

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 219**

51 Int. Cl.:
C07H 17/00 (2006.01)
C07H 19/02 (2006.01)
A61K 31/7042 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05779751 .6**
96 Fecha de presentación: **11.08.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1778710**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

54 Título: **Metabolitos, derivados de tanaproget, y sus utilizaciones**

30 Prioridad:
13.08.2004 US 601254 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.05.2012

73 Titular/es:
**WYETH LLC
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:
**SHEN, Li;
KEATING, Kelly;
McCONNEL, Oliver;
DeMAIO, William y
CHANDRASEKARAN, Appavu**

74 Agente/Representante:
Curell Aguilá, Mireia

ES 2 380 219 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Metabolitos, derivados de tanaproget, y sus utilizaciones.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención proporciona nuevos derivados de tanaproget.

10 El tanaproget es un potente agonista no esteroideo de los receptores de la progesterona que se está desarrollando para su uso como anticonceptivo, como alternativa a los anticonceptivos orales disponibles actualmente. La eliminación de las progestinas esteroideas de los programas de anticoncepción podría reducir los efectos secundarios comunes de los anticonceptivos orales.

15 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona metabolitos del compuesto activo tanaproget. Estos compuestos resultan útiles en métodos y kits para la monitorización de la terapia con tanaproget.

20 Entre dichos metabolitos se ha aislado un raro conjugado de glucurónido S-ligado, el S-glucurónido tanaproget, que se ha sintetizado. Se identificó originariamente como metabolito, y cuando se administra un glucurónido tanaproget en un sujeto, es un fármaco que es cortado enzimáticamente por glucuronidasa *in vivo*, proporcionando el tanaproget. De esta manera, la invención proporciona derivados del glucurónido tanaproget formulados para la administración como fármaco del tanaproget. En una forma de realización, la administración se realiza por vía oral con el fin de maximizar las ventajas de la actividad de glucuronidasa en el intestino.

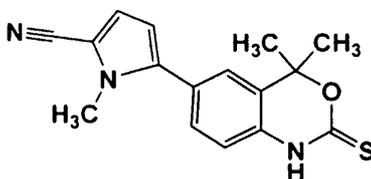
25 Otros aspectos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente de la invención.

30 **Descripción detallada de la invención**

Los derivados de la invención son metabolitos sintéticos únicos que se cree que son bioequivalentes a los metabolitos producidos por un sujeto tras la administración del tanaproget. De esta manera, los derivados de la invención resultan útiles como estándares para la monitorización de la terapia con tanaproget, y para generar anticuerpos específicos para los metabolitos del tanaproget. Estos anticuerpos resultan útiles para la monitorización y el estudio de los efectos de la terapia con tanaproget.

40 Además, los derivados glucurónido del tanaproget de la invención pueden administrarse en un sujeto en forma de fármaco, que resulta cortado produciendo la forma activa de tanaproget *in vivo*. De esta manera, la invención proporciona además composiciones farmacéuticas y kits que contienen los derivados glucurónido del tanaproget de la invención y métodos de utilización de los mismos para la administración de tanaproget en un sujeto. Un sujeto puede incluir cualquier mamífero, preferentemente hembra, incluyendo seres humanos y no humanos.

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el compuesto agonista de PR denominado "NSP-989" o "tanaproget" [Wyeth] se caracteriza por una estructura central:

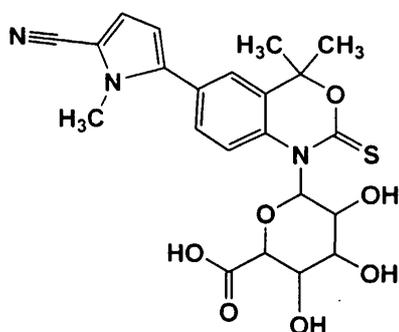


50 Los métodos para la síntesis de la estructura central ilustrada, 5-(4,4-dimetil-2-tioxo-1,4-dihidro-2H-3,1-benzoxazín-6-il)-1-metil-1H-pirrol-2-carbonitrilo, se describen en la patente US nº 6.436.929, solicitud de patente US nº 11/113.794 (presentada el 25 de abril de 2005) y en las solicitudes de patente provisional US nº 60/675.550 (presentada el 28 de abril de 2005), nº 60/675.551 (presentada el 28 de abril de 2005), nº 60/675.599 (presentada el 28 de abril de 2005), nº 60/675.737 (presentada el 28 de abril de 2005) y nº 60/675.738 (presentada el 28 de abril de 2005), al igual que los usos de dicho compuesto. Otros métodos sintéticos adecuados para obtener el tanaproget resultarán fácilmente evidentes para el experto en la materia. La presente invención no se encuentra limitada por los medios para producir tanaproget.

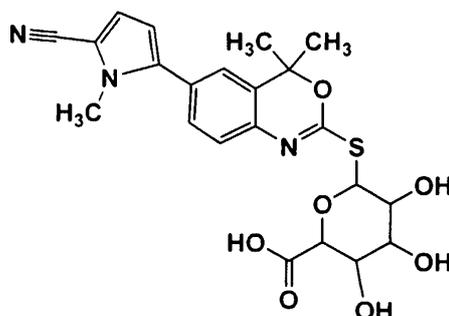
60 La presente invención proporciona derivados glucurónido de la estructura central anteriormente indicada. Los derivados de la invención pueden contener uno o más centros asimétricos y de esta manera pueden dar lugar a isómeros ópticos y diastereoisómeros. Aunque se muestra a continuación sin consideración de la estereoquímica, la presente invención incluye dichos isómeros ópticos y diastereoisómeros, así como los estereoisómeros R y S

enantioméricamente puros en mezcla racémica y resueltos, así como otras mezclas de los estereoisómeros R y S y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

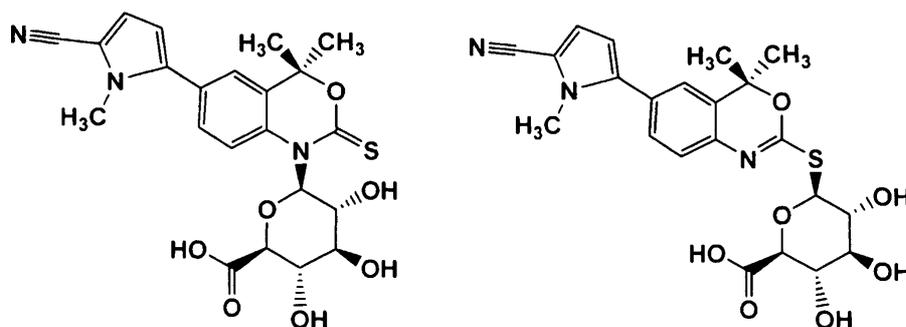
5 En una forma de realización, la fracción glucurónido se une mediante el átomo de N en el anillo oxiindol. Este derivado puede caracterizarse mediante la estructura siguiente:



10 En otra forma de realización, la fracción glucurónido se une mediante el átomo de S al anillo oxiindol. En una forma de realización, este derivado se caracteriza por la estructura siguiente:



15 En otras formas de realización, dichos compuestos presentan la estereoquímica siguiente:



20 Los derivados glucurónido del tanaproget de la invención pueden producirse sintéticamente, utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, se añade gota a gota bajo una atmósfera de nitrógeno una solución de tanaproget en solvente neutro anhidro (por ejemplo DMF) a una solución de una base fuerte (por ejemplo hidruro sódico) diluida en el solvente y después se enfría utilizando hielo seco. Tras la mezcla, se añade una solución de éster de ácido acetobromo- α -D-glucurónico. A continuación, la solución de reacción se calienta hasta la temperatura ambiente y se agita. Tras aproximadamente 8 a 24 horas, la solución de reacción se divide entre agua y un solvente orgánico, por ejemplo acetato de etilo. Se extrae la capa acuosa. Las capas orgánicas agrupadas se lavan con solución saturada de cloruro sódico (NaCl) (100 ml), se secan y se elimina el solvente al vacío.

25 Alternativamente, los derivados glucurónido de la invención pueden producirse en un sistema enzimático utilizando métodos adecuados.

30 Pueden utilizarse técnicas convencionales para recuperar los derivados de tanaproget crudos purificados. En una forma de realización, los derivados de tanaproget pueden purificarse por los medios descritos en la solicitud provisional de patente US nº 60/675.738 (presentada el 28 de abril de 2005), incorporada como referencia en la presente memoria. En otra forma de realización, el extracto crudo puede pasarse por una columna de HPLC de fase

5 inversa con un gradiente de solventes para eliminar el tanaproget no reaccionado y separar los materiales de partida y reactivos de los productos crudos. Los solventes adecuados para la utilización en los gradientes de una columna podrán ser fácilmente seleccionados por el experto en la materia. En el ejemplo en la presente memoria, se utilizó acetoniitrilo/metanol y acetoniitrilo/acetato amónico como solventes. Las fracciones, que contenían derivados de tanaproget, se agruparon y los solventes purificados se evaporaron, proporcionando la mezcla de derivados de tanaproget. La cromatografía de capa fina u otros métodos cromatográficos conocidos de la técnica pueden utilizarse para la purificación.

10 Con el fin de aislar los derivados individuales, la mezcla purificada puede someterse a una separación adicional mediante técnicas cromatográficas. Por ejemplo, puede utilizarse la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Las columnas y condiciones de separación adecuadas resultarán fácilmente evidentes para el experto en la materia tras la lectura de la presente memoria.

15 En otro aspecto, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas y tratamientos que comprenden la administración en un sujeto (por ejemplo una mujer en edad de concebir, para la anticoncepción, u otro mamífero con fines terapéuticos) de una cantidad farmacéuticamente efectiva de uno o más derivados glucurónidos de tanaproget tal como se ha mencionado anteriormente como agonistas de receptores de la progesterona.

20 Los compuestos glucurónidos de tanaproget de la presente invención, utilizados solos o en combinación, pueden utilizarse en métodos de anticoncepción, terapia de sustitución hormonal premenopáusica, perimenopáusica y/o postmenopáusica, y en el tratamiento y/o prevención de trastornos cutáneos, sangrado disfuncional, sincronización del estro, leiomiomas uterinos, endometriosis, síndrome del ovario poliquístico y carcinomas y adenocarcinomas del endometrio, ovario, mama, colon y próstata. Los usos adicionales de la invención incluyen la estimulación de la ingesta de alimentos.

25 El término "piel" se refiere a la cubierta externa de una forma de mamífero, que comprende de manera no limitativa, la epidermis, la dermis y los tejidos subcutáneos. Típicamente, la piel puede incluir otros componentes, tales como los folículos pilosos y las glándulas sudoríparas. Los trastornos de la piel incluyen, por ejemplo, el acné y el hirsutismo.

30 El término "acné" pretende incluir cualquier trastorno de la piel en el que un poro de la misma resulta bloqueado y/o por lo tanto inflamado. El término acné comprende de manera no limitativa acné superficial, que incluye comedones, pápulas inflamadas, quistes superficiales y pústulas, y acné profundo, que incluye nódulos inflamados profundos y quistes rellenos de pus. Las condiciones específicas del acné comprenden de manera no limitativa *acne vulgaris*, *acne comedo*, acné papular, acné premenstrual, acné preadolescente, *acne venenata*, acné por productos cosméticos, acné por pomada, acné por detergentes, acné excoriado, acné Gram-negativo, acné rosácea, pseudofoliculitis de la barba, foliculitis, dermatitis perioral e hidradenitis supurativa. El término "hirsutismo" pretende referirse a un trastorno de la piel en el que se observa un crecimiento exceso de pelo corporal en áreas del cuerpo en las que normalmente no se produce un crecimiento excesivo de pelo.

40 Una serie de trastornos cutáneos pueden ser tratados con los compuestos de la presente invención, entre ellos trastornos cutáneos de los folículos pilosos y de las glándulas sebáceas. En una forma de realización, algunos trastornos cutáneos, tales como el acné y el hirsutismo entre otros, pueden tratarse según la presente invención.

45 Otros trastornos cutáneos, incluyendo la piel seca/agrietada, la seborrea, la soriasis o la alopecia, pueden tratarse utilizando los compuestos y composiciones de la invención. La invención también resulta útil para tratar la piel frente a los efectos de las condiciones ambientales.

50 La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que utilizan los compuestos mencionados en la presente memoria, opcionalmente en combinación con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. En el caso de que los compuestos se utilicen para los usos mencionados anteriormente, pueden combinarse con uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo solventes, diluyentes y similares, y pueden administrarse por vía oral en formas tales como comprimidos, cápsulas, polvos dispersables, gránulos, suspensiones que contienen, por ejemplo entre aproximadamente 0,05% y 5% de agente de suspensión, jarabes que contienen, por ejemplo, entre aproximadamente 10% y 50% de azúcar, y elixires que contienen, por ejemplo, entre aproximadamente 20% y 50% de etanol, y similares, o por vía parenteral en forma de soluciones o suspensiones inyectables estériles que contienen entre aproximadamente 0,05% y 5% de agente de suspensión en un medio isotónico. Dichas preparaciones farmacéuticas pueden contener, por ejemplo, entre aproximadamente 25% y aproximadamente 90% del derivado de tanaproget en combinación con el portador, más habitualmente entre aproximadamente 5% y 60% en peso.

65 La dosis efectiva del derivado tanaproget utilizado puede variar dependiendo del derivado glucurónido de tanaproget particular utilizado, del modo de administración y de la gravedad de la afección bajo tratamiento. Sin embargo, en general, se obtienen resultados satisfactorios en el caso de que los compuestos de la invención se administran en una dosis diaria de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal del animal, opcionalmente administrados en dosis divididas una a cuatro veces al día, o en una forma de liberación sostenida.

Para la mayoría de grandes mamíferos, la dosis diaria total es de entre aproximadamente 1 y 100 mg, o de entre aproximadamente 2 y 80 mg. Las formas de dosificación adecuadas para el uso interno comprenden entre aproximadamente 0,5 y 500 mg del derivado de tanaproget en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable sólido o líquido. Este régimen de dosificación puede ajustarse para que proporcione la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse diariamente varias dosis divididas o la dosis puede reducirse proporcionalmente según aconsejen las exigencias de la situación terapéutica.

Dichos derivados glucurónido de tanaproget pueden administrarse por vía oral, así como por las vías intravenosa, intramuscular o subcutánea. Los portadores sólidos incluyen almidón, lactosa, fosfato dicálcico, celulosa microcristalina, sacarosa y colín, mientras que entre los portadores líquidos incluyen agua estéril, polietilenglicoles, surfactantes no iónicos y aceites comestibles, tales como aceites de maíz, cacahuete y sésamo, según resulte apropiado a la naturaleza del derivado de tanaproget y la forma particular de administración deseada. Pueden incluirse ventajosamente adyuvantes utilizados rutinariamente en la preparación de composiciones farmacéuticas, entre ellos agentes saborizantes, agentes colorantes, agentes conservantes y antioxidantes, por ejemplo la vitamina E, el ácido ascórbico, BHT y BHA.

Las composiciones farmacéuticas preferidas desde el punto de vista de la facilidad de preparación y administración son las composiciones sólidas, particularmente los comprimidos y cápsulas rellenas de polvos o de líquido. La administración oral de los derivados glucurónidos de tanaproget actualmente resulta preferida.

Dichos derivados del tanaproget también pueden administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. Las soluciones o suspensiones de estos derivados del tanaproget en forma de base libre o de sal farmacológicamente aceptable pueden prepararse en agua convenientemente mezcladas con un surfactante, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, líquido, polietilenglicoles y mezclas de los mismos en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para impedir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para el uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en grado suficiente para su fácil capacidad de ser administrada como inyección. Deben ser estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y deben conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos, y aceite vegetal.

La presente invención proporciona kits o paquetes de formulaciones farmacéuticas diseñados para la utilización en los regímenes indicados en la presente memoria. En una forma de realización, estos kits están diseñados para la administración oral diaria en ciclos de 21, 28, 30 o 31 días, entre otros, y para la administración oral de una vez al día. En el caso de que las composiciones estén destinadas a la administración en continuo, un paquete o kit puede incluir la composición en cada comprimido. En el caso de que las composiciones estén destinadas a la administración en modo discontinuo periódico, un paquete o kit puede incluir placebos los días en los que no se administre la composición.

En una forma de realización, los kits se organizan para indicar que debe administrarse una única formulación oral o una combinación de formulaciones orales en cada día del ciclo, incluyendo comprimidos orales que deben administrarse en cada uno de los días indicados, y en una forma de realización adicional, un comprimido oral contendrá cada una de las dosis diarias combinadas indicadas.

En una forma de realización, un kit puede incluir una única fase de una dosis diaria del compuesto de la invención durante un ciclo de 21, 28, 30 o 31 días. Alternativamente, un kit puede incluir una única fase de una dosis diaria del compuesto de la invención durante los primeros 21 días de un ciclo de 28, 30 o 31 días. Un kit también puede incluir una única fase de una dosis diaria del compuesto de la invención durante los primeros 28 días de un ciclo de 30 o 31 días.

En una forma de realización adicional, un kit puede incluir una única fase combinada de una dosis diaria del compuesto de la invención y un estrógeno durante un ciclo de 21, 28, 30 o 31 días. Alternativamente, un kit puede incluir una única fase combinada de una dosis diaria del compuesto de la invención y un estrógeno durante los 21 primeros días de un ciclo de 28, 30 o 31 días. Un kit también puede incluir una única fase combinada de una dosis diaria del compuesto de la invención y un estrógeno durante los primeros 28 días de un ciclo de 30 o 31 días.

En otra forma de realización, un kit de 28 días puede incluir una primera fase de entre 14 y 28 unidades de dosificación diaria del compuesto de la invención; una segunda fase de entre 1 y 11 unidades de dosificación diaria de un estrógeno, y opcionalmente, una tercera fase de un placebo oral y farmacéuticamente aceptable para los días restantes del ciclo.

En todavía otra forma de realización, un kit de 28 días puede incluir una primera fase de entre 14 y 21 unidades de

5 dosificación diaria del compuesto de la invención; una segunda fase de entre 1 y 11 unidades de dosificación diaria de un estrógeno, y opcionalmente, una tercera fase de un placebo oral y farmacéuticamente aceptable para los días restantes del ciclo. En otra forma de realización, un kit de 28 días puede incluir una primera fase de entre 18 y 21 unidades de dosificación diaria de un compuesto de la invención; una segunda fase de entre 1 y 7 unidades de dosificación diaria de un estrógeno, y opcionalmente, un placebo oral y farmacéuticamente aceptable para cada uno de los restantes 0 a 9 días del ciclo de 28 días.

10 En otra forma de realización, un kit de 28 días puede incluir una primera fase de 21 unidades de dosificación diaria de un compuesto de la invención; una segunda fase de 3 unidades de dosificación diaria para los días 22 a 24 de un estrógeno, y opcionalmente, una tercera fase de 4 unidades de dosificación diaria de un placebo oral y farmacéuticamente aceptable para cada uno de los días 25 a 28.

15 En todavía otra forma de realización, la dosificación diaria de cada componente farmacéuticamente activo del régimen queda fijada en cada fase particular durante la que se administra. Resulta preferido además que las unidades de dosificación diaria indicadas se administran en el orden indicado, con la primera fase seguida en orden por las segunda y tercera fases. Para ayudar a facilitar el cumplimiento de cada régimen, los kits también pueden contener el placebo indicado para los días finales del ciclo.

20 Son conocidos en la técnica varios paquetes o kits para la utilización en la distribución de agentes farmacéuticos para el uso oral. En una forma de realización, el paquete presenta indicadores para cada día del ciclo de 28 días, y puede ser un paquete blíster etiquetado o un paquete o botella de distribución diaria.

Metabolitos y usos de los mismos

25 Los derivados glucurónido de la invención resultan útiles para la monitorización de la terapia con tanaproget o con un profármaco de tanaproget (por ejemplo un compuesto S-glucurónido de tanaproget) en un sujeto. Además, la invención da a conocer otros metabolitos del tanaproget que resultan útiles para la monitorización de la terapia con tanaproget y profármacos del mismo. En el caso de que se utilice como reactivo y/o estándar, los compuestos metabolitos del tanaproget pueden marcarse, por ejemplo con una etiqueta radioactiva, fluorescente o colorimétrica.

30 En una forma de realización, la invención proporciona además un metabolito aislado del tanaproget, que puede producirse enzimática o sintéticamente. Dicho metabolito puede seleccionarse de entre derivados glucurónidos del tanaproget. Otros metabolitos adecuados contienen la estructura central del tanaproget y sustituciones opcionales, incluyendo, por ejemplo, tanaproget con una fracción sulfato situado en el grupo tiocarbonilo; tanaproget que presenta un grupo hidroxilo situado en el anillo pirrol; tanaproget que presenta un grupo hidroxilo situado en el anillo fenilpirrol, y tanaproget que presenta un carbamato en lugar del grupo tiocarbonilo.

35 Uno o más de dichos metabolitos del tanaproget puede actuar como estándar, es decir, a título comparativo, en un método para detectar la presencia de un metabolito del tanaproget en una muestra. Una "muestra" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra biológica, tal como, por ejemplo, tejido o líquido aislado a partir de un individuo (incluyendo, aunque sin limitación, plasma, suero, líquido cerebroespinal, orina, linfa, lágrimas, saliva y secciones de tejido) o de constituyentes de cultivos celulares *in vitro*, así como de muestras del medio ambiente.

45 En otra forma de realización, pueden utilizarse uno o más de los metabolitos del tanaproget para generar un anticuerpo o anticuerpos que se utilicen para detectar la presencia de los metabolitos del tanaproget en una muestra. Convenientemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o policlonal específico para un derivado del tanaproget. En una forma de realización deseable, dicho anticuerpo se une selectivamente al derivado de tanaproget de la invención y distingue dicho metabolito del tanaproget de otros metabolitos del mismo.

50 El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria pretende incluir fragmento del mismo que son específicamente reactivos con tanaproget y/o metabolitos del mismo, por ejemplo un fragmento Fv y un fragmento F(ab)₂.

55 Un anticuerpo específico para un derivado de tanaproget de la invención puede prepararse utilizando técnicas estándares en las que el antígeno es un derivado de la invención. Ver, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

60 Los anticuerpos policlonales y monoclonales de sitios específicos de un metabolito de tanaproget pueden utilizarse para el desarrollo de inmunoensayos o kits de monitorización de fármacos terapéuticos (TDM). Entre dichos ensayos pueden incluirse, aunque sin limitación, los inmunoensayos directos, de inhibición, competitivos o de tipo sándwich (ELISA u otros sistemas de ensayo), RIA, ensayos en fase sólida o líquida o sistemas de ensayo automatizados.

65 En el caso de que se utilice un ensayo competitivo, el competidor del anticuerpo puede ser un derivado de tanaproget de la invención unido a la placa de ensayo, o un derivado marcado, por ejemplo un derivado marcado fluorescentemente, un derivado marcado radioactivamente o un derivado tritiado.

En los casos en que se desee, puede utilizarse un kit para facilitar los métodos de la invención.

Un kit de la invención puede contener un trazador adecuadamente marcado, un anticuerpo, un estándar, instrucciones de utilización y el envase. El marcaje para el trazador puede ser cualquier marcaje adecuado, por ejemplo un marcaje radioactivo, fluorescente o colorimétrico. En caso conveniente, los componentes del kit pueden encontrarse en forma liofilizada.

El procedimiento de ensayo de la invención presenta las ventajas de que puede llevarse a cabo rápida y simplemente utilizando equipos bioanalíticos estándares con el fin de proporcionar resultados exactos y reproducibles. Además, puede utilizarse sangre completa sin necesidad de extracción.

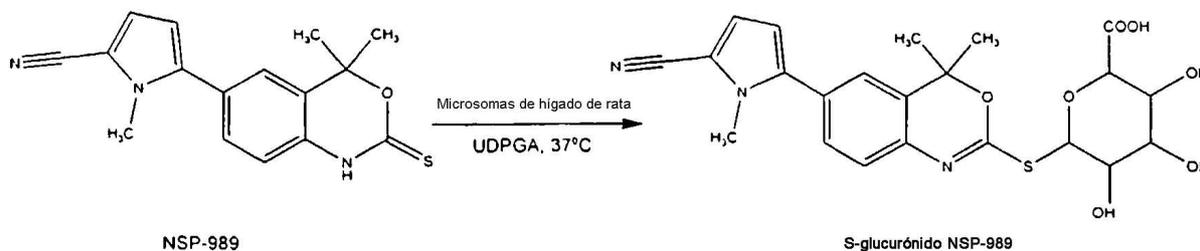
La invención también proporciona un kit de ensayo adecuado para detectar la cantidad de metabolito de tanaproget en una muestra (por ejemplo sangre u orina). En una forma de realización, el kit comprende un competidor de unión que desplaza el farmacéutico del metabolito de tanaproget en la muestra, y un anticuerpo que se une al farmacéutico pero no en grado significativo al competidor de unión.

Los ejemplos siguientes se proporcionan a fin de ilustrar la invención y no limitan el alcance de la misma. El experto en la materia apreciará que, aunque se describen de manera general reactivos y condiciones específicas en los ejemplos siguientes, pueden introducirse modificaciones que se pretende que se encuentren comprendidas dentro del espíritu y alcance de la invención.

Los ejemplos siguientes son ilustrativos de los métodos para generar compuestos de la invención.

Ejemplo 1. Preparación de S-glucurónido de tanaproget a partir de microsomas de hígado de rata

El glucurónido de tanaproget se preparó en microsomas de hígado de rata macho y se identificó la estructura como un conjugado de S-glucurónido mediante cromatografía líquida (CL)/espectrometría de masas (EM) y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Este metabolito también se identificó como un metabolito principal en microsomas de hígado de rata tanto macho como hembra, de perro y humano, y también era el componente de tipo farmacológico principal observado en plasma de rata, perro y humano. Este S-glucurónido también puede prepararse sintéticamente de modo simultáneo con un N-glucurónido. Los dos glucurónidos sintéticos pudieron separarse mediante HPLC y sus estructuras se caracterizaron mediante CL/EM y espectroscopía RMN. En el esquema siguiente se utiliza la terminología NSP-989 en lugar de tanaproget.



A. Incubación de tanaproget y extracción de glucurónido de tanaproget

Se prepararon microsomas hepáticos a partir de ratas Sprague-Dawley en el propio laboratorio utilizando un método de ultracentrifugación diferencial descrito por Lake [Lake B., en: *Biochemical Toxicology: A Practical Approach*, Snell K., Mullock B. (editores), IRL Press: Inglaterra, 1987, páginas 183 a 215] con ligeras modificaciones. Se determinaron los contenidos de proteínas microsómicas y citocromo P450 mediante el método de Bradford [Bradford M.M., *Anal Biochem.* 72:248-254, 1976] y de Omura y Sato [Omura T., Sato R., *J. Biol. Chem.* 238:2370-2378, 1964], respectivamente. La concentración de proteína y el contenido de P450 eran de 50,9 mg/ml y 0,42 nmoles/mg de proteína, respectivamente. Se obtuvo acetato amónico, cloruro de magnesio y ácido uridín-difosfoglucurónico (UDPGA) de Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Los solventes utilizados para la expresión y el análisis cromatográfico eran de grado HPLC o grado reactivo ACS (Mallinckrodt Baker, Phillipsburg, NJ).

Las incubaciones (100 ml) se llevaron a cabo con tanaproget (40 μM), UDPGA (5 mM), cloruro de magnesio (10 mM) y microsomas hepáticos de rata macho (1,5 mg/ml) en tampón de fosfato potásico 0,1 M, pH 7,4, a 37°C. Las muestras se preincubaron durante 1 minuto a 37°C y la reacción se inició mediante la adición de UDPGA. La muestra se enfrió utilizando un baño de hielo para detener la reacción tras 3 horas. El tanaproget no reaccionado se eliminó de las muestras mediante dos extracciones con éter dietílico (200 ml x 2).

El glucurónido de tanaproget y el tanaproget no reaccionado remanente se extrajeron mediante extracción en fase sólida utilizando cartuchos C-18 y la elución con metanol (10 ml). El eluyente metanol se secó mediante evaporación rotatoria bajo vacío a temperatura ambiente. Los residuos se extrajeron con acetonitrilo al 50% en agua (5 ml) y se

centrifugaron a 3.500 rpm durante 15 minutos. Se analizaron alícuotas (800 µl) de los sobrenadantes mediante un sistema de HPLC Waters 2690[®] con una columna semipreparativa. La separación de los metabolitos de tanaproget se llevó a cabo en una columna Phenomenex Luna[™] (C18, 250 x 10 mm DI, tamaño de partícula: 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA) y los metabolitos se detectaron mediante monitorización de la absorbancia de UV a 310 nm. Se fijó la temperatura del automuestreador en 6°C, mientras que la columna se encontraba a temperatura ambiente. Se utilizó acetato amónico (10 mM, pH 4,5) y acetonitrilo como fases móviles A y B, respectivamente. Se utilizó el gradiente siguiente a un caudal de 2 ml/minuto con un reequilibrado post-análisis de 5 minutos: 0 minutos 20% de B, 1 minuto de 20% de B, 10 minutos de 40% de B, 20 minutos de 70% de B, 25 minutos de 95% de B, 28 minutos de 95% de B y 30 minutos de 20% de B. Bajo estas condiciones, se recogió el pico de glucurónido de tanaproget (M1) a los 15,5 minutos para el análisis de espectroscopía RMN. Las fracciones que contenían el pico de conjugado de glucurónido se recogieron en tubos limpios y se congelaron sobre hielo seco inmediatamente después de la recolección. Todas las fracciones de glucurónido se agruparon y se eliminó el acetonitrilo mediante evaporación rotatoria. El glucurónido se extrajo de los eluidos acuosos mediante extracción en fase sólida utilizando cartuchos C-18. Se utilizó agua (2 ml) para lavar el tampón residual, y metanol al 50% en agua para eluir el conjugado de glucurónido. Los eluidos de metanol/agua se secaron mediante evaporación rotatoria bajo vacío a temperatura ambiente. Las soluciones acuosas remanentes se transfirieron a un vial cónico de 5 ml para eliminar el agua mediante liofilización. El secado del residuo sólido continuó durante la noche para eliminar la humedad adicional previamente al análisis de espectroscopía RMN.

20 *B. Condiciones del análisis de HPLC/EM:*

Se utilizó un espectrómetro de masa cuadrupolo triple Micromass Quattro Ultima[™] (Waters Corp., Milford, MA). Se dotó de un interfaz de ionización por electropulverización (ESI) y se operó en modos de ionización tanto positivo como negativo. Los parámetros fijados en el espectrómetro de masas fueron los siguientes: pulverización ESI: 2,5 kV, cono: 50 V, resolución de masas: 0,7 Da ± 0,2 Da, anchura a media altura; flujo de gas de desolvatación: 900 a 1.000 L/h, flujo de gas en el cono: 50 a 80 l/hora, temperatura de la fuente: 80°C, temperatura del gas de desolvatación: 250°C. Los datos de CL/EM se analizaron con el programa Micromass MassLynx (Waters Corp., versiones 3.5 y 4.0).

Los solventes utilizados para el análisis cromatográfico del glucurónido de tanaproget aislado a partir de microsomas de hígado de rata eran de grado HPLC o de grado reactivo ACS (Mallinkrodt Baker, Phillipsburg, NJ y EMD Chemicals, Gibbstown, NJ). El sistema de HPLC acoplado al espectrómetro de masas era un sistema de HPLC modelo 2695[™] de Waters Alliance. Se dotó de un automuestreador integrado y de un detector de UV de serie de diodos modelo 996 para la monitorización de 210 a 350 nm. Las separaciones se llevaron a cabo en una columna Phenomenex Luna C18(2) (150 x 2 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA) con una columna de guarda Deltabond[™] C-18 (10 x 2 mm) (ThermoElectron Corp., Bellefonte, PA). El caudal era de 0,3 ml/minuto. Durante el análisis de muestras mediante CL/EM, se desviaron del espectrómetro de masas hasta 10 minutos del flujo inicial antes de iniciar la evaluación de los metabolitos. La fase móvil A era de acetato amónico 10 mM en agua, pH 4,5 (diluido a partir de una solución madre 0,5 M de cantidades molares iguales de acetato amónico y ácido acético) y la fase móvil B era de acetonitrilo. El gradiente de fase móvil lineal utilizado fue: 0 minutos, 10% de B; 1 minuto, 10% de B; 10 minutos, 15% de B; 35 minutos, 17,5% de B; 36 minutos, 25% de B; 50 minutos, 30% de B; 55 minutos, 50% de B; 60 minutos, 90% de B; 62 minutos, 90% de B; 65 minutos, 10% de B; 75 minutos, 10% de B.

45 *C. Resultados de CL/EM*

El glucurónido de tanaproget produjo iones moleculares protonados y desprotonados ($[M+H]^+$ y $[M-H]^-$), a m/z 474 y 472, respectivamente), indicando un peso molecular de 473. Este peso era 176 Da superior al del tanaproget. La pérdida de 176 Da del m/z 474 en el espectro de masas de ionización positiva y de m/z 472 en el espectro de masas de ionización negativa generó los iones fragmentos a m/z 298 en el modo de ionización positiva y de m/z 296 en el modo de ionización negativa, que se asignan a tanaproget. El fragmento de ión de ácido glucurónico se observó en m/z 175 en el modo de ionización negativa. El ión fragmento de m/z 339 aparentemente procede de la fragmentación del anillo del ácido glucurónico. Estos datos concuerdan con la conjugación del ácido glucurónico de tanaproget.

55 *D. Espectroscopía de RMN*

Se utilizó dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) para todas las muestras de RMN. Para todas las muestras de metabolito aisladas a partir de microsomas de hígado de rata, se realizó la disolución en una bolsa de contención bajo argón para reducir la absorción del agua atmosférica. Típicamente se utilizaron alícuotas de 50 µl de un total de 200 µl de DMSO-d₆ para enjuagar el vial que contenía la muestra secada al vacío y después se transfirieron a un tubo de RMN de 3 mm. Se obtuvieron los espectros de RMN a 500 MHz (instrumento Varian Inova[™]) y a 600 MHz (instrumento Bruker Avance[™]). La mayor parte del trabajo experimental de RMN se llevó a cabo en un instrumento Varian Inova 500[™] MHz dotado de una sonda de detección indirecta Varian[™] de 3 mm para ¹H. Se informan los desplazamientos químicos δ respecto a la TMS interna (δ0,0) para ¹H y para ¹³C. En el DMSO-d₆, los desplazamientos químicos de ¹H se referencian respecto al DMSO protonado residual a δ2,49 y los desplazamientos químicos de ¹³C se referencian al DMSO-d₆ interno a δ39,5. Los desplazamientos químicos para ¹⁵N se informan

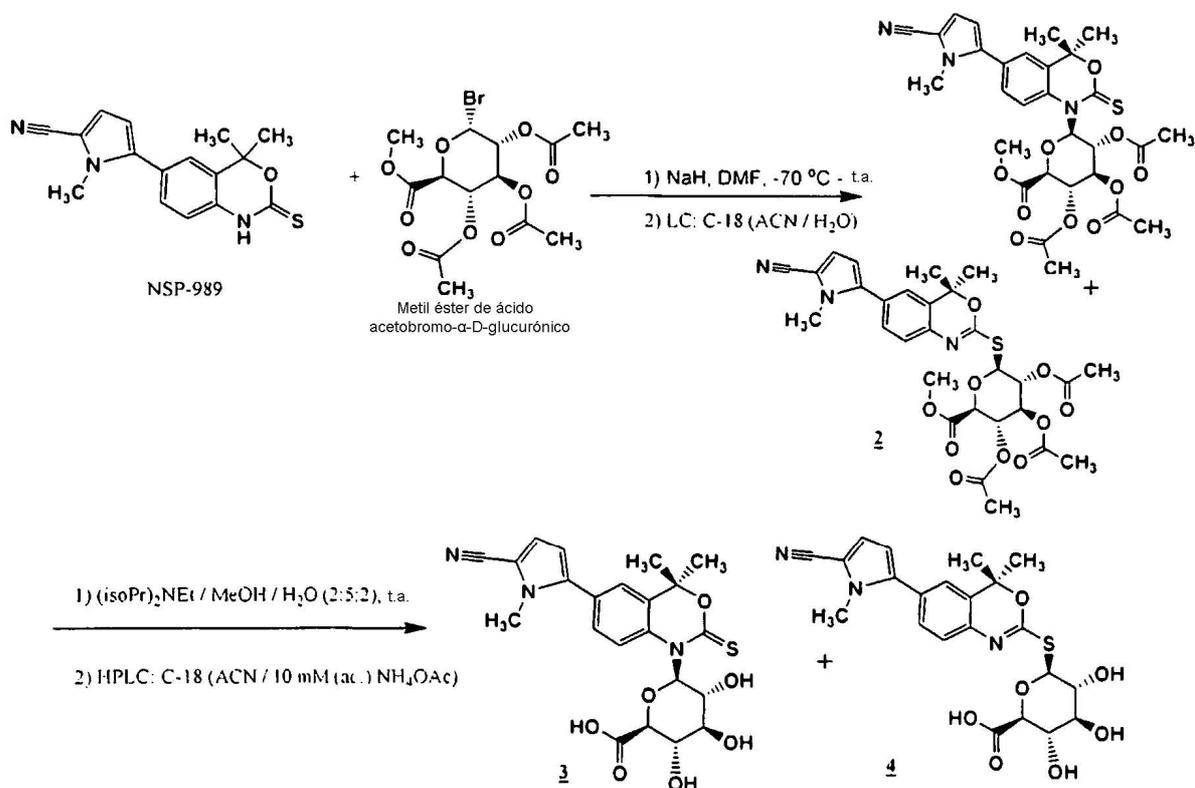
respecto al amonio líquido ($\delta 0,0$) y se referencian respecto a la formamida externa a $\delta 112,0$. Se informa de las multiplicidades de los protones como s=singulete, d=doblete, dd=doblete de dobletes y m=multiplete. Los valores de J se proporcionan en forma de constantes de acoplamiento ^1H - ^1H , en Hz.

5 Los parámetros generales para los experimentos de RMN- ^1H incluyen una anchura espectral de 5.000 Hz, 32 K puntos de datos, una anchura de pulso de 45° , un retardo de relajación de 1 segundo y un promedio de entre 32 y >1.000 barridos, según la concentración de la muestra. Se utilizaron rutinas de procesamiento de ensanchamiento de línea ($\sim 0,5$ Hz) o gaussianas para incrementar la proporción de señal a ruido (S/N). Los parámetros generales para un experimento de RMN- ^{13}C incluyen una anchura espectral de 25.000 Hz, 64 K puntos de datos, una anchura de pulso de 45° , un retardo de relajación de 1 segundo y un promedio de por lo menos 10.000 barridos para conseguir una S/N óptima. Además, se aplicó un ensanchamiento de línea de 2 Hz para incrementar la S/N. Todos los espectros se captaron a 25°C .

15 Se utilizaron varios tipos de experimentos 2D de RMN para determinar las conectividades ^1H - ^1H y ^1H - ^{13}C . Incluyeron un experimento gCOSY para la determinación de las conectividades ^1H - ^1H a tres enlaces, los experimentos gHSQC y gHMBC para la determinación de las conectividades ^1H - ^{13}C a uno, dos, tres y cuatro enlaces y un experimento NOESY o ROESY para la determinación de las conectividades a través del espacio.

20 A pesar de varios intentos de utilización de muestras de glucurónido de tanaproget aisladas recientemente, la pureza y concentración de las muestras típicamente era baja (pureza <70% y una cantidad total estimada <20 μg en solución), dificultando la captación de datos completos de RMN 2D. Además, durante el procedimiento de incubación de microsomas y las posteriores etapas de aislamiento, la solución tendía a producir rápidamente el análogo carbamato del tanaproget (al sustituirse el azufre del tanaproget por oxígeno). Sin embargo, se consiguieron desplazamiento químico, acoplamiento y correlaciones de RMN 2D para preparar asignaciones de ^1H y ^{13}C casi completas de glucurónido de tanaproget aislado de microsomas de hígado de rata. Sin embargo, no pudo determinarse la localización de la unión de glucurónido a partir de la muestra derivada de microsomas. Se observó únicamente una correlación heteronuclear clave protón-carbono en el espectro de RMN de gHMBC de la muestra de incubación de microsomas de hígado de rata, la de H-1' (5,10 ppm) a C-6 (161,63 ppm). Sin embargo, se esperaba este mismo entrecruzamiento de picos tanto si el metabolito era un N-glucurónido como un S-glucurónido (es decir, un acoplamiento a tres enlaces en cualquiera de los dos casos).

Ejemplo 2. Preparación de conjugados sintéticos de glucurónido de tanaproget.



A. Condiciones de análisis de HPLC/EM y de RMN:

Se captaron datos de HPLC/EM para los compuestos sintéticos utilizando una HPLC Waters Alliance 2695TM acoplada a un espectrómetro de masas Waters ZQTM. En general, las muestras se analizaron utilizando un método de CL/EM de acceso abierto, tal como se ha descrito anteriormente [Mallis L.M., Sarkahian A.B., Kulishoff J.M., Watts W.L. Jr., J. Mass Spectrom. 37:889-896, 2002].

Se utilizó dimetilsulfoxido deuterado (DMSO-d₆) para todas las muestras de RMN excepto la n^o 2, que se disolvió en CDCl₃ (solventes deuterados de Aldrich, Milwaukee, WI). Los espectros de RMN se obtuvieron a 300 MHz (instrumento Bruker DPXTM), 400 MHz (instrumento Varian InovaTM), 500 MHz (instrumento Varian InovaTM) y 600 MHz (instrumento Bruker AvanceTM). La mayor parte del trabajo experimental de RMN se llevó a cabo en un instrumento Varian Inova 500TM MHz provisto de una sonda de detección indirecta VarianTM de 3 mm para ¹H. Los desplazamientos químicos δ (ppm) en DMSO-d₆ se informan tal como se ha indicado anteriormente para el glucurónido de tanaproget. En CDCl₃, los desplazamientos químicos de ¹H se refieren al CHCl₃ protonado residual en δ7,27 y los desplazamientos químicos de ¹³C se refieren al CDCl₃ interno a δ77,7. Se informa de los desplazamientos químicos para ¹⁵N tal como se ha indicado anteriormente para el glucurónido de tanaproget.

Los parámetros generales para los experimentos de RMN-¹H y de RMN-¹³C son tal como se ha indicado anteriormente para el glucurónido de tanaproget. Todos los espectros se captaron a 25°C. Los experimentos de RMN 2D utilizados para determinar las conectividades ¹H-¹H y ¹H-¹³C fueron gCOSY, gHSQC, gHMBC, NOESY y ROESY.

B. Preparación del ácido S-glucurónido protegido (2) de tanaproget

Se añadió gota a gota una solución de tanaproget (0,292 g, 1,0 mmol) en dimetilformamida (DMF) anhidra (10 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno a una solución de hidruro sódico (NaH) (0,052 g, 2,2 mmoles) en DMF (50 ml) que se había enfriado a aproximadamente -70°C (hielo seco). Tras agitar durante 10 minutos, se añadió gota a gota una solución de metil éster de ácido acetobromo-α-D-glucurónico (0,396 g, 1 mmol) en DMF (10 ml). A continuación, la solución de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante un total de 24 horas. Tras 24 horas, se dividió la solución de reacción entre agua (100 ml) y acetato de etilo (100 ml). La capa acuosa se extrajo nuevamente con acetato de etilo (100 ml). Las capas orgánicas agrupadas se lavaron con solución saturada de cloruro sódico (NaCl) (100 ml), se secaron (sulfato de magnesio, MgSO₄) y se eliminó el solvente al vacío. Se cromatografiaron alícuotas del material crudo condiciones de C18 de fase inversa a baja presión (RediSep/ISCO, 125 x 25 mm DI, tamaño de partícula: 40 μm) con un gradiente de 50% a 95% de acetonitrilo/agua. Las fracciones que eluyeron con 75% a 80% de acetonitrilo/agua contenían el derivado ácido (D)-glucurónico S-protegido (2) de tanaproget. Se obtuvo un total de aproximadamente 200 mg de (2) con una pureza de 95% según el análisis de espectroscopía de RMN (rendimiento aislado de 32%). Todos los compuestos químicos se obtuvieron de Aldrich (Milwaukee, WI) y se utilizaron sin purificación adicional o secado.

C. Preparación de derivados ácido N-glucurónico (3) y ácido S-glucurónico (4) de tanaproget

En una reacción separada, se añadió gota a gota una solución de tanaproget (0,146 g, 0,5 mmoles) en DMF anhidro (5 ml) bajo una atmósfera de nitrógeno a una solución de NaH (0,027 g, 1,1 mmoles) en DMF (25 ml) que se enfrió hasta aproximadamente -70°C (hielo seco). Tras agitar durante 10 minutos, se añadió gota a gota a continuación una solución de metil éster de ácido acetobromo-α-D-glucurónico (0,198 g, 0,5 mmoles) en DMF (5 ml). A continuación, la solución de reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante un total de 8 horas. La solución de reacción se dividió entre agua (100 ml) y acetato de etilo (100 ml). La capa acuosa se extrajo nuevamente con acetato de etilo (100 ml). Las capas orgánicas agrupadas se lavaron con solución saturada de NaCl (100 ml), se secaron (MgSO₄) y se eliminó el solvente al vacío, rindiendo 0,350 g de material de reacción crudo. A una parte de este material (0,210 g) se le añadió una solución de MeOH/base de Hunig ((iso-Pr)₂NEt)/H₂O (5 ml/2 ml/2 ml) y la solución se agitó durante 8,5 horas a temperatura ambiente. A continuación, se ajustó el pH de la solución de reacción a 2,5 utilizando HCl (concentrado, aproximadamente 1,5 ml) y se cromatografió mediante HPLC de fase inversa semipreparativa utilizando una columna YMC-Pack CN 150 x 20 mm, S-5 μm con un gradiente de 15% a 35% de acetonitrilo en acetato amónico (acuoso) 10 mM. A partir de inyecciones repetidas, se purificaron aproximadamente 5 mg del derivado ácido N-(D)-glucurónico (3) (rendimiento de 3% aislado de tanaproget) y 15 mg del derivado S-(D)-glucurónico (4) (rendimiento de 10% aislado de tanaproget) hasta una pureza >98% para el análisis de RMN y el análisis y comparación de CL/EM.

Ejemplo 3. Comparación de los compuestos sintéticos con M1

A partir de la comparación extensa de los datos espectrales y cromatográficos del metabolito derivado de microsomas y los compuestos sintéticos, se determinó que el metabolito era el S-(β)-D-glucurónido de tanaproget.

El espectro de CL/EM de modo de ionización positiva (no representado) del compuesto sintético 2, el S-glucurónido protegido de tanaproget, proporcionó un ión molecular protonado [M+H]⁺ en 614, indicando un peso molecular de 613. La pérdida de 297 Da proporcionó un m/z de 317, que se asignó a [M+H - tanaproget]⁺. Una señal iónica en m/z

257 se asignó a m/z 317 - ácido acético ($C_2H_4O_2$), y un ión observado en m/z 197 se asignó a m/z 257 - ácido acético ($C_2H_4O_2$). Además, un ión en m/z 155 se asignó a m/z 197 - acetilo (C_2H_3O) + H. Los espectros de CL/EM protonados y desprotonados (no mostrados) del S-glucurónido **4** proporcionaron un ión $[M+H]^+$ en 474 y un ión $[M-H]$ en m/z 472, respectivamente (como también ocurrió para **3**; espectros no mostrados), indicando la glucuronidación del tanaproget. También se observaron para **4** en los espectros de masas de modo de ionización negativa los iones m/z 298 y m/z 296, asignados a tanaproget, es decir, a la pérdida de ácido glucurónico. Además, también se detectó un fragmento en m/z 175, asignado a ácido glucurónico, en el espectro de ionización negativa.

También se llevaron a cabo comparaciones de HPLC para confirmar si el glucurónido sintético principal del tanaproget, el S-glucurónido **4**, era idéntico al glucurónido de tanaproget, que se propone que sea el S-glucurónido, a partir de los resultados de RMN y espectrales proporcionados anteriormente. Se utilizaron cinco tipos diferentes de columnas de HPLC de fase inversa bajo dos condiciones de fase móvil diferentes. Estas diez condiciones de HPLC cubrían un amplio abanico de selectividades, tal como pone de manifiesto el cambio de orden de elución de los componentes principales y menores en las muestras. Para comparar y hacer corresponder el tiempo de retención de los picos principales en las dos muestras, se llevaron a cabo experimentos de adición. El glucurónido sintético que se determinó que era S-glucurónido **4** se encontró que presentaba tiempos de retención idénticos a los del metabolito glucurónido de tanaproget bajo la totalidad de las diez condiciones de HPLC.

Las correlaciones de RMN clave en los compuestos sintéticos **3** y **4** que localizan el sitio de glucuronidación en el tanaproget se indican a continuación. El desplazamiento químico de protones y constante de acoplamiento para el protón anomérico (H-1') con β -estereoquímica en el N-glucurónido era de 6,31 ppm y es un doblete con una constante de acoplamiento de 9,5 Hz. El desplazamiento químico del carbono anomérico (C-1') era de 90,2 ppm. El desplazamiento químico del carbono de la benzoxazín-2-tiona (C-6) del metabolito N-glucuronidado del tanaproget era de 188,0 ppm, comparado con el carbono del tiocarbonilo del grupo benzoxazín-2-tiona observado en la molécula parental, el tanaproget, de 182,8 ppm.

Existían cuatro correlaciones a 3 enlaces importantes observadas en el espectro de HMBC (no representadas) de dicha molécula: entre el protón anomérico (H-1') y el carbono de la benzoxazín-2-tiona (C-6), y el carbono aromático sp^2 en 131,5 ppm (C-4) y entre los protones H-7 y H-9, observados en 7,50 ppm y 7,57 ppm, respectivamente, y C-4. El desplazamiento químico del protón (H-10) que se encontraba en una posición *peri*- respecto al N-glucurónido se ha movido campo abajo a 7,80 ppm, en comparación con 7,13 ppm en la molécula parental, indicando la proximidad del grupo ácido glucurónico (y posiblemente la fracción ácido carboxílico) a este protón. Se llevaron a cabo experimentos de gHMBC de 1H - ^{15}N con todos los compuestos estudiados, pero no se observaron señales del nitrógeno clave N-5 en ningún compuesto excepto en el tanaproget (δ 144,81), que presentaba un entrecruzamiento de picos de la HBMC con H-10. El otro nitrógeno esperado, N-15, únicamente se observó en el tanaproget (δ 154,99) y en **3** (δ 155,40), y en cada compuesto presentaba correlaciones de la gHMBC con H-17, H-18 y H-19.

El desplazamiento químico de protones y la constante de acoplamiento del protón anomérico (H-1') con estereoquímica β en el S-glucurónido sintético **4** era de 5,11 ppm, y era un doblete con una constante de acoplamiento de 10,2 Hz. El desplazamiento químico del carbono anomérico (C-1') era de 85,0 ppm. El desplazamiento químico de carbonos del carbono (C-6) de la benzoxazín-2-tiona derivatizada de dicho metabolito S-glucuronidado del tanaproget se observó en 161,3 ppm, con un desplazamiento químico desplazado bastante campo arriba del desplazamiento químico observado del carbono del tiocarbonilo (182,8 ppm) del grupo benzoxazín-2-tiona observado en la molécula parental, tanaproget. Se observó una correlación a 3 enlaces en el espectro de HMBC de esta molécula entre el protón anomérico (H-1') del ácido β -glucurónico y el carbono (C-6) de la benzoxazín-2-tiona derivatizada. Finalmente, se observó una correlación a 2 enlaces en el espectro de HMBC entre los protones del gem-dimetilo (H-11 y H-12) observados en 1,59 ppm y 1,70 ppm, y el carbono (C-2) al que se encontraba unido este grupo, observado en 81,5 ppm. Estos datos confirman que el grupo benzoxazín-2-tiona (N(C=S)O) del tanaproget no se había reorganizado para formar un grupo tiolcarbamato (N(C=O)S) antes de la S-glucuronidación.

La comparación entre los espectros de RMN- 1H y los datos de RMN derivados del glucurónido de tanaproget y los dos compuestos sintéticos **3** y **4** reveló que el glucurónido de tanaproget debía ser el derivado S-glucurónido del tanaproget. El desplazamiento químico de H1' para el glucurónido de tanaproget era 5,10 ppm y de 5,11 ppm para **4**, en comparación con H-1' en 6,31 ppm observado para **3**. Además, C-6 en la parte benzoxazín-2-tiona del tanaproget resonaba a \sim 161 ppm tanto para el glucurónido de tanaproget como para **4**, pero en 188,0 ppm para **3** y en 182,8 ppm para el tanaproget.

Ejemplo 4. Hidrólisis enzimática del metabolito conjugado de glucurónido de tanaproget

Con el fin de confirmar que el derivado glucurónido de tanaproget era un profármaco al administrarse en los pacientes, se utilizó en el ensayo siguiente la capacidad del conjugado de glucurónido de ser enzimáticamente cortado por una glucuronidasa que es nativa del tracto gastrointestinal en el ser humano.

Se hidrolizaron con Glusulasa[®] muestras agrupadas de orina (4 a 8 horas) procedentes de mujeres sanas. Alícuotas (1 ml) de la orina agrupada se ajustaron a pH 5 con 0,5 ml de tampón de acetato sódico 0,6 M. La orina diluida se mezcló con Glusulasa[®] (9.000 unidades/ml, 100 μ l) y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación suave. Se

detuvo la reacción mediante la adición de 2 ml de acetona y se separó el precipitado mediante centrifugación. El sobrenadante se secó bajo nitrógeno en un TurboVap™ (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA). Los residuos se reconstituyeron con 1 ml de metanol al 60% en agua y posteriormente se analizaron mediante HPLC y CL/EM, confirmando la conversión del glucurónido en el fármaco parental tanaproget. Se llevaron a cabo incubaciones de control bajo las mismas condiciones, aunque sin adición de Glusulasa® o con Glusulasa® y 10 mM de inhibidor sacarolactona de β -glucuronidasa y no se observó conversión del conjugado de glucurónido en tanaproget.

Ejemplo 5. Farmacología

Los glucurónidos de tanaproget son un profármaco del tanaproget, un agonista no esteroideo de receptores de progesterona primero de su clase utilizado principalmente en la anticoncepción. El efecto de los glucurónidos del tanaproget sobre la actividad de la fosfatasa alcalina en las células T47D se analizó del modo siguiente.

A. Reactivos:

Medio de cultivo: DMEM:F12 (1:1) (GIBCO, BRL) suplementado con suero de feto bovino tratado con carbón (no inactivado por calor al 5% (v/v)), 100 U/ml de penicilina, estreptomycin 100 μ g/ml y GlutaMax 2 mM (GIBCO, BRL).

Tampón de ensayo de fosfatasa alcalina: Tris-HCl 1,01 M, pH 9,8, que contenía Triton X-100 al 0,2%, Tris-HCl 0,1 M, pH 9,8, que contenía fosfato de p-nitrofenilo 4 mM (Sigma).

B. Cultivo celular y tratamiento:

Se descongelaron en un baño de agua a 37°C células T47D congeladas y se diluyeron a 280.000 células/ml en medio de cultivo. A cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Falcon, Becton Dickinson Labware) se le añadieron 180 μ l de suspensión celular diluida.

A continuación, se añadieron a cada pocillo veinte μ l de compuestos de referencia o de ensayo diluidos en el medio de cultivo. Las células se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ durante 24 horas. Para el cribado de alto rendimiento, se sometió a ensayo una concentración de cada compuesto a 0,3 μ g/ml. Basándose en un peso molecular medio de 300 g/mol para los compuestos de la biblioteca, la concentración era de aproximadamente 1 μ M. A continuación, los compuestos activos se sometieron a ensayo en ensayos de respuesta a dosis para determinar la EC₅₀.

C. Ensayo del enzima fosfatasa alcalina:

Al final del tratamiento se retiró el medio de la placa. Se añadieron cincuenta μ l de tampón de ensayo a cada pocillo. Se agitaron las placas en un agitador de placas de titulación durante 15 minutos. A continuación, se añadieron 150 μ l de tampón de ensayo a cada pocillo. Se realizaron mediciones de la densidad óptica a intervalos de 5 minutos durante 30 minutos a una longitud de onda de ensayo de 405 nm.

D. Análisis de los datos de respuesta a dosis:

Para los compuestos de referencia y de ensayo, se generó una curva de respuesta a dosis para las dosis frente a la tasa de la reacción enzimática (pendiente). Se utilizaron datos transformados mediante raíz cuadrada para el análisis de la varianza y el ajuste no lineal de la curva de respuesta a dosis para los modos tanto agonista como antagonista. Se utilizó la ponderación de Huber para reducir la influencia de los valores atípicos. Se calcularon los valores de EC₅₀ a partir de los valores retrotransformados. Se utilizó el programa JMP (SAS Institute, Inc.) tanto para el análisis unidireccional de la varianza como para el análisis de respuesta a dosis no lineal -4 en estudios tanto de una sola dosis como de dosis-respuesta.

E. Resultados:

El S-glucurónido de tanaproget a 0,1 nM presentó una eficacia de 60% en comparación con la progesterona.

El tanaproget puede regenerarse mediante experimentos de hidrólisis enzimática, tal como los descritos en el Ejemplo 4, anteriormente.

Ejemplo 6. Metabolitos adicionales del tanaproget.

Mediante la utilización de los métodos descritos en el Ejemplo 1 para la obtención de metabolitos de glucurónido de tanaproget, se observaron, utilizando técnicas conocidas, metabolitos adicionales del tanaproget en las preparaciones de microsomas de hígado de rata y en preparaciones de microsomas de hígado de monos macho y hembra.

Se observó el metabolito M2 en preparaciones de microsomas de hígado de rata macho. Este metabolito produjo un

[M-H]⁻ en m/z 312. El ión producto en m/z 58 de NCS⁻, que indicaba un grupo tioamida no modificado, también se observó para NSP-989. Los iones producto en m/z 159 y 195 indicaban que el anillo pirrol era el sitio de metabolismo. Por lo tanto, se propuso que el metabolito M2 era hidroxí-NSP-989 con el grupo hidroxí en la fracción pirrol.

5 Se observó el metabolito M3 en preparaciones de microsomas de hígado de rata macho y de monos macho y hembra. Este metabolito produjo un [M-H]⁻ en m/z 312. El ión producto en m/z 58 de NCS⁻, que indicaba un grupo tioamida no modificado, también se observó para NSP-989. El ión producto en m/z 237, observado para NSP-989 en m/z 220, indicaba la oxidación del anillo fenilo o pirrol. Los iones producto en m/z 195 y 252 concordaban con la oxidación del anillo fenilo o pirrol. Por lo tanto, se propuso que el metabolito M3 era hidroxí-NSP-989 con el grupo hidroxí en la fracción fenilo o pirrol.

15 Se observó el metabolito M4 en todas las muestras de metabolismo *in vitro*. Este metabolito produjo un [M-H]⁻ en m/z 280 que era 16 unidades de masa atómica (amu) menor que NSP-989. La falta de un ión producto en m/z 58 y el desplazamiento de 16 amu de peso molecular indicaban un grupo tioamida modificado. Los iones producto, observados en m/z 129, 220 y 234 también se encontraban presentes para NSP-989. El metabolito M4 presentaba el mismo tiempo de retención de HPLC y espectro de iones producto (datos no mostrados) que el NSP-989-carbamato sintético. Por lo tanto, se identificó que el metabolito M4 era NSP-989-carbamato.

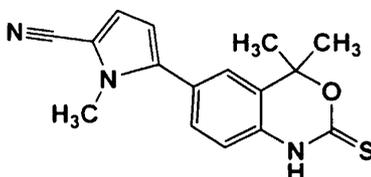
20 Se observó el metabolito M6 en preparaciones de microsomas de hígado de perro y de rata. Este metabolito produjo un [M-H]⁻ en m/z 344. Los iones producto en m/z 80 y 81 indicaban la presencia de un grupo sulfato. Los iones producto en m/z 220 y 234 indicaban que las partes no tiocarbonilo de la molécula de NSP-989 no habían sido modificadas. Por lo tanto, se identificó que el metabolito M6 era sulfato de NSP-989 (ácido 6-(5-ciano-1-metil-1H-pirrol-2-il)-4,4-dimetil-4H-benzo[d][1,3]oxazín-2-sulfónico).

25 Dichos metabolitos pueden purificarse a partir de preparaciones de microsomas utilizando los métodos descritos anteriormente para los derivados glucurónido. Alternativamente, estos metabolitos pueden generarse utilizando técnicas convencionales de síntesis.

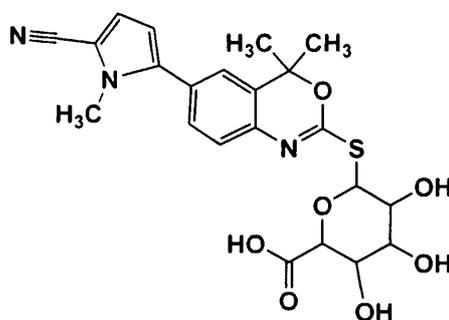
REIVINDICACIONES

1. Derivado S-glucurónido o N-glucurónido sintético del tanaproget.

5 2. Derivado glucurónido sintético del tanaproget según la reivindicación 1, presentando dicho tanaproget la estructura central:

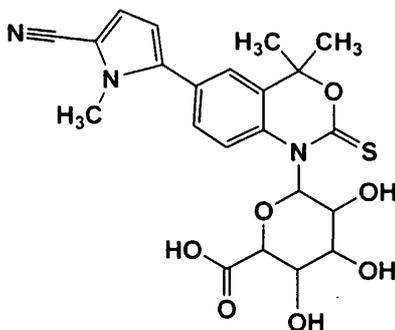


10 3. Derivado según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque presenta la estructura:



15 4. Derivado glucurónido sintético del tanaproget según la reivindicación 3, en el que dicho compuesto es un derivado S-β-(D)-glucurónido del tanaproget.

5. Derivado según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque presenta la estructura:



20 6. Anticuerpo generado utilizando un derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, siendo dicho anticuerpo específico para dicho derivado del tanaproget.

25 7. Kit para la monitorización de la terapia con tanaproget, comprendiendo dicho kit un anticuerpo según la reivindicación 6 o un estándar que comprende un derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

8. Método *in vitro* para detectar metabolitos del tanaproget, comprendiendo dicho método la comparación de una muestra con un derivado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

30 9. Método *in vitro* para detectar metabolitos del tanaproget, comprendiendo dicho método detectar la unión a un anticuerpo según la reivindicación 6.

10. Composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable y un derivado glucurónido del tanaproget según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

35 11. Utilización de un derivado glucurónido del tanaproget según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento útil para la anticoncepción en un mamífero.

12. Método para producir un derivado glucurónico sintético del tanaproget, caracterizado porque presenta el esquema de reacción:

