

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 629**

51 Int. Cl.:

C07D 219/12 (2006.01)
C07D 401/06 (2006.01)
C07D 403/06 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)
C07D 471/10 (2006.01)
C07D 498/06 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)
A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2011 E 11749677 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2606032**

54 Título: **Composición y métodos para tratar glioblastomas**

30 Prioridad:

20.08.2010 US 375704 P

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

04.03.2015

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF WASHINGTON THROUGH ITS
CENTER FOR COMMERCIALIZATION (100.0%)
4311 11th Avenue NE, Suite 500
Seattle, WA 98105, US**

72 Inventor/es:

**STELLA, NEPHI y
KLINE, TONI**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 530 629 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

Composición y métodos para tratar glioblastomas

5 Antecedentes

Campo de la descripción

La descripción se refiere a composiciones farmacéuticas para el tratamiento de tumores cerebrales.

10

Descripción de la técnica relacionada

15

Hay una necesidad urgente de nuevas terapias para el tratamiento de tumores cerebrales, especialmente astrocitomas de grado IV (conocidos además como glioblastomas multiformes). Estos tumores progresan rápidamente a través del parénquima cerebral sano y resisten todos los enfoques terapéuticos actuales, haciéndolos unos de los más devastadores de todos los cánceres. Los pacientes diagnosticados con astrocitomas grado IV mueren típicamente dentro de un año. Incluso las intervenciones terapéuticas agresivas (es decir, la combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia disponibles) extienden la esperanza de vida de estos pacientes por sólo unos pocos meses. Todas los fármacos y adyuvantes desarrollados para matar los astrocitomas (por ejemplo, agentes alquilantes novedosos y anticuerpos monoclonales) han producido beneficios terapéuticos mínimos, si hubiera. Por lo tanto, debe ser identificada y aplicada una aproximación terapéutica radicalmente diferente de manera que podamos tratar de manera fiable estos tumores devastadores.

20

25

Debido a las deficiencias de los tratamientos de cáncer cerebral ya existente, hay una necesidad en la técnica de terapias mejoradas que proporcionan la intervención terapéutica significativa contra los tumores cerebrales. En los últimos años, un número de estudios han sugerido la existencia de receptores activados por los compuestos cannabinoides como: los aminoalquilindoles (AAI). Hay una necesidad en la técnica de identificar nuevos compuestos que activan selectivamente los receptores AAI. Los receptores de AAI pueden estar implicados en la enfermedad y usar estos receptores, solos o como parte de un panel de otros receptores, para identificar y perfilar los efectos de los compuestos terapéuticos potenciales capaces de tratar uno u otra de las muchas enfermedades y trastornos mediados por los receptores AAI.

30

Resumen

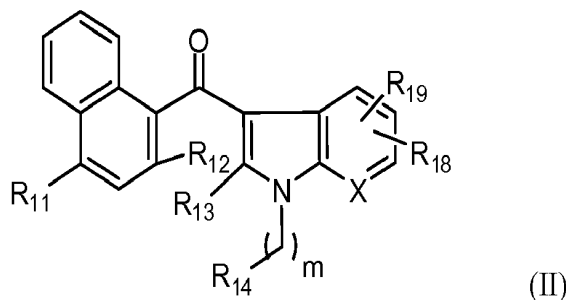
35

La descripción proporciona compuestos para usar en métodos mejorados y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de tumores cerebrales.

La descripción proporciona además los compuestos de la Fórmula (II)

40

45



50

o sales farmacéuticamente aceptables, en donde

X es CH o N;

55

R₁₁ es C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

60

R₁₂ es H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₄ y R₁₃ tomados junto con los átomos a los cuales están unidos forman un grupo heterociclilo de 5, 6, o 7 miembros opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₅, R₁₆, y R₁₇ son independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alcoxi, halógeno, hidroxilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₈ y R₁₉ son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀,

R₂₀ es halógeno, -CN, -OH, -NO₂, -NH₂, -NH(C₁-C₆ alquilo), -N(C₁-C₆alquil)₂, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, -CO₂H, -CO₂(C₁-C₆ alquilo), -SO₂(C₁-C₆ alquilo), -CONH₂, -CONH(C₁-C₆alquilo), -CON(C₁-C₆ alquil)₂, -CON(H)OH, -NHCO(C₁-C₆ alquilo), o -NHCO₂(C₁-C₆ alquilo); y

m es un entero 1 o 2.

La descripción proporciona además una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (II), y uno o más diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes, excipientes, o portadores farmacéuticamente aceptables.

La descripción proporciona además los métodos para preparar los compuestos de la descripción y los intermediarios usado en esos métodos.

La descripción proporciona adicionalmente un compuesto o composición farmacéutica de la descripción en un estuche con instrucciones para el uso del compuesto o la composición.

La descripción proporciona además compuestos de la descripción que pueden administrarse solos o en combinación con otros fármacos o terapias conocidas por ser eficaces para tratar la enfermedad para mejorar la efectividad general de la terapia.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el perfil tóxico de a) THC, b) CP55940, c) WIN 55212-2 y d) JWH-451 en células K, MDA y T98g. Se indican las EC₅₀ del efecto tóxico respectivo.

La Figura 2 muestra WIN-2 que compite por la unión de [³H]-CP55940 a CB₁ (no mostrado) y CB₂ (cuadros); mientras que JWH-451 no (círculos).

La Figura 3 muestra la identificación de ARNip (después del descenso del ARNm durante 4 días *in vitro* para determinar la estabilidad de la caída). La homología de secuencia entre CB₂ y GPR124 dentro del 3^{er} dominio transmembrana, que contiene un sitio de interacción para la unión de WIN a los receptores CB₂.

La Figura 4 muestra la potencia tóxica de JWH-451 en diferentes tipos de células.

La Figura 5 muestra inyecciones i.p. diarias de JWH-451 (5 mg/Kg, cuadrados) inhibe el crecimiento de gliomas U251 implantadas en los flancos de ratones desnudos, comparado con los controles (triángulos).

La Figura 6 muestra el cromatograma LC-MS de JWH-451 detectado en cerebro de ratón y los niveles alcanzados una hora después de la inyección i.p. de 5, 15 y 40 mg/Kg de JWH-451.

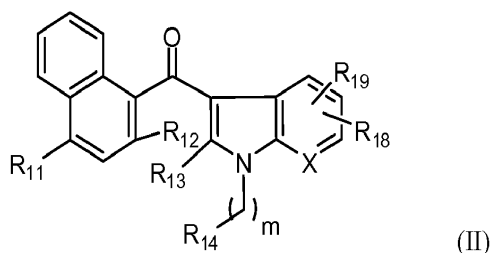
La Figura 7 muestra la cuantificación de linfocitos y la densidad de macrófago cerebral usando secciones teñidas con H&E y Iba-1 IHC recogidas de tumores DBT de ratón durante tres semanas en el cerebro del ratón.

El tratamiento diario con JWH-451 (40 mg/Kg; i.p.) condujo a un aumento de dos veces en los linfocitos y la densidad de macrófagos cerebrales dentro del núcleo tumor.

Descripción detallada

En resumen, la descripción proporciona compuestos, composiciones farmacéuticas, y compuestos para el uso en métodos para tratar tumores cerebrales en un sujeto.

Así, en un aspecto, se describen los compuestos de la Fórmula (II):



o sales farmacéuticamente aceptables, en donde

X es CH o N;

R₁₁ es C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₂ es H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₃ es C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₄ es H, arilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀, o

R₁₄ y R₁₃ tomados junto con los átomos a los cuales están unidos forman un grupo heterociclilo de 5, 6, o 7 miembros opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

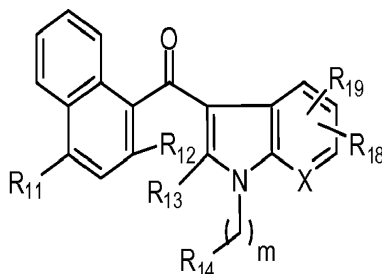
R₁₅, R₁₆, y R₁₇ son independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alcoxi, halógeno, hidroxilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₈ y R₁₉ son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀,

R₂₀ es halógeno, -CN, -OH, -NO₂, -NH₂, -NH(C₁-C₆ alquilo), -N(C₁-C₆alquil)₂, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, -CO₂H, -CO₂(C₁-C₆ alquilo), -SO₂(C₁-C₆ alquilo), -CONH₂, -CONH(C₁-C₆alquilo), -CON(C₁-C₆ alquil)₂, -CON(H)OH, -NHCO(C₁-C₆ alquilo), o -NHCO₂(C₁-C₆ alquilo); y

m es un entero 1 o 2.

En otro aspecto, la descripción proporciona los compuestos de la Fórmula (II):



(II)

o sales farmacéuticamente aceptables, en donde

X es CH o N;

R₁₁ es C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₂ es H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₄ y R₁₃ tomados junto con los átomos a los cuales están unidos forman un grupo heterociclilo de 5, 6, o 7 miembros opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₅, R₁₆, y R₁₇ son independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alcoxi, halógeno, hidroxilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₈ y R₁₉ son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -

NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀, R₂₀ es halógeno, -CN, -OH, -NO₂, -NH₂, -NH(C₁-C₆ alquilo), -N(C₁-C₆alquil)₂, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alqueno, C₂-C₆ alquino, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, -CO₂H, -CO₂(C₁-C₆ alquilo), -SO₂(C₁-C₆ alquilo), -CONH₂, -CONH(C₁-C₆alquilo), -CON(C₁-C₆ alquil)₂, -CON(H)OH, -NHCO(C₁-C₆ alquilo), o -NHCO₂(C₁-C₆ alquilo); y m es un entero 1 o 2.

5

En una modalidad, la descripción, como se describió anteriormente, proporciona los compuestos en donde X de la Fórmula (II) es CH. En otra modalidad, X de la Fórmula (II) es N.

10

En una modalidad, la descripción, como se describió anteriormente, proporciona los compuestos en donde R₁₁ es C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alqueno, C₂-C₆ alquino, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, o alquilarilo, cada uno opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀. En otra modalidad, R₁₁ es C₁-C₆alquilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -C(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -NR₁₆R₁₇, o -C(O)NR₁₆R₁₇. En aún otra modalidad, R₁₁ es C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -C(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -NR₁₆R₁₇, o -C(O)NR₁₆R₁₇. En algunas modalidades, R₁₁ es C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, halógeno, -OR₁₅, o -NR₁₆R₁₇.

15

20

En otra modalidad, la descripción, como se describió anteriormente, proporciona los compuestos en donde R₁₁ es C₁-C₆ alquil o C₁-C₆ alcoxi. Más específicamente, R₁₁ es C₁-C₄ alquilo o C₁-C₄ alcoxi. Aún más específicamente, R₁₁ es metilo o metoxi. Por ejemplo, R₁₁ es metilo.

25

En ciertas modalidades, la descripción, como se describió anteriormente, proporciona los compuestos en donde R₁₂ es H o C₁-C₆ alquilo opcionalmente sustituido con R₂₀. En una modalidad, R₁₂ es H.

La descripción, como se describió anteriormente, proporciona los compuestos en donde R₁₃ y R₁₄ tomados junto con los átomos a los cuales están unidos forman un grupo heterociclilo de 5, 6, o 7 miembros, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀. En una modalidad, R₁₃ y R₁₄ tomados junto con los átomos a los cuales están unidos forman un heterociclilo de 5, o 6 miembros. En otra modalidad, R₁₃ y R₁₄ tomados junto con los átomos a los cuales están unidos forman un heterociclilo de 6 miembros (por ejemplo, piperidinilo, piperazinilo, morfolinilo, etc.) En una modalidad, el heterociclilo es piperidinilo.

30

La descripción, como se describió anteriormente, proporciona los compuestos en donde R₁₈ y R₁₉ son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, o -SO₂NR₁₆R₁₇, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀. En una modalidad, R₁₈ y R₁₉ son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, o -NR₁₆R₁₇. En otra modalidad, R₁₈ y R₁₉ son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆haloalcoxi, halógeno, u -OH.

40

La descripción, como se describió anteriormente, proporciona además los compuestos R₁₈y R₁₉ que son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, u -OH. En una modalidad, uno de R₁₈ y R₁₉ es H, y el otro es C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, u -OH. En otra modalidad, uno de R₁₈ y R₁₉ es H, y el otro es C₁-C₆ alcoxi o halógeno. En aún otra modalidad, uno de R₁₈ y R₁₉ es H, y el otro es halógeno. En algunas modalidades, ambos R₁₈ y R₁₉ son H. En otras modalidades, ambos R₁₈ y R₁₉ son halógeno.

45

En ciertas modalidades específicas, la descripción, como se describió anteriormente, proporciona los compuestos en donde R₁₄ y R₁₈ tomados junto con los átomos a los cuales están unidos forman un grupo heterociclilo, arilo, heteroarilo o cicloalquilo de 5, 6, o 7 miembros, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀. En una modalidad, R₁₄ y R₁₈ tomados junto con los átomos a los cuales están unidos forman un grupo heterociclilo de 6 miembros, opcionalmente sustituido con R₂₀.

50

En ciertas modalidades, se describen los compuestos de la Fórmula (II) en donde R₁₄ es H. En otras modalidades, R₁₁ es C₁-C₆ alquilo; R₁₂ es H, R₁₃es C₁-C₆ alquilo; R₁₄ es H; y R₁₈ y R₁₉ son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alquilo, halógeno, u -OH.

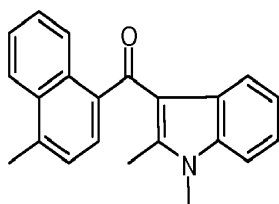
55

En otras modalidades, la descripción proporciona los compuestos de la Fórmula (II) en donde R₁₁ es C₁-C₆ alquilo; R₁₂ es H; R₁₃ y R₁₄ tomados junto con los átomos a los cuales están unidos forman un heterociclilo de 5, o 6 miembros; y R₁₈ y R₁₉ son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alquilo, halógeno, u -OH.

60

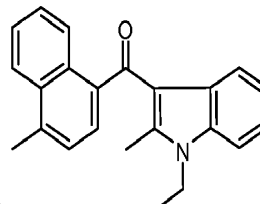
Los compuestos de la Fórmula (II), son:

5



,

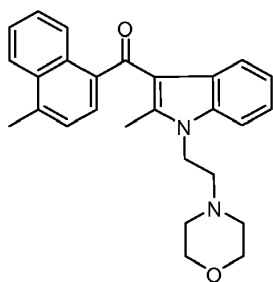
o



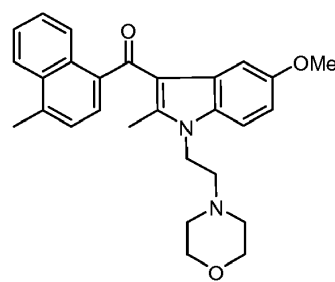
10

En una modalidad, la descripción proporciona los compuestos de la Fórmula (II), el cual es:

15



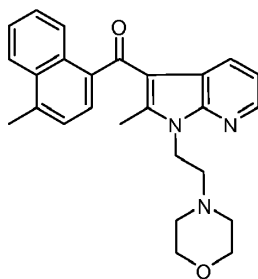
,



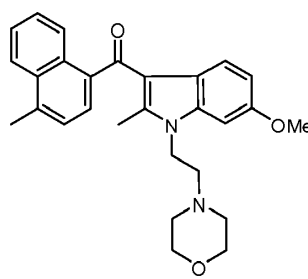
,

20

25



,

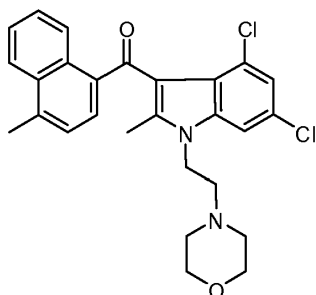


,

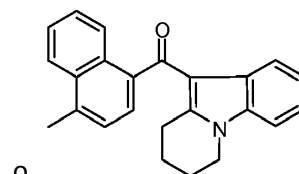
30

35

40



,



o

45

Formulaciones farmacéuticas y modos de administración

50

En varios aspectos, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de la Fórmula (II), y uno o más diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvantes, excipientes, o portadores farmacéuticamente aceptables.

55

En ciertos aspectos, la descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende los compuestos de la descripción junto con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos. Tales excipientes incluyen líquidos tales como agua, solución salina, glicerol, polietilenglicol, ácido hialurónico, etanol, y similares.

60

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o portador con el que se administra un compuesto de la descripción. Los términos "cantidad eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente del agente para proporcionar el resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser la reducción y/o alivio de los signos, síntomas, o causas de una enfermedad, o cualquier otra

alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" para usos terapéuticos es una cantidad de la composición que comprende uno o más compuestos macrólidos de polieno descritos en la presente requeridos para tratar una enfermedad causada por infecciones fúngicas para proporcionar una disminución en las infecciones clínicamente significativa. Una cantidad "eficaz" adecuada en cualquier caso individual puede determinarse por uno con habilidades ordinarias en la técnica usando experimentación de rutina.

"Portadores farmacéuticamente aceptables" para uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica, y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18va Edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990). Por ejemplo, se puede usar solución salina estéril y solución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico. Los conservantes, estabilizadores, tintes e incluso agentes saborizantes pueden proporcionarse en la composición farmacéutica. Por ejemplo, benzoato sódico, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hdroxibenzoico pueden añadirse como conservantes. *Id.* en 1449. Además se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión. *id.*

Los excipientes adecuados para formulaciones no líquidas también se conocen por aquellos expertos en la técnica. Una discusión detallada de sales y excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18va Edición (Easton, Pensilvania: Mack Publishing Company, 1990).

Además, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tampones biológicos, agentes surfactantes, y similares, pueden estar presentes en tales vehículos. Un tampón biológico puede ser cualquier solución que es farmacológicamente aceptable y que proporciona a la formulación el pH deseado, es decir, un pH en el intervalo fisiológicamente aceptable. Ejemplos de soluciones tampón incluyen solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada de Hank, y similares.

Dependiendo del modo de administración pretendido, las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de formas de dosificación sólidas, semisólidas o líquidas, tales como, por ejemplo, tabletas, supositorios, píldoras, cápsulas, polvos, líquidos, suspensiones, cremas, ungüentos, lociones o similares, preferentemente en forma de dosificación unitaria para una sola administración de una dosificación precisa. Las composiciones incluirán una cantidad eficaz del fármaco seleccionado en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable y, además, pueden incluir otros agentes, adyuvantes, diluyentes, tampones, y similares.

La descripción incluye una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la descripción que incluye isómeros, mezclas de isómeros racémicos o no racémicos, o solvatos o sales farmacéuticamente aceptables de estos junto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente otros ingredientes terapéuticos y/o profilácticos.

En general, los compuestos de la descripción se administrarán en una cantidad terapéuticamente eficaz por cualquiera de los modos de administración aceptados. Los intervalos de dosificación adecuados dependen de numerosos factores tales como la gravedad de la enfermedad a tratar, la edad y salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto usado, la vía y forma de administración, las indicaciones hacia las que se dirige la administración, y las preferencias y experiencia del médico practicante involucrado. El experto en la técnica de tratar tales enfermedades será capaz, sin excesiva experimentación y confiando en el conocimiento personal y la descripción de esta solicitud, de determinar una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos de la descripción para una enfermedad dada.

Así, los compuestos de la descripción pueden administrarse como formulaciones farmacéuticas que incluyen aquellas adecuadas para la administración oral (que incluye la bucal y sublingual), rectal, nasal, tópica, pulmonar, vaginal o parenteral (que incluye la intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para la administración por inhalación o insuflación. La manera de administración preferida es intravenosa u oral usando un régimen de dosificación diario conveniente que se puede ajustar de acuerdo al grado de aflicción.

Para las composiciones sólidas, los portadores sólidos no tóxicos convencionales incluyen, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato magnésico, y similares. Las composiciones líquida farmacéuticamente administrables pueden prepararse, por ejemplo, al disolver, dispersar, y similares, un compuesto activo descrito en la presente y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un excipiente, tal como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar de ese modo una solución o suspensión. Si se desea, la composición farmacéutica que va a administrarse puede contener además pequeñas cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tampones de pH y similares, por ejemplo, acetato sódico, monolaurato de sorbitán, acetato sódico de trietanolamina, oleato de trietanolamina, y similares. Los métodos actuales para preparar esas formas de dosificación se conocen, o resultarán evidentes, para aquellos con experiencia en esta técnica; por ejemplo, ver Remington's Pharmaceutical Sciences, mencionado anteriormente.

En aún otra modalidad es el uso de excipientes potenciadores de la permeación que incluyen polímeros tales como: policones (quitosana y sus derivados de amonio cuaternario, poli-L-arginina, gelatina aminada); polianiones (N-

carboximetilo quitosana, ácido poliacrílico); y, polímeros tiolados (carboximetil celulosa-cisteína, policarbofil-cisteína, quitosana-tiobutilamidina, quitosana-ácido tioglicólico, conjugados de quitosana-glutation).

5 Para la administración oral administración, la composición tomará generalmente la forma de una tableta, cápsula, una
cápsula de softgel o puede ser un jarabe, suspensión o solución acuosa o no acuosa. Las tabletas y cápsulas son las
formas de administración orales preferidas. Las tabletas y cápsulas para uso oral pueden incluir uno o más de los
portadores comúnmente usados tales como lactosa y almidón de maíz. Típicamente, también se añaden agentes
10 lubricantes, tales como el estearato de magnesio. Típicamente, los compuestos de la descripción pueden combinarse
con un portador inerte oral, no tóxico, farmacéuticamente aceptable, tal como lactosa, almidón, sacarosa, glucosa, metil
celulosa, estearato magnésico, fosfato dicálcico, sulfato cálcico, manitol, sorbitol y similares. Por otra parte, cuando se
desea o sea necesario, también se pueden incorporar a la mezcla aglutinantes, lubricantes, agentes desintegrantes y
agentes colorantes adecuados. Los aglutinantes adecuados incluyen almidón, gelatina, azúcares naturales tales como
15 glucosa o beta-lactosa, edulcorantes de maíz, gomas naturales y sintéticas tales como acacia, tragacanto, o alginato
sódico, carboximetilcelulosa, polietilenglicol, ceras, y similares. Los lubricantes usados en estas formas de dosificación
incluyen oleato sódico, estearato sódico, estearato magnésico, benzoato sódico, acetato sódico cloruro sódico y
similares. Los desintegrantes incluyen, sin limitación, almidón, metil celulosa, agar, bentonita, goma de xantano y
similares.

20 Así, por ejemplo, las cápsulas pueden prepararse por procedimientos convencionales de manera que la unidad de
dosificación sea 100 mg de los compuestos de la descripción, 100 mg de celulosa y 10 mg de estearato magnésico. Un
gran número de cápsulas unitarias pueden además prepararse mediante el llenado de cápsulas de gelatina dura de dos
piezas estándar cada una con 100 mg del ingrediente activo en polvo, 150 mg de lactosa, 50 mg de celulosa, y 10 mg
de estearato magnésico. O, las tabletas pueden prepararse por procedimientos convencionales de manera que la
25 unidad de dosificación sea 100 mg de los compuestos de la descripción, 150 mg lactosa, 50 mg de celulosa y 10 mg de
estearato magnésico. Un gran número de tabletas puede además prepararse por procedimientos convencionales de
manera que la unidad de dosificación sea 100 mg de los compuestos de la descripción, y los otros ingredientes pueden
ser 0.2 mg de dióxido silicio coloidal, 5 mg de estearato magnésico, 250 mg de celulosa microcristalina, 10 mg de
almidón y 100 mg de lactosa. Se pueden aplicar recubrimientos adecuados para aumentar la palatabilidad o retrasar la
30 absorción.

35 Cuando se usan suspensiones líquidas, el agente activo puede combinarse con cualquier portador inerte oral, no tóxico,
farmacéuticamente aceptable, tal como, etanol, glicerol, agua, y similares y con agentes emulsionantes y de suspensión.
Si se desea también, se pueden añadir agentes saborizantes, colorantes y/o edulcorantes. Otros componentes
opcionales para incorporar en una formulación oral de la presente incluyen, pero sin limitarse a, conservantes, agentes
de suspensión, agentes espesantes, y similares.

40 Las formulaciones parenterales se pueden preparar en formas convencionales como soluciones líquidas o
suspensiones, formas sólidas adecuadas para solubilización o suspensión en el líquido antes de la inyección, o como
emulsiones. Preferentemente, las suspensiones inyectables estériles se formulan de acuerdo con las técnicas conocidas
en la técnica usando agentes de suspensión, agentes de dispersión o humectantes y portadores adecuados. La
formulación inyectable estéril puede ser además una solución inyectable estéril o una suspensión en un solvente o
45 diluyente parenteralmente aceptable no tóxico. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear están
el agua, solución de Ringer, y solución de cloruro de sodio isotónica. Adicionalmente, los aceites fijos estériles, ésteres
grasos o polioles se emplean convencionalmente como solventes o medios de suspensión. Adicionalmente, la
administración parenteral puede involucrar el uso de un sistema de liberación sostenida o liberación lenta de manera
que se mantenga un nivel constante de dosificación.

50 La administración parenteral incluye la vía intraarticular, intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, y
subcutánea, e incluye, soluciones de inyección isotónicas estériles acuosas y no acuosas, que pueden contener
antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del destinatario
previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes,
agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. La administración a través de ciertas vías parenterales puede
55 implicar la introducción de las formulaciones de la descripción en el cuerpo de un paciente mediante una aguja o un
catéter, impulsadas por una jeringa estéril o algún otro dispositivo mecánico tal como un sistema de infusión continua.
Una formulación proporcionada por la descripción pueden administrarse usando una jeringa, inyector, bomba, o cualquier
otro dispositivo reconocido en la técnica para la administración parenteral.

60 Preferentemente, las suspensiones inyectables estériles se formulan de acuerdo con las técnicas conocidas en la
técnica usando agentes de suspensión, agentes de dispersión o humectantes y portadores adecuados. La formulación
inyectable estéril puede ser además una solución inyectable estéril o una suspensión en un solvente o diluyente
parenteralmente aceptable no tóxico. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear están el agua,
solución de Ringer, y solución de cloruro de sodio isotónica. Adicionalmente, los aceites fijos estériles, ésteres grasos o
polioles se emplean convencionalmente como solventes o medios de suspensión. Adicionalmente, la administración

parenteral puede involucrar el uso de un sistema de liberación sostenida o liberación lenta de manera que se mantenga un nivel contante de dosificación.

5 Las preparaciones de acuerdo con la descripción para la administración parenteral incluyen emulsiones, suspensiones o soluciones estériles acuosas o no acuosas. Ejemplos de solventes no acuoso o vehículos son el propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y aceite de maíz, gelatina, y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Tales formas de dosificación pueden además contener adyuvantes tales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispersantes. Ellos pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro que retiene las bacterias, por la incorporación de agentes esterilizantes en las composiciones, por la irradiación de las composiciones, o por el calentamiento de las composiciones. Estas pueden prepararse además usando agua estéril, o algún otro medio estéril inyectable, inmediatamente antes del uso.

15 Las formulaciones pueden contener opcionalmente un agente de isotonicidad. Las formulaciones preferentemente contienen un agente de isotonicidad, y la glicerina es el agente de isotonicidad más preferido. La concentración de la glicerina, cuando se usa, está en el intervalo conocido en la técnica, tal como, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml.

20 El pH de las formulaciones parenterales puede controlarse por un agente tampón, tal como, fosfato, acetato, TRIS o L-arginina. La concentración del agente tampón es preferentemente adecuada para proporcionar la regulación del pH durante el almacenamiento para mantener el pH a un pH objetivo ± 0.2 unidad de pH. El pH preferido está entre aproximadamente 7 y aproximadamente 8 cuando se mide a temperatura ambiente.

25 Oros aditivos, tales como un solubilizador farmacéuticamente aceptable como Tween 20® (polioxietileno (20) monolaurato de sorbitán), Tween 40® (polioxietileno (20) monopalmitato de sorbitán), Tween 80® (polioxietileno (20) monooleato de sorbitán), Pluronic F68® (copolímeros de bloque polioxietileno polioxipropileno), y PEG (polietilenglicol) puede añadirse opcionalmente a la formulación, y puede ser útil en las formulaciones contactarán los materiales plásticos. Además, las formulaciones parenterales pueden contener varios agentes antimicrobianos y antifúngicos, por ejemplo, parabén, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares.

30 Las soluciones inyectables estériles se preparan al incorporar uno o más de los compuestos de la descripción en la cantidad requerida en el solvente adecuado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, como se requieran, seguido por la esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada de este. Así, por ejemplo, una composición parenteral adecuada para la administración por inyección se prepara al agitar 1.5% en peso del ingrediente activo en 10% por volumen de propilenglicol y agua. La solución se prepara isotónica con cloruro sódico y se esteriliza.

35 Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden administrar en la forma de supositorios para administración rectal. Estos se pueden preparar mezclando al agente con un excipiente adecuado no irritante que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura rectal y por lo tanto se fundirá en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales incluyen manteca de cacao, cera de abejas y polietilenglicoles.

45 Las composiciones farmacéuticas de la descripción se pueden administrar además por inhalación o aerosol nasal. Tales composiciones se prepararon de conformidad con técnicas bien conocidas en la técnica de la formulación farmacéutica y se pueden preparar como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes, promotores de absorción para mejorar la biodisponibilidad, propulsores tales como fluorocarbonos o nitrógeno, y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

50 Las formulaciones preferidas para el suministro del fármaco en forma tópica son los ungüentos y cremas. Los ungüentos son preparaciones semisólidas que se basan por lo general típicamente en petrolato u otros derivados del petróleo. Las cremas que contienen el agente activo seleccionado son, como se conoce en la técnica, emulsiones semisólidas o líquidas viscosas, ya sea aceite-en-agua o agua-en-aceite. Las bases de las cremas son lavables en agua, y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa, además llamada algunas veces la fase "interna", generalmente se compone de petrolato y un alcohol graso tal como el cetílico o alcohol estearílico; la fase acuosa usualmente, aunque no necesariamente, excede la fase oleosa en volumen, y generalmente contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema es generalmente un surfactante no iónico, aniónico, catiónico o anfótero. El ungüento o crema base específica a usar, como será apreciado por aquellos con experiencia en la técnica, es uno que proporcionará un suministro óptimo del fármaco. Como con otros portadores o vehículos, una base de ungüento debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante.

Las formulaciones para la administración bucal incluyen tabletas, pastillas, geles y similares. Alternativamente, la administración bucal se puede efectuar usando el sistema de suministro transmucosal como se conoce por aquellos con experiencia en la técnica. Los compuestos de la descripción pueden además suministrarse a través de la piel o el tejido mucosal usando sistemas de suministro de fármacos transdérmicos convencionales, es decir, "parches" transdérmicos en donde típicamente el agente está contenido dentro de una estructura laminada que sirve como un dispositivo de suministro de fármacos que se fija en la superficie del cuerpo. En tal estructura, la composición del fármaco típicamente está contenida en una capa o "reservorio," subyacente a una capa de soporte superior. El dispositivo laminado puede contener un único reservorio, o puede contener múltiples reservorios. En una modalidad, el reservorio comprende una matriz polimérica de un material adhesivo de contacto farmacéuticamente aceptable que sirve para fijar el sistema a la piel durante el suministro del fármaco. Ejemplos de materiales adhesivos de contacto con la piel adecuados incluyen, pero sin limitarse a, polietileno, polisiloxanos, poliisobutilenos, poliácridatos, poliuretanos, y similares. Alternativamente, el reservorio que contiene el fármaco y el adhesivo de contacto con la piel están presentes como capas separadas y distintas, con el adhesivo subyacente en el depósito que, en este caso, puede ser tanto una matriz polimérica como se describió anteriormente, o puede ser un reservorio de líquido o gel, o puede tomar alguna otra forma. La capa de soporte en estos laminados, que sirve como la superficie superior del dispositivo, funciona como el elemento estructural primario de la estructura laminada y le proporciona al dispositivo mucha de su flexibilidad. El material seleccionado para la capa de soporte debe ser sustancialmente impermeable al agente activo y a cualquier otro material que esté presente.

Los compuestos de la descripción pueden formularse para administración con aerosol, particularmente al tracto respiratorio e incluye la administración intranasal. El compuesto tendrá generalmente un tamaño de partícula pequeño, por ejemplo, del orden de 5 micrones o menor. Tal tamaño de partícula puede obtenerse por medios conocidos en la técnica, por ejemplo por micronización. El ingrediente activo se proporciona en un empaque presurizado con un propulsor adecuado tal como un clorofluorocarbono (CFC) por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano o diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. El aerosol puede además contener convenientemente un surfactante tal como lecitina. La dosis del fármaco se puede controlar por una válvula dosificadora. Alternativamente, los ingredientes activos se pueden proporcionar en forma de un polvo seco, por ejemplo una mezcla de polvo del compuesto en una base de polvo adecuada tal como lactosa, almidón, derivados del almidón tales como hidroxipropilmetil celulosa y polivinilpirrolidina (PVP). El portador en polvo formará un gel en la cavidad nasal. La composición en polvo se puede presentar en forma de dosis unitaria por ejemplo en cápsulas o cartuchos de por ejemplo gelatina o empaques tipo ampolla a partir de las que el polvo puede administrarse por medio de un inhalador.

Una cantidad farmacéuticamente o terapéuticamente eficaz de la composición se le suministrara al sujeto. La cantidad eficaz precisa variará de sujeto a sujeto y dependerá de la especie, edad, tamaño y salud del sujeto, la naturaleza y extensión de la afección a tratar, recomendaciones del médico tratante, y los terapéuticos o combinación de terapéuticos seleccionados para la administración. Así, la cantidad eficaz para una situación dada puede determinarse por experimentación de rutina. Para los propósitos de la descripción, generalmente una cantidad terapéutica estará en el intervalo de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal, con mayor preferencia aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, en al menos una dosis. En mamíferos más grandes la dosificación diaria indicada puede ser de aproximadamente 1 mg a 300 mg, una o más veces por día, con mayor preferencia en el intervalo de aproximadamente 10 mg a 200 mg. A los sujetos se les pueden administrar tantas dosis como se requiera para reducir y/o aliviar los signos, síntomas, o causas del trastorno en cuestión, o efectuar cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Cuando se desea, las formulaciones se pueden preparar con recubrimiento entérico adaptado para la liberación sostenida o controlada del ingrediente activo.

Las preparaciones farmacéuticas están preferentemente en formas de dosificación unitaria. En dicha forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación empacada, donde el empaque contiene cantidades discretas de la preparación, tales como tabletas empacadas, cápsulas, y polvos en viales o ampulas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, tableta, sello, o pastilla en si mismas, o puede ser la cantidad adecuada de cualquiera de éstas en forma empacada.

Métodos de tratamiento de Glioblastoma

WIN 55212-2 (WIN-2) se reportó que se une con afinidad nanomolar a una proteína expresada por las células NG108-15. CP55,940 (CP), un agonista de alta afinidad en los receptores CB₁ y CB₂, no compitió por la unión de WIN-2 en estas células. WIN-2 se reportó que aumenta la unión a [³⁵S]-GTPγS en homogenados preparados a partir de cerebelo de ratón CB₁^{-/-}, una respuesta insensible al antagonista de CB₂ SR144528. WIN-2 además se reportó que inhibe la transmisión excitadora en láminas de hipocampo preparadas a partir de ratones CB₁^{-/-}, y subsecuentemente mostró que esta respuesta se bloquea por el antagonista de TRPV1 capsazepina. En conjunto, estos descubrimientos sugieren que existe un receptor activado por el compuesto aminoalquilindol WIN-2 y que es un receptor acoplado a proteína G (GPCR).

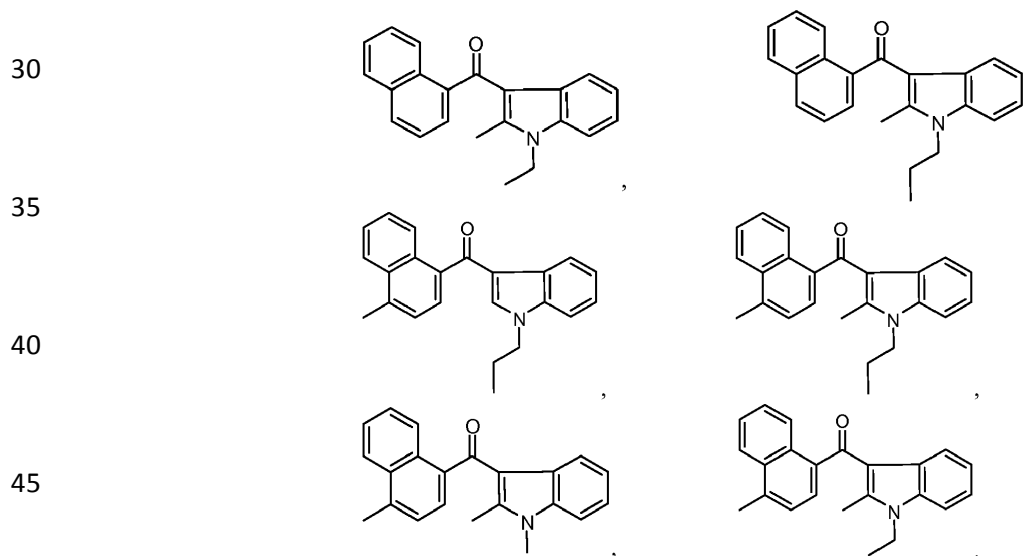
5 Los receptores acoplados a proteína G (GPCRs) constituyen una familia de proteínas que comparten una organización estructural común caracterizada por un extremo N-terminal extracelular, siete alfa hélices hidrofóbicas que putativamente constituyen dominios de transmembrana, y un dominio C-terminal intracelular. Los GPCRs unen una amplia variedad de ligandos que desencadenan señales intracelulares mediante la activación de proteínas G transductoras. Más de 300 GPCRs se han clonado, y se asume generalmente que existen más de 1000 de tales receptores. Aproximadamente 50-60% de todos los fármacos clínicamente relevantes actúan por la modulación de las funciones de varios GPCRs.

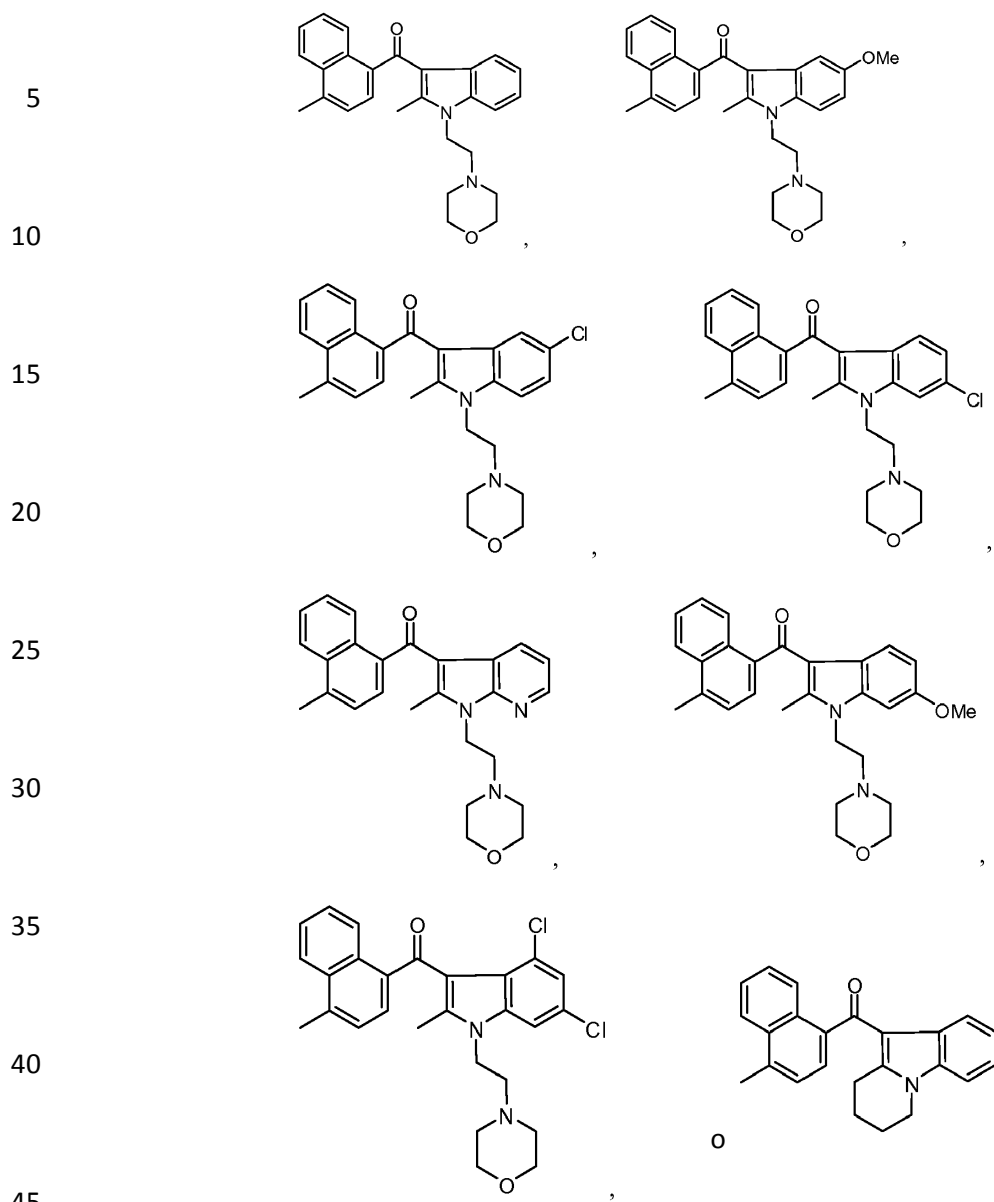
10 La activación de los receptores CB₁ y CB₂ mata los astrocitomas. A mediados de 1990, se reportó que los receptores CB₁ estaban presentes en varias líneas celulares de glioma humano, así como en explantes de tumores humanos con varios grados de malignidad. En consecuencia, agonistas en los receptores CB₁ activan la vía de la quinasa y el factor de transcripción krox-24 en líneas celulares de glioma humano, respuestas antagonizadas por el antagonista del receptor CB₁ rimonabant aplicado en concentraciones nanomolares. Poco después de estas publicaciones, se asumió que los cannabinoides servían como poderosos agentes antitumorales en el tratamiento de astrocitomas.

15 Como el compuesto AAI prototípico, WIN-2, se sintetizó originalmente como un agente antiinflamatorio y analgésico. Su direccionalización farmacológica casual a CB₁/CB₂ ha servido como una herramienta altamente eficaz para estudiar la señalización canabinoide, y de más interés para nuestro estudio, reveló efectos no mediados por CB₁/CB₂. La descripción muestra que líneas de astrocitoma de ratón y humanas expresan GPR124, un receptor de AAI; y que antagonistas al receptor GPR124 selectivamente matan las células tumorales sin dañar las células sanas.

20 La descripción proporciona además los compuestos para el uso en los métodos para tratar e inhibir el glioblastoma en un sujeto, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula (II), en donde R₁₁-R₁₄, R₁₈, R₁₉, X y m son como los definidos anteriormente.

25 Los compuestos que pudieran usarse en los métodos para tratar el glioblastoma tienen las siguientes estructuras:





En otro aspecto, la descripción proporciona los métodos para activar el receptor de GPR124 que comprende administrar un compuesto de la Fórmula (I) o (II) definido anteriormente.

50 En varias modalidades, los compuestos de la descripción se unen a GPR124. En modalidades adicionales, los compuestos de la descripción se unen a más de uno de los receptores canabinoides de CB₁ o CB₂. En algunas modalidades, los compuestos de la descripción no se unen a los receptores canabinoides de CB₁ o CB₂. En ciertas modalidades, la descripción proporciona métodos donde los astrocitomas se exterminan. En un aspecto, la descripción describe los compuestos de la Fórmula (II) definidos en la reivindicación 1 para el uso en los métodos para activar el receptor de GPR124.

60 GPR124 se definió inicialmente en células endoteliales derivadas de vasos sanguíneos que crecían en tumores colorrectales. Ningún compuesto que actúe a través de este receptor se ha reportado aún y su mecanismo de transducción de señales solo está comenzando a delinearse. Los enfoques genéticos dirigidos a eliminar o sobre-expresar GPR124 en poblaciones celulares selectivas muestran que este receptor juega un papel crucial en el desarrollo de la vasculatura y la migración de las células endoteliales. Mientras el patrón de expresión de GPR124 en un cerebro humano sano y en GBMs humanas todavía necesita determinarse, el atlas del cerebro de ratón del Instituto Allen indica que GPR124 se expresa a bajo nivel en el cerebro de ratón sano.

En una modalidad, los compuestos de la descripción definidos anteriormente se unen selectivamente a GPR124. En otra modalidad, los compuestos de la descripción definidos anteriormente activan no más de uno de los receptores canabinoides de CB₁ o CB₂. En aún otra modalidad, los compuestos de la descripción definidos anteriormente no activan los receptores canabinoides de CB₁ o CB₂.

La descripción proporciona además compuestos para el uso en los métodos de tratar los glioblastomas en un sujeto que comprende activar el receptor de GPR124 en el cerebro del sujeto, que comprende administrar uno o más de los compuestos de la descripción descritos anteriormente. En una modalidad, los astrocitos se exterminan. En una modalidad adicional, los receptores canabinoides de CB₁ o CB₂ no se activan por el tratamiento.

La descripción proporciona además los compuestos para el uso en los métodos de mejorar la actividad de GPR124 en un sujeto que comprende administrar un agonista de GPR124 en el cerebro del sujeto. En otra modalidad, los receptores canabinoides de CB₁ o CB₂ no se activan por el agonista. En una modalidad, el agonista es el compuesto de la descripción descrito anteriormente.

Métodos de tamizado

En un aspecto, los compuestos de la descripción para usar en compuestos descritos para el uso en los métodos de tamizaje por los agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de glioblastomas en un sujeto, que comprende las etapas de:

poner en contacto a compuesto de prueba con un polipéptido de GPR124 o un fragmento de este;
 medir una señal correlacionada con la unión del compuesto de prueba al polipéptido de GPR124;
 poner en contacto el compuesto de prueba con el receptor canabinoide de CB₁;
 medir una señal correlacionada con la unión del compuesto de prueba al receptor canabinoide de CB₁;
 poner en contacto el compuesto de prueba con el receptor canabinoide de CB₂;
 medir una señal correlacionada con la unión del compuesto de prueba al receptor canabinoide de CB₂; y
 determinar si el compuesto de prueba se une al polipéptido de GPR124, el receptor canabinoide de CB₁, y el receptor canabinoide de CB₂; y
 seleccionar un compuesto de prueba positivo que se une al polipéptido de GPR124 pero no a uno de los receptores canabinoides de CB₁ o CB₂.

En una modalidad, el compuesto de prueba es un agonista de GPR124. En aspectos adicionales, el compuesto de prueba es un antagonista de GPR124. En otra modalidad, el compuesto de prueba es el compuesto de la descripción descrito anteriormente.

Se describen además métodos de tamizaje para los agentes terapéuticos que además comprende:

poner en contacto un segundo agente de prueba con un polipéptido de GPR124 o un fragmento de este, en donde el GPR124 está unido al compuesto de prueba positivo;
 medir una señal correlacionada con la unión del compuesto de prueba positivo al polipéptido de GPR124;
 seleccionar un segundo compuesto de prueba que modula la actividad del compuesto de prueba positivo en el polipéptido de GPR124.

En una modalidad, la etapa de poner en contacto es en o sobre la superficie de una célula. En otra modalidad, la etapa de poner en contacto es en un sistema libre de célula.

En ciertas modalidades, el polipéptido se acopla a una etiqueta detectable. En otras modalidades, el compuesto de prueba se acopla a una etiqueta detectable. En otra modalidad, el compuesto de prueba desplaza un ligando que se une primero al polipéptido.

En una modalidad, el compuesto de prueba es un agonista de GPR124. En aspectos adicionales, el compuesto de prueba es un antagonista de GPR124. En otra modalidad, el compuesto de prueba es el compuesto de la descripción descrito anteriormente.

Estuches

En otros aspectos, la descripción proporciona estuches que pueden usarse para realizar los métodos descritos en la presente. En varios aspectos, los estuches comprenden los compuestos de la descripción en uno o más envases. En algunos aspectos, los estuches contienen todos los componentes necesarios y/o suficientes para administrar los compuestos de la descripción a un sujeto, que incluye las instrucciones para administrar los compuestos. En algunos aspectos, los estuches contiene todos los componentes necesarios y/o suficientes para realizar los ensayos de métodos de tamizaje de la descripción, que incluyen todos los controles, direcciones para realizar los ensayos, y cualquier programa necesario para el análisis y presentación de los resultados. En ciertos aspectos, la descripción proporciona un estuche con compartimento en el cual están contenidos los reactivos en envases separados. Tales envases permiten

- transferir los reactivos eficientemente de un compartimento a otro compartimento de forma tal que no hay contaminación cruzada de las mezclas y reactivos, y los agentes y soluciones de cada envase se pueden añadir en una forma cuantitativa de un compartimento a otro. Tales envases incluirán un envase que aceptará la muestra de prueba, un envase que contiene el receptor soluble usado en los métodos, envases que contienen reactivos de lavado (tales como solución salina tamponada con fosfato, tampones Tris, y similares), y envases que contienen los reactivos usados para detectar las señales correspondientes a la unión de los receptores CB1 y CB2 y el receptor GPR124. Una persona con experiencia en la técnica reconocerá fácilmente que los compuestos descritos en la presente se pueden incorporar fácilmente dentro de uno de los formatos de los estuches establecidos que se conocen bien en la técnica.
- 5
- 10 En una modalidad, la descripción proporciona un estuche que comprende un compuesto de la Fórmula (I) descrito anteriormente. En otra modalidad, la descripción proporciona un estuche que comprende un compuesto de la Fórmula (II) descrito anteriormente.
Otros métodos terapéuticos
- 15 La descripción proporciona además modalidades relacionada a la interacción entre compuestos AAI y otros ligandos y los receptores de AAI. De acuerdo a la descripción, se proporcionan métodos para la identificación de compuestos que modulan la unión de AAI y otros ligandos a los receptores de AAI. Estos métodos se usan para identificar compuestos que modulan la activación de los receptores de AAI por compuestos AAI y otros ligandos, identificar compuestos que son agonistas, antagonistas, moduladores alostéricos, o agonistas inversos de los receptores de AAI, e identificar compuestos que modulan selectivamente los receptores de AAI, en lugar de otros receptores, tales como CB1 o CB2. Los ensayos de la descripción pueden usarse además para identificar compuestos con actividad en cualquier combinación de receptores CB1, CB2 y AAI.
- 20
- 25 Modulación de la actividad del sitio de unión a AAI por agonistas, antagonistas o agonistas inversos endógenos, naturales o sintéticos puede ser útil para el tratamiento (terapéutico o profiláctico) de un número de enfermedades donde los ligandos tipo canabinoide desempeñan un papel o tienen un efecto beneficioso, en particular pero sin limitarse a tejidos donde el sitio de unión a AAI se expresa y donde AAI están implicados para tener un efecto modificador de la enfermedad significativo, tal como la corteza prefrontal, sustancia negra y núcleo basalis de Meynert en CNS y trastornos de cognición, ego esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer y demencia, o el caudado y el putamen en la enfermedad de Parkinson, depresión, esclerosis múltiple, y otras patologías asociadas con neuroinflamación (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, demencia Fronto temporal, parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 y enfermedades priónicas como Kuru, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, tembladera y la encefalitis espongiiforme bovina, y similares). Por lo tanto, la descripción proporciona métodos de tratamiento de trastornos de cognición, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer y demencia, enfermedad de Parkinson, depresión, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, demencia Fronto temporal, parkinsonismo vinculado al cromosoma 17 y enfermedades priónicas (tales como Kuru, enfermedad de Creutzfeld-Jacob, tembladera y la encefalitis espongiiforme bovina) que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula (I) o Fórmula (II) como se describió anteriormente.
- 30
- 35
- 40 Definiciones
- Cualquiera de los términos no definidos directamente en la presente se deberá entender con el significado comúnmente asociado con ellos como se entiende dentro de la técnica de la descripción. Ciertos términos se discuten en la presente para proporcionar orientación adicional al practicante al describir las composiciones, dispositivos, métodos, y similares, de modalidades de la descripción, y cómo usarlos. Se apreciará que la misma cosa puede decirse en más de una forma. Consecuentemente, puede usarse el lenguaje alternativo y los sinónimos para uno cualquiera o más de los términos mencionados en la presente. No se dará significación a si un término se elabora o discute o no en la presente. Se proporcionan algunos sinónimos o método, materiales y similares sustituidos. Recital de uno o unos pocos sinónimos o equivalentes no excluye el uso de otros sinónimos o equivalentes, a menos que se indique explícitamente. El uso de los ejemplos, incluyendo los ejemplos de los términos, tiene un propósito ilustrativo solamente y no limita el alcance y significado de las modalidades de la presente descripción.
- 45
- 50
- 55 Debe destacarse que, como se usa en la descripción, las formas singulares "un," "una" y "el/la" incluyen referencias del plural a menos que el contexto claramente lo establezca de cualquier otra forma.
- 60 Como se usa en la presente, el término "paciente" o "sujeto" abarca los mamíferos y no mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen, pero sin limitarse a, cualquier miembro de la clase mamífero: humanos, primates no-humanos tales como los chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja como reces, caballos, ovejas, cabras, cerdos; animales domésticos tales como conejos, perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores, tales como ratas, ratones y cobayas, y similares. Los ejemplos de no mamíferos incluyen, pero sin limitarse a, aves, peces y similares. El término no denota una edad o género particular.
- Las porciones químicas referidas como porciones químicas univalentes (por ejemplo, alquilo, arilo, y similares) abarcan

5 además porciones multivalentes permisibles estructuralmente, como se entiende por aquellos con experiencia en la técnica. Por ejemplo, aunque una porción "alquilo" generalmente se refiere a un radical monovalente (por ejemplo, CH_3CH_2-), en circunstancias adecuadas una porción "alquilo" puede referirse además a un radical divalente (por ejemplo, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, el cual es equivalente a un grupo "alquileno"). Similarmente, bajo circunstancias donde se requiere una porción divalente, aquellos con experiencia en la técnica entenderán que el término "arilo" se refiere al grupo arileno divalente correspondiente.

10 Los términos usados en la presente pueden estar precedidos o seguidos por un guión simple, "-", o un guión doble, "=", para indicar el orden de enlace del enlace entre el llamado sustituyente y su porción original; un guión simple indica un simple enlace y un guión doble indica un doble enlace. En ausencia de un guión simple o doble se entiende que se forma un simple enlace entre el sustituyente y la porción original; más aun, se pretende que los sustituyentes se lean de izquierda a derecha a menos que un guión lo indique de cualquier otra forma. Por ejemplo, $\text{C}_1\text{-C}_6$ alcoxicarboniloxi y $-\text{OC}(\text{O})\text{C}_1\text{-C}_6$ alquilo indican la misma funcionalidad; similarmente arilalquilo y -alquilarilo indican la misma funcionalidad.

15 Se entiende que todos los átomos tienen su número normal de valencias para la formación de enlaces (por ejemplo, 4 para el carbono, 3 para el N, 2 para el O, 2, 4, o 6 para el S, dependiendo del estado de oxidación del átomo). Ocasionalmente una porción puede definirse, por ejemplo, como $(\text{A})_a\text{B}$, en donde a es 0 o 1. En tales casos, cuando a es 0 la porción es B y cuando a es 1 la porción es AB.

20 Donde un sustituyente puede variar en el número de átomos o grupos del mismo tipo (por ejemplo, grupos alquilo pueden ser C_1 , C_2 , C_3 , y similares), el número de átomos o grupos repetidos se pueden representar por un intervalo (por ejemplo, $\text{C}_1\text{-C}_6$ alquilo) que incluye cada y todos los números y cualquiera y todos los intervalos. Por ejemplo, $\text{C}_1\text{-C}_3$ alquilo incluye C_1 , C_2 , C_3 , C_{1-2} , C_{1-3} , y C_{2-3} alquilo.

25 "Alcoxi" se refiere a un grupo alquilo, como se define en la presente, añadido a la porción molecular original a través de un átomo de oxígeno. Los ejemplos representativos de alcoxi incluyen, pero sin limitarse a, metoxi, etoxi, propoxi, 2-propoxi, butoxi, terc-butoxi, pentiloxi, y hexiloxi.

30 El término "alquilo", como se usa en la presente, se refiere a un hidrocarburo de cadena recta o ramificada que contiene de 1 a 10 átomos de carbono a menos que se especifique de cualquier otra forma. Los ejemplos representativos de alquilo incluyen, pero sin limitarse a, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, n-hexilo, 3-metilhexilo, 2,2-dimetilpentilo, 2,3-dimetilpentilo, n-heptilo, n-octilo, n-nonilo, y n-decilo. Cuando un grupo "alquilo" es un grupo de enlace entre dos otras porciones, entonces también puede ser una cadena recta o ramificada; los ejemplos incluyen, pero sin limitarse a $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-$, $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}_2-$.

35 El término "alqueno", como se usa en la presente, se refiere a un hidrocarburo de cadena recta o ramificada que contiene de 2 a 10 carbonos, a menos que se especifique de cualquier otra forma, y que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos representativos de alqueno incluyen, pero sin limitarse a, etenilo, 2-propenilo, 2-metil-2-propenilo, 3-butenilo, 4-pentenilo, 5-hexenilo, 2-heptenilo, 2-metil-1-heptenilo, 3-decenilo, y 3,7-dimetilocta-2,6-dienilo.

40 El término "alquino", como se usa en la presente, se refiere a un grupo hidrocarburo de cadena recta o ramificada que contiene de 2 a 10 átomos de carbono y que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos representativos de alquino incluyen, pero sin limitarse a, acetilenilo, 1-propinilo, 2-propinilo, 3-butinilo, 2-pentinilo, y 1-butinilo.

45 El término "arilo," como se usa en la presente, se refiere a un fenilo (*es decir*, arilo monocíclico), o un sistema anular bicíclico que contiene al menos un anillo fenilo o un anillo bicíclico aromático que contiene solamente átomos de carbono en el sistema anular bicíclico aromático. El arilo bicíclico puede ser azuleno, naftilo, o un fenilo fusionado a un cicloalquilo monocíclico, un cicloalqueno monocíclico, o un heterociclo monocíclico. El arilo bicíclico se une a la porción molecular original a través de cualquier átomo de carbono contenido dentro de la porción fenilo del sistema bicíclico, o cualquier átomo de carbono con el anillo naftilo o azuleno. Las porciones cicloalquilo monocíclico o heterocíclico monocíclico del arilo bicíclico se sustituyen opcionalmente con uno o dos grupos oxo y/o tio. Los ejemplos representativos de arilos bicíclicos incluyen, pero sin limitarse a, azuleno, naftilo, dihidroinden-1-ilo, dihidroinden-2-ilo, dihidroinden-3-ilo, dihidroinden-4-ilo, 2,3-dihidroindol-4-ilo, 2,3-dihidroindol-5-ilo, 2,3-dihidroindol-6-ilo, 2,3-dihidroindol-7-ilo, inden-1-ilo, inden-2-ilo, inden-3-ilo, inden-4-ilo, dihidronaftalen-2-ilo, dihidronaftalen-3-ilo, dihidronaftalen-4-ilo, dihidronaftalen-1-ilo, 5,6,7,8-tetrahidronaftalen-1-ilo, 5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-ilo, 2,3-dihidrobenzofuran-4-ilo, 2,3-dihidrobenzofuran-5-ilo, 2,3-dihidrobenzofuran-6-ilo, 2,3-dihidrobenzofuran-7-ilo, benzo[d][1,3]dioxol-4-ilo, benzo[d][1,3]dioxol-5-ilo, 2H-cromen-2-on-5-ilo, 2H-cromen-2-on-6-ilo, 2H-cromen-2-on-7-ilo, 2H-cromen-2-on-8-ilo, isoindolina-1,3-dion-4-ilo, isoindolina-1,3-dion-5-ilo, inden-1-on-4-ilo, inden-1-on-5-ilo, inden-1-on-6-ilo, inden-1-on-7-ilo, 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxan-5-ilo, 2,3-dihidrobenzo[b][1,4]dioxan-6-ilo, 2H-benzo[b][1,4]oxazin3(4H)-on-5-ilo, 2H-benzo[b][1,4]oxazin3(4H)-on-6-ilo, 2H-benzo[b][1,4]oxazin3(4H)-on-7-ilo, 2H-benzo[b][1,4]oxazin3(4H)-on-8-ilo,

- benzo[d]oxazin-2(3H)-on-5-ilo, benzo[d]oxazin-2(3H)-on-6-ilo, benzo[d]oxazin-2(3H)-on-7-ilo, benzo[d]oxazin-2(3H)-on-8-ilo, quinazolin-4(3H)-on-5-ilo, quinazolin-4(3H)-on-6-ilo, quinazolin-4(3H)-on-7-ilo, quinazolin-4(3H)-on-8-ilo, quinoxalin-2(1H)-on-5-ilo, quinoxalin-2(1H)-on-6-ilo, quinoxalin-2(1H)-on-7-ilo, quinoxalin-2(1H)-on-8-ilo, benzo[d]tiazol-2(3H)-on-4-ilo, benzo[d]tiazol-2(3H)-on-5-ilo, benzo[d]tiazol-2(3H)-on-6-ilo, y, benzo[d]tiazol-2(3H)-on-7-ilo. En ciertas modalidades, el arilo bicíclico es (i) naftilo o (ii) un anillo fenilo fusionado a un cicloalquilo monocíclico de 5 o 6 miembros, un cicloalqueno monocíclico de 5 o 6 miembros, o un heterociclilo monocíclico de 5 o 6 miembros, en donde los grupos cicloalquilo, cicloalqueno, y heterociclilo fusionados son opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos que son independientemente oxo o tia.
- Un grupo "aralquilo" o "arilalquilo" comprende un grupo arilo covalentemente unido a un grupo alquilo, cada uno de estos es independientemente opcionalmente sustituido. Preferentemente, el grupo aralquilo es aril(C₁-C₆)alquilo, que incluye, sin limitarse a, bencilo, fenetilo, y naftilmetilo.
- El término "cicloalquilo", como se usa en la presente, se refiere a un sistema anular cicloalquilo monocíclico o bicíclico. Los sistemas de anillo monocíclico son grupos de hidrocarburo cíclicos que contiene de 3 a 8 átomos de carbono, donde tales grupos pueden ser saturado o insaturado, pero no aromáticos. En ciertas modalidades, los grupos cicloalquilo son completamente saturados. Los ejemplos de cicloalquilos monocíclicos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclopentenilo, ciclohexilo, ciclohexenilo, cicloheptilo, y ciclooctilo. Los sistemas de anillo de cicloalquil o bicíclicos son anillos monocíclicos puenteados o anillos bicíclicos fusionados. Los anillos monocíclicos puenteados contienen un anillo de cicloalquilo monocíclico donde dos átomos de carbono no adyacentes del anillo monocíclico se unen por un puente de alqueno de entre uno y tres átomos de carbono adicionales (*por ejemplo*, un grupo de puente de la forma -(CH₂)_w-, donde w es 1, 2, o 3). Los ejemplos representativos de sistemas anulares bicíclicos incluyen, pero sin limitarse a, biciclo[3.1.1]heptano, biciclo[2.2.1]heptano, biciclo[2.2.2]octano, biciclo[3.2.2]nonano, biciclo[3.3.1]nonano, y biciclo[4.2.1]nonano. Los sistemas anulares cicloalquilo bicíclico fusionados contienen un anillo cicloalquilo monocíclico fusionado a un fenilo, un cicloalquilo monocíclico, un cicloalqueno monocíclico, un heterociclilo monocíclico, o un heteroarilo monocíclico. El cicloalquilo bicíclico enlazado o fusionado se une a la porción molecular original a través de cualquier átomo de carbono contenido dentro del anillo cicloalquilo monocíclico. Los grupos cicloalquilo son opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos que son independientemente oxo o tia. En ciertas modalidades, el cicloalquilo bicíclico fusionado es un anillo cicloalquilo monocíclico de 5 o 6 miembros fusionado a un anillo fenilo, un cicloalquilo monocíclico de 5 o 6 miembros, un cicloalqueno monocíclico de 5 o 6 miembros, un heterociclilo monocíclico de 5 o 6 miembros, o un heteroarilo monocíclico de 5 o 6 miembros, en donde el cicloalquilo bicíclico fusionado es opcionalmente sustituido por uno o dos grupos que son independientemente oxo o tia.
- El término "heterociclilo", como se usa en la presente, se refiere a un heterociclo monocíclico o un heterociclo bicíclico. El heterociclo monocíclico es un anillo de 3, 4, 5, 6 o 7 miembros que contiene al menos un heteroátomo independientemente seleccionado del grupo que consiste en O, N, y S donde el anillo es saturado o insaturado, pero no aromático. El anillo de 3 o 4 miembros contiene un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste de O, N y S. El anillo de 5 miembros puede contener cero o un doble enlace y uno, dos o tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste de O, N y S. Los anillos de 6 o 7 miembros contienen cero, uno o dos dobles enlaces y uno, dos o tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste de O, N y S. El heterociclo monocíclico se conecta a la porción molecular original a través de cualquier átomo de carbono o cualquier átomo de nitrógeno contenido dentro del heterociclo monocíclico. Los ejemplos representativos de heterociclo monocíclico incluyen, pero sin limitarse a, azetidino, azepano, aziridino, diazepano, 1,3-dioxano, 1,3-dioxolano, 1,3-ditiano, 1,3-ditiano, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolinilo, isotiazolidinilo, isoxazolinilo, isoxazolidinilo, morfolino, oxadiazolinilo, oxadiazolidinilo, oxazolinilo, oxazolidinilo, piperazino, piperidino, pirano, pirazolinilo, pirazolidinilo, pirrolino, pirrolidinilo, tetrahidrofurano, tetrahidrotieno, tiadiazolinilo, tiadiazolidinilo, tiazolinilo, tiazolidinilo, tiomorfolino, 1,1-dioxidotiomorfolino (tiomorfolina sulfona), tiopirano, y tritiano. El heterociclo bicíclico es un heterociclo monocíclico fusionado a un fenilo, un cicloalquilo monocíclico, un cicloalqueno monocíclico, un heterociclo monocíclico, o un heteroarilo monocíclico. El heterociclo bicíclico se conecta a la porción molecular original a través de cualquier átomo de carbono o cualquier átomo de nitrógeno contenido dentro de la porción del heterociclo monocíclico del sistema anular bicíclico. Los ejemplos representativos de heterociclilos bicíclicos incluyen, pero sin limitarse a, 2,3-dihidrobenzofuran-2-ilo, 2,3-dihidrobenzofuran-3-ilo, indolin-1-ilo, indolin-2-ilo, indolin-3-ilo, 2,3-dihidrobenzotien-2-ilo, decahidroquinolinilo, decahidroisoquinolinilo, octahidro-1H-indolilo, y octahidrobenzofuranilo. Los grupos heterociclilo son opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos que son independientemente oxo o tia. En ciertas modalidades, el heterociclilo bicíclico es un anillo heterociclilo monocíclico de 5 o 6 miembros fusionado al anillo fenilo, un cicloalquilo monocíclico de 5 o 6 miembros, un cicloalqueno monocíclico de 5 o 6 miembros, un heterociclilo monocíclico de 5 o 6 miembros, o un heteroarilo monocíclico de 5 o 6 miembros, en donde el heterociclilo bicíclico es opcionalmente sustituido por uno o dos grupos que son independientemente oxo o tia.
- "Halógeno" se refiere a un radical de un átomo de cloro, bromo, fluoro o yodo. El término "halógeno" contempla además los términos "halo" o "haluro".

Los términos "haloalquilo", "haloalquenilo" y "haloalcoxi" se refieren a un grupo alquilo, alquenilo o alcoxi, según sea el caso, que está sustituido con uno o más átomos de halógeno.

5 "Heteroátomo" se refiere a un átomo no carbono, donde boro, nitrógeno, oxígeno, azufre y fósforo son los heteroátomos preferidos en los compuestos de la descripción.

10 El término "heteroarilo," como se usa en la presente, se refiere a un heteroarilo monocíclico o un sistema anular bicíclico que contiene al menos un anillo heteroaromático. El heteroarilo monocíclico puede ser un anillo de 5 o 6 miembros. El anillo de 5 miembros consiste de dos enlaces dobles y uno, dos, tres o cuatro átomos de nitrógeno y opcionalmente un átomo de oxígeno o azufre. El anillo de 6 miembros consiste de tres enlaces dobles y uno, dos, tres o cuatro átomos de nitrógeno. El heteroarilo de 5 o 6 miembros se conecta a la porción molecular original a través de cualquier átomo de carbono o cualquier átomo de nitrógeno contenido dentro del heteroarilo. Los ejemplos representativos de heteroarilo monocíclico incluyen, pero sin limitarse a, furilo, imidazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, oxadiazolilo, oxazolilo, piridinilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, pirazolilo, pirrolilo, tetrazolilo, tiadiazolilo, tiazolilo, tienilo, triazolilo, y triazinilo. El heteroarilo bicíclico consiste en un heteroarilo monocíclico fusionado a un fenilo, un cicloalquilo monocíclico, un cicloalquenilo monocíclico, un heterociclilo monocíclico, o un heteroarilo monocíclico. La porción cicloalquilo o heterociclilo del grupo heteroarilo bicíclico fundidas se sustituye opcionalmente con uno o dos grupos que son independientemente oxo o tia. Cuando el heteroarilo bicíclico contiene un cicloalquilo, cicloalquenilo, o anillo heterociclilo fundido, después el grupo heteroarilo bicíclico se conecta a la porción molecular original a través de cualquier átomo de carbono o nitrógeno contenido dentro de la porción heteroarilo monocíclica del sistema de anillo bicíclico. Cuando el heteroarilo bicíclico es un heteroarilo monocíclico fusionado a un anillo fenilo, entonces el grupo heteroarilo bicíclico se conecta a la porción molecular original a través de cualquier átomo de carbono o átomo de nitrógeno dentro del sistema anular bicíclico. Los ejemplos representativos de heteroarilo bicíclico incluyen, pero sin limitarse a, bencimidazolilo, benzofuranilo, benzotienilo, benzoxadiazolilo, benzoxatiadiazolilo, benzotiazolilo, cinnolinilo, 5,6-dihidroquinolin-2-ilo, 5,6-dihidroisoquinolin-1-ilo, fupiridinilo, indazolilo, indolilo, isoquinolinilo, naftiridinilo, quinolinilo, purinilo, 5,6,7,8-tetrahydroquinolin-2-ilo, 5,6,7,8-tetrahydroquinolin-3-ilo, 5,6,7,8-tetrahydroquinolin-4-ilo, 5,6,7,8-tetrahydroisoquinolin-1-ilo, tienopiridinilo, 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[c][1,2,5]oxadiazolilo, y 6,7-dihydrobenzo[c][1,2,5]oxadiazol-4(5H)-onilo. En ciertas modalidades, el heteroarilo bicíclico fusionado es un anillo heteroarilo monocíclico de 5 o 6 miembros fusionado a un anillo fenilo, un cicloalquilo monocíclico de 5 o 6 miembros, un cicloalquenilo monocíclico de 5 o 6 miembros, un heterociclilo monocíclico de 5 o 6 miembros, o un heteroarilo monocíclico de 5 o 6 miembros, en donde los grupos cicloalquilo, cicloalquenilo, y heterociclilo fusionados son opcionalmente sustituidos con uno o dos grupos que son independientemente oxo o tia.

35 "Hidroxiálquilo" se refiere a un grupo alquilo ramificado o no ramificado que porta un grupo hidroxilo (-OH). Los ejemplos incluyen hidroximetil (-CH₂OH, a C₁hidroxialquil) y 1-hidroxietil (-CHOHCH₃, a C₂hidroxialquilo).

El término "nitro", como se usa en la presente, se refiere a un grupo -NO₂.

40 El término "oxo", como se usa en la presente, se refiere a un grupo =O.

El término "saturado", como se usa en la presente, se refiere a la estructura química mencionada no contiene ningún enlace múltiple carbono-carbono. Por ejemplo, un grupo cicloalquilo saturado como el definido en la presente incluye ciclohexilo, ciclopropilo, y similares.

45 El término "sustituido", como se usa en la presente, se refiere a que el radical hidrógeno de la porción designada se sustituye con el radical de un sustituyente especificado, siempre y cuando la sustitución resulte en un compuesto estable o químicamente factible. El término "sustituible", cuando se usa con referencia a un átomo designado, se refiere a que unido al átomo está un radical hidrógeno, que puede sustituirse con el radical de un sustituyente adecuado.

50 La frase "uno o más sustituyentes, como se usa en la presente, se refiere al número de sustituyentes que iguala desde uno al máximo número de sustituyentes posibles basado en el número de sitios de cohesión disponibles, siempre que las condiciones anteriores de estabilidad y viabilidad química se cumplan. A menos que se indique de cualquier otra forma, un grupo opcionalmente sustituido puede tener un sustituyente en cada posición sustituible del grupo, y los sustituyentes pueden ser el mismo o diferentes. Como se usa en la presente, el término "independientemente seleccionado" se refiere a que valores iguales o diferentes pueden ser seleccionados para múltiples casos de una variable dada en un único compuesto.

60 Los compuestos de la descripción pueden existir como estereoisómeros, en donde están presentes centros asimétricos o quirales. Los estereoisómeros se designan (R) o (S) dependiendo de la configuración de los sustituyentes alrededor del átomo de carbono quiral. Los términos (R) y (S) usados en la presente son configuraciones como las definidas en IUPAC 1974 Recommendations for Section E, Fundamental Stereochemistry, Pure Appl. Chem., (1976), 45: 13-30, incorporadas por este medio como referencia. La descripción contempla varios estereoisómeros y mezclas de estos, los cuales se incluyen específicamente dentro del alcance de la descripción. Los estereoisómeros incluyen enantiómeros,

diastereómeros, y mezclas de enantiómeros o diastereómeros. Los estereoisómeros individuales de los compuestos de la descripción se pueden preparar sintéticamente a partir de materiales de partida disponibles comercialmente que contienen centros asimétricos o quirales o por la preparación de mezclas racémicas seguido de métodos de resolución bien conocidos para aquellos con experiencia ordinaria en la técnica. Estos métodos de resolución están ejemplificados por (1) la unión de una mezcla de enantiómeros a un auxiliar quiral, la separación de la mezcla resultante de diastereómeros por recristalización o cromatografía y la liberación del producto ópticamente puro a partir del auxiliar o (2) la separación directa de la mezcla de enantiómeros ópticos en columnas de cromatografía quiral.

Además, las porciones descritas en la presente que existen en múltiples formas tautoméricas incluyen todas las formas abarcadas por una estructura tautomérica dada.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a que es aprobado o puede aprobarse por una agencia regulatoria del gobierno Federal o Estatal o enumerado en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para usar en animales, y más particularmente en humanos. Puede ser material que no es indeseable biológicamente o de alguna otra manera, es decir, el material puede administrarse a un individuo sin causar ningún efecto biológico indeseable o interactuar en una manera deletérea con cualquiera de los componentes de la composición en que está contenido.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" de un compuesto se refiere a una sal que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original. Tales sales incluyen, por ejemplo, sales de adición ácida y sales de adición básica.

"Sales de adición ácida" de acuerdo con la descripción, se forman con ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o se forman con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido trifluoacético, ácido propiónico, ácido hexanoico, ácido ciclopentanopropionico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido malónico, ácido succínico, ácido málico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 1,2-etanodisulfónico, ácido 2-hidroxietanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido 2-naftalenesulfónico, ácido 4-metilbicyclo-[2.2.2]oct-2-eno-1-carboxílico, ácido glucoheptónico, ácido 4,4'-metileno-bis-(3-hidroxi-2-eno-1-carboxílico), ácido 3-fenilpropiónico, ácido trimetilacético, ácido butilacético terciario, ácido lauril sulfúrico, ácido glucónico, ácido glutámico, ácido hidroxinaftoico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido mucónico, y similares.

"Sales de adición básicas" de acuerdo con la descripción se forman cuando un protón ácido presente en el compuesto original se sustituye por un ion de metal, por ejemplo, un ion de metales alcalinos, un ion alcalinotérreo, o un ion de aluminio; o coordinados con una base orgánica. Las bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, y similares. Las bases inorgánicas aceptables incluye hidróxido aluminico, hidróxido cálcico, hidróxido potásico, carbonato sódico, hidróxido sódico, y similares. Se debe entender que una referencia a una sal farmacéuticamente aceptable incluye las formas con adición del solvente o las formas cristalinas de ella, particularmente solvatos o polimorfos. Los solvatos contienen cantidades ya sea estequiométricas o no-estequiométricas de un solvente, y a menudo se forman durante el proceso de cristalización. Los hidratos se forman cuando el solvente es agua, o los alcoholatos se forman cuando el solvente es alcohol. Los polimorfos incluyen los diferentes arreglos de empaquetado del cristal de la misma composición elemental de un compuesto. Los polimorfos usualmente tienen diferentes patrones de difracción de rayos X, espectro de infrarrojo, puntos de fusión, densidad, dureza, forma del cristal, propiedades ópticas y eléctricas, estabilidad, y solubilidad. Varios factores tales como el solvente de recristalización, la velocidad de cristalización, y la temperatura de almacenado pueden causar que domine una sola forma cristalina.

El término "agonista" se refiere a un compuesto que se puede combinar con un receptor GPR124 para producir o aumentar la actividad celular. Un agonista puede ser un ligando que se une directamente al receptor. Alternativamente, un agonista se puede combinar con un receptor indirectamente por, por ejemplo, (a) la formación de un complejo con otra molécula que se une directamente al receptor, o (b) de otra forma resulta en la modificación de otro compuesto de forma que el otro compuesto se une directamente al receptor GPR124.

El término "activar", y variaciones de este, se refiere a cualquier aumento medible en la actividad celular.

El término "antagonista" se refiere a un compuesto que se puede combinar con un receptor GPR124 para reducir o inhibir la actividad celular. Un antagonista puede ser un ligando que se une directamente al receptor. Alternativamente, un antagonista se puede combinar con un receptor indirectamente por, por ejemplo, (a) la formación de un complejo con otra molécula que se une directamente al receptor, o (b) de otra forma resulta en la modificación de otro compuesto de forma que el otro compuesto se une directamente al receptor GPR124.

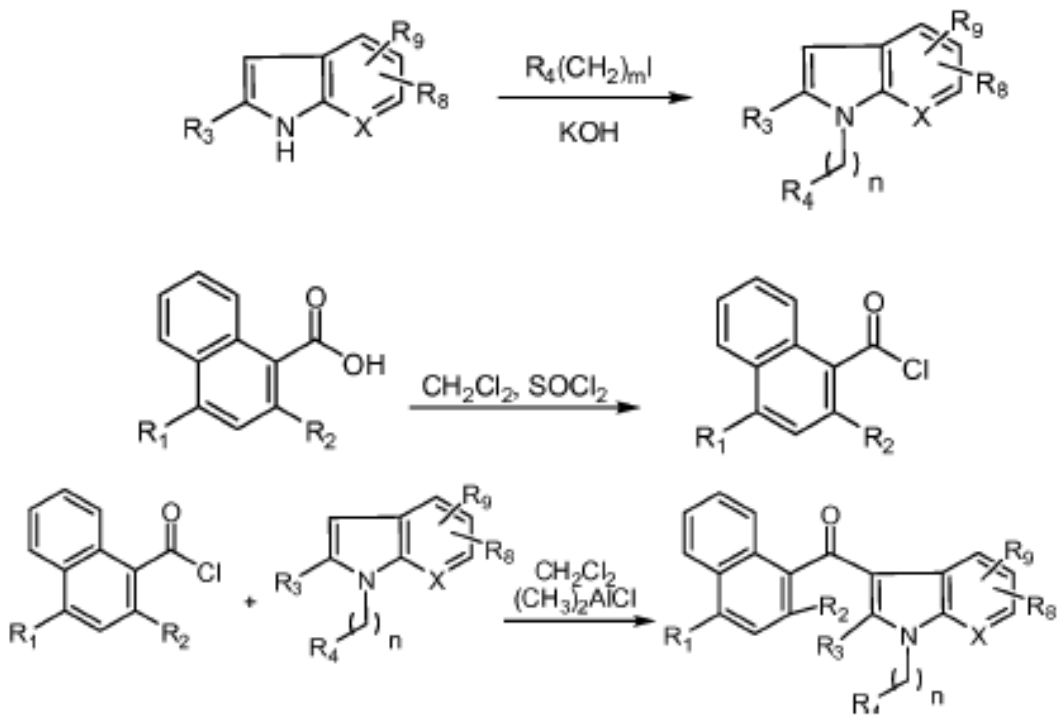
Métodos de preparación

Los compuestos de la descripción pueden prepararse mediante el uso de procedimientos y reacciones químicas conocidos. Los métodos representativos para sintetizar los compuestos de la descripción se presentan más abajo. Se entiende que la naturaleza de los sustituyentes requeridos para el compuesto objetivo deseado a menudo determina el método de síntesis preferido. Todos los grupos variables de estos métodos son como se describe en la descripción genérica si no se es definido específicamente más abajo.

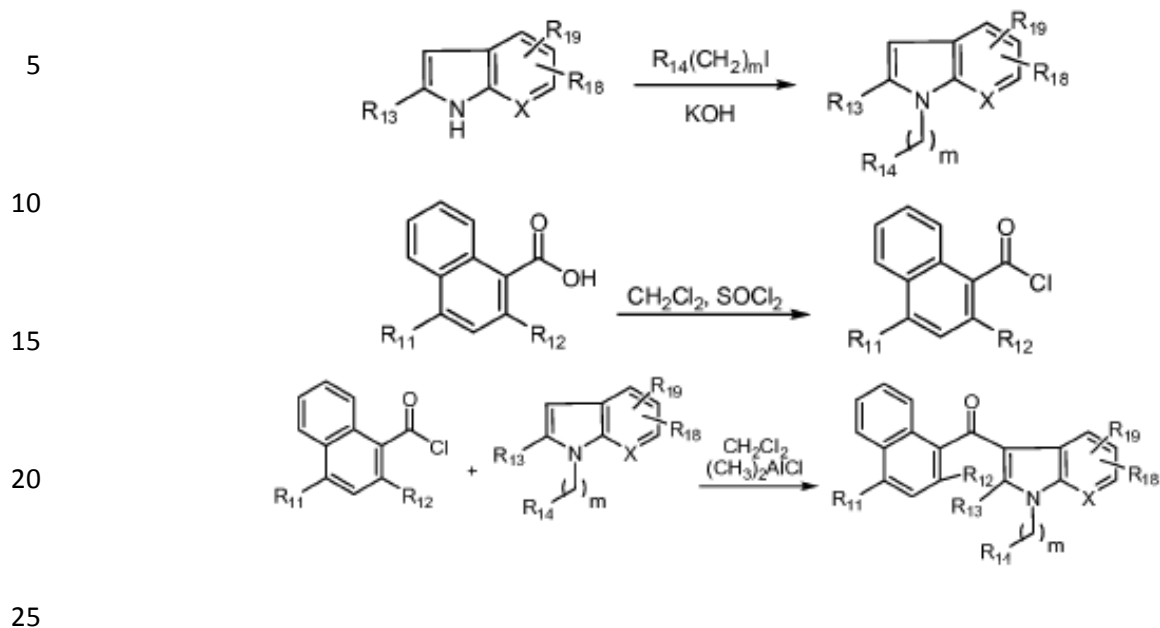
Procedimiento general

Los procedimientos de síntesis representativos para la preparación de los compuestos de la descripción se esbozan más abajo en los siguientes esquemas. A menos que se indique de cualquier otra forma, R₁-R₄, R₈, R₉, R₁₁-R₁₄, R₁₈, R₁₉, X, m y n llevan las definiciones expuestas anteriormente en relación con las fórmulas anteriores.

Esquema 1



Esquema 2

**EJEMPLOS**

30 La preparación y utilidad de los compuestos de la descripción se ilustra además por los siguientes ejemplos. Los ejemplos que caen dentro del alcance de la reivindicación 1 representan las modalidades de la invención; todos los otros ejemplos se ofrecen como referencia. En todos los casos, a menos que se especifique de cualquier otra forma, la cromatografía de columna se realiza usando una fase sólida de gel de sílice.

35 Los expertos en la técnica reconocerán que los materiales de partida y condiciones de reacción se pueden variar, la secuencia de las reacciones alteradas, y emplear etapas adicionales para producir los compuestos abarcados por la descripción, como se demuestra por los siguientes ejemplos. Se encuentran disponibles muchas referencias generales que proporcionan condiciones y esquemas de síntesis químicas comúnmente conocidos útiles para sintetizar los compuestos descritos (ver, por ejemplo, Smith and March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, Quinta Edición, Wiley-Interscience, 2001; o Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, Quinta Edición, Nueva York: Longman, 1978).

40

Los materiales de partida pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales o prepararse por métodos bien establecidos en la literatura conocidos por aquellos con experiencia en la técnica. Las reacciones se llevan a cabo en un solvente adecuado para los reactivos y materiales empleados y adecuados para las transformaciones que se efectúan. Se entenderá por aquellos con experiencia en la técnica de la síntesis orgánica que la funcionalidad presente en la molécula debe ser consistente con las transformaciones propuestas. Esto algunas veces requiere un juicio para modificar el orden de las etapas sintéticas o seleccionar un esquema de proceso particular sobre otro con el objetivo de obtener un compuesto deseable de la descripción.

45

50

En algunos casos, puede ser necesario la protección de algunas funcionalidades reactivas para alcanzar algunas de las transformaciones anteriores. En general, la necesidad de tales grupos protectores, así como las condiciones necesarias para unir y eliminar tales grupos, resultará evidente a aquellos con experiencia en la técnica de la síntesis orgánica. Un trabajo fiable que describe las muchas alternativas para los practicantes entrenados son J. F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Londres y Nueva York 1973, en T. W. Greene and P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", Tercera edición, Wiley, Nueva York 1999, en "The Peptides"; Volumen 3 (editores: E. Gross y J. Meienhofer), Academic Press, Londres y Nueva York 1981, en "Methoden der organischen Chemie", Houben-Weyl, 4ta edición, Vol. 15/1 Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, en H.-D. Jakubke y H. Jescheit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine", Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, y Basel 1982, y/o en Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide and Derivate", Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974. Los grupos de protección se pueden eliminar en una etapa subsiguiente conveniente por medio del uso de métodos conocidos en la técnica.

55

60

Los nombres químicos en este documento se generaron usando Chemdraw Ultra Versión 10.0 o Versión 12.0, disponible comercialmente de CambridgeSoft.

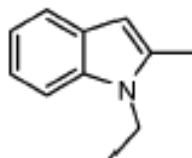
5 Materiales

DMSO (sulfóxido de dimetilo), tripsina-EDTA (0.25%), HEPES, NaHCO₃, KCl, CaCl₂, MgSO₄, glucosa, NaOH y tritón X-100 se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). NaCl, HCl (ácido clorhídrico), y EDTA se adquirieron de Fisher Scientific (Santa Clara, CA). NaH₂PO₄ se adquirió de JT Baker Analytical (Batavia, IL).

10 **Fármacos.** [³H]-CP55,940 ((-)-*cis*-3R-[2-hidroxi-4-(1,1-dimetil-[2,3,4,4-³H₄]-heptil)fenil]-*trans*-4R-3(hidroxiopropil)-1R-ciclohexanol) (0.54 mCi/ml), y CP55,940, Δ⁹-THC, se proporcionó por el National Institute of Drug Abuse Drug Supply Program (RTI, Research Triangle Park, NC). WIN55,212-2 se adquirió de Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). HU-210 se adquirió de Tocris Bioscience (Ellisville, MO). Pravadolina se obtuvo de Biomol. Research Laboratories, Inc (Filadelfia, PA). JWH-042, JWH-043, JWH-120, JWH-148, JWH-370, JWH-450 y JWH-451 se proporcionaron por Dr. John W. Huffman (Clemson University, Clemson, SC). Todos los fármacos se disolvieron en DMSO, a menos que se indique de cualquier otra forma y se almacenaron a -20°C hasta que se usaron para los experimentos.

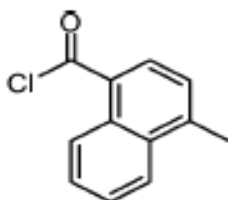
Ejemplo 1

20 Síntesis de JWH451



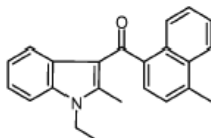
25 1-Etil-2-metilindolina

30 A una mezcla de 0.20 g (1.52 mmol) de 2-metilindol, 0.38 g (6.89 mmol) de KOH en DMSO (6 ml) se añadieron 0.24 ml (3.04 mmol) de yodoetano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente por 12 horas, se apagó por la adición de 15 ml de H₂O, y se extrajo con acetato de etilo (2 X 15 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua (10 ml), salmuera (20 ml), se secaron (MgSO₄), se filtraron y se concentraron *al vacío*. El producto crudo se purificó por cromatografía de columna (éter/éter de petróleo 0.5:9.5) para dar 0.20g (83 %) del producto deseado como un aceite rojo.



45 Cloruro de 4-Metil-1-naftoil

50 A una solución de 0.35 g (1.89 mmol) de ácido 4-metil-1-nafto en 3 ml de diclorometano seco bajo argón, se añadió 2.5 ml (34.3 mmol) de cloruro de tionilo. La solución se sometió a reflujo por 4 hrs y el solvente y el exceso de cloruro de tionilo se eliminaron por destilación al vacío para dar un aceite rojo, el cual se usó sin purificación adicional.

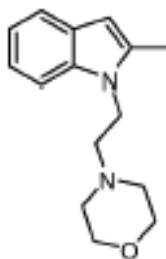


60 1-Etil-2-metil-3-(4-metil-1-naftoil)indol

A una solución de 0.20 g (1.26 mmol) de 1-etil-2-metilindol en 4 ml de diclorometano seco a 0 °C bajo argón, se añadió en forma de gotas 0.17 g (1.89 mmol) de cloruro de dimetilaluminio. La solución se agitó a esta temperatura por 45 min y después 0.39 g (1.88 mmol) de cloruro de 4-metil-1-naftoilo en 6 ml de diclorometano seco se añadió, y la solución se agitó a 0 °C por 4 hrs. La solución se apagó cuidadosamente por la adición de 1 M HCl y se extrajo con diclorometano (2 x 20 ml). El extracto orgánico combinado se lavó con una solución saturada de NaHCO₃, H₂O, salmuera, se secó (MgSO₄), se filtró y se concentró *al vacío*. El aceite se purificó por cromatografía (acetato de etilo/éter de petróleo 1:9) para proporcionar el compuesto deseado como un sólido naranja 0.16 g (40%), la recristalización a partir de éter de petróleo/éter proporcionó cristales blancos, mp 136-137 °C: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (t, *J*= 7.3 Hz, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.80 (s, 3H), 4.25 (q, *J*= 7.3 Hz, 2H), 6.92-7.05 (m, 1H), 7.17-7.29 (m, 2H), 7.32-7.39 (m, 2H), 7.46-7.53 (m, 2H), 7.54-7.61 (m, 1H), 8.11 (d, *J*= 8.3 Hz, 1H), 8.21 (d, *J*= 8.3 Hz, 1H); ¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 12.3, 14.75, 19.9, 38.0, 109.2, 115.1, 121.4, 121.9, 122.2, 124.3, 125.8, 126.1, 126.3, 126.5, 127.3, 130.5, 132.9, 135.6, 136.7, 138.9, 145.1, 193.6; GC/MS (EI) *m/z* (intensidad rel) 327 (100), 312 (80), 186 (60), 115 (20). Anal. Calcul. para C₂₃H₂₁NO: C, 84.37; H, 6.46; N, 4.28. Encontrado C₂₃H₂₁NO: C, 84.23; H, 6.48; N, 4.29.

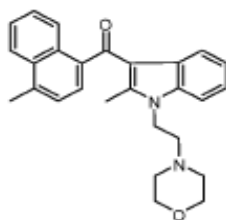
Ejemplo 2

Síntesis de TK18



N-(2-(N-morfolinoetil)-2-metilindol

Una solución de 2-metil indol (1.31 g, 10 mmol) en N, N-Dimetilformamida (10 ml) se añadió en forma de gotas a una suspensión de hidruro sódico (0.6 g, 60% dispersión en aceite mineral, 15 mmol) en N, N-Dimetilformamida (6 ml) y se agitó por 30 minutos. Una solución de 4-(2-metanosulfoniloxietil) morfolina (2.51 mmol, 12 mmol) se añadió a temperatura ambiente y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se diluyó con agua (50ml) y se extrajo con diclorometano (3x30 ml). El extracto orgánico combinado se secó con sulfato magnésico y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía rápida sobre gel de sílice y se eluyó con 2% v/v metanol/diclorometano. Rendimiento 1.05 g, (43%).

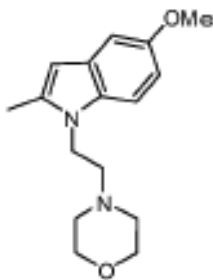


3-(4-Metilnaftoil N-(2-(N-morfolinoetil)-2-metil indol (TK18)

Una solución de N-(2-(N-morfolinoetil)-2-metilindol (600 mg, 2.45 mmol) en diclorometano (4ml) se añadió a 0 °C a una suspensión de cloruro de aluminio (1.0 gramo, 7.35 mmol) y cloruro de 4-metil naftoilo (1.5 g; 7.35 mmol) en diclorometano (25ml) y se agitó por 1h a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó toda la noche. Se añadió solución de cloruro de amonio saturado (25 ml), y la mezcla de reacción se extrajo con diclorometano (3x50 ml). El extracto orgánico combinado se secó sobre sulfato magnésico anhidro y se concentró a presión reducida. El producto se purificó por cromatografía rápida sobre gel de sílice y se eluyó con 0.5 % v/v metanol/diclorometano. La purificación final por recristalización a partir de 10% v/v acetato de etilo/hexano dio un rendimiento final de 0.20 g, (25%). ¹H NMR (d₆DMSO, δ) 8.20 (d, *J*= 8.4 Hz, 1 H), 8.11 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H), 7.01-7.59 (m, 8H), 4.28 (t, *J*= 7.2Hz, 2 H), 3.72 (t, *J*= 4.5 Hz, 4 H), 2.80 (s, 3H), 2.72(t, *J*= 7.2 Hz, 2 H), 2.51 (br.s. 8 H superposición DMSO. MS *m/z* 413.5 [M+H]⁺, 435.5 [M+Na]⁺.

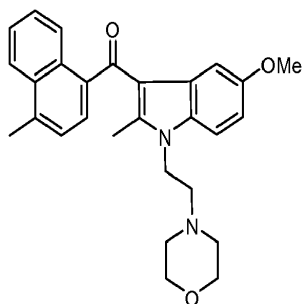
Ejemplo 3

Síntesis de CBX001



4-(2-(5-metoxi-2-metil-1H-indol-1-il)etil)morfolina

A una solución de 2-cloroetilmorfolina HCl (138 mg, 0.74 mmol) en 0.3ml DMSO se añadió KOH pulverizado (104 mg, 1.86 mmol), luego, después de 5 min, se añadió una solución de 5-metoxi-2-metilindol (138 mg, 0.74 mmol) en 0.2 ml DMSO y la reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se particionó entre H₂O y tolueno, y el extracto orgánico se lavó dos veces con H₂O, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 5% MeOH en CH₂Cl₂ para dar un rendimiento final de 120 mg (0.44 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.47 (s, 3H), 2.49-2.62 (m, 4H), 2.66 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.76 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.89 (s, 3H), 4.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 6.22 (s, 1H), 6.86 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 7.06 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 7.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 12.89, 41.12, 54.15, 55.91, 58.01, 66.98, 99.87, 102.01, 109.45, 110.32, 128.53, 131.82, 137.06, 154.05. MS *m/z* 275.3 [M+H]⁺.

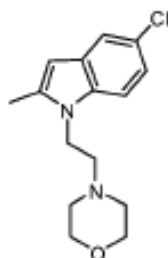


(5-metoxi-2-metil-1-(2-morfolinoetil)-1H-indol-3-il)(4-metilnaftalen-1-il)metanona (CBX001)

A una solución de cloruro de 4-metil-1-naftoilo (84 mg, 0.41 mmol) y 4-(2-(5-metoxi-2-metil-1H-indol-1-il)etil)morfolina (120 mg, 0.44 mmol) en 8 ml CH₂Cl₂ a - 70°C se añadió en forma de gotas dicloruro de etil aluminio (0.5 ml, 0.90 mmol, 1.8 M en tolueno). La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se particionó después entre acetato de etilo y H₂O fría, y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. El extracto orgánico combinado se lavó sucesivamente con H₂O, 10% K₂CO₃, y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 10% MeOH en CH₂Cl₂ para dar CBX001 (107 mg, 0.24 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.37 (s, 3H), 2.42-2.55 (m, 4H), 2.66 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.78 (s, 3H), 3.59 (s, 3H), 3.68 (t, *J* = 4.2 Hz, 4H), 4.17 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 6.84 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.20 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.41-7.50 (m, 2H), 7.55 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 13.14, 20.21, 41.74, 53.90, 54.49, 55.80, 57.81, 67.29, 103.91, 110.33, 112.67, 115.61, 124.69, 125.76, 126.30, 126.59, 126.91, 128.42, 130.86, 131.35, 133.25, 136.92, 139.50, 145.98, 156.28, 193.91. MS *m/z* 443.4 [M+H]⁺.

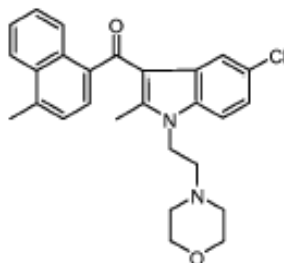
Ejemplo 4

Síntesis de CBX002



4-(2-(5-cloro-2-metil-1H-indol-1-il)etil)morfolina

A una solución de 2-cloroetilmorfolina HCl (100 mg, 0.60 mmol) en 0.3 ml DMSO se añadió KOH pulverizado (102 mg, 1.81 mmol), luego, después de 10 min, se añadió una solución de 5-cloro-2-metilindol (134 mg, 0.72 mmol) en 0.2 ml DMSO y la reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Se añadió adicionalmente 2-cloroetilmorfolina (22 mg, 0.12 mmol) y KOH (17 mg, 0.3 mmol) y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se particionó entre H₂O y tolueno, y el extracto orgánico se lavó dos veces con H₂O, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 5% MeOH en CH₂Cl₂ para dar un rendimiento final de 154 mg (0.55 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.47 (s, 3H), 2.48-2.57 (m, 4H), 2.63 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.73 (t, *J* = 4.4 Hz, 4H), 4.16 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.20 (s, 1H), 7.11 (dd, *J* = 8.6 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.19 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.50 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 12.88, 41.23, 54.13, 57.86, 66.95, 99.88, 109.78, 119.15, 120.64, 124.97, 129.18, 134.99, 138.03. MS *m/z* 279.3 [M+H]⁺.

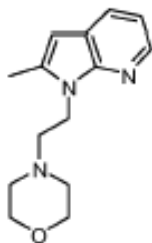


(5-cloro-2-metil-1-(2-morfolinoetil)-1H-indol-3-il)(4-metilnaftalen-1-il)metanona (CBX002)

A una solución de cloruro de 4-metil-1-naftoilo (106 mg, 0.52 mmol) y 4-(2-(5-cloro-2-metil-1H-indol-1-il)etil)morfolina (154 mg, 0.55 mmol) en 8 ml CH₂Cl₂ a -70°C se añadió en forma de gotas dicloruro de etil aluminio (0.63 ml, 1.14 mmol, 1.8 M en tolueno). La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se particionó después entre acetato de etilo y H₂O fría, y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. El extracto orgánico combinado se lavó sucesivamente con H₂O, 10% K₂CO₃, y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 10% MeOH en CH₂Cl₂ para dar CBX002 (141 mg, 0.32 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.32 (s, 3H), 2.47 (t, *J* = 4.3 Hz, 4H), 2.66 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.79 (s, 3H), 3.68 (t, *J* = 4.4 Hz, 4H), 4.19 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.14-7.21 (m, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.43-7.52 (m, 2H), 7.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 12.69, 19.92, 41.47, 54.08, 57.34, 66.87, 110.25, 115.09, 121.16, 122.69, 124.45, 125.75, 125.99, 126.06, 126.23, 126.66, 127.98, 128.34, 130.46, 132.95, 134.43, 137.27, 138.21, 146.37, 193.24. MS *m/z* 447.5 [M + H]⁺.

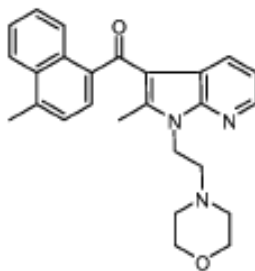
Ejemplo 5

Síntesis de CBX003



4-(2-(2-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-1-il)etil)morfolina

A una solución de 2-cloroetilmorfolina HCl (169 mg, 0.91 mmol) en 0.3 ml DMSO se añadió KOH pulverizado (128 mg, 2.27 mmol), luego, después de 10 min, se añadió una solución de 2-metil-7-azaindol (100 mg, 0.76 mmol) en 0.2 ml DMSO y la reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se particionó entre H₂O y tolueno, y el extracto orgánico se lavó dos veces con H₂O, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 10% MeOH en CH₂Cl₂ para dar un rendimiento final de 144 mg (0.59 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.46 (s, 3H), 2.47-2.58 (m, 4H), 2.67 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.66 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 4.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.15 (s, 1H), 6.87-7.09 (m, 1H), 7.73 (dd, *J* = 7.7 Hz, 1.3 Hz, 1H), 8.19 (dd, *J* = 4.6 Hz, 1.3 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 13.51, 39.75, 54.37, 58.49, 67.18, 98.40, 116.05, 121.09, 127.47, 137.78, 141.71, 148.56. MS *m/z* 246.1 [M+H]⁺.

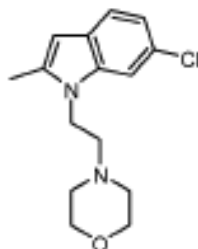


(2-metil-1-(2-morfolinoetil)-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-3-il)(4-metilnaftalen-1-il)metanona (CBX003)

A una solución de cloruro de 4-metil-1-naftoilo (112 mg, 0.55 mmol) y 4-(2-(2-metil-1H-pirrolo[2,3-b]piridin-1-il)etil)morfolina (143 mg, 0.59 mmol) en 2.5 ml CH₂Cl₂ a -70°C se añadió en forma de gotas dicloruro de etil aluminio (0.67 ml, 1.21 mmol, 1.8 M en tolueno). La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se particionó después entre acetato de etilo y H₂O fría, y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. El extracto orgánico combinado se lavó sucesivamente con H₂O, 10% K₂CO₃, y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 5% MeOH en CH₂Cl₂, después se tomó en CHCl₃ y se lavó con una solución saturada de Na₂CO₃, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró, y se concentró *al vacío* para dar CBX003 (32 mg, 0.077 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.46-2.58 (m, 4H), 2.60 (s, 3H), 2.78 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.81 (s, 3H), 3.69 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 4.47 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 6.91-7.02 (m, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.43 (dd, *J* = 7.9 Hz, 1.4 Hz, 1H), 7.45-7.52 (m, 2H), 7.58 (td, *J* = 7.6 Hz, 1.1 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.26 (dd, *J* = 4.7 Hz, 1.5 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 12.83, 19.93, 39.55, 53.99, 57.68, 66.93, 113.29, 118.10, 119.85, 124.42, 125.76, 125.78, 126.06, 126.24, 126.66, 129.10, 130.36, 132.90, 137.15, 138.40, 143.02, 146.42, 147.59, 193.21. MS *m/z* 415.5 [M+H]⁺.

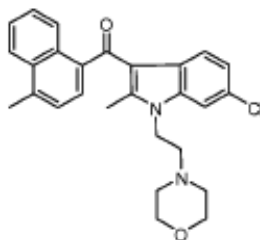
Ejemplo 6

Síntesis de CBX004



4-(2-(6-cloro-2-metil-1H-indol-1-il)etil)morfolina

A una solución de 2-cloroetil morfolina HCl (134 mg, 0.72 mmol) en 0.3 ml DMSO se añadió KOH pulverizado (102 mg, 1.81 mmol), luego, después de 10 min, se añadió una solución de 6-cloro-2-metilindol (100 mg, 0.60 mmol) en 0.2 ml DMSO y la reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Se añadió adicionalmente 2-cloroetil morfolina (22 mg, 0.12 mmol) y KOH (17 mg, 0.3 mmol) y se agitó toda la noche. La mezcla de reacción se particionó entre H₂O y tolueno, y el extracto orgánico se lavó dos veces con H₂O, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 50% acetato de etilo en hexano para dar un rendimiento final de 149 mg (0.54 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.44 (s, 3H), 2.49 (t, *J* = 4.4 Hz, 4H), 2.62 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.73 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 4.11 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.23 (s, 1H), 7.06 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1.7 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 12.79, 41.18, 54.11, 57.83, 67.5, 100.30, 108.95, 119.90, 120.53, 126.40, 126.70, 137.06, 137.37. MS *m/z* 279.3 [M+H]⁺.



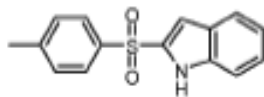
(6-cloro-2-metil-1-(2-morfolinoetil)-1H-indol-3-il)(4-metilnaftalen-1-il)metanona (CBX004)

A una solución de 4-(2-(6-cloro-2-metil-1H-indol-1-il)etil)morfolina (48 mg, 0.17 mmol) en 0.5 ml CH₂Cl₂ a 0°C se añadió en forma de gotas dicloruro de etil aluminio (0.14 ml, 0.26 mmol, 1.8 M en tolueno). La mezcla de reacción se agitó a 0°C por 30 min, después se añadió una solución de cloruro de 4-metil-1-naftoilo (43 mg, 0.21 mmol) en 0.5 ml CH₂Cl₂ y se agitó a 0°C por 1 h, después se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente toda la noche. La reacción se agitó a temperatura ambiente por 3 d. La mezcla de reacción se vertió después en 1 M HCl que se enfrió en hielo y se extrajo tres veces con CH₂Cl₂. El extracto orgánico combinado se lavó tres veces con una solución saturada de bicarbonato sódico, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 5% MeOH en CH₂Cl₂ para dar CBX004 (23 mg, 0.052 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.46 (s, 3H), 2.48-2.59 (m, 4H), 2.71 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.80 (s, 3H), 3.71 (t, *J* = 4.6 Hz, 4H), 4.20 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.02 (dd, *J* = 8.6 Hz, 1.8 Hz, 1H), 7.25 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.44-7.53 (m, 2H), 7.58 (td, *J* = 7.6 Hz, 1.1 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.18 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 12.62, 19.93, 41.40, 54.10, 57.36, 66.88, 109.40, 115.34, 122.34, 122.49, 124.40, 125.72, 125.76, 126.03, 126.08, 126.21, 126.66, 128.25, 130.43, 132.91, 136.51, 137.22, 138.35, 146.00, 193.43. MS *m/z* 447.6 [M+H]⁺.

Ejemplo 7

Síntesis de CBX005

5

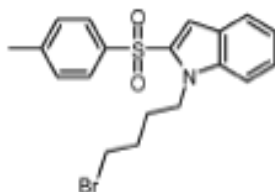


10

2-tosil-1H-indol

15 A una solución de indol (586 mg, 5.0 mmol) en 10 ml THF a -70°C se añadió *n*-butil litio (3.7 ml, 5.1 mmol, 1.39 M en hexano) en forma de gotas durante 35 min manteniendo la temperatura por debajo de -65°C . La reacción se agitó a -70°C por 30 min, después una solución saturada de CO_2 en 20 ml THF se añadió mediante una cánula, se eliminó el baño de hielo seco y la mezcla de reacción se burbujeó con CO_2 cuando la reacción se calentó hasta la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró *al vacío*, después se tomó en 10 ml THF y se enfrió hasta -70°C . A la solución se añadió *tert*-butil litio (3 ml, 5.17 mmol, 1.7 M en pentano) en forma de gotas y se agitó a -70°C 1 h, después la mezcla de reacción se añadió mediante una cánula a una solución de fluoruro de *p*-toluenosulfonilo (1.74 g, 10 mmol) en 10 ml THF y se agitó a -70°C 2 h. La reacción se apagó con 1 ml H_2O , se vertió en una solución de cloruro de amonio (pH 5), y se extrajo dos veces con CHCl_3 . El extracto orgánico combinado se lavó sucesivamente con una solución saturada de bicarbonato sódico y salmuera, se secó sobre MgSO_4 , se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 2 a 20% acetato de etilo en hexanos para dar un rendimiento final de 199 mg (0.73 mmol). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 2.41 (s, 3H), 7.16-7.26 (m, 2H), 7.27-7.33 (m, 2H), 7.35 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.93 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 9.31 (s, 1H). ^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 21.61, 108.87, 112.39, 121.52, 122.62, 125.95, 127.08, 127.35, 130.02, 134.45, 137.16, 138.53, 144.57.

30

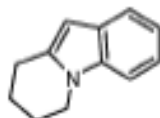


35

1-(4-bromobutil)-2-tosil-1H-indol

40 A una solución de 2-tosil-1H-indol (199mg, 0.73 mmol) en 3 ml DMF se añadió 1,4-dibromobutano (263 μl , 2.20 mmol) en 1 ml DMF y KOH (41 mg, 0.73 mmol), y la reacción se agitó a temperatura ambiente 1.75 h. La mezcla de reacción se particionó después entre agua y éter, y la capa acuosa se extrajo dos veces con éter. El extracto orgánico combinado se lavó con agua, se secó sobre MgSO_4 , se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 15% acetato de etilo en hexanos para dar un rendimiento final de 178 mg (0.44 mmol). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 1.66-1.81 (m, 2H), 1.81-1.94 (m, 2H), 2.44 (s, 3H), 3.34 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 4.35 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 7.21 (t, $J = 7.0$ Hz, 1H), 7.30-7.44 (m, 5H), 7.73 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H). ^{13}C NMR (500 MHz, CDCl_3 , δ): 22.07, 29.04, 30.26, 33.26, 44.41, 111.08, 111.49, 121.67, 123.42, 125.83, 126.19, 128.09, 130.44, 135.22, 138.78, 139.12, 145.08. MS m/z 406.3 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

50

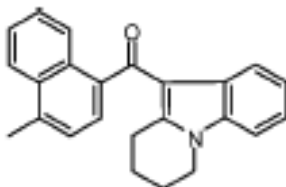


55

6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-a]indol

60 A una solución de reflujo de 1-(4-bromobutil)-2-tosil-1H-indol (178 mg, 0.44 mmol) en 9.5 ml tolueno se le añadió en forma de gotas durante 5 min una mezcla de hidruro de tributilestaño (285 μl , 1.06 mmol) y 2,2'-azobisisobutironitrilo (14 mg, 0.088 mmol) en 22.5 ml tolueno. La mezcla de reacción se sometió a reflujo 2 h, después se concentró *al vacío*. Al producto crudo se añadió 125 μl de H_2O , 3 ml de acetato de etilo, y 150 mg de KF y se agitó a temperatura ambiente toda la noche. Se añadió carbonato potásico y la mezcla se filtró y se concentró *al vacío*. El proceso se repitió con otros 125 μl de H_2O , 3 ml de acetato de etilo, y 150 mg de KF y se agitó a temperatura ambiente 2 h. Se añadió carbonato

potásico y la mezcla se filtró y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 10% acetato de etilo en hexanos para dar un rendimiento final de 58 mg (0.34 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 1.89-2.05 (m, 2H), 2.10-2.24 (m, 2H), 3.06 (t, *J*= 6.1 Hz, 2H), 4.11 (t, *J*= 6.1 Hz, 2H), 6.29 (s, 1H), 7.18 (t, *J*= 7.1 Hz, 1H), 7.23 (t, *J*= 7.4 Hz, 1H), 7.35 (d, *J*= 7.9 Hz, 1H), 7.63 (d, *J*= 7.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 21.76, 23.93, 24.75, 42.78, 97.98, 109.03, 120.06, 120.58, 128.71, 136.76, 137.63. MS *m/z* 172 [M + H]⁺.

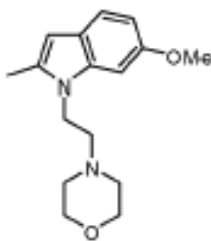


(4-metilnaftanen-1-il)(6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-a]indol-10-il)metanona
(CBX005)

A una solución de cloruro de 4-metil-1-naftoilo (37 mg, 0.18 mmol) y 6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-a]indol (30 mg, 0.18 mmol) en 1 ml CH₂Cl₂ a -70°C se añadió en forma de gotas dicloruro de etil aluminio (0.22 ml, 0.40 mmol, 1.8 M en tolueno). La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente y se agitó por 3 d, después se enfrió hasta -70°C y se añadió cloruro de 4-metil-1-naftoilo (4 mg, 0.020 mmol) y dicloruro de etil aluminio (20 µl, 0.036 mmol) y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente y se agitó 6 h. La mezcla de reacción se enfrió nuevamente hasta -70°C y se añadió cloruro de 4-metil-1-naftoilo (4 mg, 0.020 mmol) y dicloruro de etil aluminio (20 µl, 0.036 mmol) y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente toda la noche. Se enfrió nuevamente hasta -70°C y se añadió cloruro de 4-metil-1-naftoilo (8 mg, 0.040 mmol), dicloruro de etil aluminio (40 µl, 0.072 mmol), y 1 ml de CH₂Cl₂ y se dejó calentar hasta la temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se particionó después entre acetato de etilo y H₂O fría, y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. El extracto orgánico combinado se lavó sucesivamente con H₂O, 10% K₂CO₃, y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 25% acetato de etilo en hexanos para dar CBX005 (22 mg, 0.065 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 1.80-1.95 (m, 2H), 2.05-2.33 (m, 2H), 2.82 (s, 3H), 2.97 (t, *J*=6.3 Hz, 2H), 4.13 (t, *J*= 6.2 Hz, 2H), 7.09 (t, *J*= 7.6 Hz, 1H), 7.22 (t, *J*=7.6 Hz, 1H), 7.30-7.37 (m, 2H), 7.40 (d, *J*= 7.1 Hz, 1H), 7.43-7.52 (m, 2H), 7.58 (t, *J*= 7.6 Hz, 1H), 8.08-8.19 (m, 2H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 19.87, 20.03, 22.31, 25.20, 42.65, 108.94, 113.75, 121.25, 122.03, 122.44, 124.31, 124.99, 125.93, 126.05, 126.24, 126.41, 126.97, 130.34, 132.89, 136.27, 139.26, 147.09, 193.08. MS *m/z* 340.4 [M + H]⁺.

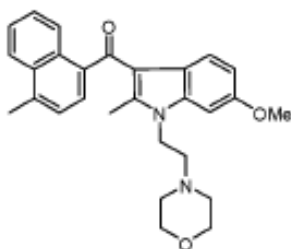
Ejemplo 8

Síntesis de CBX006



4-(2-(6-metoxi-2-metil-1H-indol-1-il)etil)morfolina

A una solución de 2-cloroetilmorfolina HCl (138 mg, 0.74 mmol) en 0.3 ml DMSO se añadió KOH pulverizado (104 mg, 1.86 mmol), luego, después de 10 min, se añadió una solución de 6-metoxi-2-metilindol (138 mg, 0.74 mmol) en 0.2 ml DMSO y la reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se particionó entre H₂O y tolueno, y el extracto orgánico se lavó dos veces con H₂O, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 10% MeOH en CH₂Cl₂ para dar un rendimiento final de 17 mg (0.062 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.45 (s, 3H), 2.50-2.63 (m, 4H), 2.67 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H), 3.71-3.83 (m, 4H), 3.90 (s, 3H), 4.18 (t, *J*= 7.4 Hz, 2H), 6.19 (s, 1H), 6.78 (dd, *J*= 8.5 Hz, 2.2 Hz, 1H), 6.81 (s, 1H), 7.42 (d, *J*= 8.5 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 12.77, 40.98, 54.13, 55.92, 57.74, 66.94, 93.50, 99.82, 108.35, 120.26, 122.51, 135.31, 137.25, 155.53. MS *m/z* 275.3 [M + H]⁺.

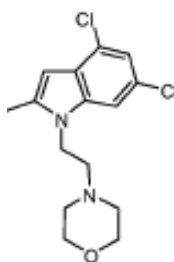


(6-metoxi-2-metil-1-(2-morfolinoetil)-1H-indol-3-il)(4-metilnaftalen-1-il)metanona (CBX006)

A una solución de cloruro de 4-metil-1-naftoilo (11 mg, 0.055 mmol) y 4-(2-(6-metoxi-2-metil-1H-indol-1-il)etil)morfolina (15 mg, 0.055 mmol) en 1 ml CH₂Cl₂ a -70°C se añadió en forma de gotas dicloruro de etil aluminio (70 µl, 0.12 mmol, 1.8 M en tolueno). La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se particionó después entre acetato de etilo y H₂O fría, y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. El extracto orgánico combinado se lavó sucesivamente con H₂O, 10% K₂CO₃, y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 10% MeOH en CH₂Cl₂ para dar CBX006 (4 mg, 0.009 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.46 (s, 3H), 2.50-2.63 (m, 4H), 2.72 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.81 (s, 3H), 3.73 (t, *J* = 4.5 Hz, 4H), 3.87 (s, 3H), 4.23 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.72 (dd, *J* = 8.7 Hz, 2.2 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.44-7.54 (m, 2H), 7.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H). MS *m/z* 443.4 [M + H]⁺.

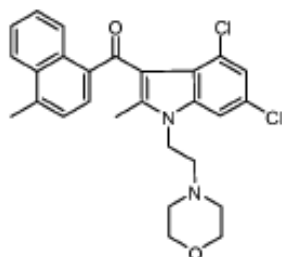
Ejemplo 9

Síntesis de CBX007



4-(2-(4,6-dicloro-2-metil-1H-indol-1-il)etil)morfolina

A una solución de 4,6-dicloro-2-metilindol (75 mg, 0.37 mmol) en 0.5 ml DMSO se añadió KOH pulverizado (95 mg, 1.69 mmol), después 2-cloroetilmorfolina HCl (140 mg, 0.75 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se particionó entre H₂O y tolueno, y el extracto orgánico se lavó dos veces con H₂O, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 10% MeOH en CH₂Cl₂ para dar un rendimiento final de 91 mg (0.29 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.42-2.55 (m, 4H), 2.44 (s, 3H), 2.60 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.65-3.79 (m, 4H), 4.08 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 6.31 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.16 (s, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 12.84, 41.59, 54.10, 57.79, 66.91, 98.99, 107.84, 119.47, 125.23, 125.51, 126.17, 137.22, 138.20. MS *m/z* 313.5 [M + H]⁺.

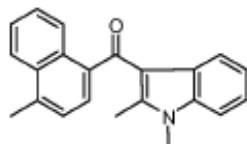


(4,6-dicloro-2-metil-1-(2-morfolinoetil)-1H-indol-3-il)(4-metilnaftalen-1-il)metanona (CBX007)

15 A una solución de cloruro de 4-metil-1-naftoilo (29 mg, 0.14 mmol) y 4-(2-(4,6-dicloro-2-metil-1H-indol-1-il)etil)morfolina (44 mg, 0.14 mmol) en 1 ml CH₂Cl₂ a -70°C se añadió en forma de gotas dicloruro de etil aluminio (0.17 ml, 0.31 mmol, 1.8 M en tolueno). La mezcla de reacción se dejó calentar lentamente hasta la temperatura ambiente toda la noche. La mezcla de reacción se particionó después entre acetato de etilo y H₂O fría, y la capa acuosa se extrajo dos veces con acetato de etilo. El extracto orgánico combinado se lavó sucesivamente con H₂O, 10% K₂CO₃, y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y se concentró *al vacío*. El producto crudo se purificó a través de cromatografía en gel de sílice mediante el uso de un gradiente de 0 a 3% MeOH en CH₂Cl₂ para dar CBX007 (50 mg, 0.10 mmol). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 2.46 (s, 3H), 2.55 (t, *J*=4.4 Hz, 4H), 2.74 (t, *J*=6.9 Hz, 2H), 2.77 (s, 3H), 3.74 (t, *J*=4.5 Hz, 4H), 4.25 (t, *J*=6.9 Hz, 2H), 7.10 (d, *J*=1.7 Hz, 1H), 7.21 (d, *J*=7.4 Hz, 1H), 7.31 (d, *J*=1.6 Hz, 1H), 7.42 (d, *J*=7.3 Hz, 1H), 7.60-7.74 (m, 2H), 8.10 (d, *J*=7.7 Hz, 1H), 8.94 (d, *J*=8.2 Hz, 1H). ¹³C NMR (500 MHz, CDCl₃, δ): 12.09, 20.60, 42.21, 54.54, 57.91, 67.28, 108.62, 116.44, 122.84, 123.78, 124.66, 125.62, 126.70, 126.93, 127.12, 128.03, 128.18, 131.09, 131.49, 133.51, 137.34, 137.57, 140.30, 142.76, 194.75. MS *m/z* 481.6 [M + H]⁺.

Ejemplo 10

30 Síntesis de JWH-450



(1,2-dimetil-1H-indol-3-il)(4-metilnaftalen-1-il)metanona (JWH-450)

40 Este compuesto se preparó de acuerdo con el procedimiento que se esboza en el Ejemplo 1.

Ejemplo 11

45 Cultivo Celular

50 Todas las líneas celulares se cultivaron a 5% CO₂ y 37°C en medio de crecimiento de cultivo celular que consiste en DMEM+GlutaMAX™-I (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con HEPES (10 mM), NaHCO₃ (5 mM), penicilina (100U/ml)/estreptomicina (00µg/ml) y 10% FBS (que se inactivó con calor a 65°C por 30 min) en placas Falcon de 10 cm (BD Biosciences, San Jose, CA). El mantenimiento de las células consistió de cambios del medio aproximadamente cada 3 días y cuando las células se hicieron 90% confluentes, las células se trataron con tripsina (1X 0.25% tripsina-EDTA, Gibco, Carlsbad, CA), se resuspendieron en el medio de crecimiento y se colocaron nuevamente en placas de cultivo celular a una dilución 1:10.

55 Generación de líneas celulares HEK293 estables.

Las líneas celulares HEK293 estables que expresan CB₁ y CB₂ se generaron mediante el uso de plásmidos que contienen las regiones codificantes completas de ratón CB₁ y CB₂.

60 Los fragmentos se amplificaron del ARN total de las líneas celulares por reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa (RT-PCR). La secuencia se confirmó y el fragmento se clonó en el sitio *EcoRI* del vector de expresión pIRES2-eGFP. Las células se cultivaron hasta aproximadamente un 80% de confluencia en placas de cultivo celular de 10 cm, transfectadas con el vector pIRES-eGFP de ADNc que contiene el receptor CB1 o CB2 *murino*

mediante el uso del reactivo LipofectAMINE™ 2000 en el medio libre de suero Opti-MEM 1 de acuerdo con la descripción del fabricante. Las células se sometieron a clasificación por FACS 48 h después de la transfección y las células individuales se clasificaron en base a la expresión de dsRed en placas de 96 pocillos. De los clones positivos que expresan dsRed, se validaron 3 para la expresión de proteínas CB₁ y CB₂ mediante análisis de unión de radioligando (los métodos se discuten más abajo).

Ejemplo 12

Unión de Radioligando

Preparaciones de Proteínas de Membrana para Unión de Radioligando.

Las células se cultivaron hasta un 90% de confluencia, se enjuagaron dos veces con PBS 1X y se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior. Para preparar fracciones de membranas celulares del crudo, las placas se sacaron de -80°C y se descongelaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Una vez que se descongelaron, las células se lisaron con tampón de homogeneización que se enfrió con hielo (50mM Tris, 1mM EDTA, 3mM MgCl₂) y se rasparon suavemente de la placa. Los lisados de células totales se recolectaron de 3-5 placas en 3ml de tampón de homogeneización que se enfrió con hielo. Las células se homogeneizaron a 6,500rpm (PRO Scientific, Oxford, CT) dos veces por 10 seg y se centrifugaron a 11,500 rpm durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes se desecharon y los sedimentos celulares se resuspendieron en tampón de homogeneización y se trituraron 10 veces en tampón de homogeneización que se enfrió con hielo. Los homogenados de membrana celulares crudos se almacenaron a -80°C hasta su uso posterior. En el día de los experimentos, los homogenados congelados se descongelaron a temperatura ambiente, se trituraron suavemente 10 veces y posteriormente se homogeneizaron en un triturador de tejidos de vidrio de 7 ml de tipo dounce (Wheaton Science Products, Millville, NJ) por 5 golpes mientras se mantenía en hielo. El ensayo de proteína DC (BioRad, Hercules, CA) se usó según las instrucciones del fabricante para determinar las concentraciones de proteínas y se usó BSA en tampón de homogeneización (ver métodos de ensayo de unión de radioligando) para los estándares de proteína.

Ensayo de Unión de Radioligando

Debido a la naturaleza lipofílica de los compuestos que se ensayaron, todos los experimentos se realizaron en tubos de ensayo de vidrio silanizados (Alltech, Deerfield, IL) con puntas de pipeta silanizadas (VWR Scientific, Brisbane, CA) para reducir la pérdida de ligandos. Mientras se mantenían en hielo, se añadieron los componentes de reacción a los tubos de ensayo en el siguiente orden: 50 µl de ligando no-radiomarcado, 50 µl de radioligando y 100 µl de proteína (50 µg) para un volumen de reacción total de 200 µl. Las reacciones se iniciaron con la adición de proteína. Las reacciones no contienen más de 0.1% DMSO. Sin embargo, debido a las limitaciones de solubilidad de algunos de los compuestos que se ensayaron, se utilizaron concentraciones de DMSO mayores pero controladas en cada experimento con el control de DMSO apropiado. Todos los componentes se prepararon en tampón de unión (50mM Tris-base, 1mM EDTA, 3mM MgCl₂, 1 mg/ml BSA, pH=7.4) Una vez que se iniciaron las reacciones, los tubos se cubrieron con parafina y se incubaron en un baño de agua que se mantuvo a 30°C con agitación suave por 1 hora. Las reacciones se detuvieron mediante la adición de tampón de unión que se enfrió con hielo bajo filtración rápida mediante el uso de un cosechador Brandel (Brandel, Gaithersburg, MD) y se recolectaron en tiras de filtros Whatman GFB (Brandel, Gaithersburg MD) que se incubaron previamente en tampón de unión por 1 h a temperatura ambiente. Los filtros se transfirieron inmediatamente a viales de vidrio de centelleo de 7 ml (VWR Scientific, Brisbane, CA) mediante el uso del Depósito Manual Brandel (Brandel, Gaithersburg, MD) y se añadieron 5ml de líquido de centelleo (National Diagnostics, Atlanta GA; Ecoscint XR) a cada vial de centelleo. Las muestras se agitaron rápidamente durante 10 segundos, seguido por 3 horas de incubación a temperatura ambiente antes de obtener cuentas radiactivas en el contador de centelleo (PerkinElmer, Boston MA). Para las curvas de saturación del radioligando, las concentraciones de [³H]-CP95440 variaron mientras se usó una dosis de saturación constante de un ligando no-radiomarcado de alta afinidad para determinar la unión no específica. En experimentos de competición del radioligando, [³H]-CP95440 se mantuvo a la calculada K_d, ~1 nM, y las concentraciones de ligando competitivo variaron. Para los ensayos de unión de competencia, la unión específica se calculó mediante la resta de las dpm (desintegraciones por minuto, dpm) promedio si los puntos no específicos de los valores individuales de dpm para cada punto de unión total y que se expresan ya sea como fmol/mg para los análisis de saturación o como un por ciento de la unión total de radioligando en las curvas de competición. Todos los experimentos se realizaron en duplicado o triplicado, a un mínimo de tres experimentos diferentes.

Ejemplo 13

Ensayo de viabilidad celular

Las células se sembraron en medio que se suplementó con 10% de suero en placas de 96 pozos (10⁴ células *por* pozo; 0.1 ml *por* pozo). Una vez que alcanzaron ~un 70% de confluencia, se enjuagaron con PBS y se mantuvieron durante

24 horas adicionales en medio suplementado con 1% de suero, tiempo al que se añadieron los medicamentos o vehículos (DMSO, 0.1%, que se preparó en medio libre de suero 10 µl) directamente a cada pozo. Después de 3 días, la viabilidad celular se evaluó mediante el uso del Reactivo de Proliferación Celular WST-1 (Roche, Indianapolis, IN). Brevemente, el reactivo WST-1(10 µl) se añadió a cada pozo por 3 horas a 37°C con 5% de CO₂ y los productos WST-1 se leyeron a 450 nm mediante el uso de un Packard SpectraCount™.

Ejemplo 14

RT-PCR Cuantitativo

El ARN se extrajo mediante el uso del estuche PerfectPure RNA Cultured Cell Kit (5 prima). Los ensayos de PCR cuantitativos a tiempo-real se realizaron mediante el uso del estuche Brilliant® II QRT-PCR Master Mix, 1-Step kit (Stratagene) y las sondas se obtuvieron del Universal Probe Library Set (Roche AppliedScience). Los siguientes iniciadores sentido/antisentido y sondas se utilizaron: CB₁ humana: 5'-TGTCTGTCTGCACACCTTGAA-3' y 5'-CATCTGCACATGACAGAGAGG-3', sonda #40; CB₂ humana: 5'-TGGGAGAGGACAGAAAACAACT-3' y 5'-GAGCTTGTCTAGAAGGCTTTGG-3', sonda #24; GPR124 humana 5'-GGCTCCTTCCTGGGACTG-3' y 5'-GCACTGTGCTGATGATGTTGT-3' sonda #67; GPR124 murina 5'-GTCCCTGTTGGAGAAGTTGG-3' y 5'-AGCGTTTTAGCTCTCTCCAGA-3', sonda #1. Se utilizaron los Universal Probe Library Human HPRT Gene Assays (Roche AppliedScience) como referencias en las reacciones de qPCR de color dual. Las amplificaciones se corrieron en un Mx3000P™ Real-Time PCR System (Stratagene).

Ejemplo 15

Análisis de Datos

Todos los datos se analizaron mediante el uso del programa GraphPad PRISM® 4.02 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos de los experimentos de unión de radioligando se calcularon como siguen: el promedio de los valores de dpm de los puntos no-específicos se sustrajeron de cada valor de dpm total individual. Para los análisis de saturación, los valores de unión específicos que se calcularon se expresaron como fmol/mg y se graficaron contra las concentraciones libres de [³H]-CP55940. Todos los valores de unión de competencia de radioligandos se normalizaron mediante la expresión de los valores como por cientos de la cantidad máxima de radioligando que se desplaza por un compuesto no radiomarcado en cada línea celular. Todos los datos se representaron como la media ± SEM. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso del GraphPad PRISM® 4.02.

Ejemplo 16

Diseño de un enfoque genético para identificar el gen que codifica para los receptores de AAI

1: Selección de células que carecen de los receptores CB₁/CB₂:

Los niveles de expresión de los ARNm. de CB₁ y CB₂ se determina por qPCR en ocho líneas celulares humanas y se encontraron tres, T98g, MDA231 y células sknmc, que carecen de los mRNA de CB₁ y CB₂ (Tabla 1).

Tabla 1

líneas celulares humanas	CB1, ΔCt	CB2, ΔCt
T98G	no ct	no ct
MDA231	no ct	no ct
sknmc	no ct	no ct
SW480	8.29	no ct
SF767	11.11	no ct
HT29	13.41	no ct
U87	7.73	no ct
hek	10.13	no ct
U3t3 ADNc.	-5.22	no ct
HL60 ADNc.	6.37	-3.49

2. Determinación del perfil de sensibilidad de las células CB₁/CB₂-KO para WIN55212-2:

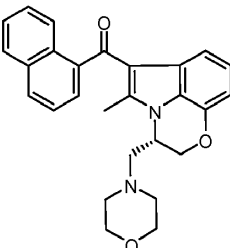
WIN55212-2 se conoce que mata las líneas tumorales en cultivo independientemente de los receptores CB₁/CB₂. Con base en esta evidencia, se determinó si WIN55212-2 mata diferencialmente las células sknmc, T98g y MDA231, lo cual proporciona un índice de funcionalidad del receptor de AAI en estas células. Comprobado además es Δ⁹-THC (canabinoide clásico) y CP55940 (canabinoide no clásico).

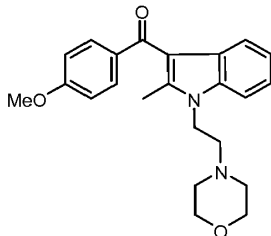
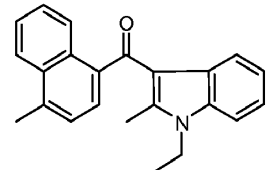
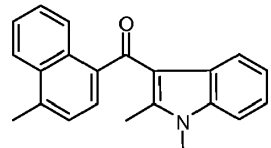
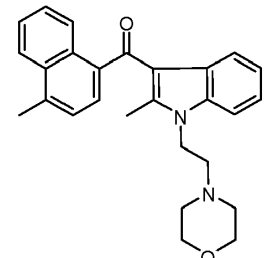
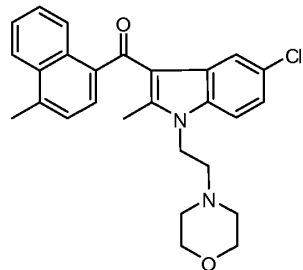
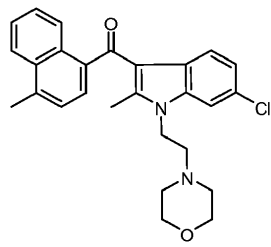
La potencia de WIN55212-2 en la matanza de las células sknmc, T98G y MDA231 estuvo dentro de rangos micromolares similares (1.5-2.9 μM) y exhibió una eficacia tóxica gradual (T98g > MDA > sknmc) (Figura 1). Por el contrario, tanto THC como CP55940 exhibieron eficacias y potencias inconsistentes en la matanza de estas células, lo que sugiere que las células sknmc, T98G y MDA231 expresan los receptores de AAI a diferentes niveles de expresión, y que el compuesto AAI induce la respuesta tóxica más fuerte en la línea celular de astrocitoma humano T98G.

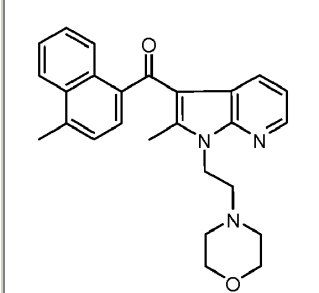
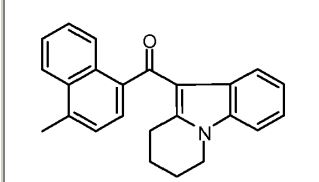
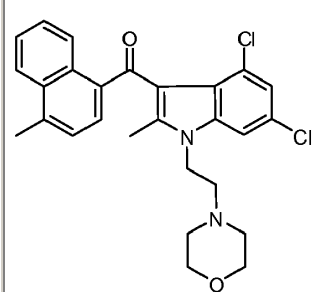
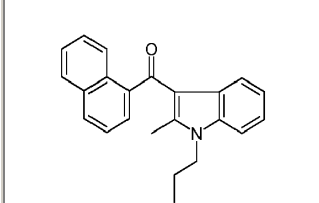
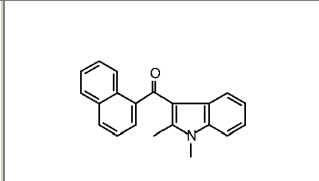
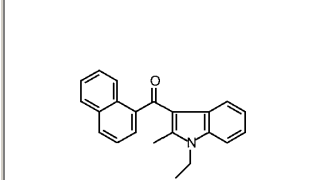
3: Estudio SAR y de los compuestos AAI:

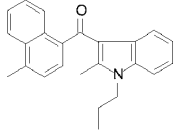
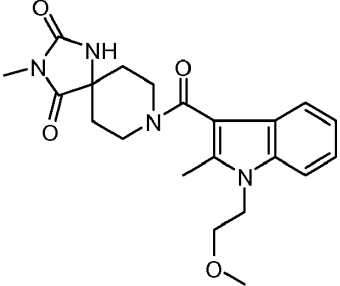
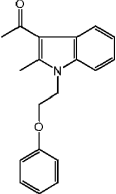
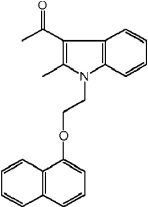
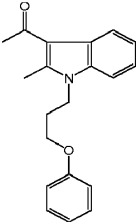
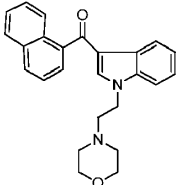
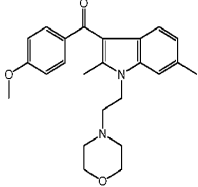
Debido a que el efecto tóxico más fuerte de WIN55212-2 se midió en células T98g, estas células se utilizan como marco de interpretación para estudiar la relación estructura actividad (SAR) de los compuestos AAI en la inducción de la muerte celular a través de receptores de AAI. La Tabla 2 proporciona la eficacia y potencia tóxica de 16 compuestos AAI que se seleccionaron racionalmente. JWH-451 indujo la combinación óptima de la mayor potencia (1.1 μM) y alta eficacia (mata el 81% de las células). JWH-451 exhibió además 100 veces menor afinidad por los receptores CB₁ y CB₂ que WIN55212-2, por lo que es el primer ligando a los receptores de AAI que exhibe afinidad reducida a receptores CB₁/CB₂ en comparación con WIN55212-2 (Figura 2).

Tabla 2

Compuesto	Estructura	Potencia tóxica en células T98g potencia μM (porcentaje de eficacia)
WIN55212-2 (disponible comercialmente)		1.5 μM (87 %)

5	Pravadolina (disponible comercialmente)		22 μ M (88 %)
10			
15	JWH-451		1.1 μ M (81 %)
20			
25	JWH-450		2 μ M (66 %)
30			
35	TK-18		3 μ M (48 %)
40			
45	CBX-002		30 μ M (45 %)
50			
55	CBX-004		2 μ M (68 %)
60			

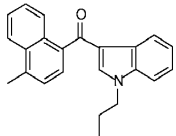
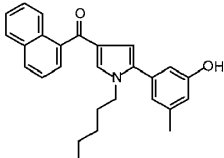
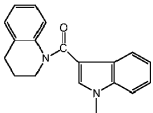
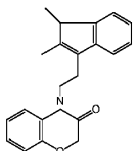
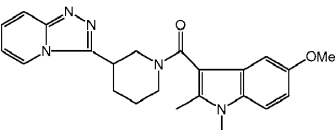
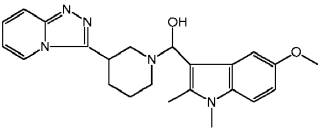
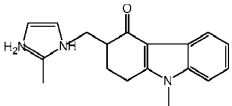
5	CBX-003		5 μ M (71 %)
10			
15	CBX-005		1.2 μ M (64%)
20			
25	CBX-007		0.6 μ M (56%)
30			
35	JWH-015 (disponible comercialmente)		1.3 μ M (58%)
40			
45	JWH-042 (Drug and Alcohol Dependence, 2000. 60(2): p. 133-140)		3.1 μ M (71%)
50	JWH-043 (Drug and Alcohol Dependence, 2000. 60(2): p. 133-140)		6.9 μ M (84%)
55			

<p>5</p> <p>JWH-148 (Reggio, P. H. (ed.) The cannabinoid receptors. Humana Press, Totowa, NJ 2008. p. 49-94.)</p>		<p>2 μM (48%)</p>
<p>10</p> <p>15</p> <p>TK-8 (disponible comercialmente)</p>		<p>886 μM (55%)</p>
<p>20</p> <p>25</p> <p>TK-2 (disponible comercialmente)</p>		<p>3.1 μM (81%)</p>
<p>30</p> <p>35</p> <p>TK-15 (disponible comercialmente)</p>		<p>45 μM (62%)</p>
<p>40</p> <p>45</p> <p>TK-14 (disponible comercialmente)</p>		<p>40 μM (92%)</p>
<p>50</p> <p>55</p> <p>JWH-200 (disponible comercialmente)</p>		<p>21 μM (48%)</p>
<p>60</p> <p>AM630 (disponible comercialmente)</p>		<p>7.8 μM (92%)</p>

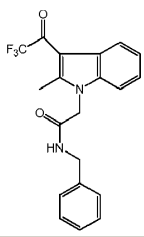
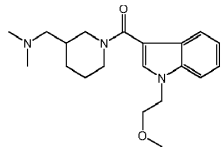
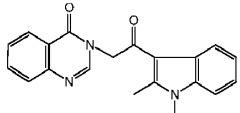
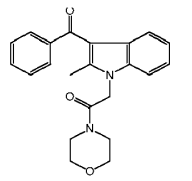
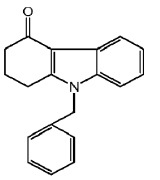
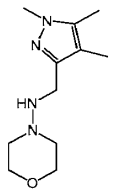
La SAR de los compuestos AAI en la matanza de las células T98g a través de los receptores de AAI se enfocó aún más por los resultados que muestran que trece análogos adicionales de WIN55212-2 y JWH-451, cada uno con restos químicos distintos, no afectaban a la viabilidad de las células T98g (Tabla 3).

5

Tabla 3

Compuesto	Estructura	Actividad en la matanza de las células T98g por ciento de eficacia a 10 μ M
JWH-120 (Drug y Alcohol Dependence, 2000. 60(2): p.133-140)		0%
JWH-370		11%
TK10 (disponible comercialmente)		0%
TK4 (disponible comercialmente)		10%
TK11 (disponible comercialmente)		10%
TK12 (disponible comercialmente)		16%
TK3 (disponible comercialmente)		11%

60

5	TK6 (disponible comercialmente)		8%
10	TK9 (disponible comercialmente)		0%
15	TK5 (disponible comercialmente)		3%
20	TK16 (disponible comercialmente)		3%
30	TK7 (disponible comercialmente)		19%
40	TK-1 (disponible comercialmente)		6%

45

4: Identificación de genes candidatos para receptores de AAI:

50

Puesto que la evidencia sugiere que los receptores de AAI se acoplan a proteínas G, el análisis de matriz génica de las células skmnc, T98G y MDA231 se realizó con enfoque en el ARNm que codifica para GPCRs. Las matrices de genes se generaron mediante la mezcla del ARNm total que se extrajo a partir de tres cultivos independientes para cada línea celular. Las tres líneas celulares expresaron 39 ARNm de GPCR en común. Estos 39 genes representan genes candidatos:

55

GPR1	GPR126	GPR18	GPR25	GPR45	GPR124	GPR85
GPR116	GPR135	GPR19	GPR37	GPR50	GPR64	GPR97
GPR12	GPR144	GPR20	GPR39	GPR52	GPR65	
GPR124	GPR17	GPR21	GPR4	GPR56	GPR68	
GPR125	GPR173	GPR22	GPR44	GPR6	GPR75	

60

5: Identificación de GPR124 como un receptor de AAI:

Para determinar cuál de los genes candidatos codifica para los receptores de AAI, un enfoque de ARNip se usa para apagar cada candidato individualmente para determinar cuál evita el efecto tóxico de JWH-451 y por lo tanto codifica para los receptores de AAI. La predicción es que el apagar los receptores de AAI previene la muerte celular que se induce por JWH-451. Las células T98g se trataron con ARNip que se dirigieron a cada uno de los 39 genes GPCR candidatos individualmente. El primer experimento se diseñó para apagar cada candidato GPCR mediante el uso de una mezcla de 3 ARNip de manera que se maximice así la eficacia de modificación genética dirigida. Así, las células se incubaron con mezclas de ARNip y después se trataron con JWH-451 (1 μ M) y la viabilidad celular se midió después de tres días. Sólo una mezcla de ARNips (que se dirigió a GPR124) disminuyó la toxicidad de JWH-451. Para validar este resultado, la mezcla de 3 ARNip que se dirigieron a GPR124 se deconvolucionó mediante la comprobación de cada ARNip por separado, con la medición de su respectiva eficacia en el apagado del ARNm de GPR124 por qPCR. Dos de los tres ARNips apagaron la expresión GPR124 por más de un 80% durante 4 días (Figura 3b). La Figura 3c muestra los resultados que se obtuvieron con uno de estos ARNip, lo que demuestra que la muerte de las células T98g que se indujo por JWH-451 se reduce cuando la expresión del mRNA de GPR124 se reduce de manera concomitante. El efecto de matanza que se indujo por JWH-451 se media por GPR124, un receptor de AAI.

Al comparar la secuencia global de aminoácidos de GPR124 con las de los receptores CB₁ y CB₂ no se encontró homología significativa. Sin embargo, cuando se enfoca la comparación con la secuencia de aminoácidos que codifica para los 3^{er}os dominios de transmembrana de los receptores GPR124 y CB₂, se encontró un 84% de homología (Figura 3a). Los estudios de mutagénesis sitio dirigida mostraron que WIN55212-2 interactúa de manera directa con el 3^{er} dominio de transmembrana de los receptores CB₂. Por lo tanto, es probable que WIN55212-2, JWH-451 y otros compuestos AAI interactúen de manera directa con el 3^{er} dominio de transmembrana de GPR124.

Ejemplo 17

Perfil tóxico de JWH-451

JWH-451 se comprobó para la toxicidad en células que expresan GPR124. JWH-451 fue equipotente en la matanza de líneas celulares de astrocitoma humanas: U251, A172 y GBM8 (potencias de 2-4 μ M, Figura 4); JWH-451 exhibió un efecto mucho menos tóxico sobre progenitores cardíacos y motoneuronales; y no afectó a la viabilidad de las neuronas de ratón en cultivo primario y de la línea de células endoteliales bEnd.3. Por lo tanto, JWH-451 mata de manera eficaz las células malignas, no afecta de manera significativa la viabilidad de células progenitoras y de células no malignas sanas.

Perfil de JWH-451 *In vivo*

Los ratones desnudos a los que se les implantaron tumores de flanco U251 se trataron con un régimen diario de JWH-451. Este experimento se realizó como sigue: 10⁶ células U251 se implantaron en los flancos de los ratones desnudos y se dejó crecer el tumor hasta que alcanzó una talla de 250 mm³, punto en el cual los ratones se incorporaron al tratamiento diario. El crecimiento del tumor se midió y expresó en función de la talla inicial del tumor. La inyección i.p. diaria de JWH-451 (15 mg/Kg) redujo de manera significativa el crecimiento tumoral *in vivo* (Figura 5).

Ejemplo 18

Farmacocinética y formulación de JWH-451

Se preparó una formulación liposomal compuesta de fosfatidilcolina:PEG (6:1) que mantiene a JWH-451 soluble en tampón a 4°C por dos semanas.

Las evaluaciones farmacocinéticas (PK) iniciales indican que el JWH-451 formulado que se inyectó a los ratones (i.p.) a 5, 15 y 45 mg/Kg resulta después de una hora en concentraciones alcanzadas de JWH-451 de 0.7-1, 1.5-2.2 y 3.7-5 μ M, respectivamente, en cerebro y sangre de ratón (Figura 6) Aquí, los niveles de JWH-451 en tejido se cuantificaron por LC-MS, mediante el uso de JWH-015 ((2-metil-1-propil-1H-indol-3-il)(naftalen-1-il)metanona) como estándar de LC-MS y la generación de curvas de calibración externas. Estos resultados de PK muestran que la inyección periférica de JWH-451 formulado conduce a concentraciones de JWH-451 en sangre y cerebro de ratón que están dentro del orden de activación de GPR124 eficaz para matar astrocitomas.

Ejemplo 19

Invasión de linfocitos *in vivo*

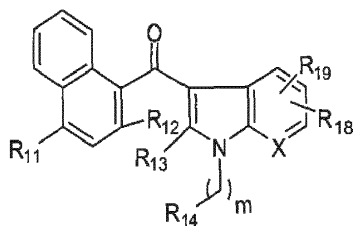
Se midió el efecto de JWH-451 en la invasión de las células inmunes del modelo de ratón singénico de tumores

5 astrocitomas (células de astrocitoma de ratón que se implantaron en el cerebro de ratones silvestres hospederos con el sistema inmune intacto). De manera breve, se utilizaron ratones (BALB/c, 8 semanas de edad, machos, Charles River) para este estudio y se mantuvieron bajo condiciones libres de patógenos específicos por al menos una semana antes de la cirugía. Veinticuatro horas antes de la cirugía, 5×10^6 células DBT se cosecharon en 10 ml de DMEM suplementado con 10% FBS que se inactivó con calor, 10 U/ml penicilina y 10 μ g/ml estreptomina y se sembraron en frascos de cultivo de células T75 cm^2 (un frasco *por* ratón). Justo antes de la cirugía, las células de un frasco se despegaron con tripsina-EDTA, se recuperaron en DMEM suplementado con 10% FBS que se inactivó con calor, se centrifugaron/enjuagaron dos veces con MEM (suero libre) y se resuspendieron a 10^6 células/ μ l de MEM que se enfrió en hielo (listo para inyección). Los ratones se anestesiaron con ketamina/xilazina (dada a 0.1 ml *por* gramo de peso
 10 corporal i.p., 130 mg/kg ketamina / 8.8 mg/kg xilazina) y se colocaron en un instrumento estereotáxico (David Kopf Instruments, CA) sobre una almohadilla térmica (Deltaphase®, Braintree Scientific, Inc, Braintree, MA). Después de la incisión de la línea media del cuero cabelludo, se usó una aguja 25-G para realizar una craneostomía a 2 mm craneales del bregma y 1,5 mm lateral izquierdo. Otra aguja 25-G que contenía las células se bajó 2 mm dentro de la corteza a través de la craneostomía y 1 μ l que contenía 10^6 células DBT se inyectó durante tres minutos mediante el uso de un
 15 microinyector (Life Sciences Instruments, CA). La aguja se mantuvo en su lugar durante 2 minutos después de la inyección y luego se retiró lentamente, seguido por irrigación suave con 0.9% de solución salina para eliminar las células residuales. La craneostomía y el cuero cabelludo se cerraron con cera para huesos (Ethicon, NJ) y sutura de seda (no. 3-0, Ethicon), respectivamente. La anestesia se revirtió con yohimbina y a los animales se les permitió recuperarse en la almohadilla calentada. Tres semanas después de la implantación del tumor, los ratones se sacrificaron por sobredosis de pentobarbital, se perfundieron transcárdialmente con 25 ml de PBS frío, seguido de 25 ml de paraformaldehído (PFA, 4%). Los cerebros se extrajeron y se colocaron en PFA (4%) durante la noche, seguido de sacarosa (30% en PBS, 4°C, hasta que la muestra se hundió). Los cerebros se embebieron después en medio Tissue Tek O.C.T. (Sakura, CA), se congelaron de manera rápida en 2-metilbutano que se enfrió en nitrógeno líquido durante 30 segundos y se almacenaron a -80°C. Las secciones coronales (4 μ m) se cortaron mediante el uso de un criostato (Reichert-Jung 2800
 20 Frigocut E), se secaron con aire y se fijaron en etanol (70% durante 1 min), seguido de un enjuague con agua y de una tinción de hematoxilina-eosina (5 segundos en hematoxilina de Mayer concentrada y 60 segundos en eosina Y concentrada).
 25

30 La inyección i.p. diaria de JWH-451 formulado conduce a un incremento de dos veces en el número de linfocitos y macrófagos que invaden los tumores DBT (Figura 7), lo que sugiere que parte del mecanismo de acción terapéutica de JWH-451 en la matanza de astrocitomas es hacer que la barrera hematoencefálica sea más permeable a los linfocitos y macrófagos cerebrales invasores, posiblemente aumentando una respuesta inmune contra los tumores.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:



- o sales farmacéuticamente aceptables, en donde

X es CH o N;

R₁₁ es C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₂ es H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

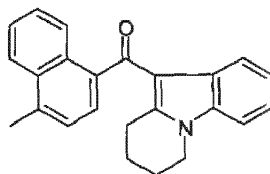
R₁₄ y R₁₃ tomados junto con los átomos a los cuales están unidos forman un grupo heterociclilo de 5, 6, o 7 miembros opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₅, R₁₆, y R₁₇ son independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alcoxi, halógeno, hidroxilo, arilo, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀;

R₁₈ y R₁₉ son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, C₁-C₆ hidroxialquilo, halógeno, -NO₂, -CN, -OR₁₅, -SR₁₅, -C(O)R₁₅, -NHC(O)R₁₅, -C(O)OR₁₅, -OC(O)R₁₅, -NR₁₆R₁₇, -C(O)NR₁₆R₁₇, -NHR₁₅C(O)NR₁₆R₁₇, -SO₂NR₁₆R₁₇, alquilarilo, cicloalquilo, heterociclilo, o heteroarilo, cada uno es opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀,

R₂₀ es halógeno, -CN, -OH, -NO₂, -NH₂, -NH(C₁-C₆ alquilo), -N(C₁-C₆ alquil)₂, C₁-C₆ alquilo, C₂-C₆ alquenilo, C₂-C₆ alquinilo, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalquilo, C₁-C₆ haloalcoxi, -CO₂H, -CO₂(C₁-C₆ alquilo), -SO₂(C₁-C₆ alquilo), -CONH₂, -CONH(C₁-C₆ alquilo), -CON(C₁-C₆ alquil)₂, -CON(H)OH, -NHCO(C₁-C₆ alquilo), o -NHCO₂(C₁-C₆ alquil); y

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X es CH.
3. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde R₁₁ es C₁-C₆ alquilo o C₁-C₆ alcoxi.
4. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en donde R₁₇ es metilo o metoxi.
5. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde R₁₂ es H.
6. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde R₁₃ y R₁₄ tomados junto con los átomos a los cuales se unen forman un heterociclilo de 5 o 6 miembros opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀.
7. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde R₁₃ y R₁₄ tomados junto con los átomos a los cuales se unen forman un heterociclilo de 6 miembros opcionalmente sustituido con uno a cuatro R₂₀.
8. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el heterociclilo de 6 miembros es piperidinilo.
9. El compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde R₁₈ y R₁₉ son cada uno independientemente H, C₁-C₆ alcoxi, C₁-C₆ haloalcoxi, halógeno, u -OH.
10. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, el cual es:



5

10

(4-metilnaftalen-1-il)(6,7,8,9-tetrahidropirido[1,2-a]indol-10-il)metanona.

15

11. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y uno o más diluyentes, conservantes, solubilizadores, emulsificantes, adyuvantes, excipientes, o portadores.

20

12. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para utilizar en el tratamiento o inhibición de glioblastoma, trastorno de cognición, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer y demencia, enfermedad de Parkinson, depresión, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Huntington, demencia Fronto temporal, parkinsonismo vinculado al cromosoma 17, y enfermedades priónicas.

13. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para utilizar en el tratamiento o inhibición del glioblastoma.

FIGURA 1

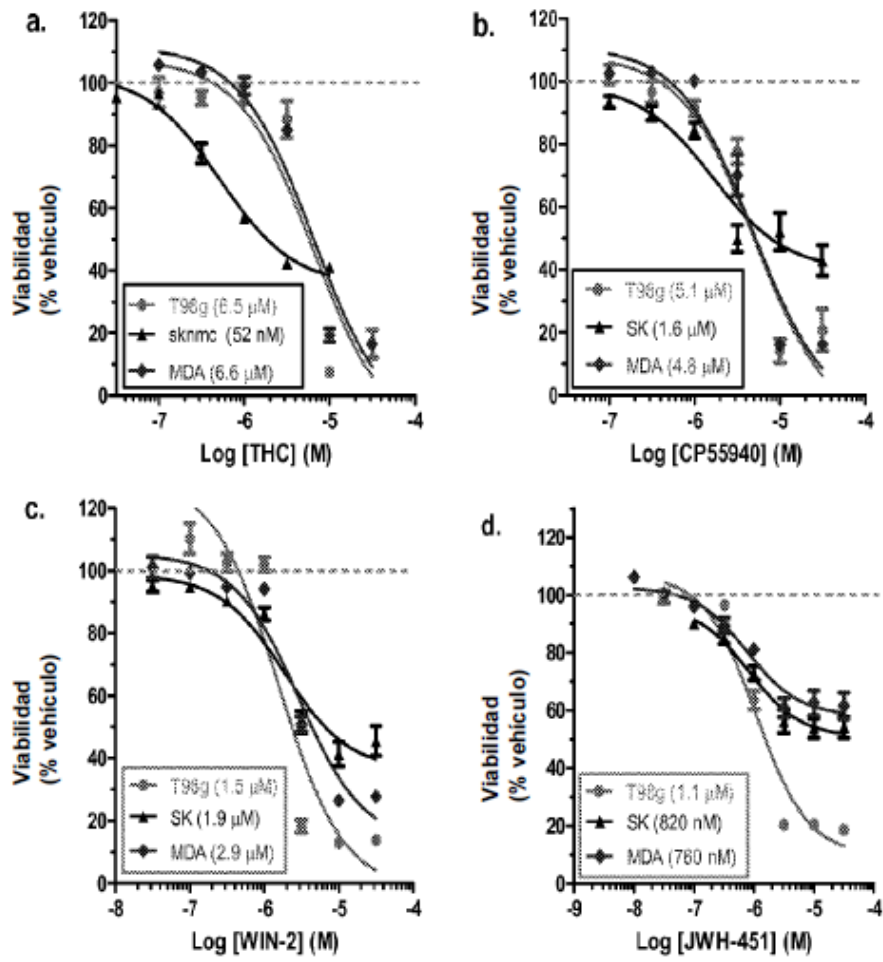


FIGURA 2

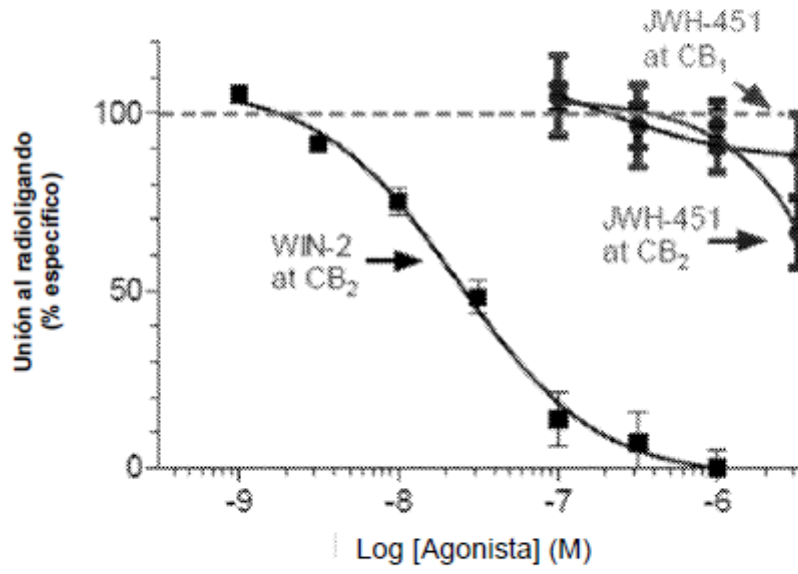


FIGURA 3

a.

Cb1	GGVTASFTASVGS
Cb2	GSVTMTFTASVGS
Gpr124	GSLLATGSARVGT
	G + + +A VG+

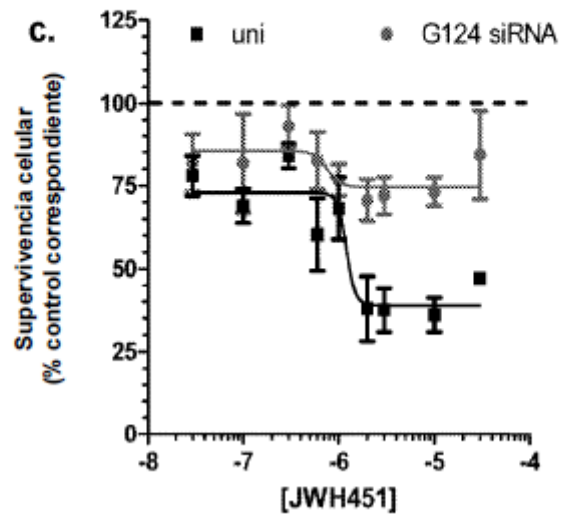
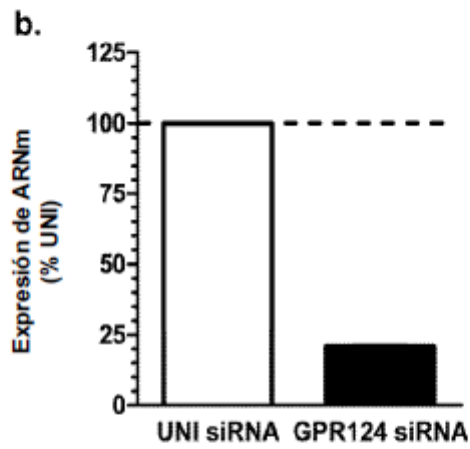


FIGURA 4

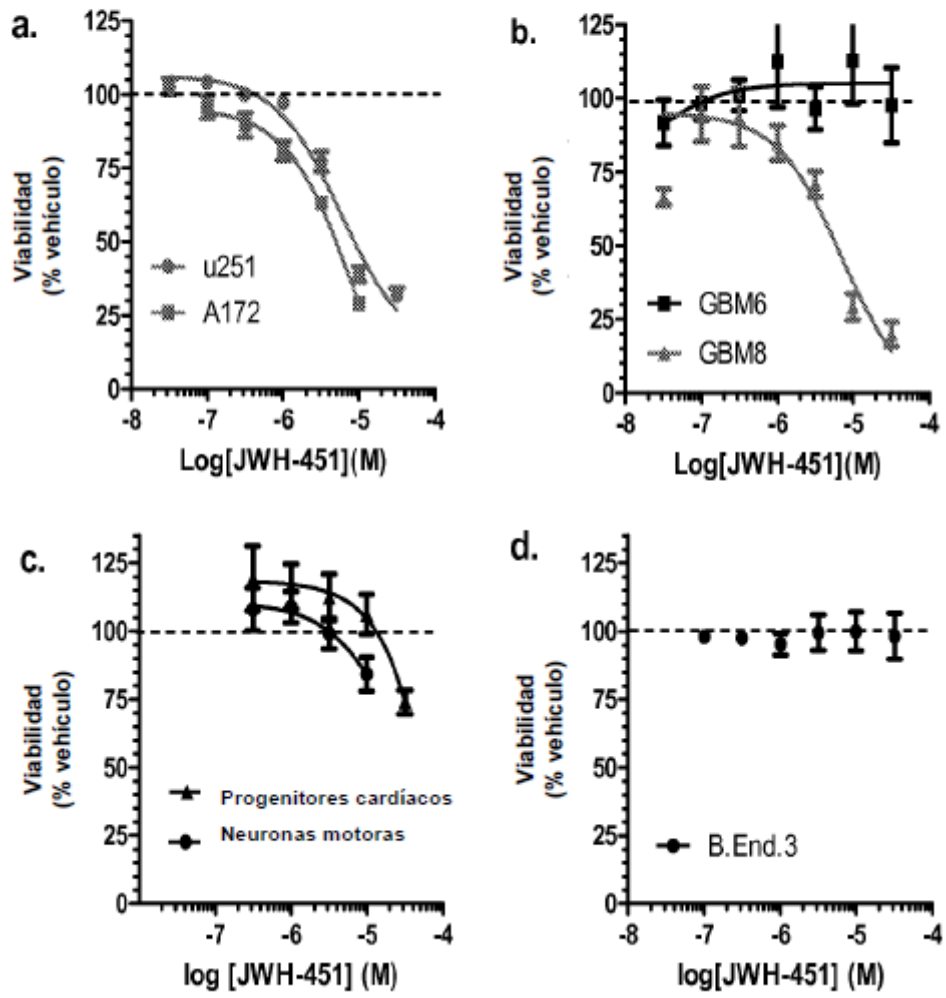


FIGURA 5

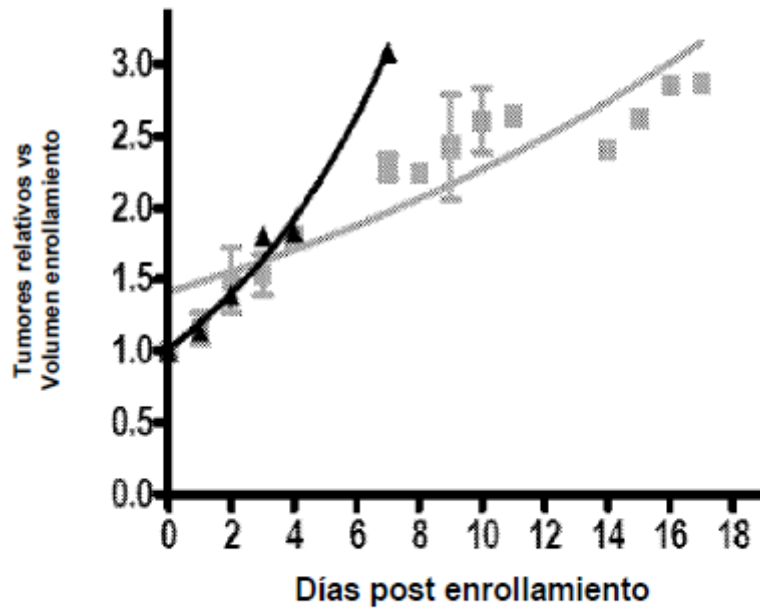
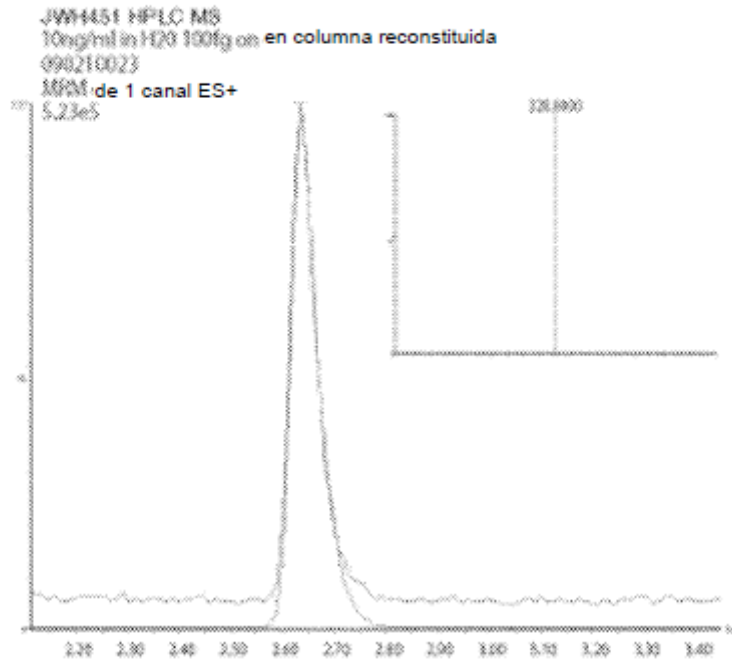


FIGURA 6



Niveles de cerebro (Liposomas)

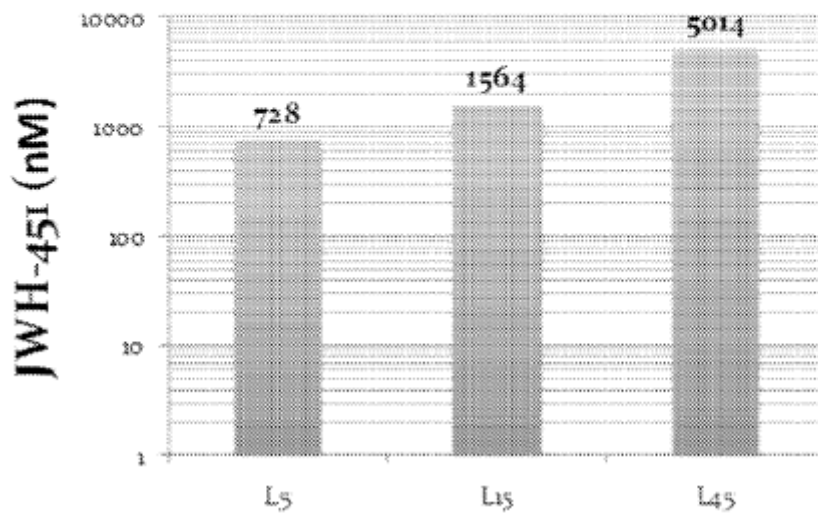


FIGURA 7

