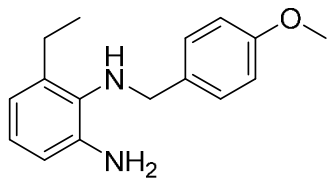
5



Esquema 1, Etapa B: Se combinaron 2-fluoro-1-nitro-3-vinilbenceno (7,22 g, 43,197 mmol) y 4-metoxi-
10 bencenometanamina (11,851 g, 86,395 mmol) en etanol (150 ml, 2,576 mol) y entonces la mezcla se calentó a reflujo durante la noche. La LCMS indicó que la reacción se completó. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente y el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se repartió
15 entre acetato de etilo y agua. La solución acuosa se retiró y el material orgánico se lavó 1X con agua, 1X con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, y después se redujo a un aceite. El material se purificó sobre gel de sílice usando acetato de etilo al 5 %/hexanos como solvente para dar un
20 aceite naranja como el compuesto del título (11,73 g, 96 % de rendimiento).

Preparación 3

Síntesis de 6-etil-N¹-(4-metoxibencil)benceno-1,2-diamina



5

Esquema 1, Etapa C: A una botella agitadora Parr de 2250 ml se añadió N-(4-metoxibencil)-2-nitro-6-vinilanilina (11,73 g, 41,257 mmol), Pt/C al 5 % (2,65 g, 11,670 mmol) y acetato de etilo (1000 ml). El recipiente de reacción se colocó en el agitador durante 4 horas a 60 psig a temperatura ambiente. LCMS indicó la formación del producto. La reacción se filtró y se enjuagó con acetato de etilo. El solvente se eliminó al vacío para dar un aceite amarillo como el compuesto del título (9,94 g, 89 % de rendimiento). MS (m/z): 257,1 (M+1).

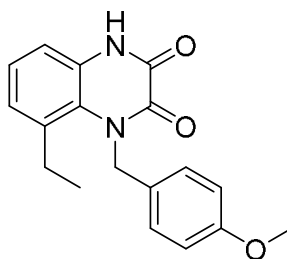
10

15

Preparación 4

Síntesis de 8-etil-1-(4-metoxibencil)-1,4-

20 dihidroquinoxalina-2,3-diona

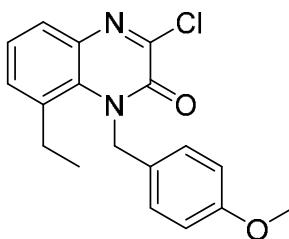


Esquema 1, Etapa D: Se disolvió 6-etil-N¹-(4-metoxibencil)benceno-1,2-diamina (9,94 g, 36,875 mmol) en
 5 etanol (270 ml, 4,638 mol). Después, se añadieron etóxido de sodio (25,093 g, 77,438 mmol) y oxalato de dietilo (10,778 g, 73,751 mmol). La reacción se agitó entonces a temperatura ambiente durante la noche. La LCMS indicó que la reacción se completó. Después, el solvente se eliminó
 10 al vacío para dar una espuma tostada. La espuma se sonicó en agua y después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. El sólido resultante se aisló por filtración al vacío, se lavó con agua, se secó durante 30 minutos, y después se colocó en un horno de vacío a 50 °C durante la
 15 noche para dar un sólido amarillo después del secado como el compuesto del título (10,91 g, 95 % de rendimiento). MS (m/z): 309,0 (M-1).

Preparación 5

20

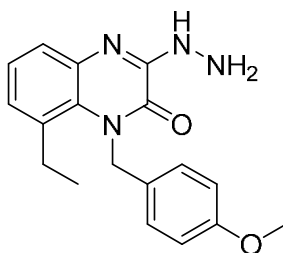
Síntesis de 3-cloro-8-etil-1-(4-metoxibencil)quinoxalin-2(1H)-ona



Esquema 1, Etapa E: Se combinó 8-etil-1-(4-
5 metoxibencil)-1,4-dihidroquinoxalina-2,3-diona (6,00 g,
19,333 mmol) con cloruro de tionilo (12 ml, 164,713 mmol)
y dimetilformamida (3 ml, 38,798 mmol) en tolueno (150 ml,
1,418 mol). La mezcla se calentó a 1150 °C durante 45
minutos. LCMS indicó que se consumió el material de partida.
10 Después se eliminó el tolueno al vacío. El residuo
resultante se tomó en tolueno y se retiró nuevamente al
vacío para dar un aceite marrón como el compuesto del título
(6,36 g, rendimiento cuantitativo). El material se
transfirió sin purificación adicional. MS (m/z): 329,0
15 (M+1).

Preparación 6

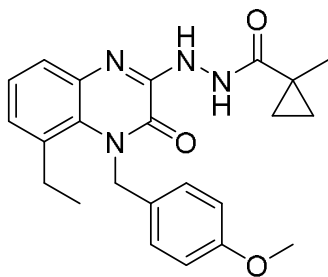
Síntesis de 8-etil-3-hidrazinil-1-(4-
20 metoxibencil)quinoxalin-2(1H)-ona



Esquema 1, Etapa F: Se suspendió 3-cloro-8-etil-1-(4-metoxibencil)quinoxalin-2(1H)-ona (6,355 g, 19,33 mmol) en etanol (80 ml, 1,374 mol) y se añadió hidrazina (3,097 ml, 96,651 mmol). La mezcla se calentó a reflujo durante 3 horas y después se enfrió a temperatura ambiente. La reacción se agitó durante el fin de semana. El precipitado resultante se aisló mediante filtración al vacío. La torta se lavó con etanol y se secó durante 2 horas para dar un sólido amarillo como el compuesto del título (4,23 g, 67 % de rendimiento). MS (m/z): 325,2 (M+1).

Preparación 7

Síntesis de N'-(5-etil-4-(4-metoxibencil)-3-oxo-3,4-dihidroquinoxalin-2-il)-1-metilciclopropano-1-carbohidrazida

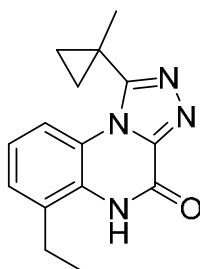


Esquema 1, Etapa G: Se combinaron 8-etil-3-hidrazinail-1-(4-metoxibencil)quinoxalin-2(1H)-ona
 5 (4,23 g, 13,04 mmol), ácido 1-metilciclopropano-1-carboxílico (22,219 g, 22,168 mmol), HATU (8,429 g, 22,168 mmol) y diisopropiletilamina (7,960 ml, 45,640 mmol) en dimetilformamida (80 ml, 1,035 mol) y se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla
 10 se repartió entre acetato de etilo y agua. La solución acuosa se retiró y el material orgánico se lavó 2X con bicarbonato de sodio saturado, se lavó 2X con salmuera, se secó sobre sulfato de sodio, y después se redujo a residuo. El residuo se purificó sobre gel de sílice usando acetato
 15 de etilo al 50 %/hexanos como disolvente para dar una espuma amarilla como compuesto del título (3,0 g, 56 % de rendimiento). MS (m/z): 407,2 (M+1).

Ejemplo 1

20

Síntesis de 6-etil-1-(1-metilciclopropil)-[1,2,4]triazolo[4,3-a]quinoxalin-4(5H)-ona



Esquema 1, Etapa H: Se disolvió N'-(5-etil-4-(4-
5 metoxibencil)-3-oxo-3,4-dihidroquinoxalin-2-il)-1-
metilciclopropano-1-carbohidrazida (3,00 g, 7,380 mmol) en
ácido acético (30 ml, 523,541 mmol) y se calentó a 115 °C
durante la noche. LCMS indicó que se consumió el material
de partida. La reacción se enfrió a temperatura ambiente y
10 se dejó en agitación durante la noche. El ácido acético se
eliminó al vacío. El semisólido amarillo resultante se
retomó en TFA (8 ml) y se calentó en un microondas a 90 °C
durante 1 hora. Se dejó reposar la mezcla a temperatura
ambiente durante la noche. El TFA se eliminó al vacío y el
15 residuo se sonicó en éter de dietilo. El sólido resultante
se aisló mediante filtración al vacío. La torta se lavó con
éter y se secó durante 4 horas para dar un sólido
blanquecino. El material se purificó en gel de sílice usando
70 % de acetato de etilo/hexanos a 100 % de acetato de etilo
20 para dar un sólido blanquecino como el compuesto del título
(1,22 g, 62 % de rendimiento). MS (m/z): 269,0 (M+H), peso
molecular: 268.

Generación de proteínas PDE

Las secuencias de nucleótidos que codifican PDE1A humana de longitud completa (NP_001003683.1), PDE1C (NP_005011.1), PDE5A (NP_001074.2), PDE7B (NP_061818.1) y
5 PDE9A (NP_002597.1) se insertan en el vector pFastBac1 (Invitrogen) con una etiqueta HIS N-terminal. Las secuencias de nucleótidos que codifican PDE4D humana de longitud completa (NP_006194.2) y el dominio catalítico (residuo 641-1141) de PDE3A (NP_000912.3) se insertan en
10 el vector pFastBac1 (Invitrogen) con una etiqueta HIS C-terminal. Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE8A (NP_002596.1) y PDE11A (AAI12394.1) humanas de longitud completa se insertan en el vector pFastBac1 (Invitrogen) con una etiqueta Flag en el extremo N-
15 terminal. Las secuencias de nucleótidos que codifican la PDE10A (AAD32595.1) humana de longitud completa se insertan en el vector pFastBac1 (Invitrogen) con una etiqueta Flag-His en el extremo C-terminal. Las secuencias de nucleótidos que codifican PDE6A (NP_000431.2) y PDE6B (AAH00249.1)
20 humanas de longitud completa se insertan en el vector pFastBacDual (Invitrogen) con una etiqueta HIS en el extremo N-terminal y una etiqueta Flag en el extremo N-terminal, respectivamente, para la producción del dímero PDE6A/6B. La generación de baculovirus y la expresión de
25 proteínas en células Sf9 se realizan de acuerdo con el protocolo del sistema de expresión de baculovirus Bac-to-

Bac (Invitrogen). Las secuencias de nucleótidos que codifican PDE1B humana de longitud completa (NP_000915.1) y PDE2A (NP_002590.1) se insertan en pIEX4 (Novagen) con una etiqueta HIS C-terminal, y ambas producciones de
5 proteínas en células Sf9 se realizan de acuerdo con el protocolo del proveedor (Novagen). Las proteínas PDE etiquetadas con His se purifican usando agarosa Ni-NTA (Qiagen) seguida de cromatografía de exclusión por tamaño en una columna SUPERDEX[®] 200 (GE Healthcare) en regulador de almacenamiento (Tris-HCl en una concentración de 20 mM,
10 pH 7,5, NaCl en una concentración de 150 mM, glicerol al 10 %). Las proteínas PDE etiquetadas con Flag incluyendo PDE6A/6B se purifican usando anti-FLAG M2-agarosa (Sigma), después de la purificación a través de cromatografía en
15 columna Ni-NTA y eluidas en regulador de almacenamiento (Tris-HCl en una concentración de 50 mM, pH 7,5, NaCl en una concentración de 150 mM, glicerol al 10 %, péptido Flag en una concentración de 0,1 mg/ml). Todas las proteínas purificadas se almacenan a -80 °C en pequeñas alícuotas.

20

Ensayos enzimáticos fosfodiesterasa

Todas las actividades enzimáticas de nucleótido fosfodiesterasa (PDE) cíclico en 3' y 5' se determinan con un ensayo enzimático radiométrico basado en el sistema de
25 detección SPA (ensayo de proximidad de centelleo). Los compuestos a analizar se diluyen en dimetilsulfóxido puro

(DMSO) usando curvas de concentración-respuesta de diez puntos. La concentración máxima de compuesto en la mezcla de reacción es ya sea 10 o 100 μM . Los compuestos a la concentración adecuada se preincubaban con cualquiera de las
5 enzimas PDE durante 30 minutos antes de que se inicie la reacción mediante la adición de sustrato. Se deja que las reacciones continúen durante 60 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las reacciones se detienen mediante la adición de perlas de SPA. Las muestras se leen
10 12 horas después en un contador MICROBETA™ TRILUX®. “IC₅₀” se refiere a la concentración del compuesto que produce 50 % de la respuesta inhibitoria máxima posible para ese compuesto. Los valores de IC₅₀ se calculan trazando los datos normalizados vs. el log [compuesto] y ajustando los
15 datos usando una ecuación lógica de cuatro parámetros.

Ensayos enzimáticos de PDE dependientes de calmodulina

Ca²⁺

PDE1B, PDE1A, y PDE1C se clonan y purifican
20 siguiendo procedimientos estándar de generación de proteínas. El regulador de ensayo se prepara para dar una concentración final en el ensayo de Tris-HCl en una concentración de 50 mM, MgCl₂ en una concentración de 50 mM, CaCl₂ en una concentración de 4 mM, albúmina de suero bovino
25 al 0,1 % y 6 U/ml de Calmodulina en agua, a pH 7,5. La concentración final de enzima es de 0,25, 0,074 y 0,0012

nM, para PDE1A, PDE1B y PDE1C respectivamente. Las reacciones se inician mediante la adición del sustrato, [³H]AMPC, para dar una concentración final de 47 nM.

5 Tabla 1: Potencia *in vitro* del Ejemplo 1 contra PDE1A, PDE1B y PDE1C humanas.

Enzimas PDE	IC ₅₀ (nM) del Ejemplo 1
PDE 1A	1,41 ± 1,04 (n=3)
PDE 1B	5,32 ± 0,921 (n=3)
PDE 1C	2,08 ± 0,975 (n=3)

Los resultados en la Tabla 1 demuestran que los
10 compuestos de los Ejemplos 1 inhiben la actividad enzimática de PDE1A, PDE1B, y PDE1C humanas *in vitro*.

Ensayos enzimáticos de PDE usando [³H]AMPC como sustrato

Se miden las siguientes actividades de
15 fosfodiesterasa usando [³H]AMPC como sustrato de reacción: PDE3A humana (dominio catalítico), PDE4D humana, PDE7B humana y PDE8A humana. Todas estas enzimas se clonan y purifican siguiendo procedimientos estándar. El regulador de ensayo se prepara para dar una concentración final en
20 el ensayo de Tris-HCl en una concentración de 50 mM, MgCl₂ en una concentración de 8,3 mM, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) en una concentración de 1,7 mM y albúmina sérica bovina al 0,1 % a pH 7,5. Las

concentraciones finales de enzima son 0,008, 0,021, 0,5 y 0,06 nM para PDE3A, PDE4D, PDE7B y PDE8A respectivamente. Las reacciones se inician mediante la adición del sustrato, [³H]AMPC, para dar una concentración final de 47 nM.

5

Tabla 2: Potencia *in vitro* del Ejemplo 1 contra PDE3A (dominio catalítico), PDE4D, PDE7B y PDE8A humanas.

Enzimas PDE	IC ₅₀ (nM) del Ejemplo 1
PDE3A	79.300 (n=1/3)
PDE4D	9610 ± 3390 (n=3)
PDE7B	>10.000 (n=1/5)
PDE8A	>10.000 (n=1/3)

10 Ensayos enzimáticos de PDE usando [³H]GMPc como sustrato

Se miden las siguientes actividades de fosfodiesterasa usando [³H]GMPc como sustrato de reacción: PDE2A humana, PDE5A humana, PDE6A/6B humana, PDE9A humana, PDE10A humana y PDE11A humana. La forma catalítica activa de la PDE6 humana es un dímero compuesto por una α (PDE6A humana) y subunidades de β (PDE6B humana). El dímero de la PDE6A/6B humana se produce mediante la estrategia de expresión y purificación, usando dos etapas de purificación, es decir, cromatografía Ni-NTA y de afinidad anti-FLAG en Sepharose. El resto de las enzimas se clonan y purifican en el laboratorio siguiendo procedimientos estándar. El regulador de ensayo se prepara para dar una concentración final en el ensayo de Tris-HCl en una

concentración de 50 mM, MgCl₂ en una concentración de 8,3 mM, EDTA en una concentración de 1,7 mM y albúmina sérica bovina al 0,1 % a pH 7,5. Las concentraciones finales de enzima son 0,2, 0,002, 5, 1, 0,03 y 0,03 nM para PDE2A humana, PDE5A humana, PDE6AB humana, PDE9A humana, PDE10A humana y PDE11A humana, respectivamente. Las reacciones se inician mediante la adición del sustrato, [³H]GMPC, para dar una concentración final de 80 nM en el caso de los ensayos de PDE2A humana, PDE10A humana, PDE5A humana, PDE6AB humana y PDE11A humana, mientras que para PDE9A humana se usan 20 nM de [³H]GMPC.

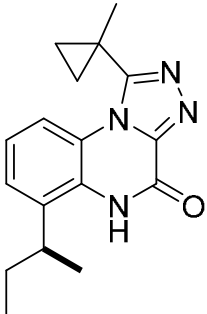
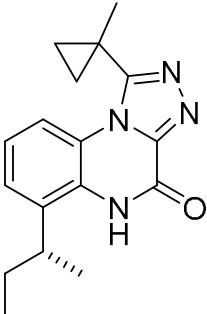
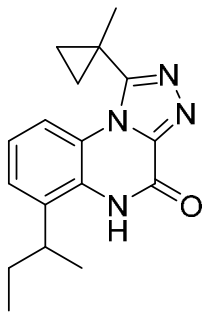
Tabla 3: Potencia *in vitro* del Ejemplo 1 frente a PDE2A, PDE5A, PDE6AB, PDE9A, PDE10A y PDE11A.

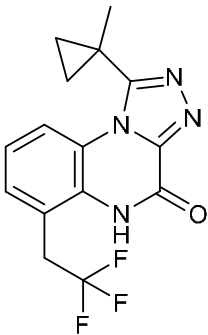
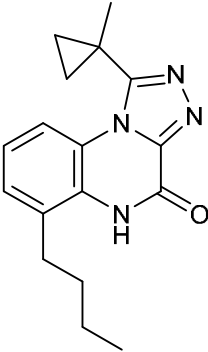
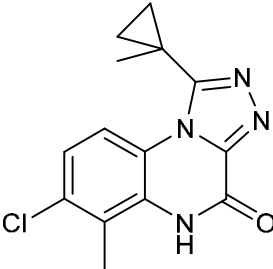
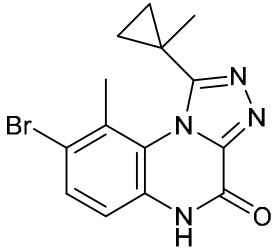
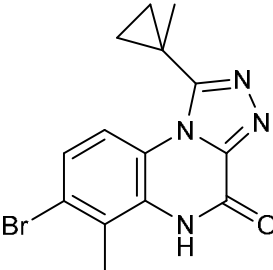
Enzimas PDE	IC ₅₀ (nM) del Ejemplo 1
PDE2A	6170 ± 227 (n=2/3)
PDE5A	3440 ± 1010 (n=5)
PDE 6AB	7850 ± 1100 (n=2)
PDE9A	1720 ± 630 (n=4)
PDE10A	>10.000 (n=1/3)
PDE11A	9820 (n=1/5)

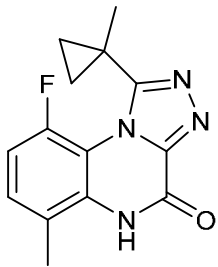
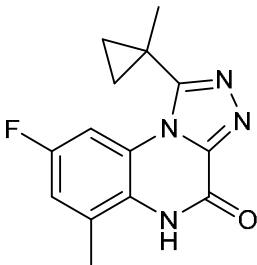
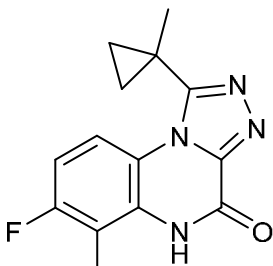
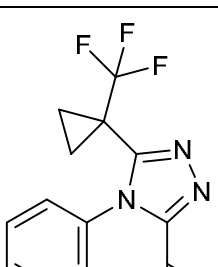
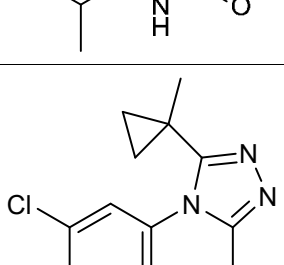
Los datos de las Tablas 1, 2 y 3 demuestran que el compuesto del Ejemplo 1 es un inhibidor selectivo de PDE1A, PDE1B y PDE1C humanas en relación con PDE2A, PDE3A, PDE4D, PDE5A, PDE6AB, PDE7B, PDE8A, PDE9A, PDE10A, y PDE11A *in vitro*.

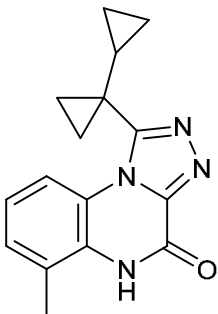
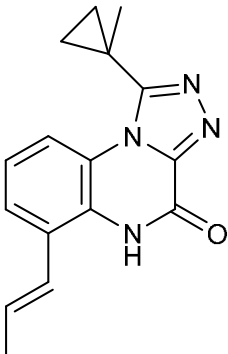
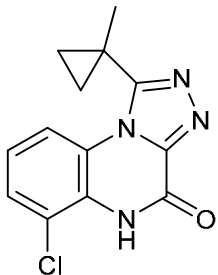
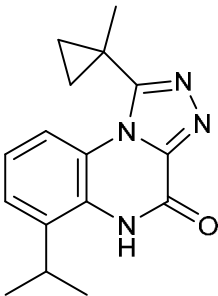
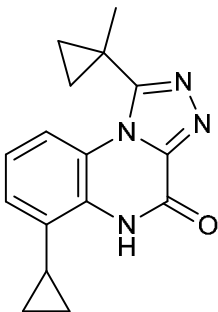
Ejemplo 2

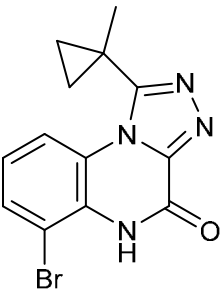
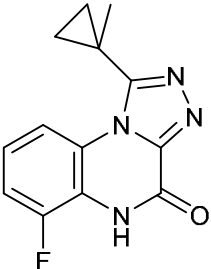
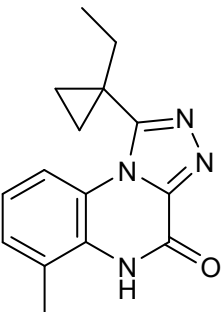
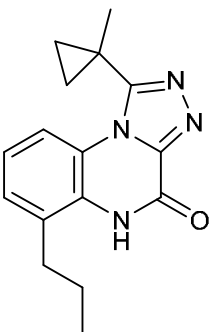
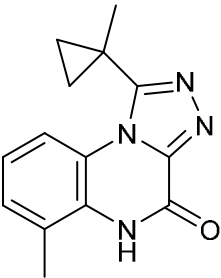
Otros compuestos se prepararon de una manera análoga al método del Ejemplo 1, como se muestra a
5 continuación.

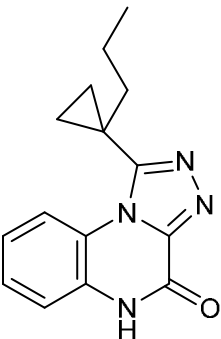
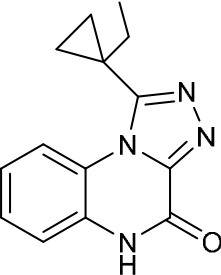
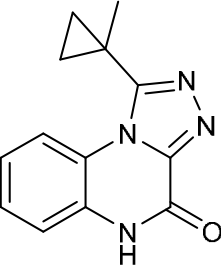
Estructura	Peso molecular	MS (<i>m/z</i>)
	296	297 (M+H)
	296	297 (M+H)
	296	297 (M+H)

Estructura	Peso molecular	MS (m/z)
	322	323 (M+H)
	296	-
	288	289 (M+H)
	332/334	333/335 ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) (M+H)
	332/334	333/335 ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) (M+H)

Estructura	Peso molecular	MS (<i>m/z</i>)
	272	273 (M+H)
	272	273 (M+H)
	272	273 (M+H)
	308	309 (M+H)
	288	289 (M+H)

Estructura	Peso molecular	MS (<i>m/z</i>)
	280	281 (M+H)
	280	281 (M+H)
	274	275 (M+H)
	282	283 (M+H)
	280	281 (M+H)

Estructura	Peso molecular	MS (<i>m/z</i>)
	318/320	319/321 (⁷⁹ Br/ ⁸¹ Br) (M+H)
	258	259 (M+H)
	268	269 (M+H)
	282	283 (M+H)
	254	255 (M+H)

Estructura	Peso molecular	MS (m/z)
 <chem>CC1CC2C(C1)c3nn[nH]c3-c4c[nH]c(=O)c5ccccc45</chem>	268	269 (M+H)
 <chem>C1CC2C(C1)C3=NN=C4C(=N3)c5c[nH]c(=O)c6ccccc564</chem>	254	255 (M+H)
 <chem>CC12CC1C2C3=NN=C4C(=N3)c5c[nH]c(=O)c6ccccc564</chem>	240	241 (M+H)