

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 461 520**

51 Int. Cl.:

C07D 405/06 (2006.01)

A61K 31/403 (2006.01)

A61P 5/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.11.2010** **E 10779407 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 2499135**

54 Título: **Modulador de receptores de andrógenos y sus usos**

30 Prioridad:

13.11.2009 US 261022 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.05.2014

73 Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

72 Inventor/es:

JADHAV, PRABHAKAR KONDAJI y
KRISHNAN, VENKATESH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 461 520 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

Modulador de receptores de andrógenos y sus usos.

La presente invención pertenece al campo de los moduladores de receptores de andrógenos para uso terapéutico.

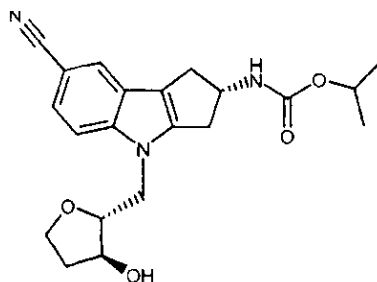
Los andrógenos esteroides endógenos (esto es, testosterona y 5α -dihidrotestosterona (DHT)) son las hormonas de sexo circulantes principales y desempeñan un papel en la regulación de diversos procesos fisiológicos. Entre los efectos anabólicos (por ejemplo, construcción de tejidos) de los andrógenos figuran el aumento y fortalecimiento de la masa muscular y el aumento de la masa y densidad ósea, mientras que entre los efectos andrógenos (por ejemplo, masculinización) figuran el desarrollo de tejidos reproductores internos (por ejemplo, próstata y vesículas seminales), los genitales externos, las configuraciones del crecimiento del peso en hombres y la libido. Clínicamente se ha usado la terapia de sustitución de andrógenos en el tratamiento de diversas afecciones y trastornos, incluidos hipogonadismo masculino, osteoporosis, enfermedades de agotamiento muscular y disfunción sexual o eréctil.

Sin embargo, la terapia con andrógenos esteroides tiene limitaciones. Por ejemplo, se ha encontrado que las preparaciones de andrógenos esteroides adolecen de una degradación rápida en el hígado que conduce a una mala biodisponibilidad oral y poca duración de la actividad tras administración parenteral, variaciones en niveles de plasma, hepatotoxicidad o reactividad cruzada con otros receptores de hormonas esteroides (por ejemplo, receptor de glucocorticoide (GR), el receptor de mineralocorticoide (MR) o el receptor de progesterona (PR)). Además, con la terapia de andrógenos esteroides están asociados efectos secundarios no deseados, incluida la estimulación de la próstata y vesículas seminales, la estimulación de tumores de próstata y subidas del antígeno prostático específico (PSA), y el riesgo de hirsutismo y virilización en mujeres.

Así, sigue habiendo una necesidad en la técnica de alternativas a la terapia con andrógenos esteroides. En particular, sigue habiendo necesidad de ligandos de receptores de andrógenos no esteroides (AR) que posean actividad agonista de andrógenos. Más en particular, sigue habiendo necesidad de agonistas de AR no esteroides que se unan a AR con una afinidad mayor en comparación con los otros receptores de hormonas esteroides. Más en particular, sigue habiendo necesidad de moduladores de receptores de andrógenos selectivos de tejido (SARM) que presenten actividad agonista de andrógenos en tejidos anabólicos tales como músculo o hueso, pero sólo actividad agonista parcial, actividad antagonista parcial o actividad antagonista en tejidos andrógenos tales como próstata o vesícula seminal.

La solicitud de patente internacional publicada WO 2008/063867 y la solicitud de patente internacional en tramitación con la presente PCT/US2009/043875 desvelan, cada una de ellas, una serie de compuestos de ciclopenta[b]indol útiles como moduladores de receptores de andrógenos. Todavía sigue habiendo necesidad de más compuestos de ciclopenta[b]indol con una potencia mejorada y/o características farmacocinéticas mejores tales como exposición o biodisponibilidad.

La presente invención está dirigida a un compuesto ciclopenta[b]indol, definido por la siguiente fórmula (I) que tiene perfiles de actividad particular en un ensayo in vitro y in vivo, que sugiere que es útil en el tratamiento de trastornos que responden a una terapia de andrógenos esteroides. Así, la presente invención proporciona un compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I)

éster isopropílico del ácido ([[(S)-7-ciano-4-((2R, 3S)-3-hidroxitetrahidrofuran-2-ilmetil)-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il]-carbámico).

La presente invención se refiere a un procedimiento para tratar o prevenir el hipogonadismo, la osteoporosis, osteopenia, sarcopenia, caquexia, atrofia muscular, disfunción sexual o la disfunción eréctil que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I). En un aspecto particular, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la osteoporosis, la osteopenia, la atrofia muscular, o la disfunción eréctil, que comprende la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I). En otro aspecto particular, la presente invención proporciona un

procedimiento para tratar o prevenir la atrofia muscular asociada con la falta de uso, trauma, inmovilización, la lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular que comprende la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I). Aún más en particular, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la atrofia muscular asociada con sustitución de cadera o rodilla, fractura de cadera, lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular que comprende la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I).

Además, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para uso en el tratamiento o la prevención de hipogonadismo, osteoporosis, osteopenia, sarcopenia, caquexia, atrofia muscular, disfunción sexual o disfunción eréctil. Más en particular, la invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para uso en el tratamiento o la prevención de osteoporosis, osteopenia, atrofia muscular o disfunción eréctil. En otro aspecto particular, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para uso en el tratamiento o la prevención de atrofia muscular asociada con falta de uso, trauma, inmovilización, lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular. Aún más en particular, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para tratar o prevenir la atrofia muscular asociada con sustitución de cadera o rodilla, fractura de cadera, lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular. Además, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para uso en terapia.

En otra realización, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de hipogonadismo, osteoporosis, osteopenia, sarcopenia, caquexia, atrofia muscular, disfunción sexual o disfunción eréctil. Más en particular, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de osteoporosis, osteopenia, atrofia muscular o disfunción eréctil. En otro aspecto particular, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de atrofia muscular asociada con falta de uso, trauma, inmovilización, lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular. Aún más en particular, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la atrofia muscular asociada con sustitución de cadera o rodilla, fractura de cadera, lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) en combinación con uno o varios vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables para el tratamiento o la prevención de hipogonadismo, osteoporosis, osteopenia, sarcopenia, caquexia, atrofia muscular, disfunción sexual o disfunción eréctil, que comprende el compuesto de fórmula (I) en combinación con uno o varios vehículos, diluyentes a excipientes farmacéuticamente aceptables. Más en particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de osteoporosis, osteopenia, sarcopenia, caquexia, atrofia muscular, disfunción sexual o disfunción eréctil, que comprende el compuesto de fórmula (I) en combinación con uno o varios vehículos, diluyentes a excipientes farmacéuticamente aceptables. Más en particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de atrofia muscular asociada con falta de uso, trauma, inmovilización, lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular que comprende el compuesto de fórmula (I) en combinación con uno o varios vehículos, diluyentes a excipientes farmacéuticamente aceptables. Aún más en particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento o la prevención de la atrofia muscular asociada con sustitución de cadera o rodilla, fractura de cadera, lesión de la médula espinal o accidente cerebrovascular, que comprende el compuesto de fórmula (I) en combinación con uno o varios vehículos, diluyentes a excipientes farmacéuticamente aceptables. En otra realización más, la composición farmacéutica de la presente invención comprende además uno o varios agentes terapéuticos adicionales.

La presente invención también abarca intermedios y procedimientos útiles para la síntesis del compuesto de fórmula (I).

El compuesto de fórmula (I) y los intermedios relacionados con ellos tienen centros quirales y se consideran aquí las configuraciones estereoisómeras. Los términos "R" y "S" se usan aquí como se usan comúnmente en química orgánica para denotar configuraciones específicas de un centro quiral. Los términos "(+)" o "RS" se refieren a una configuración de un centro quiral que comprende un racemato. La obra *Nomenclature of Organic Compounds: Principles and Practice* J.H. Fletcher y otros, eds., 1974) contiene una lista parcial de prioridades y una discusión de estereoquímica. Los estereoisómeros y enantiómeros específicos pueden prepararlos expertos en la técnica de cualificación normal usando técnicas y procedimientos bien conocidos. Por ejemplo, se pueden preparar estereoisómeros y enantiómeros específicos por síntesis estereoespecíficas usando materiales de partida enantioméricamente y geoméricamente puros, o enantiomérica y geoméricamente enriquecidos. Además, se pueden resolver y recuperar estereoisómeros y enantiómeros específicos por técnicas tales como cromatografía sobre fases quirales estacionarias, resolución enzimática, recristalización fraccionada de sales de adición. Así como las técnicas proporcionadas en los Esquemas, Preparaciones y Ejemplos de esta memoria. Además, el compuesto de la presente invención puede existir como solvato. Así, el compuesto de fórmula (I) incluye en su significado cualquier solvato del compuesto.

La designación



se refiere a un enlace que sobresale hacia adelante del plano de la página.

La designación



5 se refiere a un enlace que sobresale hacia atrás del plano de la página.

La designación



se refiere a un enlace que existe como mezcla de enlaces que sobresalen hacia adelante y hacia atrás del plano de la página.

- 10 Se han usado clínicamente o preclínicamente agonistas de receptores de andrógenos y andrógenos no esteroideos en una variedad de aplicaciones terapéuticas, por lo que los procedimientos para el tratamiento o la prevención de síntomas, afecciones o trastornos que responden al agonismo de receptores de andrógenos están relacionados con la presente invención. El compuesto de la presente invención puede administrarse o usarse en un medicamento solo o en combinación con otros agentes terapéuticos convencionales usados para tratar un síntoma particular, una afección o un trastorno. Cuando los compuestos de la presente invención se usan como parte de una combinación, los compuestos de fórmula (I) se pueden administrar separadamente o como parte de una formulación que comprende el agente terapéutico con el que debe combinarse.
- 15

Un procedimiento particular en el que se cree que el compuesto de la presente invención es útil, es en el tratamiento o la prevención de las afecciones de debilitación muscular o atrofia muscular. La debilitación muscular puede producirse como resultado natural del envejecimiento (por ejemplo, después de sustitución de la cadera o rodilla o fractura de cadera), trauma, inmovilización (por ejemplo, entablillado o escayolado del brazo), así como lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular. (Véase Hafer-Macko y otros, J. Rehab. Res. Develop. 45(2): 261-272 (2008)). Así, tal como se usa aquí, el término "atrofia muscular asociada con falta de uso, trauma, inmovilización, lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular" se refiere a atrofia muscular que se presenta como consecuencia secundaria de la incidencia de la falta de uso o inactividad (por ejemplo, después de sustitución de la cadera o rodilla o fractura de cadera), trauma, inmovilización (por ejemplo, entablillado o escayolado del brazo), lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular. Además, en el contexto de lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular, el compuesto de la presente invención se puede usar como coadyuvante a la terapia estándar de rehabilitación (por ejemplo, terapia física u ocupacional), ejercicio, paseos asistidos y/o entrenamiento para resistencia).

20

25

30

Otro procedimiento particular en el que se cree que el compuesto de la presente invención es útil es en el tratamiento o la prevención de la disfunción eréctil. Entre los agentes convencionales para el tratamiento de la disfunción eréctil figuran los inhibidores de fosfodiesterasa de tipo 5 (PDE5) tadalafil (Cialis® o Cialis® para uso diario), citrato de sildenafil (Viagra®) e hidrocloreuro de vardenafil (Levitra®). Así, la presente invención proporciona también un procedimiento de tratamiento o prevención de la disfunción eréctil que comprende la administración a un paciente que lo necesita de una cantidad eficaz del compuesto de fórmula (I) en combinación con un agente seleccionado entre el grupo constituido por tadalafil, citrato de sildenafil e hidrocloreuro de vardenafil. Más en particular, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir la disfunción eréctil que comprende administrar a un paciente que lo necesita el compuesto de fórmula (I) en combinación con un agente seleccionado entre el grupo constituido por Cialis®, Cialis® para uso diario, Viagra® y Levitra®. Además, la presente invención también proporciona el compuesto de fórmula (I) para uso en combinación con un agente seleccionado entre el grupo constituido por tadalafil, citrato de sildenafil e hidrocloreuro de vardenafil en el tratamiento de la disfunción eréctil. Más en particular, la presente invención proporciona el compuesto de fórmula (I) para uso con un agente seleccionado entre el grupo constituido por Cialis®, Cialis® para uso diario, Viagra® y Levitra® en el tratamiento de la disfunción eréctil.

35

40

45

El compuesto de la presente invención se puede formular como parte de una composición farmacéutica. Como tal, una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I) en combinación con uno o varios vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables es un aspecto importante de la presente invención. Como otro aspecto, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de fórmula (I), composición farmacéutica que comprende uno o varios agentes terapéuticos adicionales. En particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: (a) el compuesto de fórmula (I); (b) un agente terapéutico seleccionado entre el grupo constituido por tadalafil, citrato de sildenafil e hidroclicloruro de vardenafil, y (c) un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Más en particular, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: (a) el compuesto de fórmula (I) con un agente seleccionado entre el grupo constituido por Cialis®, Cialis® para uso diario, Viagra® y Levitra® en el tratamiento de la disfunción eréctil. Los ejemplos de composiciones farmacéuticas y los procedimientos para su preparación son bien conocidos en la técnica.

Tal como se usa aquí, el término “paciente” se refiere a un mamífero humano o no humano, y preferiblemente se refiere a un ser humano. El término “tratar” (o “tratar” o “tratamiento”) tal como se usa aquí se refiere a prohibir, restringir, ralentizar, parar o revertir la progresión o gravedad de un síntoma, una afección o un trastorno existente. El término “prevenir” (o “prevenir” o “prevención”) tal como se usa aquí se refiere a prohibir, restringir o inhibir la incidencia o presencia de un síntoma, una afección o trastorno. Los síntomas, afecciones o trastornos pueden estar presentes como acontecimientos “agudos” o “crónicos”. En un acontecimiento agudo, el compuesto se administra a la aparición del síntoma, la afección o el trastorno, y se interrumpe la administración cuando desaparece el acontecimiento, mientras que un síntoma, una afección o un trastorno crítico se trata en el transcurso del acontecimiento. La presente invención contempla el tratamiento agudo y el crónico.

Tal como se usa aquí, “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad o la dosis del compuesto de fórmula (I) que, después de la administración de una o múltiples dosis al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente diagnosticado o en tratamiento. Se puede determinar una cantidad eficaz fácilmente atendiendo a quien ha diagnosticado, un experto en la técnica, considerando varios factores tales como la especie de mamífero, su tamaño, edad y estado general de salud la enfermedad específica implicada, el grado de gravedad de la enfermedad, la respuesta del paciente individual; el compuesto particular a administrar, el modo de administración, las características de biodisponibilidad de la preparación a administrar, el régimen de dosificación y el uso de cualesquiera medicaciones concomitantes. El compuesto de fórmula (I), o una composición que comprende el compuesto de fórmula (I) se puede administrar por cualquier vía que haga biodisponible el compuesto, incluidas las vías oral y parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o transdérmica).

Determinación de la actividad biológica

Como lo evidencian los ensayos in vitro y in vivo, el compuesto de fórmula (I) tiene un perfil de actividad que sugiere que tiene utilidad en el tratamiento de síntomas, afecciones o trastornos que responden a la terapia de andrógenos esteroides. En particular, el compuesto de fórmula (I) es un potente agonista de AR que se une a AR en comparación con cada uno de MR, GR y PR.

Tal como se usa aquí, “ K_d ” se refiere a la constante de disociación en equilibrio para un complejo de ligando-receptor; “ K_i ” se refiere a la constante de disociación en equilibrio para un complejo de fármaco-receptor, y es una indicación de la concentración de fármaco que se unirá a la mitad de los sitios de unión en el equilibrio; “ K_b ” se refiere a la constante de disociación en equilibrio para un complejo de antagonista-receptor; “ CI_{50} ” se refiere a la concentración de un agente que produce el 50% de la respuesta inhibidora máxima posible para ese agente o, alternativamente, la concentración de un agente que produce el 50% de desplazamiento de la unión de ligando al receptor; “ CE_{50} ” se refiere a la concentración de un agente que produce 50% de la respuesta máxima posible para ese agente; “ DE_{50} ” se refiere a la dosis de un agente terapéutico que produce 50% de la respuesta máxima posible para ese agente; “DS” se refiere a la desviación estándar; “p.o.” representa por boca y se refiere a administración oral; “s.c.” se refiere a administración subcutánea y “HEC” se refiere a hidroxietilcelulosa.

Ensayo de unión del receptor nuclear de hormona esteroide

Se usan lisados de células de células HEK293 de hígado embrionario humano que sobreexpresan MR (receptor de corticoide mineral), GR (receptor de glucocorticoide) AR (receptor de andrógeno) o PR (receptor de progesterona) para ensayos de unión de competición de receptor-ligando para determinar los valores de K_i . Los procedimientos típicos se indican seguidamente.

En resumen, los ensayos de unión de competición de receptor esteroide se realizan en un tampón que contienen tampón HEPES 20 mM (pH = 7,6), EDTA 0,2 mM, NaCl 75 mM, $MgCl_2$ 1,5 mM, 20% de glicerol, molibdato sódico 20 mM, DTT 0,2 mM (ditiotretol), 20 μ g de aprotinina y 20 μ g/ml de leupeptina (tampón de ensayo). Típicamente, los ensayos de unión de receptor esteroide incluyen ligandos radiomarcados tales como [3H]-aldosterona 0,25 nM para unión de MR, [3H]-dexametasona 0,3nM para unión de GR, [3H]-metiltienolona 0,36 nM para unión de AR y [3H]-metiltienolona 0,29 nM para unión de PR, y 20 μ g de lisado de 293-GR, 22 μ g de lisado de 293-AR o 40 μ g de 293-PR por pocillo. Típicamente los ensayos se realizan en formato de 96 pocillos. Los compuestos del ensayo de

competición se añaden a diferentes concentraciones que varían de aproximadamente 0,01 nM a 10 μ M. La unión no específica se determina en presencia de aldosterona 500 nM para unión de MR, dexametasona 500 nM para unión de GR, o metiltienolona 500 nM para unión de AR y PR. Las reacciones de unión (140 μ l) se incuban durante la noche a 4°C, luego se añaden a cada reacción 70 μ l de tampón de carbón vegetal-tampón de dextrano frío (que contiene por 50 ml de tampón de ensayo, 0,75 g de carbón vegetal y 0,25 g de dextrano). Se mezclan las placas durante 8 minutos en un agitador orbital a 4°C. Las placas se centrifugan luego a 3.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Luego se pasa a otra placa de 96 pocillos una parte alícuota de 120 μ l y se añaden a cada pocillo 175 μ l de fluido de centelleo Wallac Optiphase Hisafe 3^{MC}. Se cierran las placas y se agitan vigorosamente en un agitador orbital. Después de incubación durante 2 horas, se leen las placas en un contador Wallac Microbeta.

Se usan los datos para calcular una CI_{50} estimada e inhibición porcentual a 10 μ M. Se determina por unión con saturación la K_d para [³H]-aldosterona para unión de MR, [³H]-dexametasona para unión de GR, [³H]-metiltienolona para unir AR, o [³H] metiltienolona para unir PR. Los valores de CI_{50} para los compuestos se convierten en K_i usando la ecuación de Chang-Prushoff.

Siguiendo un protocolo esencialmente como de ha descrito antes, el compuesto de fórmula (I) presentó en el ensayo de unión de AR una K_i de aproximadamente 10 nM. Además, el compuesto presentó una K_i en los ensayos de unión de MR, GR y PR mayor que aproximadamente 4000 nM, mayor que aproximadamente 2000 nM y mayor que aproximadamente 4000 nM respectivamente. Así, el compuesto de fórmula (I) es un ligando selectivo de alta afinidad para el receptor de andrógenos.

Ensayos funcionales de modulación del receptor de hormona nuclear esteroide

Los andrógenos ejercen sus efectos fisiológicos por interacción con el receptor de andrógeno. Después de la unión citoplasmática de un andrógeno a AR, el complejo de receptor de ligando se transpone al núcleo de la célula donde se une a elementos de respuesta a hormona en el ADN, iniciando la expresión de genes diana. Los efectos de los andrógenos se pueden caracterizar como anabólicos o androgénicos por naturaleza. Los efectos anabólicos (esto es, construcción de tejido) de los andrógenos incluyen el crecimiento de la masa muscular y la resistencia de la masa ósea, mientras que los efectos androgénicos (esto es, masculinización) incluyen el desarrollo de características sexuales masculinas secundarias tales como los tejidos reproductores internos (esto es, próstata y vesículas seminales), genitales externos (pene y escroto), libido y las configuraciones de crecimiento de pelo.

Para demostrar la capacidad de los compuestos de la presente invención para modular la actividad de receptores de hormona esteroide (esto es, agonizar, agonizar parcialmente, antagonizar parcialmente o antagonizar) se realizan bioensayos que detectan la modulación funcional de la expresión de genes diana en células transfectadas transitoriamente con una proteína de receptor nuclear y una construcción de genes informadores de elemento que responde a hormonas. Los disolventes, reactivos y ligandos empleados en el ensayo funcional son fácilmente adquiribles de fuentes comerciales, o se pueden preparar por un experto normal en la técnica. Seguidamente se proporcionan procedimientos típicos para ensayos funcionales de receptor de hormona nuclear.

A. Exploración de panel de receptor de hormona nuclear

Se transfectan células HEK293 de riñón embrionario humano con receptor de hormona esteroide y plásmidos de gen informador usando un reactivo de transfección adecuado tal como Fugene^{MC}. En resumen, el plásmido informador que contiene dos copias de probasina ARE y promotor de TK (timidinaquinasa) corriente arriba del ADNc del informador de luciferasa se transfecta en células HEK293 con un plásmido que constitutivamente expresa receptor de andrógeno humano (AR) usando promotor de CMV(citomegalovirus) viral. El plásmido de promotor que contiene dos copias del promotor de GRE y TK corriente arriba del ADNc de promotor de luciferasa se transfecta con un plásmido que constitutivamente expresa receptor de glucocorticoide (GR) humano, receptor de mineralcorticoide (MR) humano o receptor de progesterona (PR) humana usando promotor CMV viral. Las células se transfectan en matraces T de 150 cm en medio DMEM con suero fetal bovino (FBS) apurado con 5% de carbón vegetal. Después de incubación durante la noche, se tripsinizan las células transfectadas, se cultivan en placas de 96 pocillos en medio DMEM que contiene FBS apurado con carbón vegetal, se incuban durante 4 horas y luego se exponen a varias concentraciones de los compuestos de ensayo, que varían de aproximadamente de 0,01 nM a 10 μ M. Al modo antagonista de ensayo, las concentraciones bajas de agonista para cada respectivo receptor se añaden al medio (aldosterona 0,08 nM para MR, dexametasona 0,25 nM para GR, metiltienolona 0,66 nM para AR y 0,06 nM de progesterona para PR). Después de 24 horas de incubación con los compuestos de ensayo, se lisan las células y se determina la actividad de luciferasa usando técnicas estándar.

Los datos se ajustan a una curva logística de ajuste de cuatro parámetros para determinar los valores de CE_{50} . La eficacia porcentual (compuestos con respuestas máximas saturadas) o la estimulación máxima porcentual (compuestos con respuestas máximas que no saturan) se determinan en relación a la estimulación máxima obtenida con los siguientes agonistas de referencia: aldosterona 30 nM para el ensayo de MR, metiltienolona 100 nM para el ensayo de AR, promegestona 30 nM para el ensayo de PR y con dexametasona 100 nM para el ensayo de GR. Se determinan análogamente los valores de CI_{50} usando los datos del ensayo al modo antagonista. Al modo antagonista, el porcentaje de inhibidores se determina por comparación de la actividad del compuesto de

ensayo en presencia de una concentración baja de agonista (aldosterona 0,08 nM para MR, dexametasona 0,25 nM para GR, metiltienolona 0,66 nM para AR, y promegestona 0,08 nM para PR) a la respuesta producida por la misma concentración baja de agonista en ausencia del compuesto de ensayo.

B, Ensayo de informador C2C12AR/ARE

Como indicador de la actividad agonista de tejido muscular se realiza el ensayo de informador C2C12 AR/ARE. En resumen células C2C12 de mioblasto de ratón se cotransfectan usando el reactivo Eugene^{MC}. Un plásmido de informador que contiene GRE/ARE (elemento de respuesta de glucocorticoide/elemento de respuesta de andrógeno) y promotor de TK corriente arriba del ADNc de informador de luciferasa, se transfecta con un plásmido que constitutivamente expresa receptor de andrógeno (AR) humano usando un promotor CMV viral. Las células se transfectan en matraces T de 150 cm² en medio DMEM con suero fetal bovino (FBS) purificado con 4% de carbón vegetal. Después de incubación durante 5 horas, se tripsinizan las células transfectadas en placas de 96 pocillos en medio DMEM que contiene FBS purificado con 4% de carbón vegetal, se incuban durante 2 horas y se exponen a varias concentraciones (que varían de aproximadamente de 0,01 nM a 10 µM) de compuestos de ensayo. Después de incubaciones durante 24 horas con los compuestos, se lisan las células y se determina la actividad de liciferasa por técnicas estándar. Los datos se ajustan a una logística de ajuste de 4 parámetros para determinar los valores de CE₅₀. La eficacia porcentual se determina frente a la estimulación máxima obtenida con metiltienolona 10 nM.

Un experto en la técnica puede diseñar fácilmente ensayos funcionales de modulación del receptor de hormona nuclear de hormona esteroide similares a los descritos antes. Siguiendo un protocolo esencialmente como del descrito, el compuesto de fórmula (I) presentó una CE₅₀ en el ensayo de informador C2C12 AR/ARE de aproximadamente 0,2 nM (media geométrica de n = 7; SD de aproximadamente 0,8), lo que demuestra que el compuesto de la presente invención es un agonista de AR humano.

Modelo in vivo de eficacia y selectividad

Se castran ratas Sprague Dawley de ocho semanas (gonadaectomizadas o "GDX") de acuerdo con procedimientos aprobados y se deja que vegeten durante 8 semanas. También se preparan ratones simuladamente operados emparejados por la edad. Los animales se alojan en una habitación con temperatura controlada (24°C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas que se invierte, y tienen disponible al libitum agua y alimento.

Los animales se distribuyeron aleatoriamente atendiendo al peso corporal antes de adscribirlos a un lote de ensayo. Se administra diariamente compuesto de ensayo en un vehículo o el vehículo solo por inyección subcutánea a las ratas castradas de 16 semanas de edad (peso corporal de aproximadamente 380-400 g). usando un vehículo convencional tal como 5% de DMSO/95% de aceite de soja, Se usan ratas operadas simuladamente tratadas con vehículo solo como controles positivos de tratamiento, mientras que las ratas castradas tratadas con vehículo solo se usan como control negativo de tratamiento. Para comparación se trata con testosterona una cohorte separada de animales castrados.

Se administra diariamente a los animales de ensayo durante un período de dos a ocho semanas 0,1, 0,3 o 1,0 mg/kg por día del compuesto de la presente invención o semanalmente 10 mg/kg por semana de testosterona (vehículo de aceite de sésamo). Después del período de tratamiento se sacrifican los animales y se determinan el peso húmedo del músculo levator ani (LA), la próstata y el músculo bulbocavernoso de cada animal (después de pesar, el músculo bulbocavernoso se puede congelar en nitrógeno líquido para uso posterior en la medición de ARNm de síntesis de óxido nítrico neuronal, como se describe más adelante). Luego se normalizan los pesos húmedos dividiendo cada peso húmedo por el peso del correspondiente animal final del estudio. Luego se comparan los valores normalizados de los animales del tratamiento con los valores normalizados del grupo de control castrados con vehículo solo, o el grupo operado simuladamente. Como indicador de la actividad selectiva de tejido, se puede comparar similarmente el peso de la próstata húmeda de estos animales con el peso de la próstata húmeda de los grupos de control o el grupo de comparación tratado con testosterona.

Siguiendo un protocolo esencialmente como el descrito antes, usando un período de tratamiento de dos semanas, se estudió el compuesto de fórmula (I) obteniéndose los resultados siguientes: El grupo operado simuladamente (vehículo solo) presentó un valor del peso en húmedo de LA normalizado medio (n = 8) de aproximadamente 0,72, un valor normalizado medio de la próstata húmeda de aproximadamente 1,5 y un valor normalizado medio del bulbocavernoso húmedo de aproximadamente 2,15; los animales castrados/vehículo solo presentaron un valor normalizado medio (n = 6) del peso en húmedo de LA de aproximadamente 0,18, un valor normalizado medio de la próstata húmeda de aproximadamente 0,04, y un valor normalizado medio del bulbocavernoso húmedo de aproximadamente 0,77; el grupo de estudio de 0,3 mg/kg por día presentó un valor normalizado medio (n = 6) de peso húmedo de LA de aproximadamente 0,57, un valor normalizado medio de peso húmedo de próstata de aproximadamente 0,14 y un valor normalizado medio de peso húmedo del bulbocavernoso de aproximadamente 1,29; y el grupo de estudio de 1,0 mg/kg por día presentó un valor normalizado medio (n = 6) de peso húmedo de LA de aproximadamente 0,68, un valor normalizado medio de peso húmedo de próstata de aproximadamente 0,52 y un valor normalizado medio de peso húmedo del músculo bulbocavernoso de aproximadamente 1,41.

Así, el tratamiento con el compuesto de fórmula (I) produjo un aumento dependiente de la dosis de los pesos del levatur ani y del músculo bulbocavernoso en comparación con el grupo de control castrado, demostrando que el compuesto de la invención es un potente agonista de andrógeno in vivo. Además, el compuesto de fórmula (I) reveló eficacia en el músculo mientras que concomitantemente producía un efecto aminorado sobre el peso de la próstata cuando se comparó con el control de animales operados simuladamente y los animales tratados con testosterona, lo que demuestra que el compuesto de la presente invención tiene selectividad tisular.

Ensayo in vitro de la actividad eréctil

La vía de paso de óxido nítrico sintasa/monofosfato de guanosina cíclico (NOS/GMPc) es crítica para la actividad eréctil. La expresión de NOS conduce a la generación de óxido nítrico (NO) que, a su vez, promueve la generación de GMPc por activación de guanililciclase. GMPc promueve la actividad de proteinquinasa G (PKG) que media la relajación de músculo liso corporal facilitando la erección del pene. La evidencia soporta el papel de los andrógenos en la regulación de la expresión y actividad de los isoformas de NOS en el cuerpo cavernoso en modelos experimentales de animales. Traish y otros, *European Urology*, 52; 54-70 (2007). Así, los moduladores de receptores de andrógenos, que son capaces de aumentar la expresión de isomorfos de NOS, se cree que tienen un papel en la regulación de la actividad eréctil del pene.

Para determinar la capacidad de los compuestos de la presente invención para regular por hiperproducción la expresión de isoformas de NOS se pueden emplear los siguientes procedimientos in vitro.

Se aísla ARN de tejidos cavernosos de bulbo o cuerpo congelados, obtenidos por necropsia de ratas Sprague Dawley castradas, que son preparadas y dosificadas esencialmente como se ha descrito para el Modelo de Eficacia y Selectividad. Se sintetiza ADNc a partir de 2 µg de ARN usando un kit de ADNc de alta capacidad de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se realiza RCP cuantitativa en tiempo real de acuerdo con la metodología TaqMan® fluorescente (Applied Biosystems), Se usan sondas Assays-on Demand^{MC} (Applied Biosystems) para el transcripto de óxidonítricosintasa endotelial (NOS_e) de rata, mientras que se diseñan sondas para isomorfo específico de pene de rata de óxidonítricosintasa neuronal NOS_{pn}) usando software de diseño de sondas (Applied Biosystems). Las sondas se diseñan para cubrir una región de 102 bp del gen de óxidonítricosintasa neuronal (NOS_{pn}) que es específico para NOS_{pn} (posiciones 2865-2967). Las series de sonda de Assays-on-Deman^{CM} para el transcripto de PIB se usan como control interno. Se realiza la RCP en un sistema de detección de secuencia 770 ABI Prism en las condiciones de termociclación siguientes: 2 min a 50°C, 10 min a 96°C y 40 ciclos a 95°C durante 30 s y a 60°C durante 1 min. Todas las reacciones se realizan por triplicado.

Las reducciones de la masa muscular o los fortalecimientos se pueden presentar como resultado de falta de uso, trauma o inmovilización. Con el fin de confirmar la capacidad de los compuestos de la presente invención para tratar o prevenir la pérdida de masa muscular o el fortalecimiento asociado con falta de uso, trauma o inmovilización se pueden emplear los siguientes modelos animales.

Modelo in vivo de pérdida muscular inducida por trauma e inmovilización

Se anestesian con isoflurano (1-5%) ratones macho ICR a la edad de 8 semanas y se inyectan bilateralmente en el músculo gastrocnémico derecho de una pata trasera 100 µl de cardiotoxina 10 µM (naja naja atra; Sigma Aldrich) para inducir lesión muscular focal. Se deja que se recuperen los animales y antes de 24 h se inmoviliza la pata trasera en cuanto a la flexión plantar poniendo en la pata una pieza. Después de 7 días de inmovilización y después de quitar la pieza puesta en la pata, los animales se tratan con diferentes dosis de un compuesto de la presente invención durante diferentes períodos de tiempo. Los animales de control, con y sin las piezas inmovilizadoras, se tratan similarmente con vehículo durante varios períodos. Al final del protocolo de tratamiento, se sacrifican los ratones, se determinan los pesos húmedos del músculo gastrocnemius inmovilizado y se comparan los grupos de tratamiento individuales con los controles con vehículo. Véase en general Am. J. Endocrinol. Metab. 289:969-980 (2005).

Modelo in vivo de pérdida muscular inducida por trauma

Se castran a la edad de 8 semanas ratones macho ICR y se deja que vegeten durante 8 semanas más. Se enjaulan individualmente los ratones y se mantienen a 22°C en un ciclo de 12 h de oscuridad/luz con acceso ad libitum a alimento y agua. Se anestesian los ratones con isoflurano (1-5%) y luego se inyectan bilateralmente en el músculo gastrocnemius derecho 100 µl de cardiotoxina 10 µM (naja naja atra; Sigma Aldrich) para inducir lesión muscular. Los animales se recuperan de la anestesia y asumen en 5 min la actividad normal. Transcurridos 5 días desde la inyección, los animales se tratan con varias dosis de un compuesto de la presente inyección. Después del día 14, se eutanizan los ratones tratados, se pesan y se cosecha el tejido del músculo gastrocnemius de ambas piernas la no inyectada (control contralateral) y la inyectada con cardiotoxina. Los pesos del músculo se emparejan con el no inyectado y el control no tratado para establecer la recuperación porcentual del trauma.

Para demostrar que el compuesto de la presente invención tiene la capacidad de tratar trastornos asociados con la

pérdida de hueso, como por ejemplo osteoporosis u osteopenia, se pueden emplear otros modelos de animales bien conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de dichos modelos son proporcionados por Y. L. Ma y otros, Japanese Journal of Bone y Mineral Metabolism 23 (Suppl.): 62-68 (2005); Y. L. Ma y otros, Endocrinology 144: 2008-2015 (2003); y K. Hanada y otros, Biol. Pharm. Bull. 26(11): 1563-1569 (2003). Se hace mención particular a Female Rat Model of Estrogen Deficiency Osteopenia Induced by Ovariectomy y Male Rat Model of Androgen Deficiency Osteopenia Induced by Orchidectomy.

Modelo de osteopenia de deficiencia de estrógeno inducida por ovariectomía

Ratas hembra Sprague Dawley vírgenes de seis meses de edad, de un peso de aproximadamente 220 g se alojan con acceso ad libitum a alimento y agua. Se realizan ovariectomías bilaterales (Ovx) en los animales (excepto de los controles simuladamente operados) y luego se distribuyen en grupos de tratamiento de 7-8 ratas por grupo. Cada ensayo contiene típicamente como mínimo seis conjuntos de controles, incluidas ovariectomía simulada y controles ovariectomizados (Ovx) tratados con vehículo. Se permite una pérdida ósea en las ratas Ovx durante 1 mes para establecer osteopenia antes del tratamiento con compuesto de ensayo. Los compuestos de ensayo se administran oralmente a los animales Ovx con sonda gástrica durante 8 semanas. Como control positivo se puede dar a un subconjunto de animales Ovx PTH recombinante humano (1-38) (aproximadamente 10 µg/kg/d, subcutáneamente). Finalizado el protocolo de ensayo se usa tomografía cuantitativa computada (QCT) para analizar la densidad ósea mineral volumétrica (BDM, cm³) de la vértebra lumbar L-5 y el fémur. Se realizan análisis biomecánicos de flexión en tres puntos en la diáfisis femoral y la carga a rotura en el fémur proximal usando una máquina de ensayos mecánicos, analizando los resultados usando software TestWorks 4®.

Modelo de osteopenia de deficiencia de andrógenos inducida por orquidectomía

Ratas macho Sprague Dawley de seis meses de edad, de un peso de aproximadamente 485 g se alojan con acceso ad libitum a alimento y agua. Se realiza orquidectomía bilateral (Orx) en los animales (excepto para los controles simuladamente operados) y luego se distribuyen en grupos de tratamiento de 7-8 ratas por grupo. Cada ensayo contiene típicamente como mínimo dos conjuntos de controles, incluidos animales orquidectomizados simuladamente y controles orquidectomizados (Orx) tratados con vehículo. Se permite una pérdida ósea en las ratas Ovx durante 2 meses para establecer osteopenia antes de iniciar el tratamiento con compuesto de ensayo. Los compuestos de ensayo se administran oralmente a los animales Orx con sonda gástrica durante 8 semanas. Como control positivo se puede dar a un subconjunto de animales Orx PTH recombinante humano (1-38) (aproximadamente 10 µg/kg/d, subcutáneamente). Finalizado el protocolo de ensayo, la determinación de la BMD de la vértebra y el fémur así como los ensayos biomecánicos del fémur se puede realizar como se ha indicado antes para el modelo de rata hembra ovariectomizada.

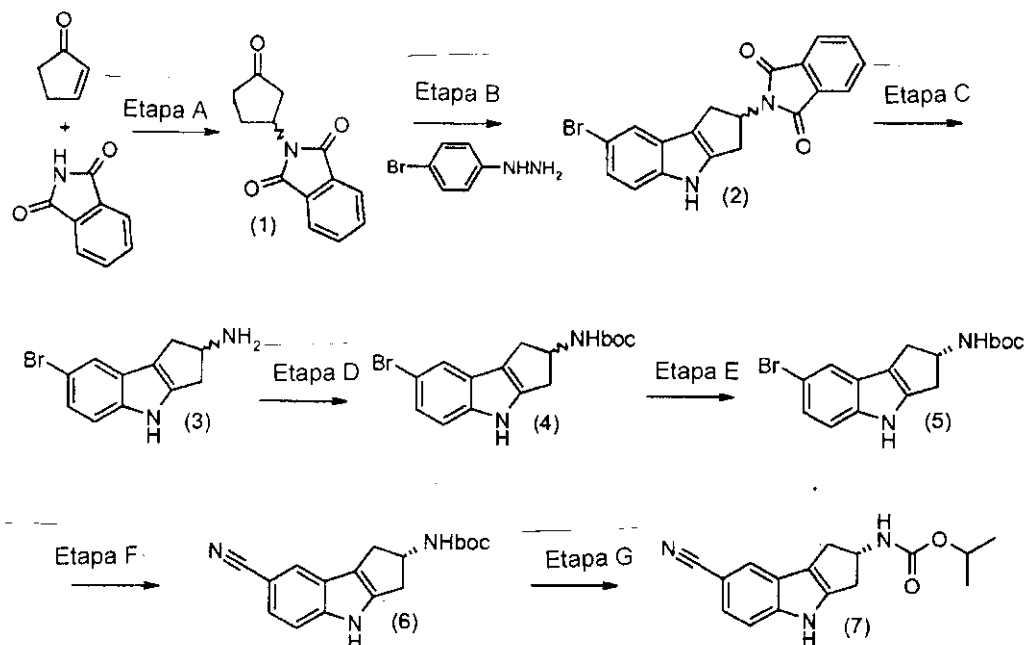
(Véase en general Ma y otros, JBMR 17:2256-2264 (2002), y Turner y otros, Bone [Review] 14:595-608 (1993)).

Determinación de exposición de plasma

Se administran las dosis a grupos de ratas macho Sprague Dawley (6 animales/grupo), oralmente (volumen de la dosis 1,25 ml/kg: vehículo de 5% de DMSO/95% de HEC), o subcutáneamente (volumen de la dosis: 2,5 ml/kg: vehículo de 5% de DMSO/95% de aceite de soja) 10 mg/kg p.o., 1 mg/kg s.c., 3 mg/kg s.c o 10 mg/kg s.c., del compuesto de fórmula (I), una vez al día durante dos semanas. Empezando el segundo día hasta el último de administración de las dosis, se recogen muestras de plasma a las 0,5 horas, 2 horas, 4 horas o 24 horas después de la administración [en cada momento se muestrean dos animales, usándose los mismos animales para el muestreo a las 0,5 y 24 horas]. Para cada muestra recogida se determina la concentración en plasma del compuesto de fórmula (I) usando LC/MS/MS (sistema Sciex API-4000 LC/MS/MS). Las concentraciones resultantes se usan para construir un área bajo la curva tiempo - concentración en plasma (AUC) para cada dosis administrada como índice de exposición. Siguiendo un protocolo esencialmente como se ha descrito antes, las dosis administradas del compuesto de fórmula (I) produjeron los siguientes valores de AUC: 10 mg/kg p.o.: aprox. 295,511 ng.h/ml; 1 mg/kg s.c.: aprox. 38,963 ng.h/ml; 3 mg/kg s.c.: aprox. 137,056 ng.h/ml; y 10 mg/kg s.c.: aprox. 218,537 ng.h/ml. Así, el compuesto de fórmula (I), cuando se administra oralmente o subcutáneamente, presenta una significativa exposición del plasma.

Los Esquemas, Preparaciones y Ejemplos siguientes ilustran más la invención. Los materiales y materiales de partida son fácilmente asequibles o los puede sintetizar fácilmente un experto corriente en la técnica. Debe entenderse que los esquemas, las preparaciones y los ejemplos se presentan a fines ilustrativos y no limitativos, y que se pueden hacer diversas modificaciones por parte de un experto en la técnica de cualificación normal. Las configuraciones R o S de las preparaciones y ejemplos se pueden determinar por técnicas estándar tales como análisis por rayos X y la correlación con el tiempo de retención de HPLC quiral. A no ser que se indique lo contrario, los nombres de las preparaciones y ejemplos son generalmente proporcionados por Autonom 2000 para SIS Draw add-in. Tal como se usan aquí, los siguientes términos tienen los significados que se indican: "MeOH" se refiere a metanol; "EtOH" se refiere a etanol; "i-PrOH" o "IPA" se refiere a isopropanol; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "DMAC" se refiere a dimetilacetamida; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; "t-boc" o "boc" se refiere a t-butoxicarbonilo.

Esquema 1



La formación de un intermedio de fórmula (7) se puede realizar de acuerdo con las reacciones indicadas en el Esquema 1.

5 En el Esquema 1, Etapa A, se hace reaccionar ciclopentenona con ftalimida en una adición de Michael obteniéndose (R,S)-2-(3-oxo-ciclopentil)-isoindol-1,3-diona (1). La reacción se realiza en metanol/ Na_2CO_3 2N en una relación de aproximadamente 10/1 en volumen, preferiblemente a temperatura ambiente usando condiciones similares a las descritas por O. Nowitzki y otros en Tetrahedron 1996, 52, 11799-11810. El producto se aísla por adición de agua y se obtiene (1) como un sólido blanco.

10 En la Etapa B, se hace reaccionar (R,S)-2-(3-oxo-ciclopentil)-isoindol-1,3-diona (1) con hidrocloreto de 4-bromofenilhidrazina en hidrato de hidrazina en una síntesis de Fischer típica. En las condiciones preferidas se usa ácido acético glacial a aproximadamente 50-80°C durante 2 a 24 horas.

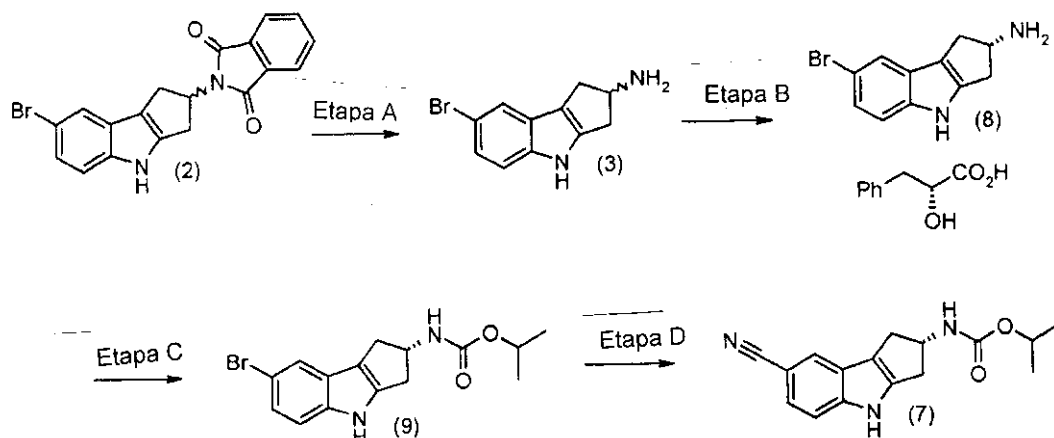
15 En el Esquema 1, Etapa C, el grupo ftalimida de tetrahidrociclopente[b]indol de fórmula (2) se escinde con hidrazina o hidrato de hidrazina obteniéndose el aminotetrahidrociclopenta[b]indol de fórmula (3). Las condiciones preferidas usan tetrahidrofurano/etanol en una mezcla de aproximadamente 20/1 en volumen a una temperatura de aproximadamente 40 a 70°C durante 1 a 12 horas. La ftalhidrazida resultante se separa por filtración y el producto se aísla por concentración del filtrado.

20 En la Etapa D, se protege la amina de fórmula (3) con un grupo t-boc, obteniéndose la amina protegida de fórmula (4). Las condiciones preferidas usan di-t-butildicarbonato en un disolvente inerte tal como THF o dioxano, en presencia de una base inorgánica tal como NaHCO_3 . En la Etapa E, el material de t-boc racémico de fórmula (4) se resuelve usando HPLC quiral obteniéndose el enantiómero (S) de fórmula (5).

25 En la Etapa F, el (S) bromocarbamato de fórmula (5) se convierte en el nitrilo de fórmula (6). La reacción transcurre en un disolvente inerte tal como N,N'-dimetilacetamida en presencia de una mezcla de acetato de zinc o formiato de zinc, cianuro de zinc y polvo de zinc. Se usa un catalizador de paladio tal como [1,1'-bis(difenilfosfino)-ferroceno]dicloropaladio(II) o como complejo con diclorometano. Alternativamente, el catalizador se puede formar in situ usando paladio metal y el ligando apropiado. Se calienta la mezcla de reacción a aproximadamente 80 a 120°C durante aproximadamente de 2 a 24 horas.

30 En la Etapa G, el grupo de boc se elimina usando condiciones ácidas típicas tales como HCl/dioxano o TFA, obteniéndose la amina quiral, que luego se acila con cloroformiato de isopropilo, resultando un carbamato de fórmula (7) usando condiciones bien conocidas por los expertos en la técnica. La amina se combina con un exceso de una base amina orgánica tal como trietilamina o diisopropiletilamina en un disolvente inerte tal como tetrahidrofurano, tolueno, dicloroetano o diclorometano, N-metilpirrolidinona o N,N'-dimetilformamida, o una mezcla de los mismos. En las condiciones preferidas se usa diisopropiletilamina en diclorometano en presencia de cloroformiato de isopropilo a una temperatura de aproximadamente 0 a 40°C durante aproximadamente 72 horas. El producto se aísla por adición de agua y recogida del sólido resultante.

Esquema 2



En el Esquema 2 se presenta una vía alternativa para la síntesis de un intermedio de fórmula (7),

En el Esquema 2, Etapa A, el grupo ftalimida del tetrahidrociclopenta[b]indol de fórmula (2) se escinde con metilamina, obteniéndose un aminotetrahidrociclopenta[b]indol de fórmula (3). Las condiciones preferidas usan un disolvente tal como etanol a una temperatura de aproximadamente 0 a 35°C, durante 3 a 24 horas. El subproducto resultante se elimina alcalinizando el pH y filtrando el precipitado resultante. El producto se aísla del filtrado por precipitación con agua y NaOH al 10%.

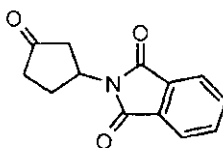
En la Etapa B, el aminotetrahidrociclopenta[b]indol racémico de fórmula (3) se resuelve usando ácido (R)-2-hidroxi-3-fenilpropiónico, obteniéndose la sal de (S)-aminotetrahidrociclopenta[b]indol de fórmula (8). La formación de la sal preferiblemente se realiza en isopropanol con calentamiento durante aproximadamente 1 a 6 horas, a lo que sigue el enfriamiento para obtener el enantiómero deseado.

En la Etapa C, la sal de fórmula (8) se neutraliza a base libre y luego se acila, obteniéndose un carbamato de fórmula (9). La sal se neutraliza con aproximadamente 2 a 3 equivalentes de una base orgánica tal como trietilamina o diisopropiletilamina en un disolvente inerte tal como tolueno, y seguidamente se acila con cloroformiato de isopropilo.

En el Esquema 2, Etapa D, el bromocarbamato de fórmula (9) se convierte en el nitrilo de fórmula (7) como se ha descrito anteriormente para el Esquema 1, Etapa F.

Preparación 1

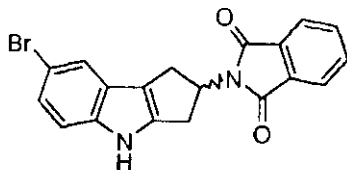
(R,S)-2-(3-oxo-ciclopentil)-isoindol-1,3-diona



Mientras que se agita vigorosamente con un agitador mecánico, se añade Na_2CO_3 acuoso 2M (79 ml, 0,158 mol) a una suspensión de ciclopentenona (100 g, 1,22 mol) y ftalimida (180 g, 1,22 mol) en MeOH (886 ml). Después de aproximadamente 2 horas se formará un precipitado blanco. Se agita la mezcla a temperatura ambiente durante 24 horas. Se recoge por filtración en vacío el sólido blanco y se enjuaga con metanol (1 l). El sólido se pone en suspensión en agua (1 l) y se agita durante 3 horas. Se recoge el sólido y se seca en horno de vacío a 40°C durante la noche, obteniéndose 198 g (71%) del compuesto del título como un sólido blanco. RMN ^1H (DMSO- d_6) δ 7,85-7,77 (m, 4H), 4,90 (m, 1H), 2,67 (ddd, 1H, $J = 18,5, 6,2, 1,3$ Hz), 2,54 (dd, 1H, $J = 18,5, 9,2$ Hz), 2,45 (m, 1H), 2,32-2,21 (m, 3H); ES/EM m/z 230 ($m+1$, débil). NOTA. El producto experimentará fácilmente la reacción de retro-Michael después de tratamiento con una base acuosa.

Preparación 2

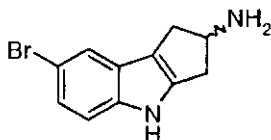
(R,S)-2-(7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-isoindol-1,3-diona



En un matraz de 5 l se mezclan (R,S)-2-(3-oxo-ciclopentil)-isoindol-1,3-diona (295,3 g, 1,29 mol), 4-bromofenil-hidrazina-HCl (287,9 g, 1,29 mol) y ácido acético glacial (3 l) con agitación mecánica. La mezcla de reacción se somete a reflujo durante 5 horas y luego se enfría a temperatura ambiente. Se vierte la mezcla de reacción en agua (4 l) agitando rápidamente. Se recoge el sólido por filtración en vacío, se lava con agua (4 l) y se seca al aire durante 30 min. Se dispersa el sólido con MeOH (700 ml), se recoge por filtración en vacío y se enjuaga con MeOH (100 ml). Se seca al aire el sólido gris durante 2 horas y luego se seca durante la noche en horno de vacío a 50°C, obteniéndose 416,67 g (84%) del compuesto del título como un sólido oscuro. ES/EM m/z ($^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$) 381/383 [M^+H] $^+$.

Preparación 3

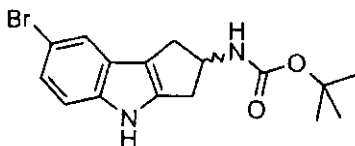
(R,S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-ilamina



A una solución de (R,S)-2-(7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]-isoindol-1,3-diona (150 g, 393 mmol) en THF (1000 ml) y EtOH (150 ml) se añade monohidrato de hidrazina (35,0 g, 34,0 ml, 699 mmol). La mezcla de reacción se agita con agitador mecánico a temperatura ambiente durante 18 horas y luego durante 2 horas a 55°C, haciéndose después muy viscosa, y se añaden THF (425 ml) y EtOH (75 ml). Se continúa calentando a 55°C durante otras 2 horas. Se enfría la mezcla de reacción a temperatura ambiente, se filtra a través de tierra de diatomeas y se concentra nuevamente a sequedad. El producto se somete a alto vacío durante 3 horas, resultando 94 g (95%) del compuesto del título como un sólido. LC-ES/EM m/z $\text{C}^{79}\text{Br}/^{81}\text{Br}$ 251/253 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$. $T_R = 1,14$ min.

Preparación 4

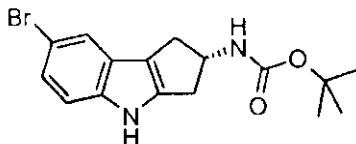
Éster de t-butilo del ácido ((R,S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)carbámico



Una mezcla de (R,S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-ilamina (81,5 g, 325 mmol) en THF (800 ml) y solución acuosa saturada de NaHCO_3 (200 ml) se trata con dicarbonato de di-t-butilo (80,3 g, 357 mmol) en porciones y se agita a temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluye la mezcla de reacción con EtOAc (300 ml) y salmuera (100 ml). Se separan las capas y la capa orgánica se seca sobre MgSO_4 , se filtra y se concentra, obteniéndose un sólido oleoso oscuro. El sólido se mezcla con CH_2Cl_2 (400 ml), se enfría en baño de hielo y se filtra. Se enjuaga el sólido con CH_2Cl_2 y hexanos, recuperándose 28,1 g (34%) del compuesto del título como un sólido. Se obtienen 78,8 g (60%) más del compuesto del título al concentrar el filtrado y purificación posterior por cromatografía (1 l de gel de sílice cargado como solución concentrada en CH_2Cl_2 , eluyendo con hexanos al 30%/CH $_2$ Cl $_2$, 100% de CH $_2$ Cl $_2$, luego EtOAc al 3%/CH $_2$ Cl $_2$). RMN ^1H (400 MHz, CDCl $_3$) δ 7,98-7,91 (m, 1H), 7,54 (s, 1H), 7,25 (s, 2H), 7,20-7,15 (m, 2H), 5,05-5,02 (m, 2H), 3,37-3,29 (m, 2H), 2,77-2,70 (m, 1H), 2,62-2,57 (m, 1H), 1,46 (s, 9H).

Preparación 5

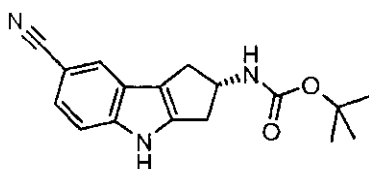
Éster de t-butilo del ácido ((S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indol-2-il)carbámico



5 Primeramente se tritura con Et₂O el éster de t-butilo del ácido ((R,S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indol-2-il)carbámico (635 g, 1810 mmol) y luego se purifica por HPLC quiral (columna; Chiralcel OJ8 x 32 cm; eluyente MeOH al 100%), obteniéndose 310 g del compuesto del título (segundo isómero que se eluye) como un sólido. HPLC quiral OJ-H, 100% de MeOH, detección por UV a 250 nm T_R = 7,6 mm, 97,8% ee.

Preparación 6

Éster de t-butilo del ácido ((S)-7-ciano-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indol-2-il)carbámico



10

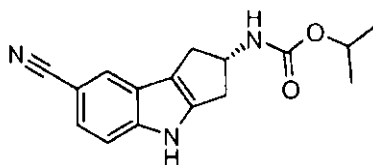
15

20

Se agitan juntos los reactivos siguientes con DMF (250 ml) a 100°C durante 18 h: éster de t-butilo del ácido ((S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indol-2-il)carbámico (50,0 g, 142 mmol), cianuro de zinc (11,9 g, 99,7 mmol), acetato de zinc (5,22 g, 28,5 mmol), cloruro de 1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno)paladio (II) (Pd(dppf)₂Cl₂) (1,74g, 2,14 mmol) y zinc (3,72 g, 56,9 mmol). Se concentra a sequedad la mezcla de reacción y se reparte entre agua y acetato de etilo. Se lavan con agua y salmuera los ingredientes orgánicos y luego se concentran a sequedad, obteniéndose un sólido. Se cromatografía el sólido en dos porciones iguales sobre gel de sílice (1600 ml) como sigue: se carga como solución en CH₂Cl₂ y se eluye con EtOAc al 2% en CH₂Cl₂ (3 l), luego EtOAc al 5% en CH₂Cl₂. Se recupere el producto de las dos columnas, obteniéndose 29 g (69%) del compuesto del título como un sólido blanco. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 8,39 (s, 1H), 7,74 (s, 1H), 7,34 (d, J = 1,8 Hz, 2H), 5,05-4,96 (m, 2H), 3,37-3,25 (m, 2H), 2,80-2,63 (m, 2H), 1,46 (s, 9H).

Preparación 7

Éster isopropílico del ácido ((S)-7-ciano-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indol-2-il)carbámico



25

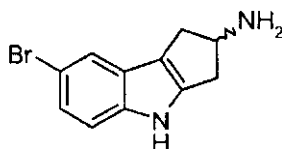
30

Se disuelve en 1,4-dioxano (102 ml) el éster de t-butilo del ácido ((S)-7-ciano-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indol-2-il)carbámico (10 g, 33,63 mmol) y se trata con HCl 4M/dioxano (102 ml) a temperatura ambiente. Después de 18 h se elimina por filtración un sólido y se lava con Et₂O (50 ml) y luego se seca en vacío.

Se dispersa el sólido en diclorometano (168 ml) y se trata con diisopropiletilamina (12,3 ml, 70,1 mmol) y cloroformato de isopropilo (1,0 M en tolueno, 34,0 ml, 34,0 mmol) a temperatura ambiente. Después de 4 h se trata la mezcla de reacción con agua (50 ml) y se concentra, resultando una suspensión acuosa del producto. Se diluye más con agua (500 ml) la mezcla de reacción y se sonica durante 10 min en baño ultrasónico, se filtra, se lava con Et₂O (50 ml) y luego se seca en vacío, obteniéndose 8,20 g (86%) del producto del título como un sólido. LC-ES/EM m/z 284 [M+H]⁺, 282[M-H]⁻, T_R = 2,20 min. RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) δ 11,44 (s, 1H), 7,78 (s, 1H), 7,52 (d, J = 7,5 Hz, 1H), 7,39 (d, J = 8,4 Hz, 1H), 7,28 (dd, J = 1,8, 8,4 Hz, 1H), 4,77-4,63 (m, 2H), 3,18-3,04 (m, 2H), 2,70 (dd, J = 6,2, 15,6 Hz, 1H), 2,58 (dd, J = 6,2, 14,5 Hz, 1H), 1,13 (d, J = 6,2 Hz, 6H).

Síntesis alternativa de éster isopropílico del ácido ((S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico**Preparación 8**

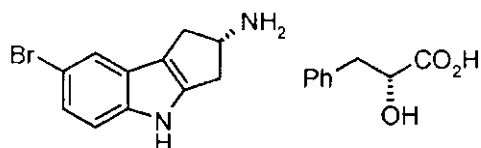
(R,S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-ilamina



A un matraz de fondo redondo de 3 bocas se añade (R,S)-2-(7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-isoindol-1,3-diona (170,00 g, 445,93 mmol) y metilamina en EtOH (510 ml, 510,00 mmol) a 25°C bajo nitrógeno. La mezcla se mantiene a 20-25°C mientras que se agita durante 14 h. Se disuelven los materiales de partida formándose una solución marrón, pudiéndose ver algún precipitado marrón. La mezcla de reacción se controla por HPLC, que revela que queda menos del 2% del material de partida. La mezcla se agita durante 1 hora y se ajusta el pH a 11 con solución de NaOH. Se filtra la mezcla y el sólido (subproducto) se lava con EtOH (170 ml). Se añade al filtrado agua (3400 ml) y solución de NaOH al 10% (600 ml) a lo largo de 30 min a temperatura ambiente. El pH llega a 12 y se forma un precipitado sólido marrón. Se separa el sólido por filtración y la torta se seca a 60°C en vacío, obteniéndose 103 g (89%) de un sólido de color marrón claro.

Preparación 9

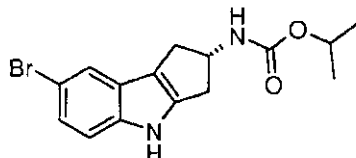
Sal de (S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-ilamina del ácido (R)-2-hidroxi-3-fenilpropiónico



A un matraz de fondo redondo de 3 bocas se añade (R,S)-2-(7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-ilamina (94,00 g, 361,66 mmol) y ácido (R)-2-hidroxi-3-fenilpropiónico (36,00 g, 0,60 equiv, 216,64 mmol). Luego se añaden lentamente a la mezcla a 25°C IPA 180 ml) y EtOH. Se observa una suspensión. Se mantiene la suspensión a 80°C con agitación durante 2 horas. De forma una solución marrón turbia. La mezcla se enfría a 60°C durante 1 h y luego se agita a 25°C durante 2 h. La mezcla se agita luego a -10°C durante 1 h. Se separa por filtración el sólido y la torta se lava con IPA (10 ml) y n-heptano (10 ml). El sólido húmedo se seca a 60°C en vacío durante 4 h, obteniéndose 66,1 g (43,5%) de un sólido amarillo claro. HPLC/EM: 93,3% de pureza. HPLC quiral; % de (Chiralcel OJ-RH, 100% de MeOH con 0,2% de dietilmetilamina, detección por UV a 230 nm, 99,62% de ee.

Preparación 10

Éster isopropílico del ácido ((S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico

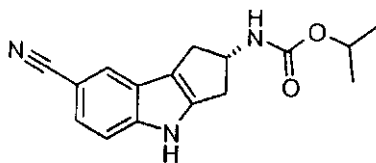


Se combinan en tolueno (165 ml) sal de (S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-ilamina del ácido (R)-2-hidroxi-3-fenilpropiónico (60,00 g, 143,78 mmol) y diisopropiletilamina (50 ml, 296,12 mmol). El recipiente de reacción se purga con nitrógeno tres veces. La mezcla se enfría a 0°C mientras que se agita y se mantiene a esta temperatura durante 30 min. Se añade a 0-5°C a lo largo de 5 min una solución de cloroformiato de isopropilo (20,00 g, 163,20 mmol) en tolueno (165 ml). Se agita la mezcla a 5°C durante 10 min. La HPLC revela que la reacción se ha realizado en un 98,6%. La reacción se apaga con agua (1 l) y acetato de etilo (480 ml). Se filtra la mezcla y el sólido se lava con acetato de etilo (2 x 240 ml). La capa orgánica combinada se lava dos veces con salmuera, se seca (MgSO₄) y se filtra. Se reduce el disolvente orgánico a 50%. Se enfría a 25°C la mezcla y se añade t-butil metil éter (50 ml) y acetato de etilo (50 ml). Precipita un sólido blancuzco. Se filtra el sólido y se lava con heptanos (100 ml). Se seca el sólido en vacío a 50°C durante 4 h, obteniéndose 44,4 g (90,3%) de un sólido

marrón claro.

Preparación 11

Éster isopropílico del ácido ((S)-7-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)carbámico



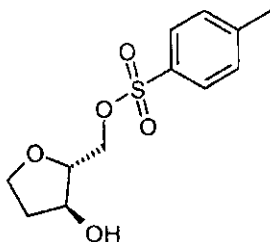
- 5 Se carga con dimetilacetamida (33 l, 10 volúmenes) un matraz de 50 l de fondo redondo y se inicia una purga bajo la superficie con nitrógeno durante 30 min. Luego se carga el matraz con acetato de zinc (363 g, 1,98 mol) en una porción. Se añade luego el complejo Pd(dppf)₂Cl₂ con diclorometano (1:1) (266 g, 0,327 mol, 3,3% en moles) y seguidamente cianuro de zinc (697 g, 5,93 mol, 0,6 equiv) en una porción. Se añade éster isopropílico del ácido ((S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)carbámico (3335 g, 9,89 mol) en una porción y la mezcla se purga bajo la superficie durante 30 min con nitrógeno. Finalmente se añade en una porción polvo de zinc (259 g, 3,96 mol) y la mezcla de reacción se calienta a 100°C - 110°C durante 6 h. Se considera que la reacción es completa cuando se ve por HPLC que hay menos de 1% de material de partida. Finalizada la reacción, se interrumpe el calentamiento y la mezcla de reacción se enfría a temperatura ambiente. Luego se filtra y se enjuaga con dimetilacetamida (3 x 3 l). Luego se vierte el filtrado sobre agua (60 l) y la suspensión resultante se agita durante como mínimo 2 h. La suspensión se filtra luego y se enjuaga con agua (20 l). Se disuelve la torta húmeda en t-butil metil éter/acetona (1:1, 60 l en total) y se agita durante como mínimo 30 min. La mezcla se filtra luego para eliminar la sal inorgánica. Se vuelve a cargar el filtrado en el tanque. La capa orgánica se lava con solución acuosa al 10% de 2,4,6-trimercapto-s-triazina (TMT) (2 x 20 l). A la capa orgánica se añade luego carbón vegetal (300 g, 10% en peso), Florisil® (330 g, 10% en peso) y sulfato magnésico para secar la capa. La mezcla se agita a temperatura ambiente durante como mínimo 2 h. Luego se filtra la mezcla y se enjuaga con acetona. Se concentra luego el filtrado a presión y se coevapora con heptano. La suspensión resultante se filtra y se enjuaga con heptano. Se recogen los sólidos y se secan a peso constante (2520 g, 90%). LC-ES(EM m/z 284 [M+H]⁺, 282 [M-H]⁻).

Método alternativo de cianuración

- 25 Se combinan éster isopropílico del ácido ((S)-7-bromo-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)carbámico (50 g, 148,27 mmol), cianuro de zinc (10,45 g, 88,99 mmol) y paladio (6,31 g, 2,96 mmol) en dimetilacetamida (500 ml). La suspensión resultante se purga bajo la superficie con nitrógeno durante 10 min. Luego se añade 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno (3,29 g, 5,93 mmol) y la mezcla de reacción se purga durante otros 10 min. Finalmente se añade formiato de zinc (2,3 g, 14,80 mmol) y la mezcla se purga nuevamente durante 10 min. La mezcla de reacción se pone bajo una capa de nitrógeno y se calienta durante la noche a 110°C. Se desconecta el calor. Se enfría la mezcla a 85°C y se añade gel de sílice funcionalizada 3-mercaptopropilo (5 g, 10% en peso). La mezcla se agita durante 2 h mientras que se enfría a temperatura ambiente. Luego se filtra la mezcla de reacción y el sólido se enjuaga con DMAC (50 ml). Al filtrado de color naranja en agitación se añade la sal tetrasódica del ácido etilendiaminotetraacético 0,3 M en agua (100 ml) a lo largo de 10 min. La suspensión resultante se agita a temperatura ambiente y se filtra. El sólido se enjuaga con la sal tetrasódica del ácido etilendiaminotetraacético 0,3 M (250 ml) y seguidamente con agua (250 ml). Se recoge un sólido marrón claro y se seca durante la noche en horno de vacío, obteniéndose el producto (42,44 g) con rendimiento cuantitativo.

Preparación 12

4-metilbencenosulfonato de [(2R, 3S)-3-hidroxitetrahidrofuran-2-il]metilo

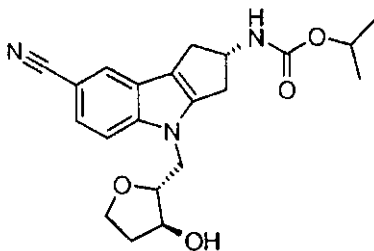


- 40 Se disuelve en piridina seca (15 ml) (2R,3S)-2-(hidroximetil)tetrahidrofuran-3-ol (1,59 g, 13,46 mmol) (preparado como se describe por Chenault, K.H., Mandes, R.F. Tetrahedron, 1997, 53(32), 11033-11038) y la solución se enfría a -40°C en baño de hielo seco/acetona durante 30 min. Se añade lentamente a lo largo de 5 min cloruro de p-

toluenosulfonilo (2,58 g, 13,51 mmol) y la solución se deja que se caliente a temperatura ambiente a lo largo de 4 h. Se concentra la solución, obteniéndose 3,59 g (86%) del compuesto del título, que se usa sin más purificación. LC-ES/EM m/z 295,0 $[M+Na]^+$, T_R = 1,76 min. (Symyx Draw 3,1 [Nombre de IUPAC] proporciona el nombre para el compuesto de la Preparación 12).

5 Ejemplo 1

Éster isopropílico del ácido [(S)-7-ciano-4-((2R,3S)-3-hidroxitetrahydrofuran-2-ilmetil)-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]-indol-2-il]carbámico



Una mezcla de éster isopropílico del ácido ((S)-7-ciano-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]-indol-2-il)carbámico (2,50 g, 8,82 mmol), 4-metilbencenosulfonato de [(2R, 3S)-3-hidroxitetrahydrofuran-2-il]metilo (3,10 g, 11,38 mmol) y carbonato de cesio (5,00 g, 15,35 mmol) en N-metilpirrolidina (25 ml) se calienta a 65°C en baño de aceite durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluye con acetato de etilo (120 ml) y se lava con agua (3 x 100 ml) y salmuera. La porción orgánica se seca sobre sulfato sódico, se filtra y se concentra a sequedad. El residuo resultante se purifica por cromatografía líquida a media presión, eluyendo con acetato de etilo. Se combinan las fracciones que contienen producto puro y se concentra la combinación, obteniéndose 2,46 g (72%) de compuesto del título. LC-ES/EM m/z 384,2 $[M+H]^+$, T_R = 1,90 min. (Symyx Draw 3,1 [Nombre de IUPAC] proporciona el nombre siguiente para el compuesto del Ejemplo 1: N-[(2,s)-7-ciano-4-[(2R,3S)-3-hidroxitetrahydrofuran-2-il]metil]-2,3-dihidro-1H-ciclopenta[b]indol-2-il]carbamato).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es el éster isopropílico del ácido [(S)-7-ciano-4-((2R,3S)-3-hidroxitetrahidrofuran-2-ilmetil)-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il]carbámico.
- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en terapia.
3. El compuesto de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o la prevención de hipogonadismo, osteoporosis, osteopenia, sarcopenia, caquexia, atrofia muscular, disfunción sexual o disfunción eréctil.
4. El compuesto de la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento o la prevención de la atrofia muscular asociada con la falta de uso, trauma, inmovilización, lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular.
- 10 5. El compuesto de la reivindicación 4 para su uso en el tratamiento o la prevención de la atrofia muscular asociada con la sustitución de cadera o rodilla, fractura de cadera, lesión de la médula espinal o accidente cerebral vascular.
6. Una composición farmacéutica que comprende el éster isopropílico del ácido [(S)-7-ciano-4-((2R,3S)-3-hidroxitetrahidrofuran-2-ilmetil)-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il]carbámico en combinación con uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables.
- 15 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para el tratamiento o la prevención de hipogonadismo, osteoporosis, osteopenia, sarcopenia, caquexia, atrofia muscular, disfunción sexual o disfunción eréctil.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, que además comprende uno o varios agentes terapéuticos adicionales.