

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 466**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/4166** (2006.01)

**C07D 233/74** (2006.01)

**C07D 233/84** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2010 E 10746795 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2400847**

54 Título: **Compuestos específicos de diariltiohidantoína**

30 Prioridad:

**24.02.2009 US 155119 P**

**27.02.2009 US 156398 P**

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

**11.05.2015**

73 Titular/es:

**MEDIVATION PROSTATE THERAPEUTICS, INC.**

**(100.0%)**

**525 Market Street, 36th Floor**

**San Francisco, CA 94105, US**

72 Inventor/es:

**JAIN, RAJENDRA PARASMAL y**

**GIBBONS, JACQUELINE A.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 535 466 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

Compuestos específicos de diariltiohidantoína

### 5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 61/155.119, depositada el 24 de febrero de 2009 y de la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° 61/156.398, depositada el 27 de febrero de 2009.

10

### Campo de la invención

En este documento se proporcionan dos compuestos específicos de diariltiohidantoína, y composiciones farmacéuticas y otras formas que comprenden estos dos compuestos específicos, y dichos compuestos para su uso en métodos para la prevención y/o el tratamiento de afecciones en mamíferos tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y el cáncer de próstata.

15

### Antecedentes de la invención

Los compuestos de diariltiohidantoína, incluyendo los compuestos de diariltiohidantoína, han sido descritos en las Publicaciones de EE.UU. N°s 2007/0004753, 2007/0254933 y 2009/0111864. No obstante, sigue habiendo una necesidad de nuevas terapias para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo el cáncer de próstata. También se desean nuevas terapias para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y de la enfermedad de Alzheimer.

20

(MI) - (MII) según se detalla en este documento son metabolitos del compuesto RD162' divulgado en la publicación de EE.UU. N° 2007/0004753 y pueden hallar uso en terapia.

25

### Breve resumen de la invención

30

Se describen los compuestos (MI) - (MII). La fórmula (I) según se proporciona en este documento describe y se refiere a los compuestos de la fórmula (MI) - (MII). El compuesto (MI) ejerce su efecto a través del transportador de norepinefrina. Los moduladores del transportador de norepinefrina han sido útiles en las terapias para el tratamiento de la depresión, la enfermedad de Alzheimer, los trastornos por déficit de atención y la enfermedad de Parkinson. El compuesto (MII) ejerce su efecto a través del receptor de progesterona. Los moduladores del receptor de progesterona se han usado en terapias en las que está implicada la progesterona. Los moduladores del receptor de progesterona tienen un uso potencial en el control de la natalidad, bien para evitar el embarazo o bien para producir un aborto. Los compuestos (MI) - (MII) son metabolitos del compuesto RD162'. El RD162' ha hallado uso en el tratamiento del cáncer de próstata.

35

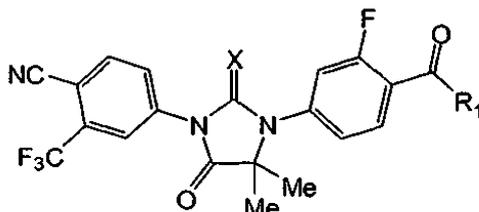
40

También se describen métodos y composiciones. En una variación, el método comprende la administración de un compuesto de fórmula (MI) o (MII) a un individuo en una cantidad eficaz para modular un receptor, tal como uno de los receptores indicados en las Tablas 5 y 9. En este documento se detallan los métodos de aislamiento de un compuesto de fórmula (MI) o (MII). También se proporcionan métodos de uso de un compuesto de fórmula (MI) y (MII) en terapia. En un aspecto, la terapia es el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, de la enfermedad de Alzheimer o del cáncer de próstata. También están englobadas composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (MI) o (MII) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, ya que son formas aisladas y/o purificadas de un compuesto de fórmula (MI) o (MII). También se describen formas de dosificación unitarias de un compuesto de fórmula (MI) o (MII).

45

50

Consecuentemente, en un aspecto, se proporcionan compuestos que son de la fórmula (I):



(I)

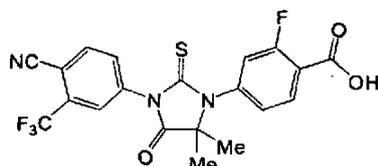
55

en la que:

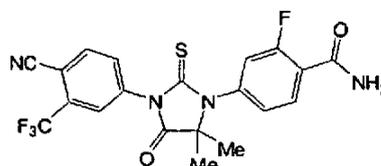
X es S, y R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>,  
o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

5

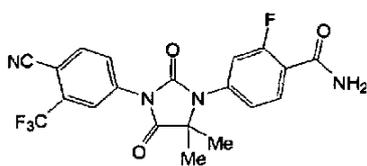
Se describen los compuestos de las fórmulas (MI), (MII), (MIII), (MIV) y (MV):



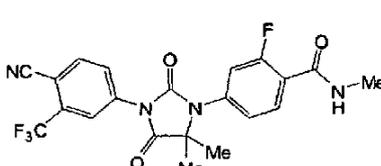
(MI)



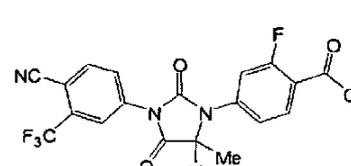
(MII)



(MIII)



(MIV)



(MV)

10 Se entiende que también se proporcionan las sales de los compuestos, tales como las sales farmacéuticamente aceptables.

15 Los compuestos de la fórmula (I) han sido identificados como metabolitos del compuesto RD162', que ha hallado utilidad en el tratamiento del cáncer de próstata y se describe en la publicación de la solicitud de EE.UU. N° 2007/0004753. Según se describe en los Ejemplos, a continuación, el RD162' y los metabolitos del mismo se aislaron mediante una precipitación de proteínas inducida por acetonitrilo de 100 µl de plasma. Los metabolitos fueron identificados mediante mediciones por escáner del tiempo de vuelo de los iones positivos desde 55 hasta 800 amu. Una molécula en particular fue identificada como un potencial metabolito del RD162' si su fragmentación daba como resultado subespecies con un patrón coherente con el del RD162' parental. Había presentes cinco supuestos metabolitos en el plasma de ratas, perros y/o seres humanos: (MI), (MII), (MIII), (MIV) y (MV). Las estructuras de los metabolitos se dedujeron mediante un análisis del espectro de masas, y después se sintetizaron los supuestos metabolitos. Las estructuras moleculares de los metabolitos fueron confirmadas a través de un experimento de elución conjunta de CL/EM/EM en el que las moléculas sintetizadas se comparaban directamente con las estructuras aisladas a partir de las muestras de plasma de ratas, de perros y de seres humanos.

25 Los compuestos de la fórmula (I) también pueden hallar uso en terapia, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer de próstata o en el tratamiento de otras indicaciones relacionadas con la actividad de dichos compuestos, tales como la actividad de unión al receptor detallada en este documento.

30 En una forma de realización, con respecto a los compuestos de fórmula (I) (es decir, los compuestos (MI) - (MII)), los compuestos se proporcionan en una forma sustancialmente pura.

35 En un aspecto se proporcionan composiciones que comprenden los compuestos, en las que la composición está exenta de sangre o de otros líquidos corporales.

En otro aspecto se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (I), y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender uno o más de los compuestos descritos en este documento, o sales o solvatos de los mismos.

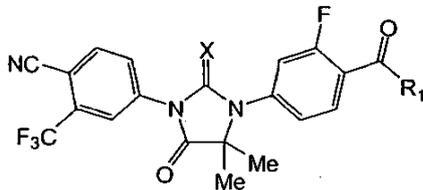
40 En otro aspecto, los compuestos son para ser usados en métodos para la prevención o el tratamiento de una afección de entre las indicadas en este documento, y particularmente, dicha afección puede estar relacionada con, por ejemplo, la depresión, alteraciones de la memoria tales como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, y el cáncer de próstata, método que comprende la administración a un individuo en necesidad de los mismos de una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la fórmula (I), o de una sal o un solvato del mismo, o de una composición farmacéutica que comprende los anteriores.

45 La invención también engloba el uso de cualquiera de los compuestos de la invención para la preparación de medicamentos, que pueden ser administrados para una terapia, tal como para el tratamiento de las indicaciones divulgadas en este documento, incluyendo el cáncer de próstata.

En aspectos adicionales, se proporcionan métodos para la síntesis de los compuestos descritos en este documento, describiéndose a continuación algunos protocolos y rutas sintéticas representativas.

Se proporciona una composición farmacéutica que comprende (a) un compuesto de la fórmula (I):

5

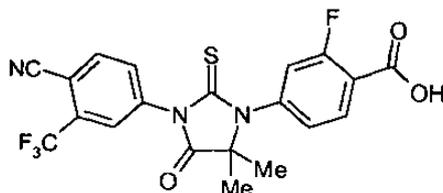


(I)

en la que:

10 X es S, y  
R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;

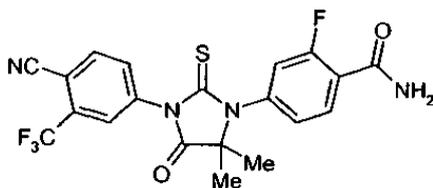
o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una variación particular de la fórmula (I), el compuesto es de la fórmula (MI):



MI

15

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra variación de la fórmula (I), el compuesto es de la fórmula (MII):



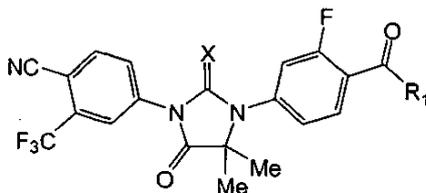
MII

20

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se proporciona una composición del compuesto sustancialmente puro, en la que el compuesto es de la fórmula I:

25



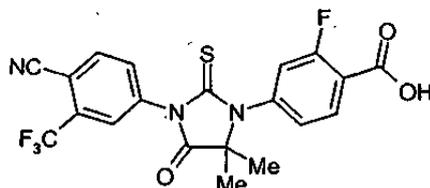
(I)

en la que:

30 X es S, y

R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;

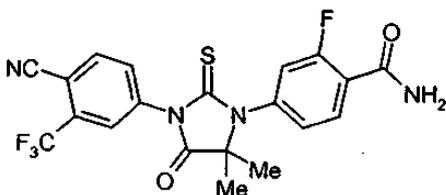
o una sal o un solvato del mismo. En una variación particular de la fórmula (I), el compuesto es de la fórmula (MI):



MI

5

o una sal o un solvato del mismo. En otra variación de la fórmula (I), el compuesto es de la fórmula (MII):

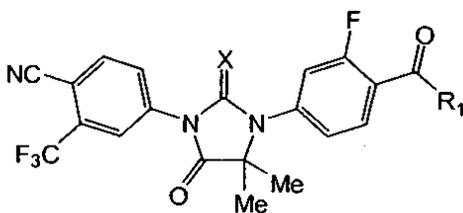


MII

10

o una sal o un solvato del mismo. También se proporciona una composición de cualquiera de las formas de realización y variaciones precedentes, en la que la composición contiene menos de aproximadamente el 10 por ciento en peso de impurezas.

La invención también engloba un compuesto de la fórmula (I):



(I)

15

en la que:

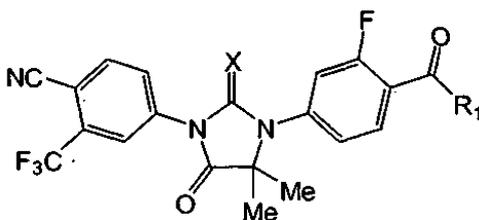
X es S, y  
R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;

20

o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de administración a un individuo para una terapia. En una forma de realización en particular, la terapia es el tratamiento del cáncer de próstata. En otra forma de realización, la terapia es el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o de la enfermedad de Alzheimer.

25

También se proporciona un kit que comprende un compuesto de la fórmula (I):



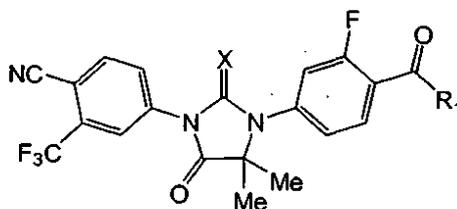
(I)

en la que:

X es S, y  
R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;

5 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo. En una forma de realización, el kit comprende adicionalmente instrucciones para su uso, que en una variación, son instrucciones para el uso del compuesto en el tratamiento del cáncer de próstata o instrucciones para el uso del compuesto en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o de la enfermedad de Alzheimer.

10 También se proporciona en este documento una forma de dosificación unitaria que comprende un compuesto de la fórmula (I):



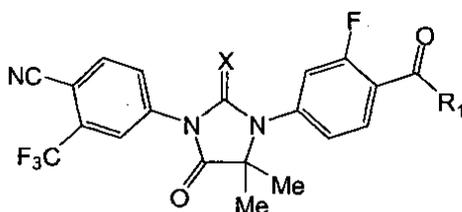
(I)

15 en la que:

X es S, y  
R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;

20 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

También se proporciona un compuesto aislado de la fórmula (I):



(I)

25 en la que:

X es S, y  
R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;

30 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otros objetos y ventajas se harán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la siguiente descripción detallada.

35 **Descripción detallada de la invención**

Definiciones

40 Salvo que claramente se indique de otro modo, los términos "un", "uno" y similares, se refieren a uno o más.

La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en este documento incluye (y describe) formas de realización que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que se refiere a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

45

Según se usa en este documento, por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un material que no es biológicamente ni de otro modo indeseable, por ejemplo, el material puede ser incorporado en una composición farmacéutica administrada a un paciente sin provocar ningún efecto biológico indeseable significativo, ni interactuar de una forma perjudicial con cualquiera de los demás componentes de la composición en la que está contenido. Los

5 vehículo o los excipientes farmacéuticamente aceptables cumplen preferiblemente los requisitos habituales de ensayos toxicológicos y de elaboración y/o están incluidos en la Inactive Ingredient Guide preparada por la Food y Drug Administration de Estados Unidos.

Las "sales farmacéuticamente aceptables" son aquellas sales que conservan al menos parte de la actividad biológica del compuesto libre (no salino) y que pueden ser administradas como fármacos o productos farmacéuticos a un individuo. Una sal farmacéuticamente aceptable tiene interacciones iónicas y no un enlace covalente. Dichas sales, por ejemplo, incluyen: (1) sales de adición ácida, formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares; o formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido propiónico, ácido succínico, ácido maleico, tartárico ácido y similares; (2)

10 sales formadas cuando un protón ácido presente en el compuesto parental es sustituido por un ión metálico, por ejemplo, un ión de un metal alcalino, un ión alcalinotérreo o un ión de aluminio; o coordina con una base orgánica. Algunas bases orgánicas aceptables incluyen etanolamina, dietanolamina, trietanolamina y similares. Algunas bases inorgánicas aceptables incluyen hidróxido de aluminio, hidróxido de calcio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de sodio, y similares. Algunos ejemplos adicionales de sales farmacéuticamente aceptables incluyen los

15 recogidos en Berge y col., *Pharmaceutical Salts*, J. Pharm. Sci., enero de 1977; 66 (1): 1 - 19. Las sales farmacéuticamente aceptables pueden prepararse *in situ* en el proceso de elaboración, o mediante una reacción por separado de un compuesto purificado de la invención en su forma de ácido o de base libre con una base o un ácido orgánico o inorgánico adecuado, respectivamente, y aislando la sal así formada durante la posterior purificación. Debería entenderse que una referencia a una sal farmacéuticamente aceptable incluye las formas de adición con el

20 disolvente o las formas cristalinas de la misma, particularmente solvatos o polimorfos. Los solvatos contienen cantidades estequiométricas o no estequiométricas de un disolvente, y a menudo se forman durante el proceso de cristalización. Los hidratos se forman cuando el disolvente es agua, o los alcoholatos se forman cuando el disolvente es un alcohol. Los polimorfos incluyen los diferentes ordenamientos de empaquetamiento cristalino de la misma composición elemental de un compuesto. Los polimorfos tienen habitualmente diferentes patrones de difracción por

25 rayos X, espectros de infrarrojos, puntos de fusión, densidades, durezas, formas cristalinas, propiedades ópticas y eléctricas, estabildades y solubilidades. Diversos factores tales como el disolvente de recristalización, la velocidad de cristalización y la temperatura de almacenamiento pueden provocar el predominio de una única forma cristalina.

El término "excipiente" se usa de forma intercambiable con "vehículo" en este documento, y según se usa en este documento se refiere a una sustancia inerte o inactiva que puede ser usada en la producción de un fármaco o de un producto farmacéutico, tal como un comprimido que contiene un compuesto de la invención como principio activo. Diversas sustancias pueden ser englobadas por el término excipiente, incluyendo, sin limitación, cualquier sustancia usada como aglutinante, disgregante, recubrimiento, coadyuvante de compresión / encapsulación, crema o loción,

35 lubricante, soluciones para administración parenteral, materiales para comprimidos masticables, edulcorante o saborizante, agente suspensor / gelificante o agente de granulación en húmedo. Algunos aglutinantes incluyen, por ejemplo, carbómeros, povidona, goma xántica, etc.; algunos recubrimientos incluyen, por ejemplo, acetato ftalato de celulosa, etil celulosa, goma gellan, maltodextrina, recubrimientos entéricos, etc.; algunos coadyuvantes de compresión / encapsulación incluyen, por ejemplo, carbonato de calcio, glucosa, fructosa dc (dc = "directamente

40 compresible"), miel dc, lactosa (anhidra o monohidratada; opcionalmente junto con aspartamo, celulosa, o celulosa microcristalina), almidón dc, sacarosa, etc.; algunos disgregantes incluyen, por ejemplo, croscarmelosa de sodio, goma gellan, glucolato sódico de almidón, etc.; algunas cremas o lociones incluyen, por ejemplo, maltodextrina, carragenanos, etc.; algunos lubricantes incluyen, por ejemplo, estearato de magnesio, ácido esteárico, estearil fumarato sódico, etc.; algunos materiales para comprimidos masticables incluyen, por ejemplo, glucosa, fructosa dc, lactosa (monohidratada, opcionalmente junto con aspartamo o celulosa), etc.; algunos agentes suspensores /

45 gelificantes incluyen, por ejemplo, carragenano, glucolato sódico de almidón, goma xántica, etc.; algunos edulcorantes incluyen, por ejemplo, aspartamo, glucosa, fructosa dc, sorbitol, sacarosa dc, etc.; y algunos agentes de granulación en húmedo incluyen, por ejemplo, carbonato de calcio, maltodextrina, celulosa microcristalina, etc.

Salvo que claramente se indique de otro modo, "un individuo" según se usa en este documento se refiere a un mamífero, incluyendo, pero no se limita a, un ser humano, un animal bovino, un primate, un equino, un canino, un felino, un porcino y un ovino. Por lo tanto, la invención halla uso tanto en la medicina humana como en el contexto veterinario, incluyendo su uso en animales agrícolas y en mascotas domésticas.

55

El término "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a dicha cantidad de un compuesto que debería ser eficaz en una forma terapéutica dada. Como se entiende en la técnica, una cantidad eficaz puede estar en una o más dosis, por ejemplo, puede ser necesaria una dosis individual o dosis múltiples para conseguir el punto final de tratamiento deseado. Pueden usarse los métodos habituales para la medición de la magnitud de este efecto, tales como los ensayos *in vitro* con enzimas purificadas, los ensayos basados en células, los modelos animales o los ensayos en seres humanos.

60

Según se usa en este documento, "tratamiento" o "tratar" es una metodología para la obtención de un resultado beneficioso o deseado, incluyendo los resultados clínicos. Para los fines de esta invención, algunos resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de un síntoma y/o la disminución de la magnitud de un síntoma y/o la prevención del empeoramiento de un síntoma asociado con una enfermedad o afección.

Según se usa en este documento, un compuesto que es un "modulador" del receptor se refiere a, y engloba, un compuesto que se une o que inhibe la unión de un ligando al receptor, o que reduce o elimina o que aumenta o mejora o mimetiza una actividad del receptor. Como tal, un "modulador del receptor" engloba tanto un antagonista del receptor como un agonista del receptor.

Según se usa en este documento, una "forma de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente individuales adecuadas como dosis unitarias, que contienen cada una, una cantidad predeterminada de un principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el vehículo farmacéutico requerido.

Una composición de un compuesto "sustancialmente puro" se refiere a que la composición contiene menos de aproximadamente el 35 % o menos de aproximadamente el 20 % o menos de aproximadamente el 15 % o preferiblemente menos de aproximadamente el 10 % o más preferiblemente menos de aproximadamente el 5 % o incluso más preferiblemente menos de aproximadamente el 3 %, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 1 %, de impurezas.

Se entiende que cualquiera de las formas de realización que se describen en este documento con el lenguaje "que comprende", también se proporcionan asimismo formas de realización análogas descritas en términos de "que consisten en" y/o "que consisten esencialmente en".

### Compuestos y composiciones

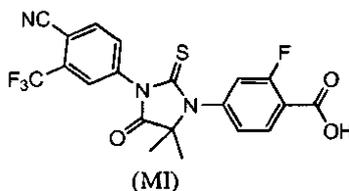
En ciertos aspectos, en este documento se proporcionan compuestos y composiciones que comprenden dichos compuestos, por ejemplo, en forma de composiciones farmacéuticas. Los compuestos y las composiciones pueden hallar uso en terapia, por ejemplo, en el tratamiento del cáncer de próstata, de la enfermedad de Parkinson o de la enfermedad de Alzheimer. También se proporcionan composiciones con los compuestos sustancialmente puros, ya que son compuestos aislados y sintéticos. También se proporcionan formas de dosificación unitarias de los compuestos.

En este documento se detallan métodos de aislamiento de un compuesto de fórmula (MI) y/o (MII), tales como un método de aislamiento de los compuestos a partir de la sangre o de cualquier otro líquido corporal. También están englobadas composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de fórmula (MI) o (MII) y un vehículo farmacéuticamente aceptable, ya que son formas aisladas y/o purificadas de un compuesto de fórmula (MI) o (MII).

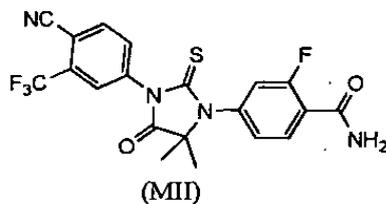
En un aspecto de la invención se describen los compuestos de las fórmulas (MI) y (MII) y las sales de los mismos. Un compuesto de fórmula (MI) o (MII) puede estar en forma aislada, y se engloban las composiciones que comprenden formas aisladas. Un compuesto de fórmula (MI) o (MII) puede estar en una forma purificada, y las composiciones que comprenden los compuestos en forma purificada se detallan en este documento.

En un aspecto se proporciona una composición que comprende un compuesto de la fórmula (I), en el que la composición está exenta de sangre o de cualquier otro líquido corporal. En un aspecto se proporciona una composición que comprende una forma purificada de un compuesto de la fórmula (I). Dicha composición puede contener otros componentes, tales como un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto se proporciona una composición de una forma sustancialmente pura de un compuesto de fórmula (I), en el que la composición comprende menos de aproximadamente cualquiera del 15 %, del 10 %, del 5 %, del 3 % y del 1 % de impurezas, impurezas que pueden ser, por ejemplo, un compuesto que no sea de la fórmula (I) o sangre u otro líquido corporal. En un aspecto, una composición del compuesto sustancialmente puro comprende únicamente uno de (MI) y (MII).

El compuesto (MI) es de la fórmula:



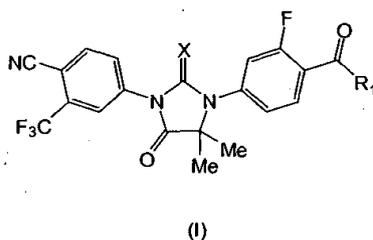
El compuesto (MII) es de la fórmula:



Los compuestos (MI) - (MII) pueden estar presentes en forma de sales, tales como sales farmacéuticamente aceptables.

5

En otro aspecto de la invención, se proporcionan compuestos que son de la fórmula (I):

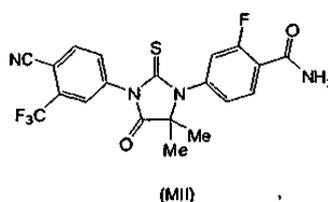
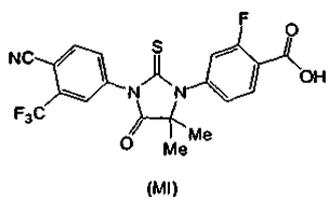


10 en la que:

X es S, y  
R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;

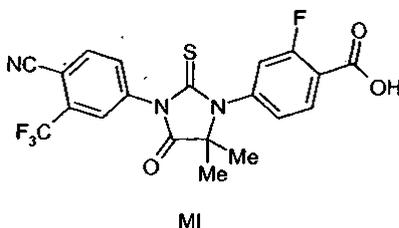
15 o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable de los mismos.

Por lo tanto, se proporcionan compuestos de acuerdo con las fórmulas (MI) y (MII):



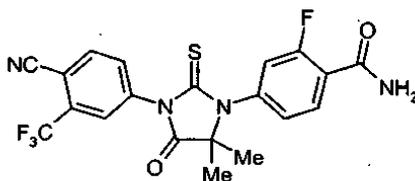
20 y pueden usarse en las composiciones y los métodos descritos en este documento.

En una forma de realización en particular, con respecto a los compuestos de fórmula (I), X es S y R<sup>1</sup> es OH. Por lo tanto, en una variación, un compuesto de fórmula (I) es de la fórmula (MI):



25

En otra forma de realización en particular, con respecto a los compuestos de fórmula (I), X es S y R<sup>1</sup> es NH<sub>2</sub>. Por lo tanto, en una variación, un compuesto de fórmula (I) es de la fórmula (MII):



MII

En otro aspecto de la invención, en este documento se proporciona una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de acuerdo con las fórmulas (MI) o (MII). En una forma de realización, la sal farmacéuticamente aceptable es de un compuesto de acuerdo con las fórmulas (MI) o (MII).

Se describen los compuestos de las fórmulas (MI) y (MII) y las sales de los mismos. Por lo tanto, los compuestos (MI) - (MII) pueden estar presentes en forma de sales, tales como sales farmacéuticamente aceptables. Un compuesto de fórmula (MI) o (MII) puede estar en una forma aislada, aquí se engloban las composiciones que comprenden las formas aisladas. Un compuesto de fórmula (MI) o (MII) puede estar en una forma purificada, y las composiciones que comprenden un compuesto en forma purificada están detalladas en este documento.

Se proporciona una composición de un compuesto sustancialmente puro de acuerdo con las fórmulas (I), o una sal del mismo. En un aspecto, la composición es una composición sustancialmente pura del compuesto (MI) o (MII). Las composiciones sustancialmente puras en un aspecto contienen menos de aproximadamente cualquiera del 10 por ciento en peso o del 5 por ciento en peso o del 1 por ciento en peso de impurezas.

Por lo tanto, se proporcionan composiciones que comprenden un compuesto de la fórmula (MI) o (MII) o una sal del mismo, tales como composiciones de compuestos sustancialmente puros. En algunas formas de realización, una composición que contiene un compuesto de fórmula (MI) o (MII) o una sal del mismo está en una forma sustancialmente pura. En una variación, "sustancialmente pura" se refiere a una composición que contiene menos de aproximadamente el 35 % de impurezas, en la que la impureza representa un compuesto distinto al compuesto de la fórmula (MI) o (MII) o una sal de los mismos. En una variación, se proporciona una composición del compuesto sustancialmente puro de la fórmula (MI) o (MII) o una sal del mismo en la que la composición contiene menos de aproximadamente el 25 % de impurezas. En otra variación, se proporciona una composición del compuesto sustancialmente puro de la fórmula (MI) o (MII) o a sal del mismo en la que la composición contiene menos de aproximadamente el 20 % de impurezas. En otra variación más, se proporciona una composición del compuesto sustancialmente puro de la fórmula (MI) o (MII) o una sal del mismo en la que la composición contiene menos de aproximadamente el 10 % de impurezas. En una variación adicional, se proporciona la composición del compuesto sustancialmente puro de la fórmula (MI) o (MII) o una sal del mismo en la que la composición contiene menos de aproximadamente el 5 % de impurezas. En otra variación, se proporciona una composición del compuesto sustancialmente puro de la fórmula (MI) o (MII) o una sal del mismo en la que la composición contiene menos de aproximadamente el 3 % de impurezas. En otra variación más, se proporciona una composición del compuesto sustancialmente puro de la fórmula (MI) o (MII) o una sal del mismo en la que la composición contiene menos de aproximadamente el 1 % de impurezas. En una variación adicional, se proporciona una composición del compuesto sustancialmente puro de la fórmula (MI) o (MII) o una sal del mismo en la que la composición contiene menos de aproximadamente el 0,5 % de impurezas. En un aspecto, el % de impurezas se refiere al porcentaje de impurezas determinado como porcentaje en peso.

Se proporcionan composiciones farmacéuticas en las que la composición comprende un compuesto de la fórmula (MI) o (MII) o una sal del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto de la invención, en este documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de acuerdo con la fórmula (MI) o (MII) o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una forma de realización, con respecto a la composición farmacéutica, el vehículo o excipiente son adecuados para una administración parenteral. En una forma de realización, con respecto a la composición farmacéutica, el vehículo es adecuado para una administración oral. En una forma de realización, con respecto a la composición farmacéutica, el vehículo es adecuado para una administración tópica.

En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende un compuesto de acuerdo con la fórmula (MI) o (MII). En otro aspecto, la composición farmacéutica está exenta de un compuesto de acuerdo con las fórmulas (MIII), (MIV) o (MV).

En una forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica de una forma sustancialmente pura del compuesto de acuerdo con las fórmulas (MI) o (MII).

Un compuesto de la fórmula (I) puede formularse con vehículos adecuados para cualquier vía de administración disponible, incluyendo una administración por vía oral, mucosal (por ejemplo, nasal, sublingual, vaginal, bucal o rectal), parenteral (por ejemplo, intramuscular, subcutánea o intravenosa), tópica o transdérmica. Un compuesto de la fórmula (I) puede formularse con vehículos adecuados para proporcionar formas de administración que incluyen, pero no se limitan a: comprimidos, capsuletas, cápsulas (tales como cápsulas de gelatina dura y cápsulas elásticas de gelatina blanda), obleas, trociscos, tabletas, gomas, dispersiones, supositorios, ungüentos, cataplasmas (apósitos), pastas, polvos, apósitos, cremas, soluciones, parches, aerosoles (por ejemplo, pulverizadores o inhaladores nasales), geles, suspensiones (por ejemplo, suspensiones líquidas acuosas o no acuosas, emulsiones de aceite en agua o emulsiones líquidas de agua en aceite), soluciones y elixires.

Una formulación farmacéutica puede prepararse mediante la combinación de un compuesto de la fórmula (I) como principio activo con un vehículo farmacológicamente aceptable, que son conocidos en la técnica. Dependiendo de la forma terapéutica del sistema (por ejemplo, comprimido oral), el vehículo puede estar en varias formas. Además, las preparaciones farmacéuticas pueden contener conservantes, solubilizantes, estabilizantes, agentes rehumectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, ajustadores, tampones, agentes de recubrimiento o antioxidantes. Las preparaciones que contienen un compuesto de la fórmula (I) como principio activo también pueden contener otras sustancias que tengan unas propiedades terapéuticas valiosas. Las formas terapéuticas pueden estar representadas por una dosis estándar habitual y pueden prepararse mediante un método farmacéutico conocido. Algunas formulaciones adecuadas pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 21<sup>a</sup> ed. (2005), que se incorpora al presente documento como referencia.

La cantidad de un compuesto de la fórmula (I) en una composición farmacéutica u otra, incluyendo una forma de dosificación unitaria, puede ser una cantidad eficaz. En una variación, una composición, tal como una composición farmacéutica, comprende un compuesto de la fórmula (I) en una forma de dosificación en una cantidad de entre aproximadamente 10 ng y aproximadamente 1.500 mg o más.

Se proporcionan artículos de elaboración que comprenden un compuesto de la invención, o una sal o un solvato del mismo, en un recipiente apropiado. El recipiente puede ser un vial, un tarro, una ampolla, y similares.

Los métodos y los kits en este documento pueden comprender un compuesto según se detalla en este documento, o una sal o un solvato del mismo, al igual que si todas y cada una de las formas de realización fueran enumeradas específicamente e individualmente. Asimismo, el método y los kits proporcionados en este documento pueden comprender una composición según se detalla en este documento, tal como una composición farmacéutica, al igual que si todas y cada una de las formas de realización fueran enumeradas específicamente e individualmente.

### **Métodos**

Los compuestos de la fórmula (I) (es decir, los compuestos (MI) - (MII)) son activos sobre uno o más objetivos moleculares, y por lo tanto pueden hallar uso en terapia. Los compuestos (MI) - (MII), o una sal o un solvato de los mismos, pueden usarse para modular un receptor de las Tablas 5 y 9, y los métodos de modulación de dicho receptor están englobados en este documento.

Se proporciona el uso en un método de terapia que comprende la administración de un compuesto de fórmula (I), o una sal o un solvato del mismo, o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anteriores, a un individuo. En una variación, el método comprende la administración de un compuesto de fórmula (MI) o (MII) a un individuo en una cantidad eficaz para modular un receptor, tal como un receptor indicado en las Tablas 5 y 9. En un aspecto, un método de modulación del transportador de norepinefrina en un individuo comprende la administración de un compuesto de la fórmula (MI), o de una sal o un solvato del mismo, al individuo. En otro aspecto, un método de modulación del receptor de la progesterona en un individuo comprende la administración de un compuesto de la fórmula (MII), o de una sal o un solvato del mismo, al individuo.

En algunas formas de realización, un compuesto según se describe en este documento que modula un receptor (un modulador de receptor) inhibe la unión de un ligando en al menos aproximadamente o en aproximadamente uno cualquiera del 10 %, del 20 %, del 30 %, del 40 %, del 50 %, del 60 %, del 70 %, del 80 %, del 90 %, del 95 % o del 100 % según se determina en los ensayos descritos en este documento. En algunas formas de realización, el modulador del receptor reduce una actividad de un receptor en al menos aproximadamente o en aproximadamente cualquiera del 10 %, del 20 %, del 30 %, del 40 %, del 50 %, del 60 %, del 70 %, del 80 %, del 90 %, del 95 % o del 100 % en comparación con la correspondiente actividad en el mismo sujeto antes del tratamiento con el modulador del receptor, o en comparación con la correspondiente actividad en otros sujetos que no reciben el modulador del receptor. En algunas formas de realización, el modulador del receptor mejora la actividad de un receptor en al menos aproximadamente o en aproximadamente cualquiera del 10 %, del 20 %, del 30 %, del 40 %, del 50 %, del 60 %, del 70 %, del 80 %, del 90 %, del 95 % o del 100 % o del 200 % o del 300 % o del 400 % o del 500 % o más en comparación con la correspondiente actividad en el mismo sujeto antes del tratamiento con el modulador del receptor, o en comparación con la correspondiente actividad en otros sujetos que no reciben el modulador del receptor. En algunas formas de realización, el modulador del receptor es capaz de unirse al sitio activo de un receptor (por ejemplo, un sitio de unión para un ligando). En algunas formas de realización, el modulador del

receptor es capaz de unirse a un sitio alostérico de un receptor.

5 En otro aspecto de la invención, en este documento se proporciona un compuesto de acuerdo con las fórmulas (MI) o (MII), o una sal del mismo, o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anteriores, para su uso en un método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad o afección divulgado en este documento en un individuo, que comprende la administración al individuo de una cantidad eficaz de dicho compuesto, sal o composición.

10 En otro aspecto de la invención, en este documento se proporciona un compuesto de acuerdo con las fórmulas (MI) o (MII), o una sal del mismo, o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anteriores, para su uso en un método para el tratamiento del cáncer de próstata que comprende la administración a un individuo en necesidad del mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto, sal o composición.

15 En una forma de realización, con respecto al uso en un método de tratamiento, la enfermedad o la afección se elige de entre la enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer. Por lo tanto, en una forma de realización, el uso es en un método para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. En otra forma de realización, el uso es en un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

20 En una forma de realización en particular, se proporciona un compuesto de la fórmula (MI), o una sal o un solvato del mismo, o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anteriores, para su uso en un método para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, en el que el método comprende la administración a un individuo en necesidad del mismo de dicho compuesto, sal, solvato o composición. En otra forma de realización, se proporciona un compuesto de la fórmula (MI), o una sal o un solvato del mismo, o una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anteriores para su uso en un método para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, en el que el método comprende la administración a un individuo en necesidad del mismo de dicho compuesto, sal, solvato o composición

30 También se proporciona un compuesto de la fórmula (I), o una sal o un solvato del mismo, para su uso en un método para el tratamiento del cáncer de próstata, de la alopecia, del carcinoma hepatocelular o del acné vulgar, en el que el método comprende la administración a un individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto, sal o solvato. En un aspecto, el uso comprende la administración de un compuesto de la fórmula (MI) o (MII). En una forma de realización, el uso es un método para el tratamiento del cáncer de próstata. En otra forma de realización, el uso es un método para el tratamiento de la alopecia. En otra forma de realización más, el uso es un método para el tratamiento del carcinoma hepatocelular. Aun en otra forma de realización, el uso es un método para el tratamiento del acné vulgar.

40 En una variación en particular, se proporciona un compuesto de la fórmula (MI), o una sal o un solvato del mismo, para su uso en un método para el tratamiento del cáncer de próstata, de la alopecia, del carcinoma hepatocelular o del acné vulgar, en el que el método comprende la administración a un individuo de dicho compuesto, sal o solvato. En otra variación se proporciona un compuesto de la fórmula (MII), o una sal o un solvato del mismo, para su uso en un método para el tratamiento del cáncer de próstata, de la alopecia, del carcinoma hepatocelular o del acné vulgar, en el que el método comprende la administración a un individuo de dicho compuesto, sal o solvato.

45 En otra variación, se proporciona un método de control de la natalidad para un individuo femenino, en el que el método comprende la administración de un compuesto de la fórmula (MII) al individuo. En una variación, el compuesto se administra al individuo en una cantidad para evitar el embarazo. En otra variación, se proporciona un compuesto de la fórmula (MII) para su uso en un método abortivo. En una variación, se administra el compuesto (MII) a un individuo femenino que está embarazada. En otra variación, se administra el compuesto (MII) a un individuo femenino que no está embarazada.

50 En una variación adicional, se proporciona el uso en un método para el tratamiento de un trastorno por déficit de atención.

55 En cualquiera de los métodos proporcionados, en un aspecto, el individuo es un ser humano.

60 En una forma de realización, el tratamiento de una enfermedad o afección con un compuesto de la invención o con una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, no está acompañado o tiene menos efectos secundarios que los asociados con las terapias disponibles actualmente para la enfermedad o afección y/o mejora la calidad de vida del individuo.

65 Un régimen de tratamiento que implique un compuesto de la fórmula (I) puede implicar la administración del compuesto a un individuo, tal como un ser humano, en una dosis de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, al menos una vez al día y durante el periodo de tiempo requerido para conseguir el efecto terapéutico. En otras variaciones, la dosis diaria (u otra frecuencia de dosificación) de un compuesto de la fórmula (I) es de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 8 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 6 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 4 mg/kg;

- o de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 2 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 1 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,03 y aproximadamente 10 mg/kg; o de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10 mg/kg; o de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10 mg/kg; o de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 mg/kg; o de entre aproximadamente 6 y aproximadamente 10 mg/kg; o de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 10 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 4 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 5 mg/kg; o de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 mg/kg; o de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 4 mg/kg; o de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4 mg/kg; o de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 mg/kg; o de entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 3 mg/kg; o de entre aproximadamente 2 y aproximadamente 3 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,03 y 4 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,03 mg/kg y 2 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,05 y 10 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,05 y 8 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,05 y 4 mg/kg; o de entre aproximadamente 0,05 y aproximadamente 3 mg/kg; o de entre aproximadamente 10 kg y aproximadamente 50 kg; o de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 mg/kg o de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 250 mg/kg; o de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 mg/kg o de entre aproximadamente 50 y 200 mg/kg; o de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 mg/kg o de entre aproximadamente 200 y aproximadamente 500 mg/kg; o una dosis por encima de aproximadamente 100 mg/kg; o una dosis por encima de aproximadamente 500 mg/kg.
- 20 Un compuesto de la fórmula (I) puede ser administrado a un individuo de acuerdo con un régimen de dosificación eficaz durante un periodo de tiempo o duración deseados, tal como al menos durante aproximadamente una semana, al menos durante aproximadamente 2 semanas, al menos durante aproximadamente tres semanas, al menos durante aproximadamente un mes, al menos durante aproximadamente 2 meses, al menos durante aproximadamente 3 meses, al menos durante aproximadamente 6 meses o al menos durante aproximadamente 12 meses o más. En una variación, un compuesto de la fórmula (I) se administra a un individuo con un esquema diario o intermitente durante la duración de la vida del individuo.

La frecuencia de dosificación de un compuesto de la fórmula (I) puede ser de aproximadamente una dosificación de una vez por semana. La frecuencia de dosificación de un compuesto de la fórmula (I) puede ser de aproximadamente una dosificación de una vez al día, una dosificación de dos veces al día o una dosificación de tres veces al día. La frecuencia de dosificación de un compuesto de la fórmula (I) puede ser de aproximadamente una dosificación de tres veces a la semana o una dosificación de aproximadamente cuatro veces por semana o puede ser una dosificación de aproximadamente dos veces por semana. La frecuencia de dosificación de un compuesto de la fórmula (I) puede ser mayor de aproximadamente una dosificación de una vez por semana, pero menor de aproximadamente una dosificación de una vez al día. La frecuencia de dosificación de un compuesto de la fórmula (I) puede ser de aproximadamente una dosificación de una vez al mes. La frecuencia de dosificación de un compuesto de la fórmula (I) puede ser de aproximadamente una dosificación de dos veces por semana. La frecuencia de dosificación de un compuesto de la fórmula (I) puede ser mayor de aproximadamente una dosificación de una vez al mes pero menor de aproximadamente una dosificación de una vez por semana. La frecuencia de dosificación de un compuesto de la fórmula (I) puede ser intermitente (por ejemplo, una dosificación de una vez al día durante 7 días seguido de ninguna dosis durante 7 días, repetido durante cualquier período de tiempo de 14 días, tal como durante aproximadamente 2 meses, durante aproximadamente 4 meses, durante aproximadamente 6 meses o más). La frecuencia de dosificación de un compuesto de la fórmula (I) puede ser continua (por ejemplo, una dosificación de una vez por semana durante semanas continuas). Cualquiera de las secuencias de dosificación puede emplear cualquiera de los compuestos descritos en este documento, o una sal o un solvato de los mismos, junto con cualquiera de las dosis descritas en este documento.

### **Kits**

- 50 La invención también proporciona kits que comprenden un compuesto de fórmula (I). Los kits pueden incluir opcionalmente un conjunto de instrucciones, generalmente instrucciones escritas, aunque también es aceptable cualquier medio de almacenamiento (por ejemplo, un disquete magnético o un disco óptico) que contenga las instrucciones. Las instrucciones incluidas en el kit incluyen generalmente la información relativa a los componentes y a su administración a un individuo, tal como la información relativa a la dosis, el esquema de dosificación y la vía de administración. En algunas formas de realización, el kit incluye (a) un compuesto de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y (b) instrucciones para su uso en una afección o trastorno descrito en este documento, tal como el cáncer de próstata, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Los kits pueden usarse para uno cualquiera o más de los usos descritos en este documento, y, consecuentemente, pueden contener destrucciones para uno cualquiera o más de los usos establecidos (por ejemplo, el tratamiento y/o la prevención y/o el retraso de la aparición y/o del desarrollo de cualquier indicación divulgada en este documento).

En algunas formas de realización, la cantidad del compuesto de la fórmula (I) en un kit es una cantidad suficiente para producir un resultado terapéutico deseado (por ejemplo, la reducción de la gravedad o de la duración, la estabilización de la gravedad, o la eliminación, de uno o más síntomas de una indicación que se va a tratar).

65

Los kits comprenden generalmente un envase adecuado. Los kits pueden comprender uno o más recipientes que comprenden cualquiera de los compuestos descritos en este documento. Algunos envases adecuados incluyen, pero no se limitan a, viales, frascos, tarros, envases flexibles (por ejemplo, bolsas de plástico), y similares. Cada componente (cuando hay más de un componente) puede estar envasado en recipientes individuales, o alguno de los componentes puede estar combinado en un recipiente cuando la reactividad cruzada y la vida de almacenamiento lo permitan. Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como excipientes.

Los recipientes pueden ser formas de dosificación unitarias, envases a granel (por ejemplo, envases multidosis) o dosis subunitarias. Por ejemplo, pueden proporcionarse kits que contengan unas dosis suficientes de un compuesto de fórmula (I) para proporcionar un tratamiento eficaz de un individuo con una indicación que se va a tratar durante un periodo prolongado, tal como cualquiera de una semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, 8 semanas, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses o más. Los kits también pueden incluir múltiples dosis unitarias de los compuestos e instrucciones para su uso, y estar envasados en cantidades suficientes para su almacenamiento y uso en farmacias (por ejemplo, en farmacias hospitalarias y en farmacias magistrales).

#### *Métodos de preparación y aislamiento de los compuestos de la invención*

Los métodos sintéticos para generar compuestos de diarilhidantoína se describen en las Publicaciones de EE.UU. N<sup>os</sup> 2007/0004753, 2007/0254933 y 2009/0111864. Los compuestos (MI) - (MV) también pueden ser elaborados de acuerdo con los métodos detallados en los Ejemplos de este documento.

Los siguientes Ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención.

#### Ejemplo 1. Aislamiento e identificación de los compuestos a partir de plasma de rata

Se aislaron los metabolitos del RD162' y se identificaron en muestras plasmáticas en estado estacionario a partir del grupo de dosis altas de un estudio de toxicología oral de 26 semanas con ratas Sprague Dawley machos y hembras.

Las muestras de plasma de rata se almacenaron aproximadamente a -20 °C o más frío. Las muestras se obtuvieron a partir de sujetos que recibían el RD162'. Las muestras de estudio se prepararon para una inyección de HPLC mediante la precipitación de cada muestra (100 µl) con un volumen de 3x (300 µl) de acetonitrilo. Las muestras se centrifugaron a 16.000 g durante 5 min. Después de la centrifugación se transfirieron 380 µl de cada sobrenadante a un tubo nuevo y se evaporaron a sequedad en una Speed-Vac. Las muestras evaporadas fueron reconstituidas con 50 µl de ácido fórmico al 0,2 % en agua.

Las muestras se analizaron mediante el uso de las siguientes condiciones de CL/EM/EM: HPLC: sistema Shimadzu VP; fase móvil: ácido fórmico al 0,2 % en agua (A) y ácido fórmico al 0,15 % en metanol (B); columna: columna de 1 x 50 mm TITAN C18 (Peeke Scientific); volumen de inyección: 20 µl; gradiente: 5 - 75 % de B en 30 min; caudal: 100 µl/min; espectrómetro de masas: Applied Biosystems/MDS SCIEX Q-STAR; interfase: división por IonSpray a ~ 1/10; escáner del ión parental: TOF positivo desde 100 - 900 amu; escáner del ión producto: TOF del ión producto desde 60 - 900 amu del ión más intenso del escáner de ión parental; calibración del TOF: calibrado externamente mediante el uso de sustrato de renina.

Las muestras se prepararon para su inyección y se analizaron el mismo día. La Tabla 1 resume los resultados de este análisis.

**Tabla 1. Resumen de los metabolitos del RD162' identificados mediante CL/EM/EM en muestras de plasma de rata**

Nombre	TR (min)	Compuesto o Metabolito (m/z)	Nº de áreas de pico de EM del animal (tiempo de muestra TK)		
			1591 (2 h)	1590 (8 h)	1709 (8 h)
RD 162'	26,0	465	5,9 e <sup>5</sup>	4,0 e <sup>5</sup>	1,1 e <sup>6</sup>
(MI)	27,8	452	1,3 e <sup>4</sup>	1,0 e <sup>4</sup>	1,8 e <sup>4</sup>
(MII)	25,1	451	7,5 e <sup>3</sup>	4,2 e <sup>3</sup>	1,2 e <sup>4</sup>

#### Ejemplo 2. Aislamiento e identificación de los compuestos en plasma de perro

Se aislaron los metabolitos del RD162' y se identificaron en muestras plasmáticas en estado estacionario a partir del grupo de dosis altas de un estudio de toxicología oral de 13 semanas con perros Beagle macho.

Las muestras de plasma de perro se almacenaron aproximadamente a -20 °C o más frío. Las muestras se obtuvieron a partir de sujetos que recibían el RD162'. Las muestras de estudio se prepararon para una inyección de HPLC mediante la precipitación de cada muestra (100 µl) con un volumen de 3x (300 µl) de acetonitrilo. Las muestras se centrifugaron a 16.000 g durante 5 min. Después de la centrifugación se transfirieron 380 µl de cada

sobrenadante a un tubo nuevo y se evaporaron a sequedad en una Speed-Vac. Las muestras evaporadas fueron reconstituidas con 50 µl de ácido fórmico al 0,2 % en agua.

5 Las muestras se analizaron mediante el uso de las siguientes condiciones de CL/EM/EM: HPLC: sistema Shimadzu VP; fase móvil: ácido fórmico al 0,2 % en agua (A) y ácido fórmico al 0,15 % en metanol (B); columna: columna de 1 x 50 mm TITAN C18 (Peeke Scientific); volumen de inyección: 20 µl; gradiente: 5 - 75 % de B en 30 min; caudal: 100 µl/min; espectrómetro de masas: Applied Biosystems/MDS SCIEX Q-STAR; interfase: división por IonSpray a ~ 1/10; escáner del ión parental: TOF positivo desde 100 - 900 amu; escáner del ión producto: TOF del ión producto desde 60 - 900 amu del ión más intenso del escáner de ión parental; calibración del TOF: calibrado externamente mediante el uso de sustrato de renina.

Las muestras se prepararon para su inyección y se analizaron el mismo día. La Tabla 2 resume los resultados de este análisis.

15 **Tabla 2. Resumen de los metabolitos del RD162' identificados mediante CL/EM/EM en muestras de plasma de perro**

Nombre	TR (min)	Compuesto o Metabolito (m/z)	Nº de áreas de pico de EM del animal (tiempo de muestra TK)			
			119 (2 h)	119 (4 h)	123 (2 h)	123 (4 h)
RD 162'	26,0	465	6,3 e <sup>5</sup>	3,1 e <sup>5</sup>	3,8 e <sup>5</sup>	4,2 e <sup>5</sup>
(MI)	27,8	452	5,6 e <sup>4</sup>	5,6 e <sup>4</sup>	2,5 e <sup>4</sup>	2,4 e <sup>4</sup>
(MII)	25,1	451	7,5 e <sup>3</sup>	2,7 e <sup>3</sup>	5,8 e <sup>3</sup>	5,1 e <sup>3</sup>

Ejemplo 3. Aislamiento e identificación de los compuestos en plasma humano

20 Se aislaron los metabolitos del RD162' y se identificaron en muestras plasmáticas en estado estacionario a partir de pacientes con cáncer de próstata que tomaban RD162'. Las muestras humanas en estado estacionario consistían en cinco muestras de C<sub>máx</sub> que se obtuvieron aproximadamente el Día 84 de tratamiento a 240 mg/día.

25 Las muestras de plasma humano plasma se almacenaron aproximadamente a -20 °C o más frío. Las muestras se obtuvieron a partir de sujetos que recibían el RD162'. Las muestras de estudio se prepararon para una inyección de HPLC mediante la precipitación de cada muestra (100 µl) con un volumen de 3x (300 µl) de acetonitrilo. Las muestras se centrifugaron a 16.000 g durante 5 min. Después de la centrifugación se transfirieron 380 µl de cada sobrenadante a un tubo nuevo y se evaporaron a sequedad en una Speed-Vac. Las muestras evaporadas fueron reconstituidas con 50 µl de ácido fórmico al 0,2 % en agua.

30 Las muestras se analizaron mediante el uso de las siguientes condiciones de CL/EM/EM: HPLC: sistema Shimadzu VP; fase móvil: ácido fórmico al 0,2 % en agua (A) y ácido fórmico al 0,15 % en metanol (B); columna: columna de 1 x 50 TITAN C18 (Peeke Scientific); volumen de inyección: 20 µl; gradiente: 5 - 75 % de B en 30 min; caudal: 100 µl/min; espectrómetro de masas: Applied Biosystems/MDS SCIEX Q-STAR; interfase: división por IonSpray a ~ 1/10; escáner del ión parental: TOF positivo desde 100 - 900 amu; escáner del ión producto: TOF del ión producto desde 60 - 900 amu del ión más intenso del escáner de ión parental; calibración del TOF: calibrado externamente mediante el uso de sustrato de renina.

40 Las muestras se prepararon para su inyección y se analizaron el mismo día. La Tabla 3 resume los resultados de este análisis.

**Tabla 3. Resumen de los metabolitos del RD162' identificados mediante CL/EM/EM en muestras de plasma humano**

Nombre	TR (min)	Compuesto o Metabolito (m/z)	ID de áreas de pico de EM del sujeto (tiempo de muestra PK)				
			3478 (1 h)	1473 (1 h)	3475 (1 h)	1472 (1 h)	3454 (2 h)
RD 162'	26,0	465	6,4 e <sup>5</sup>	6,3 e <sup>5</sup>	5,0 e <sup>5</sup>	5,4 e <sup>5</sup>	5,7 e <sup>5</sup>
(MI)	27,8	452	3,8 e <sup>4</sup>	4,5 e <sup>4</sup>	2,5 e <sup>4</sup>	5,4 e <sup>4</sup>	6,2 e <sup>4</sup>
(MII)	25,1	451	1,7 e <sup>5</sup>	1,6 e <sup>5</sup>	1,5 e <sup>5</sup>	1,5 e <sup>5</sup>	1,6 e <sup>5</sup>

45 Ejemplo 4: cuantificación de los compuestos en plasma humano

Para estimar las concentraciones de los metabolitos en plasma humano, se cualificaron y usaron ensayos de CL/EM/EM para (MI) y (MII) para analizar el plasma de 18 pacientes de cáncer de próstata que habían recibido RD162' a entre 150 y 480 mg al día durante aproximadamente tres meses. Los resultados de este análisis (Tabla 4) demostraron que (MI) y (MII) estaban presentes en elevadas concentraciones en el plasma.

**Tabla 4. Concentraciones de los metabolitos del RD162' en el plasma de pacientes tratados con RD162' durante al menos tres meses**

Resumen estadístico de los resultados de 18 pacientes	Concentraciones en el plasma de los pacientes expresadas como un porcentaje de la concentración de RD162'	
	(MI)	(MII)
Mínimo	16 %	49 %
Máximo	259 %	204 %
Promedio	60 %	112 %

5 El método usado para derivar los datos anteriores fue como sigue. Ensayo de CL/EM/EM por electropulverización de los metabolitos del RD162' ( (MI), (MII)):

10 Procedimientos de extracción del plasma para las determinaciones de concentración: se añadió una muestra de plasma humano (50 µl) a un tubo de vidrio de 10 ml. Al tubo se añadió un volumen de solución madre de 10 µl de IS, seguido de la adición de tampón de fosfato 1 M a pH 3,0 (400 µl). La mezcla se agitó vorticialmente y se añadió tetrabutil metil éter (5 ml). El tubo se agitó vorticialmente durante 30 s y después se centrifugó a 4540 g durante 10 min. El disolvente se transfirió a un tubo de vidrio y se secó bajo un flujo de aire a 35 - 40 °C. La muestra se reconstituyó con 100 µl de metanol: ácido fórmico al 0,1 % en agua (7:3) se agitó vorticialmente durante 30 s y se trató con ultrasonidos durante 5 min, La muestra se transfirió a un vial de muestras para HPLC y se centrifugó a 4.540 g durante 5 min; después se inyectó un volumen de 20 µl en un sistema de CL/EM/EM para el ensayo.

15 Parámetros de la CL/EM/EM para los metabolitos del RD162' (MII): parámetros del instrumento en modo de ión positivo - función 1; polaridad: ES+; tipo de datos: datos MRM; tipo de función: MRM del canal 5 al 8

Canal	Reacción	Reposo (s)	Voltaje del cono	Energía de col.	Compuesto
5	451,25 > 178,30	0,05	55,0	35,0	(MII)
6	451,25 > 195,40	0,05	55,0	27,0	(MII)
7	469,30 > 213,40	0,05	50,0	27,0	patrón interno de D4-RD 162'
8	469,30 > 384,40	0,05	50,0	27,0	patrón interno de D4-RD 162'

20 Condiciones iniciales de la bomba de CL HP1100: columna de HPLC: ACE C18, 5 µM, de 150 x 2,1 mm id, disolventes: % de A, 40,0; % de B, 60,0; % de C, 0,0; % de D, 0,0; válvula A ajustada al canal 1; válvula B ajustada al canal 1, Flujo: 0,300 ml/min; tiempo de detención: 9,0 min; presión mínima: 0 bar; presión máxima: 300 bar; temperatura del horno a la izquierda: 30,0 °C; temperatura del horno a la derecha: 30,0 °C.

25 Cronograma de gradiente de la bomba de CL HP1100:

Tiempo	% de A	% de B	% de C	% de D	Caudal (ml/min)	Presión
0,00	40,0	60,0	0,0	0,0	0,300	300
1,50	40,0	60,0	0,0	0,0	0,300	300
1,60	10,0	90,0	0,0	0,0	0,300	300
3,50	10,0	90,0	0,0	0,0	0,300	300
3,60	40,0	60,0	0,0	0,0	0,300	300

Parámetros de la CL/EM/EM para el metabolito del RD162' (MI)

30 Parámetros del instrumento - función 1; polaridad: ES-; tipo de datos: datos MRM; tipo de función: MRM de 5 canales.

Canal	Reacción	Reposo (s)	Voltaje del cono	Energía de col.	Compuesto
1	373,30 > 315,20	0,05	50,0	35,0	Fenilcumarina IS
2	373,30 > 343,30	0,05	50,0	25,0	Fenilcumarina IS
3	373,30 > 358,30	0,05	50,0	25,0	Fenilcumarina IS
4	450,20 > 158,00	0,05	30,0	30,0	(MI)
5	450,20 > 406,30	0,05	30,0	15,0	(MI)

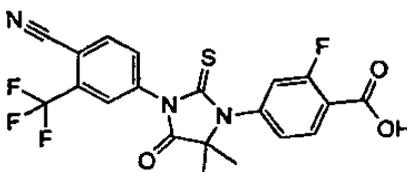
Columna de HPLC: ACE C18, 5  $\mu$ m de 150 x 2.1 mm id; modo de la bomba de CL HP1 100: isocrático; condiciones del disolvente en isocrático % de A, 25,0; % de B, 75,0; % de C, 0,0; % de D, 0,0; válvula A ajustada al canal 1; válvula B ajustada al canal 1; Flujo: 0,300 ml/min; tiempo de detención: 4,5 min; presión mínima: 0 bar; presión máxima: 300 bar; temperatura del horno a la izquierda: 30,0 °C; temperatura del horno a la derecha: 30,0 °C.

5

### Síntesis de los compuestos de la invención

Ejemplo 5. Preparación del ácido 4- (3- (4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-oxo-2-tioximidazolidin-1-il)-2-fluorobenzoico (Compuestos (MI)):

10



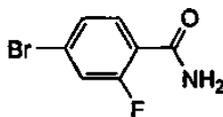
Se suspendió 4-(3-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-oxo-2-tioximidazolidin-1-il)-2-fluoro-N-metilbenzamida en HCl concentrado y se calentó a 120 °C en un recipiente a presión durante 48 h. La reacción se controló mediante una cromatografía en capa fina (TLC). La mezcla de reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente. El residuo se filtró y se purificó mediante una cromatografía sobre gel de sílice (100 - 200 de malla. eluyente: 0 - 5 % de metanol - diclorometano). EM (m/z): 452 (M+1). HPLC: columna YMC ODS AQ. de 4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m. Fase móvil A: acetato de amonio 10 mM. Fase móvil B: acetonitrilo. Gradiente isocrático: 55 % de A:45 % de B. Tiempo de retención: 3,804 min. Pureza mediante HPLC: 95,82 %. Caudal: 1 ml/min. RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, base libre):  $\delta$  (ppm) 8,22 (t, 1H), 8,0 (d, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,82 (d, 1H), 7,2 (m, 2H) 1,6 (s, 6H).

15

20

Ejemplo 6. Preparación de 4-(3-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-oxo-2-tioximidazolidin-1-il)-2-fluorobenzamida (Compuesto (MII)):

25 Ejemplo 6a. Preparación de 4-bromo-2-fluorobenzamida:

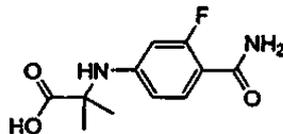


A una solución agitada de ácido 4-bromo-2-fluorobenzoico (1,5 g, 6,84 mmol) en DCM (15 ml) se añadió gota a gota cloruro de oxalilo (3,45 g, 27,39 mmol) a 0 °C. Después de que se completara la adición, se añadieron 2 - 3 gotas de DMF a 0 °C y la mezcla de reacción se agitó durante 2 h a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y el residuo se disolvió en THF seco (20 ml). A esta solución se añadió amoniaco acuoso (50 ml) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a y se agitó a la temperatura ambiente durante 30 min. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se destiló azeotrópicamente con tolueno para obtener 1,3 g de producto. RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, base libre):  $\delta$  (ppm) 8,0 (t, 1H), 7,40 (d, 1H), 7,30 (d, 1H), 6,60 (s a, 1H), 5,9 (s a, 1H).

30

35

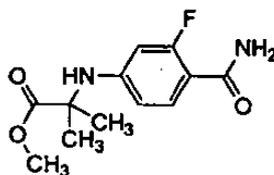
Ejemplo 6b. Preparación del ácido 2- (4-carbamoil-3-fluorofenilamino)-2-metilpropanoico:



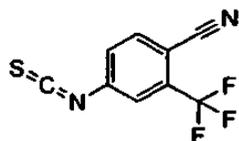
Se mezclaron 4-bromo-2-fluorobenzamida (0,5 g, 2,29 mmol), ácido 2-aminoisobutírico (0,354 g, 3,54 mmol), CUI (87 mg, 0,458 mmol) y K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,790 g, 5,72 mmol) en DMF (5 ml), se añadieron H<sub>2</sub>O (0,5 ml) y TEA (11 mg, 0,1 mmol) seguido de 2-acetil ciclohexanona (60 mg, 0,428 mmol). La mezcla de reacción se calentó a 95 - 100 °C durante 48 h. La mezcla de reacción se diluyó con H<sub>2</sub>O (20 ml) y la capa acuosa se lavó con acetato de etilo (20 ml). La capa acuosa se acidificó con ácido cítrico 1 M a pH 4 y el producto se extrajo con acetato de etilo (20 ml x 3). La capa orgánica combinada se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a presión reducida para obtener el producto. RMN-<sup>1</sup>H (DMSO, base libre):  $\delta$  (ppm) 7,55 - 7,45 (t, 1H), 7,20 (s a, 1H), 7,05 (s a, 1H), 6,80 (s a, 1H), 6,35 - 6,30 (d, 1H), 6,18 - 6,10 (d, 1H), 1,42 (s, 6H).

40

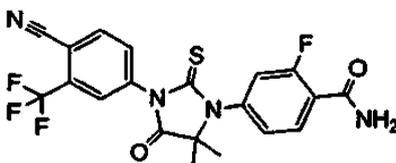
45

Ejemplo 6c. Preparación de 2-(4-carbamoil-3-fluorofenilamino)-2-metilpropanoato de metilo:

- 5 Se agitó una solución de ácido 2-(4-carbamoil-3-fluorofenilamino)-2-metilpropanoico y  $K_2CO_3$  (1,5 equivalentes) en DMF (10 veces) a la TA durante 10 min. Se añadió MeI (1,5 equivalentes) y la mezcla de reacción se calentó a 55 - 60 °C durante 2 h. El disolvente se eliminó a presión reducida y la mezcla de reacción se vertió en agua, se extrajo con acetato de etilo (100 ml x 2), se secó sobre  $Na_2SO_4$ , se concentró y se purificó mediante una cromatografía en columna. RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , base libre):  $\delta$  (ppm) 7,9 (t, 1H), 6,5 (s a, 1H), 6,4 (d, 1H), 6,2 (d, 1H), 5,6 (s a, 1H), 4,6 (s a, 1H), 3,75 (s, 3H), 1,6 (s, 6H).

Ejemplo 6d. Preparación de 4-isotiocianato-2-(trifluorometil) benzonitrilo:

- 15 Se disolvió tiosfogeno (10 g, 87,71 mmol) en agua y se agitó a la temperatura ambiente durante 10 min. Se añadió en porciones 4-amino-2-trifluorometil-benzonitrilo a la temperatura ambiente. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura ambiente durante 2 h. El producto se extrajo con diclorometano y la capa orgánica se lavó con agua y salmuera, se secó sobre sulfato de sodio y se evaporó para obtener 12 g de producto. RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  (ppm) 7,84 (d, 1H), 7,58 (s, 1H), 7,48 (d, 1H).

Ejemplo 6e. Preparación de 4-(3-(4-ciano-3-(trifluorometil)fenil)-5,5-dimetil-4-oxo-2-tioximidazolidin-1-il)-2-fluorobenzamida (Compuesto (MII)):

- 25 Se calentó una solución de 2-(4-carbamoil-3-fluorofenilamino)-2-metilpropanoato de metilo y 2-(trifluorometil)-4-isotiocianatobenzonitrilo (1,5 equivalentes) en DMSO seco (5 ml por mmol) a 80 - 82 °C durante 12 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo. La capa orgánica combinada se concentró a presión reducida y el residuo se purificó mediante una cromatografía sobre gel de sílice eluyendo con un 40 % de acetona - hexanos. EM (m/z): 451 (M+1). HPLC: columna YMC ODS A, de 4,6 x 150 mm, 5  $\mu m$ . Fase móvil A: acetato de amonio 10 mM. Fase móvil B: Acetonitrilo. Gradiente: 10 % de B hasta 2 min, del 10 % al 90 % de B en 3 min, mantener durante 3 min, del 90 % al 10 % de B en 5 min. Tiempo de retención: 2,782 min. Pureza mediante HPLC: 99,4 %. Caudal: 1 ml/min. RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ , base libre):  $\delta$  (ppm) 8,3 (t, 1H), 8,0 (d, 1H) 7,98 (s, 1H), 7,8 (d, 1H), 7,27 (d, 1H), 7,2 (d, 1H), 6,65 (d, 1H), 6,0 (s, 1H), 1,62 (s, 6H).

Actividad biológica de los compuestos de ensayo

- 35 Los siguientes ejemplos ilustran la actividad biológica de los compuestos (MI) - (MII). Los ensayos habituales de unión y enzimáticos, tales como los descritos a continuación, pueden ser llevados a cabo por profesionales tales como, por ejemplo. Cerep. Inc. (Redmond, WA. EE.UU.); MDS Pharma Services (King of Prussia, PA. EE.UU.); NovaScreen Biosciences/Caliper Life Sciences (Mountain View, CA. EE.UU.); y EuroScreen FAST (Gosselies, Bélgica).

## Definiciones:

- 45 En los siguientes ejemplos se usan las siguientes abreviaturas de receptores: adenosina para  $A_1$ ,  $A_{2a}$  y  $A_3$ ; adrenérgico para  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ; angiotensina para  $AT_1$  y  $AT_2$ ; benzodiazepina para BZD; bradicinina para  $B_1$  y  $B_2$ ; cannabinoide para  $CB_1$  y  $CB_2$ ; colecistocinina para  $CCK_1$  y  $CCK_2$ ; factor liberador de corticotropina para  $CRF_1$ ; dopamina para  $D_1$ ,  $D_{2s}$ ,  $D_3$ ,  $D_{4.4}$ ; endotelina para  $ET_A$  y  $ET_B$ ; ácido gamma-aminobutírico para GABA; ácido gamma-aminobutírico ionótrofo para  $GABA_A$ ; propionato de alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol para AMPA; ácido N-metil-D-aspartico para NMDA; histamina para  $H_1$ ,  $H_2$  y  $H_3$ ; leucotrieno para  $LTB_4$  y  $LTD_4$ ; hormona liberadora de

gonadotropinas para GnRH; melanocortina para MC<sub>4</sub>; muscarínico para M; neurocinina para NK<sub>1</sub>, NK<sub>2</sub> y NK<sub>3</sub>; neuropéptido para Y; opioide de nociceptina para NOP; fenciclidina para PCP; purinérgico para P2X y P2Y; serotonina para 5-HT; somatostatina para sst<sub>5</sub>; glucocorticoides para GR; estrógenos para ER; progesterona para PR; hormona tiroidea para TR; hormona liberadora de tirotrófina para TRH<sub>1</sub>; vasopresina para V<sub>1a</sub> y V<sub>2</sub>; K<sup>+</sup> sensible al ATP para K<sub>ATP</sub>; K<sup>+</sup> operado por voltaje para K<sub>v</sub>; y dependiente de Ca<sup>2+</sup> de baja conductancia para SKCa. En los siguientes ejemplos se usan las siguientes abreviaturas de enzimas: fosfodiesterasa para PDE1B, PDE2A, PDE3A, PDE4D, PDE5; cinasa de proteína C alfa para PKC $\alpha$ ; transferasa de catecol-O-metilo para COMT; oxidasa de monoamino para MAO-A y MAO-B; y transferasa de feniletanolamina-N-metilo para PNMT.

10 Ejemplo B1. Farmacología *in vitro*: actividad de unión de los compuestos (MD-MII).

Los compuestos (MI) - (MII) fueron evaluados mediante un cribado a 10  $\mu$ M frente a los objetivos mostrados en la Tabla 5. Los métodos de ensayo de unión de radioligando utilizados para medir la actividad de los compuestos de la invención serán familiares para los expertos en la técnica. Para cada ensayo de unión, los procedimientos generales y las condiciones experimentales se resumen en las Tablas 5 y 6, respectivamente. En cada caso de ensayo, los componentes del ensayo tales como, por ejemplo, el tipo de célula, el ligando, el compuesto de referencia y similares, serán familiares para los profesionales de dicho ensayo.

**Tabla 5: procedimientos generales**

Ensayo	Origen	Compuesto de referencia
A <sub>1</sub> (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	DPCPX
A <sub>2A</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células HEK-293)	NECA
A <sub>3</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células HEK-293)	IB-MECA
$\alpha_1$ (ns) <sup>2</sup> (aa)	corteza cerebral de rata	prazosina
$\alpha_2$ (ns) <sup>2</sup> (aa)	corteza cerebral de rata	yohimbina
$\beta_1$ (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células HEK-293)	atenolol
$\beta_2$ (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	ICI118551
AT <sub>1</sub> (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células HEK-293)	saralasin
AT <sub>2</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	saralasin
BZD (central) (ag)	corteza cerebral de rata	diazepam
B <sub>1</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	DesArg <sup>10</sup> -KD
B <sub>2</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	NPC 567
CB <sub>1</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	CP 55940
CB <sub>2</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	WIN 55212-2
CCK <sub>1</sub> (CCK <sub>A</sub> ) (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	CCK-8s
CCK <sub>2</sub> (CCK <sub>B</sub> ) (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	CCK-8s
CRF <sub>1</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	sauvagina
D <sub>1</sub> (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	SCH 23390
D <sub>2S</sub> (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células HEK-293)	(+) butaclamol
D <sub>3</sub> (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	(+) butaclamol
D <sub>4.4</sub> (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	clozapina
ET <sub>A</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	endotelina-1
ET <sub>B</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	endotelina-3
GABA (ns) <sup>2</sup> (ag)	corteza cerebral de rata	GABA
AMPA (ag)	corteza cerebral de rata	L-glutamato
kainato (ag)	corteza cerebral de rata	ácido kaínico
NMDA (aa)	corteza cerebral de rata	CGS 19755
H (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células HEK-293)	pirilamina
H (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	cimetidina
H (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	(R) $\alpha$ -Me-histamina
I <sub>2</sub> (aa)	corteza cerebral de rata	idazoxan
BLT <sub>1</sub> (LTB <sub>4</sub> ) (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	LTB <sub>4</sub>

ES 2 535 466 T3

Ensayo	Origen	Compuesto de referencia
CysLT <sub>1</sub> (LTD <sub>4</sub> ) (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	Ltd4
GnRH (LH-RH) (ag)	glándula pituitaria de rata	[D-Trp <sup>6</sup> ]-LH-RH
MC <sub>4</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	NDP- $\alpha$ -MSH
M (ns) <sup>2</sup> (aa)	corteza cerebral de rata	Atropina
NK <sub>1</sub> (h) (ag)	células U-373MG (endógenas)	[Sar <sup>9</sup> ,Met (O <sub>2</sub> ) <sup>11</sup> ]-SP
nk <sub>2</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	[Nleu <sup>10</sup> ]-NKA (4 - 10)
NK <sub>3</sub> (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	SB 222200
Y (ns) <sup>2</sup> (ag)	corteza cerebral de rata	NPY
N neuronal insensible a $\alpha$ -BGTX- ( $\alpha$ 4 $\beta$ 2) (ag)	corteza cerebral de rata	nicotina
opioide (ns) <sup>2</sup> (aa)	corteza cerebral de rata	naloxona
NOP (ORL1) (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células HEK-293)	nociceptina
PCP (aa)	corteza cerebral de rata	MK 801
P2X (ag)	vejiga urinaria de rata	$\alpha$ $\beta$ -MeATP
P2Y (ag)	corteza cerebral de rata	dATPaS
5-HT (ns) <sup>2</sup> (ag)	corteza cerebral de rata	serotonina
$\sigma$ (ns) <sup>2</sup> (ag)	corteza cerebral de rata	haloperidol
sst <sub>5</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	somatostatina-14
GR (h) (ag)	células IM-9 (citosol)	dexametasona
ER (ns) <sup>2</sup> (h) (ag)	células MCF-7 (citosol)	17- $\beta$ -estradiol
PR (h) (ag)	células T47D (citosol)	promegestona
TR (TH) (ag)	hígado de rata	T <sub>3</sub>
TRH <sub>1</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	TRH
V <sub>1a</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	[d(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> <sup>1</sup> , Tyr (Me) 2]-AVP
V <sub>2</sub> (h) (ag)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	AVP
canal de Ca <sup>2+</sup> (L, sitio de la dihidropiridina) (aa)	corteza cerebral de rata	nitrendipino
canal de Ca <sup>2+</sup> (L, sitio del diltiazem) (benzotiazepinas) (aa)	corteza cerebral de rata	diltiazem
canal de Ca <sup>2+</sup> (L, sitio del verapamilo) (fenilalquilamina) (aa)	corteza cerebral de rata	D 600
K <sub>ATP</sub> channel (aa)	corteza cerebral de rata	glibenclamida
hERG (preparación de membrana) (aa)	hr <sup>1</sup> (células HEK-293)	astemizol
canal de K <sub>v</sub> (aa)	corteza cerebral de rata	$\alpha$ -dendrotoxina
canal de SK <sub>ca</sub> (aa)	corteza cerebral de rata	apamina
canal de Na <sup>+</sup> (sitio 2) (aa)	corteza cerebral de rata	veratridina
canal de Cl <sup>-</sup> (operado por GABA) (aa)	corteza cerebral de rata	picrotoxina
transportador de norepinefrina (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	protriptilina
transportador de dopamina (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	BTCP
transportador de GABA (aa)	corteza cerebral de rata	ácido nipecótico
transportador de colina (CHT1) (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	hemicolinio-3
transportador de 5-HT (h) (aa)	hr <sup>1</sup> (células CHO)	imipramina

(ag) = radioligando agonista; (aa) = radioligando antagonista;  
1. hr - recombinante humano; 2. ns - no selectivo

Tabla 6: condiciones experimentales

Ensayo	Ligando	Concentración	No específico	Incubación
A <sub>1</sub> (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]DPCPX	1 nM	DPCPX (1 µM)	60 min / 22 °C
A <sub>2A</sub> (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]CGS 21680	6 nM	NECA (10 µM)	120 min / 22 °C
A <sub>3</sub> (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]ab-meca	0,15 nM	IB-MECA (1 µM)	120 min / 22 °C
α <sub>1</sub> (ns) (aa)	[ <sup>3</sup> H]prazosina	0,25 nM	prazosina (0,5 µM)	60 min / 22 °C
α <sub>2</sub> (ns) (aa)	[ <sup>3</sup> H]RX 821002	0,5 nM	(-)epinefrina (100 µM)	60 min / 22 °C
β <sub>1</sub> (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H](-)CGP 12177	0,15 nM	alprenolol (50 µM)	60 min / 22 °C
β <sub>2</sub> (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H](-)CGP 12177	0,2 nM	alprenolol (50 µM)	120 min / 22 °C
AT <sub>1</sub> (h) (aa)	[ <sup>125</sup> I][Sar <sup>1</sup> ,Ile <sup>8</sup> ]-AT-N	0,05 nM	angiotensina-II (10 µM)	120 min / 37 °C
AT <sub>2</sub> (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]CGP 42112A	0,04 nM	angiotensina-II (1 µM)	180 min / 37 °C
BZD (central)(ag)	[ <sup>3</sup> H]flunitrazepam	0,4 nM	diazepam (3 µM)	60 min / 4 °C
B <sub>1</sub> (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]desArg <sup>10</sup> -KD	0,35 nM	desArg <sup>9</sup> [Leu <sup>8</sup> ]-BK (10 µM)	60 min / 22 °C
B <sub>2</sub> (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]bradicinina	0,2 nM	bradicinina (1 µM)	60 min / 22 °C
CB <sub>1</sub> (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]CP 55940	0,5 nM	WIN 55212-2 (10 µM)	120 min / 37 °C
CB <sub>2</sub> (h) (ag)	-[ <sup>3</sup> H]WIN 55212-2	0,8 nM	WIN 55212-2 (5 µM)	120 min / 37 °C
CCK <sub>1</sub> (CCK <sub>A</sub> ) (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]CCK-8s	0,08 nM	CCK-8s (1 µM)	60 min / 22 °C
CCK <sub>2</sub> (CCK <sub>B</sub> ) (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]CCK-8s	0,08 nM	CCK-8s (1 µM)	60 min / 22 °C
CRF <sub>1</sub> (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]sauvagina	0,075 nM	sauvagina (0,5 µM)	120 min / 22 °C
D <sub>1</sub> (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]SCH 23390	0,3 nM	SCH 23390 (1 µM)	60 min / 22 °C
D <sub>2s</sub> (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]spiperona	0,3 nM	(+)butaclamol (10 µM)	60 min / 22 °C
D <sub>3</sub> (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]spiperona	0,3 nM	(+)butaclamol (10 µM)	60 min / 22 °C
D <sub>4.4</sub> (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]spiperona	0,3 nM	(+)butaclamol (10 µM)	60 min / 22 °C
ET <sub>A</sub> (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]endotelina-1	0,03 nM	endotelina-1 (0,1 µM)	120 min / 37 °C
ET <sub>B</sub> (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]endotelina-1	0,03 nM	endotelina-1 (0,1 µM)	120 min / 37 °C
GABA (ns) (ag)	[ <sup>3</sup> H]GABA	10 nM	GABA (100 µM)	60 min / 22 °C
AMPA (ag)	[ <sup>3</sup> H]AMPA	8 nM	L-glutamato (1 mM)	60 min / 4 °C
kainato (ag)	[ <sup>3</sup> H]ácido kaínico	5 nM	L-glutamato (1 mM)	60 min / 4 °C
NMDA (aa)	[ <sup>3</sup> H]CGP 39653	5 nM	L-glutamato (100 µM)	60 min / 4 °C
H <sub>1</sub> (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]pirilamina	3 nM	pirilamina (1 µM)	60 min / 22 °C
H <sub>2</sub> (h) (aa)	[ <sup>125</sup> I]APT	0,075 nM	tiotidina (100 µM)	120 min / 22 °C
H <sub>3</sub> (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]Nα-Me-histamina	1 nM	(R)α-Me-histamina (1 µM)	60 min / 22 °C
I <sub>2</sub> (aa)	[ <sup>3</sup> H]idazoxan (+ yohimbina 1 µM)	2 nM	cirazolina (10 µM)	30 min / 22 °C
BLT <sub>1</sub> (LTB <sub>4</sub> ) (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]LTB <sub>4</sub>	0,2 nM	LTB <sub>4</sub> (0,2 µM)	60 min / 22 °C
CysLT <sub>1</sub> (LTD <sub>4</sub> ) (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]LTD <sub>4</sub>	0,3 nM	LTD <sub>4</sub> (1 µM)	60 min / 22 °C
GnRH (LH-RH) (ag)	[ <sup>125</sup> I][D-Trp <sup>6</sup> ]-LH-RH	0,05 nM	[D-TRP <sup>6</sup> ]-LH-RH (1 µM)	90 min / 4 °C
MC <sub>4</sub> (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]NDP-α-MSH	0,05 nM	NDP-α-MSH (1 µM)	120 min / 37 °C
M (ns) (aa)	[ <sup>3</sup> H]QNB	0,05 nM	atropina (1 µM)	120 min / 22 °C
NK <sub>1</sub> (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]BH-SP	0,13 nM	[Sar <sup>9</sup> , Met(O <sub>2</sub> <sup>11</sup> )]-SP (1 µM)	60 min / 22 °C
NK <sub>2</sub> (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]NKA	0,1 nM	[Nleu <sup>10</sup> ]-NKA (4 - 10) (10 µM)	60 min / 22 °C
NK <sub>3</sub> (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]SR 142801	0,4 nM	SB 222200 (10 µM)	120 min / 22 °C
Y (ns) (ag)	[ <sup>121</sup> I]péptido YY	0,05 nM	NPY (1 µM)	120 min / 22 °C
N neuronal insensible a α-BGTX- (α4β2) (ag)	[ <sup>3</sup> H]citisina	1,5 nM	nicotina (10 µM)	75 min / 4 °C
opioide (ns) (aa)	[ <sup>3</sup> H]naloxona	1 nM	naloxona (1 µM)	40 min / 22 °C

Ensayo	Ligando	Concentración	No específico	Incubación
NOP (ORL1) (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]nociceptina	0,2 nM	Nociceptina (1 μM)	60 min / 22 °C
PCP (aa)	[ <sup>3</sup> H]TCP	10 nM	MK 801 (10 μM)	120 min / 37 °C
P2X (ag)	[ <sup>3</sup> H]α,β-MeATP	3 nM	α,β-MeATP (10 μM)	120 min / 4 °C
P2Y (ag)	[ <sup>35</sup> S]dATPαS	10 nM	dATPαS (10 μM)	60 min / 22 °C
5-HT (ns) (ag)	pH]serotonina	2 nM	serotonina (10 μM)	60 min / 37 °C
σ (ns) (ag)	[ <sup>3</sup> H]DTG	8 nM	haloperidol (10 μM)	120 min / 22 °C
sst <sub>5</sub> (h) (ag)	[ <sup>125</sup> I]Tyr <sup>11</sup> -somatostatina-14	0,1 nM	somatostatina-14 (1 μM)	120 min / 22 °C
GR (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]dexametasona	1,5 nM	triamcinolona (10 μM)	6 h / 4 °C
ER (ns) (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]estradiol	1 nM	17-β-estradiol (6 μM)	20 h / 4 °C
PR (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]progesterona	0,5 nM	promegestona (1 μM)	20 h / 4 °C
TR (TH) (ag)	[ <sup>125</sup> I]T <sub>3</sub>	0,1 nM	T <sub>3</sub> (1 μM)	18 h / 4 °C
TRH <sub>1</sub> (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]Me-TRH	2 nM	TRH (10 μM)	120 min / 4 °C
V <sub>1a</sub> (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]AVP	0,3 nM	AVP (1 μM)	60 min / 22 °C
V <sub>2</sub> (h) (ag)	[ <sup>3</sup> H]AVP	0,3 nM	AVP (1 μM)	120 min / 22 °C
canal de Ca <sup>2+</sup> (L, sitio de la dihidropiridina) (aa)	[ <sup>3</sup> H]nitrendipino	0,2 nM	Nifedipino (1 μM)	120 min / 22 °C
canal de Ca <sup>2+</sup> (L, sitio del diltiazem) (benzotiazepinas) (aa)	[ <sup>3</sup> H]diltiazem	5 nM	diltiazem (10 μM)	120 min / 22 °C
canal de Ca <sup>2+</sup> (L, sitio del verapamilo) (fenilalquilamina) (aa)	[ <sup>3</sup> H](-)D 888	3 nM	D 600 (10 μM)	120 min / 22 °C
canal de K <sub>ATP</sub> (aa)	[ <sup>3</sup> H]glibenclamida	0,1 nM	glibenclamida (1 μM)	60 min / 22 °C
hERG (preparación de membrana) (aa)	[ <sup>3</sup> H]astemizol	2 nM	astemizol (10 μM)	75 min / 22 °C
canal de K <sub>v</sub> (aa)	[ <sup>125</sup> I]α-dendrotoxina	0,01 nM	α-dendrotoxina (50 nM)	60 min / 22 °C
canal de SK <sub>Ca</sub> (aa)	[ <sup>125</sup> I]apamina	0,007 nM	apamina (100 nM)	60 min / 4 °C
canal de Na <sup>+</sup> (sitio 2) (aa)	[ <sup>3</sup> H]batracotoxina en	10 nM	veratridina (300 μM)	60 min / 22 °C
canal de Cl <sup>-</sup> (operado por GABA) (aa)	[ <sup>35</sup> S]TBPS	3 nM	picrotoxina (20 μM)	120 min / 22 °C
transportador de norepinefrina (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]nisoxetina	1 nM	desipramina (1 μM)	120 min / 4 °C
transportador de dopamina (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]BTCP	4 nM	BTCP (10 μM)	120 min / 4 °C
transportador de GABA (aa)	[ <sup>3</sup> H]GABA (+ isoguvacina 10 μM) (+ baclofen 10 μM)	10 nM	GABA (1 mM)	30 min / 22 °C
transportador de colina (CHT1) (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]hemicolinio m-3	3 nM	hemicolinio-3 (10 μM)	60 min / 22 °C
transportador de 5-HT (h) (aa)	[ <sup>3</sup> H]imipramina	2 nM	imipramina (10 μM)	60 min / 22 °C

(ag) = radioligando agonista; (aa) = radioligando antagonista; (ns) - no selectivo

Análisis y Expresión de los Resultados: los compuestos de la invención se ensayaron en ensayos bioquímicos, y se determinó el porcentaje de inhibición de la unión específica. La unión específica del ligando a los receptores se definió como la diferencia entre la unión total y la unión no específica determinada en presencia de un exceso de ligando no marcado. Los resultados están expresados como el porcentaje de inhibición de la unión específica del control (100-((unión específica medida / unión específica del control) x 100)) obtenidos en presencia de los compuestos de ensayo. Los resultados de los ensayos se resumen en la Tabla 7.

5

**Tabla 7. Resultados de los ensayos de unión**

	% de inhibición de la unión específica del control @ 10 μM	
	(MI)	(MII)
A <sub>1</sub> (h) (aa)	10	9
A <sub>2A</sub> (h) (ag)	10	-5
A <sub>3</sub> (h) (ag)	69	17

ES 2 535 466 T3

	% de inhibición de la unión específica del control @ 10 $\mu$ M	
	(MI)	(MII)
$\alpha_1$ (ns) (aa)	-4	-7
$\alpha_2$ (ns) (aa)	-7	-9
$\beta_1$ (h) (ag)	-2	-7
$\beta_2$ (h) (ag)	6	-3
AT <sub>1</sub> (h) (aa)	11	0
AT <sub>2</sub> (h) (aa)	-1	-6
BZD (central) (ag)	-35	-37
B (h) (ag)	0	6
B <sub>2</sub> (h) (ag)	2	-12
CB <sub>1</sub> (h) (ag)	-20	11
CB <sub>2</sub> (h) (ag)	-2	1
CCK <sub>1</sub> (CCK <sub>A</sub> ) (h) (ag)	47	0
CCK <sub>2</sub> (CCK <sub>B</sub> ) (h) (ag)	-10	-18
CRF <sub>1</sub> (h) (ag)	-4	1
D <sub>1</sub> (h) (aa)	-18	-14
D <sub>2s</sub> (h) (aa)	-16	-8
D <sub>3</sub> (h) (aa)	7	11
D <sub>4 4</sub> (h) (aa)	1	9
ET <sub>A</sub> (h) (ag)	-21	-16
ET <sub>B</sub> (h) (ag)	-7	-4
GABA (ns) (ag)	-12	0
AMPA (ag)	1	-10
kainato (ag)	-4	-21
NMDA (aa)	2	5
H <sub>1</sub> (h) (aa)	-8	2
H <sub>2</sub> (h) (aa)	-41	-27
H <sub>3</sub> (h) (ag)	-3	-2
I <sub>2</sub> (aa)	28	22
BLT <sub>1</sub> (LTB <sub>4</sub> ) (h) (ag)	-15	-8
CysLT <sub>1</sub> (LTD <sub>4</sub> ) (ag)	. 3	18
GnRH (LH-RH) (ag)	-21	-51
MC <sub>4</sub> (h) (ag)	-23	-25
M (ns) (aa)	18	1
NK <sub>1</sub> (h) (ag)	-7	9
NK <sub>2</sub> (h) (ag)	-6	-3
NK <sub>3</sub> (h) (aa)	-11	3
Y(ns)(ag)	-6	-6
neuronal insensible a $\alpha$ -BGTX- ( $\alpha$ 4 $\beta$ 2) (ag)	0	-3
opioide (ns) (aa)	-6	-14
NOP (ORL1) (h) (ag)	-10	-4
PCP (aa)	0	5
P2X (ag)	4	4
P2Y (ag)	-19	-2
5-HT (ns) (ag)	21	14

	% de inhibición de la unión específica del control @ 10 $\mu$ M	
	(MI)	(MII)
$\sigma$ (ns) (ag)	20	39
sst <sub>5</sub> (h) (ag)	-25	16
GR (h) (ag)	5	30
ER (ns) (h) (ag)	-8	3
PR (h) (ag)	23	74
TR (TH) (ag)	-7	0
TRH <sub>1</sub> (h) (ag)	18	-4
V <sub>1a</sub> (h) (ag)	2	15
V <sub>2</sub> (h) (ag)	5	3
canal de Ca <sup>2+</sup> (L, sitio de la dihidropiridina) (aa)	16	18
canal de Ca <sup>2+</sup> (L, sitio del diltiazem) (benzotiazepinas) (aa)	2	22
canal de Ca <sup>2+</sup> (L, sitio del verapamilo) (fenilalquilamina) (aa)	-2	-13
canal de K <sub>ATP</sub> (aa)	17	24
hERG (preparación de membrana) (aa)	-39	7
canal de K <sub>v</sub> (aa)	-2	-3
canal de SK <sub>Ca</sub> (aa)	-6	4
canal de Na <sup>+</sup> (sitio 2) (aa)	-5	13
canal de Cl <sup>-</sup> (operado por GABA) (aa)	47	81
transportador de norepinefrina (h) (aa)	56	-13
transportador de dopamina (h) (aa)	32	23
transportador de GABA (aa)	-16	7
transportador de colina (CHT1) (h) (aa)	-16	-22
transportador de 5-HT (h) (aa)	1	16

(ag) = radioligando agonista; (aa) = radioligando antagonista; (ns) - no selectivo

Resultados de la Farmacología *in vitro*: generalmente se considera que los resultados que muestran una inhibición (o una estimulación para los ensayos realizados en condiciones basales) mayor del 50 % representan unos efectos significativos de los compuestos de ensayo. Los resultados que muestran una inhibición (o una estimulación) de entre el 20 % y el 50 % son generalmente indicativos de unos efectos entre débiles y moderados. Los resultados que muestran una inhibición (o una estimulación) menor del 20 % generalmente se consideran menos significativos.

La biología de los objetivos seleccionados se resume como sigue. Receptor A3 de adenosina: receptor acoplado a proteínas G con un papel poco definido en las funciones cardiacas, inflamatorias y neuronales (Fishman, y col. "Pharmacology and therapeutic applications of A3 receptor subtype." *Curr. Top. Med. Chem.* (2003), 3 (4): 463 - 9); Cannabinoid CB2 receptor: G-protein coupled receptor involved in nociception, and immune cell function (Jhaveri, y col. "Cannabinoid CB2 receptor-mediated anti-nociception in models of acute and chronic pain." *Mol Neurobiol.* (2007), 36 (1): 26 - 35; Marriott, y col. "Recent advances in the development of selective ligands for the cannabinoid CB (2) receptor." *Curr. Top. Med. Chem.* (2008), 8 (3): 187 - 204); canal de Cl<sup>-</sup> (rata): el canal de cloruro operado por el GABA regula la actividad de las neuronas (Treiman, D. "GABAergic Mechanisms in Epilepsy." *Epilepsy* (2001), 42 (3): 8 - 12);  $\alpha$ 1 adrenérgico (no selectivo, de rata): receptor acoplado a proteínas G para catecolaminas. Estos receptores regulan la contracción del músculo liso y la liberación de neurotransmisores (Michelotti, y col. "Alpha 1-Adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications." *Pharmacol. Ther.* (2000), 88 (3): 281 - 309); Sigma (no selectivo): receptor del SNC unido membrana que modula el comportamiento relacionado con la depresión (Stahl, S. "Antidepressant Treatment of Psychotic Major Depression: Potential Role of the Sigma Receptor." *CNS Spectr.* (2005), 10 (4): 319 - 323); transportador de norepinefrina: transporta la noradrenalina, y en un menor grado la dopamina, desde la sinapsis de vuelta a las vesículas intraneuronales para su almacenamiento hasta su uso posterior (Mandela, y col. "The Norepinephrine Transporter and Its Regulation." *J. Neurochemistry* (2006), 97 (2): 310 - 333); PR de progesterona: es expresado en todos los sistemas fisiológicos superiores, con picos en el útero / ovario, el cerebelo, la médula espinal y el hipotálamo (Edwards, y col. "Progesterone receptor transcription and non-transcription signaling mechanisms." *Steroids* (2003), 68 (10 - 13): 761 - 770).

Ejemplo B2: Farmacología *in vitro*: unión al receptor de andrógenos (AR) humano

Preparación tisular: se expresó el receptor de andrógenos humano en células LNCAP que se cultivaron y se recogieron mediante tripsinización en matraces T-175. El sedimento congelado se descongeló y se resuspendió mediante la aplicación de ultrasonidos, después se diluyó hasta la concentración apropiada. El homogeneizado se centrifugó @ 48.000 g durante 10 min a 4 °C. Se usó el sobrenadante. Se determinaron las proteínas. El tejido se diluyó a 0,325 mg/ml con tampón de ensayo, de forma que cada tubo recibió 65 µg de proteína, o que la concentración final de ensayo fuera de 0,260 mg/ml.

10 Materiales y reactivos: se diluyó [<sup>3</sup>H]-metiltienolona hasta una concentración de 5 nM en HEPES 25 mM a pH 7,4 (que contenía EDTA 1,0 mM, molibdato de sodio 10 mM, 10 % de glicerol, PMSF 0,5 mM) de forma que la concentración final de radioligando en el ensayo fuera de 0,5 nM. La unión no específica se definió como la remanente en presencia de 2 x 10<sup>-7</sup> M de metiltienolona (R1881). El compuesto de referencia era metiltienolona (R1881), analizado a las siguientes concentraciones finales de: 2 x 10<sup>-11</sup>, 5 x 10<sup>-11</sup>, 1 x 10<sup>-10</sup>, 2 x 10<sup>-10</sup>, 5 x 10<sup>-10</sup>, 1 x 10<sup>-9</sup>, 2 x 10<sup>-9</sup>, 5 x 10<sup>-9</sup>, 1 x 10<sup>-8</sup>, 2 x 10<sup>-8</sup>, 5 x 10<sup>-8</sup> y 1 x 10<sup>-7</sup> M.

Tampones: HEPES 25 mM a pH 7,4; EDTA 1,0 mM; molibdato de sodio 10 mM; 10 % de glicerol; PFSM 0,5 mM (en primer lugar se disolvió el PMSF en EtOH, antes de añadirlo al resto de tampón).

20 Reacción de unión: (Liao, y col. "The Use of a Hidroxilapatite-Filter Steroid Receptor Assay Method in the Study of the Modulation of Androgen Receptor Interaction." J. Steroid Biochem. (1984), 20: 11 - 17 (con modificaciones)). Cada vial recibió los siguientes componentes: compuesto de ensayo / de referencia o vehículo (25 µl); [<sup>3</sup>H]-metiltienolona (25 µl); suspensión tisular (200 µl). La reacción de unión se inició con la adición de tejido, y se incubó a 0 - 4 °C (en un refrigerador) durante 18 - 22 h (durante una noche). La reacción de unión fue finalizada mediante una rápida filtración del contenido del tubo con filtros GF/B tratados con un 0,1 % de PEI. Los tubos de ensayo se aclararon una vez con HEPES 25 mM enfriado en hielo, después se aclararon rápidamente con 6 x 1 ml/tubo del mismo tampón de lavado. La radioactividad atrapada por los filtros fue evaluada mediante el uso de una espectrofotometría de centelleo líquido después de emparar los filtros durante al menos 1 h en cóctel de centelleo. La unión no específica se definió como la cantidad de radioactividad remanente en presencia de 2 x 10<sup>-7</sup> M de metiltienolona sin marcar (R1881). La unión específica se calculó a partir de la diferencia entre la unión específica total y la no específica. Se determinaron los valores de la CI<sub>50</sub> mediante la representación de la unión específica en función de la concentración del compuesto de ensayo. Los valores de la Ki se obtuvieron directamente a partir de los valores de la CI<sub>50</sub> mediante el uso de la ecuación de Cheng-Prusoff ( $K_i = CI_{50} / (1 + (L / K_D))$ ), en la que L = concentración de radioligando en el ensayo, y K<sub>D</sub> = afinidad del radioligando por el receptor determinada de forma independiente. Los resultados de los ejemplos de ensayo se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8. Actividad de unión al AR de los compuestos (MI) - (MII)**

Compuesto de referencia	K <sub>i</sub> (µM)		
	Mibolerona	Mibolerona	Metiltienolona
K <sub>i</sub> del compuesto de referencia	0,0051	0,0051	0,000063
Compuesto de ensayo			
(MI)	NR	NR	NR (> 10)
(MII)	0,074	0,051	0,059

Los datos de la Tabla 8 demuestran que el compuesto MII tiene actividad frente al receptor de andrógenos.

Ejemplo B3: Farmacología *in vitro*: ensayos enzimáticos

Los ensayos enzimáticos proporcionados a continuación serán familiares para los expertos en la técnica. Para cada ensayo enzimático, los procedimientos generales y las condiciones experimentales se resumen en las Tablas 9 y 10, respectivamente.

**Tabla 9: procedimientos generales**

Ensayo	Origen	Compuesto de referencia
PDE1B (h)	recombinante humano (células Sf9)	calmidazolio
PDE2A (h)	recombinante humano (células Sf9)	EHNA
PDE3A (h)	recombinante humano (células Sf9)	milrinona
PDE4D (h)	recombinante humano (células Sf9)	rolipram
PDE5 (h) (ns)	plaquetas humanas	zaprinast
ciclase de adenililo (basal)	cerebro de rata	forskolina

Ensayo	Origen	Compuesto de referencia
ciclasa de guanililo (basal)	pulmón bovino	nitroprusiato sódico
PKC $\alpha$ (h)	recombinante humano (células de insecto)	Bis 10
acetilcolinesterasa (h)	recombinante humano (células HEK-293)	neostigmina
COMT	hígado porcino	RO 41-0960
transaminasa de GABA	cerebro de rata	AoAA
MAO-A (h)	placenta humana	clorgilina
MAO-B (h)	plaquetas humanas	deprenilo
PNMT	médula adrenal bovina	LY 78335
hidroxilasa de tirosina	cuerpo estriado de rata	3-yodo L-tirosina
ATPasa (Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup> )	corteza cerebral porcina	ouabaína
(ns) - no selectivo		

Tabla 10: condiciones experimentales

Ensayo	Sustrato / estímulo / marcador	Incubación	Producto de la reacción	Método de detección
PDE1B (h)	GMPc (240 nM)	30 min / 22 °C	GMPc residual	HTRF
PDE2A (h)	AMPc (40 nM)	30 min / 22 °C	AMPc residual	HTRF
PDE3A (h)	AMPc (40 nM)	30 min / 22 °C	AMPc residual	HTRF
PDE4D (h)	AMPc (40 nM)	30 min / 22 °C	AMPc residual	HTRF
PDE5 (h) (ns)	GMPc (240 nM)	30 min / 22 °C	GMPc residual	HTRF
ciclasa de adenililo (basal)	ATP (0,5 mM) (forskolina 300 $\mu$ M como control)	60 min / 30 °C	AMPc	HTRF
ciclasa de guanililo (basal)	GTP (0,1 mM) (nitroprusiato sódico 1 mM sodium como control)	90 min / 30 °C	GMPc	HTRF
PKC $\alpha$ (h)	ATP + péptido de biotinil-neurogranina 28 - 43 (60 nM)	15 min / 22 °C	péptido de fosfobiotinil-neurogranina 28 - 43	HTRF
acetilcolinesterasa (h)	AMTCh (50 $\mu$ M)	30 min / 37 °C	tio-conjugado	fotometría
COMT	Esculetina (1 $\mu$ M)	30 min / 37 °C	escopoletina	fluorimetría
transaminasa de GABA	GABA (9 mM) + $\alpha$ -cetoglutarato (9 mM)	60 min / 37 °C	semialdehído succínico	fluorimetría
MAO-A (h)	Kinuramina (0,15 mM)	30 min / 30 °C	4-OHquinolina	fotometría
MAO-B (h)	Bencilamina (0,5 mM)	45 min / 37 °C	benzaldehído	fotometría
PNMT	[ <sup>14</sup> C]SAM (4 $\mu$ M) + normetanofrina (28 mM)	20 min / 37 °C	[ <sup>14</sup> C]metanofrina	Resuelto por centelleo
hidroxilasa de tirosina	[ <sup>3</sup> H]tirosina (10 $\mu$ M)	40 min / 37 °C	[ <sup>3</sup> H]H <sub>2</sub> O	Resuelto por centelleo
ATPasa (Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup> )	ATP (2 mM)	60 min / 37 °C	Pi	fotometría
(ns) - no selectivo				

5 Análisis y Expresión de los Resultados: los resultados están expresados como un porcentaje de la actividad específica de control ((actividad específica medida / actividad específica de control) x 100) obtenida en presencia de los compuestos de ensayo. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11: resultados de los ensayos enzimáticos

Ensayo	% de inhibición de los valores de control @ 10 $\mu$ M	
	(MI)	(MII)
PDE1B (h)	0	-11
PDE2A (h)	12	2
PDE3A (h)	3	0
PDE4D (h)	1	-9
PDE5 (h) (ns)	4	-1

Ensayo	% de inhibición de los valores de control @ 10 $\mu$ M	
	(MI)	(MII)
PKC $\alpha$ (h)	4	6
acetilcolinasterasa (h)	51	9
COMT	1	-1
transaminasa de GABA	-7	-5
MAO-A (h)	-5	0
MAO-B (h)	8	-4
PNMT	-6	-4
hidroxilasa de tirosina	-4	2
ATPasa (Na <sup>+</sup> / K <sup>+</sup> )	4	-10
	% de estimulación con respecto al control @ 10 $\mu$ M	
ciclasa de adenililo (basal)	0	3
ciclasa de guanililo (basal)	0	0
(ns) - no selectivo		

#### Ejemplo B4: ensayo de translocación nuclear del receptor de andrógenos

5 Manipulación de las células: se expandieron las líneas celulares PathHunter NHRPro a partir de reservas congeladas en matraces T25 de acuerdo con los procedimientos habituales, y se mantuvieron en medio de crecimiento selectivo antes del ensayo. Una vez se estableció que las células estaban sanas y crecían normalmente, las células se transfirieron desde los matraces mediante el uso de un tampón de disociación celular exento de tripsina, y se sembraron en microplacas de 384 pocillos de fondo transparente y paredes blancas para la caracterización de los compuestos. Para la caracterización, las células se sembraron a una densidad 10.000 células por pocillo en un volumen total de 50  $\mu$ l y se dejaron adherir y recuperarse durante una noche antes de la adición del compuesto. El medio contenía suero filtrado con carbón-dextrano para reducir el nivel de hormonas presentes.

10 Modo de cribado: los compuestos se ensayaron en los modos de agonista y de antagonista a las siguientes respuestas de dosis: 60, 20, 6,67, 2,22, 0,74, 0,25, 0,08, 0,03, 0,009 y 0,003  $\mu$ M, por duplicado, con diluciones sucesivas de tres veces, y se obtuvieron los resultados de la CE<sub>50</sub> y de la CI<sub>50</sub>.

15 Formato agonista: se generaron diluciones intermedias de las reservas de compuestos, de forma que pudieran añadirse 5,5  $\mu$ l de 10x compuesto a cada pocillo con una concentración final de DMSO del 1 % del volumen total. Para la caracterización del compuesto en modo agonista, las células se incubaron en presencia de compuesto a 37 °C durante 5 h.

20 Formato antagonista: se realizaron las curvas de dosis de agonista para determinar el valor de la CE<sub>50</sub> para los siguientes ensayos antagonistas con los compuestos. Se añadieron 5,5  $\mu$ l de 10x agonista a cada pocillo con una concentración igual del vehículo presente. Se determinó la concentración CE<sub>80</sub> de agonista directamente a partir de la curva de dosis de agonista. Para la determinación antagonista, las células se incubaron previamente con antagonista, seguido de una exposición al agonista a la concentración CE<sub>80</sub>: se añadieron 5,5  $\mu$ l de 10x compuesto a las células y se incubaron a 37 °C durante 1 h; se añadieron 5,5  $\mu$ l de 11x la CE<sub>80</sub> de agonista a las células y se incubaron a 37 °C durante 5 h.

25 Detección de la señal: después de la apropiada incubación del compuesto se generó la señal de ensayo a través de una única adición de 30  $\mu$ l (50 % v/v) del cóctel de reactivos de detección de PathHunter para los ensayos de agonista y de antagonista, respectivamente, seguido de la incubación durante 1 h a la temperatura ambiente. Se leyeron las microplacas después de la generación de la señal con un instrumento PerkinElmer ViewLux™ para la detección de la señal quimioluminiscente.

30 Análisis de los datos: se representaron las curvas de las dosis en presencia y en ausencia de compuesto mediante el uso de GraphPad Prism. En la Tabla 12 se proporciona un resumen de los resultados del ensayo.

**Tabla 12. Resultados del ensayo de translocación nuclear del receptor de andrógenos para los compuestos (MI) - (MII)**

	Ensayo de translocación nuclear del AR	
	CE <sub>50</sub> $\mu$ M del modo agonista	CI <sub>50</sub> $\mu$ M del modo antagonista
Norgesterol (ag)	0,0029	
Geldanamicina (aa)		0,018
(MI)	nr	> 60
(MII)	nr	3,2

(ag) = agonista; (aa) = antagonista

Ejemplo B5: ensayo funcional del GABA<sub>A</sub>

5 El objetivo de este estudio era evaluar los efectos funcionales de MI - MII sobre los receptores humanos ionótrofos del GABA<sub>A</sub>. Se expresaron los receptores humanos del GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 $\beta$ 3 y  $\alpha$ 1 $\beta$ 3 $\gamma$ 2 en ovocitos de *Xenopus*. Se usaron los efectos de una exposición aguda para evaluar los posibles efectos agonistas de los compuestos, mientras que se usó una exposición previa y conjunta con GABA para evaluar los posibles efectos inhibidores de los compuestos.

10 Preparación de los ovocitos: todos los experimentos se realizaron con GABA<sub>A</sub> humano expresado en ovocitos de *Xenopus* mediante el uso del método de expresión del ADNc. Los ovocitos de *Xenopus* se prepararon y se inyectaron mediante el uso de los procedimientos habituales. En resumen, se recogieron ovarios de *Xenopus laevis* hembras que habían sido anestesiadas profundamente y se punzaron siguiendo las normas de derechos animales del cantón de Ginebra. Se aisló un trozo pequeño de ovario para su preparación inmediata, mientras que la parte restante se puso a 4 °C en una solución estéril de Barth que contenía NaCl (88 mM), KCl (1 mM), NaHCO<sub>3</sub> (2,4 mM), HEPES (10 mM), MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (0,82 mM), Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O (0,33 mM), CaCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (0,41 mM), a pH 7,4, y se complementó con 20  $\mu$ g/ml de canamicina, 100 unidades/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina. Todos los registros se llevaron a cabo a 18 °C y las células se superfundieron con medio OR2 que contenía NaCl (82,5 mM), KCl (2,5 mM), HEPES (5 mM), CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (1,8 mM), MgCl<sub>2</sub> · 6 H<sub>2</sub>O (1 mM), pH 7,4.

15 Registros electrofisiológicos: se registraron las corrientes provocadas por el GABA mediante el uso de un proceso automatizado equipado con una configuración estándar de fijación de voltaje de dos electrodos (TVEC). Salvo que se indique, las células se mantuvieron a -80 mV. Los datos fueron capturados y analizados mediante el uso de un programa informático patentado de adquisición y análisis de datos HiQScreen ejecutado bajo Matlab (Mathworks INC.).

20 Preparación del agonista: se preparó el GABA en forma de una solución madre concentrada (10<sup>-1</sup> M) en agua y después se diluyó en el medio de registro para obtener la concentración de ensayo deseada. Los compuestos se prepararon en forma de una solución madre (10<sup>-2</sup> M) en DMSO y después se diluyeron en el medio de registro para obtener la concentración de ensayo deseada. El DMSO residual no superaba la concentración del 1 % a una concentración que había demostrado no tener ningún efecto sobre la función de los ovocitos de *Xenopus*.

25 Análisis de los datos y estadístico: para el análisis estadístico los valores fueron analizados bien con Excel (Microsoft) o bien con Matlab (Mathworks INC.). Para obtener la significación estadística, todos los experimentos se realizaron mediante el uso de al menos tres células. Los valores se presentan como la media + EEM.

30 Procedimientos experimentales: se realizaron inyecciones de ADNc que codifica para las subunidades del GABA<sub>A</sub> humano en al menos cien ovocitos mediante el uso de un dispositivo de inyección automatizado patentado (Hogg y col., J. Neurosci. Methods, 2008) y la expresión del receptor se examinó al menos dos días después. En los ovocitos se insertaron dos electrodos, y su potencial de membrana se mantuvo en un valor fijo (-80 mV) a lo largo del experimento.

35 Medición de la actividad agonista de MI - MII: se evaluaron los efectos de MI - MII sobre la función del receptor del GABA<sub>A</sub> con un protocolo de exposición única (30 s). En este protocolo, la célula se expone en primer lugar a un pulso de ensayo de referencia de GABA (10  $\mu$ M, 5 s) y se usa su respuesta como control. Se elimina el GABA y la célula se expone entonces durante 30 s al compuesto de ensayo, tiempo durante el cual se realizan los registros. Finalmente, se elimina el compuesto de ensayo y se vuelve a aplicar el GABA (3  $\mu$ M, 5 s) al final de la incubación. Los registros tomados durante el periodo de 30 s cuando hay presente MI - MII no mostraron corrientes hacia el interior detectables, lo que indica que estos compuestos no activan el receptor  $\alpha$ 1 $\beta$ 3 del GABA<sub>A</sub>.

40 Medición de la actividad antagonista de MI - MII: para evaluar los posibles efectos inhibidores de MI - MII se diseñaron protocolos de inhibición por concentración. En este protocolo se exponen ovocitos que expresan fuertes respuestas al GABA durante 45 s a una concentración dada del compuesto bajo supervisión, y se registra la respuesta a una concentración fija de GABA aplicada en presencia del compuesto. Después de una breve lavado para eliminar el GABA, la célula se devuelve durante otros 45 s a la misma concentración, y entonces se repite el

proceso con una concentración mayor del compuesto. Como los ovocitos están expuestos continuamente al compuesto de ensayo se observa un efecto acumulativo para las concentraciones más altas. El control positivo en este ensayo, el antagonista tionato de terc-butilbiciclofosforo (TBPS), demostró un efecto inhibitor dependiente de la concentración sobre el receptor  $\alpha 1\beta 3$ . La  $Cl_{50}$  derivada para el TBPS era de  $0,6 \pm 0,06 \mu M$ . Este valor de la  $Cl_{50}$  es coherente con lo que se había publicado en la bibliografía [Hamann y col, Mol. Pharmacol. (1990), 37 (4): 578 - 582].

Resultados: M1 demostró una inhibición dependiente de la concentración del receptor  $\alpha 1\beta 3$  y del receptor  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ , con unos valores derivados de la  $Cl_{50}$  de  $20,7 \pm 6 \mu M$  y de  $68,3 \pm 6,0 \mu M$ . A la concentración más alta, se consiguió una inhibición prácticamente completa ( $75 \pm 18,4 \%$ ). M2 demostró una inhibición dependiente de la concentración del receptor  $\alpha 1\beta 3$ , con un valor derivado de la  $Cl_{50}$  de  $2,3 \pm 0,3 \mu M$ . A la concentración más alta, se consiguió una inhibición prácticamente completa ( $80 \pm 10 \%$ ).

Resumen: efectos agonistas: una breve exposición a M1 - MII no provocó corrientes hacia el interior detectables ni en el receptor  $\alpha 1\beta 3$  ni en el  $\alpha 1\beta 3\gamma 2$  del  $GABA_A$ , lo que indica que estos compuestos no activan ninguna de estas dos formas del receptor  $GABA_A$ . Efectos antagonistas: M1 - MII antagonizaron el receptor  $\alpha 1\beta 3$  del  $GABA_A$  con unos valores de la  $Cl_{50}$  y del % de inhibición según se resumen en la Tabla 13. Dado que se observó inhibición en el intervalo  $\mu M$ , estos datos indican que M1 - MII son antagonistas funcionales del receptor  $GABA_A$ .

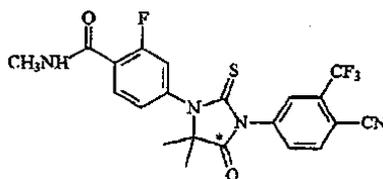
Tabla 13: resultados del ensayo funcional del  $GABA_A$  para M1 - MII

Compuesto	$\alpha 1\beta 3$ del $GABA_A$	
	$Cl_{50}$ ( $\mu M$ )	% de inhibición @ 100 $\mu M$
M1	$20,7 \pm 6,03$	90
M2	$2,3 \pm 1,5$ $75 \pm 2,1$	88

#### Ejemplo B6. Identificación de (M1) - (MII) en plasma de rata

Se aislaron los metabolitos del RD162' y se identificaron en muestras de plasma en estado estacionario procedentes de tres ratas Sprague Dawley macho a las que se les había administrado por vía oral una mezcla de RD162' no radiomarcado y RD162' radiomarcado ( $[^{14}C]RD162'$ ) a 100 mg/kg/día (RD162' total) y a 250  $\mu Ci/kg/día$  (radioactividad del  $[^{14}C]$ ). A las ratas se les administró una vez al día durante siete días consecutivos; cuatro horas después de la dosis del séptimo día, se recogió plasma de las tres ratas. Las muestras de plasma se almacenaron aproximadamente a  $-70^\circ C$  o más frío.

El  $[^{14}C]$  RD162' tenía una actividad específica de 57,6 mCi/mmol y, a través de un análisis mediante HPLC, tenía una pureza > 98 %. La posición del átomo de  $[^{14}C]$  se muestra a continuación, en la que \* significa la posición del radiomarcaje:



Se combinaron las muestras de plasma de los tres animales en una mezcla 1:1:1 (denominada "plasma de rata agrupado") y se analizaron para comprobar las concentraciones de RD162' y de sus metabolitos. La identificación del  $[^{14}C]RD162'$  y de los metabolitos del  $[^{14}C]RD162'$  en el plasma de rata agrupados se basó en una elución conjunta en HPLC con los patrones de referencia y en el análisis de los espectros de masas. Se usaron CL/EM y CL/EM/EM de electronebulización de ión positivo para el análisis de los metabolitos.

Para preparar el plasma de rata agrupado para el análisis HPLC, se combinó aproximadamente 1 g de la muestra de plasma con acetonitrilo (ACN, muestra:ACN, 1:3, V:V), se mezcló con agitación vorticial, se le aplicó ultrasonidos en agua fría, se centrifugó y se eliminaron los sobrenadantes. La extracción se repitió dos veces y se combinaron los respectivos sobrenadantes. Se analizaron alícuotas por duplicado mediante un recuento con líquido de centelleo (LSC) para determinar la recuperación de extracción, que fue del 100 %. Los sobrenadantes combinados se evaporaron a sequedad y se reconstituyeron con 1 ml de ácido fórmico al 0,1 % en ósmosis inversa (RO) de agua:ACN:metanol (MeOH, 50:45:5, V:V:V). La muestra se mezcló con agitación vorticial, se le aplicó ultrasonidos, se microcentrifugó, y las alícuotas por duplicado se analizaron mediante un LSC para determinar la recuperación de reconstitución, que fue del 98,1 %. La muestra reconstituida se analizó mediante una HPLC para determinar el perfil de metabolitos, con las fracciones recogidas a intervalos de 10 segundos y analizadas mediante un recuento con centelleo sólido.

Las muestras preparadas fueron analizadas mediante el uso de las siguientes condiciones de CL/EM/EM: HPLC: Hewlett Packard 1100 series; Fase móvil: ácido fórmico al 0,1 % en ósmosis inversa de agua (A) y acetonitrilo (B);

Columna: Agilent Eclipse XDB-C18, de 4,6 x 150 mm, 5  $\mu$ m; columna de guarda: Phenomenex Security Guard Cartridge C18, de 3 x 4 mm; temperatura de la columna: 20 °C; gradiente: 20 - 80 % de B en 40 min; caudal: 1,5 ml/min.

- 5 Para los experimentos de elución conjunta se determinaron los tiempos de elución para el RD162' y para sus metabolitos. El RD162' y sus metabolitos (MI) y (MII) se inyectaron en la HPLC y se midió el tiempo de elución desde la columna mediante una detección con luz ultravioleta a 254 nm. Los tiempos de retención resultantes, que se resumen en la Tabla 14, se usaron para determinar cualitativamente las entidades

10 **Tabla 14. Porcentaje cromatográfico mediante HPLC de radioactividad de la muestra en forma de [<sup>14</sup>C]RD162' o de los metabolitos de [<sup>14</sup>C]RD162' en muestras de plasma agrupadas en estado estacionario con la administración oral de [<sup>14</sup>C]RD162' en ratas macho**

Nombre	Inicio (min)	Finalización (min)	Retención (min)	Altura del pico (mV)	Área del pico (mV)	% de radioactividad recuperada (%)	% de radioactividad inyectada (%)
(MII)	18,57	19,17	18,90	43	288	8,45	5,38
RD162'	22,27	23,13	22,63	164	1159	34,03	21,66
(MI)	24,03	24,93	24,50	86	589	17,31	11,02

Las estructuras de (MI) y de (MII) fueron confirmadas mediante un análisis espectral de masas.

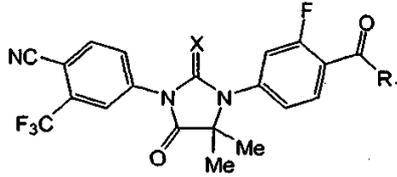
- 15 **B7. Determinación de los valores de la  $CI_{50}$  y/o de la  $CE_{50}$**

Los compuestos de la invención pueden evaluarse adicionalmente mediante la determinación de los valores de la  $CI_{50}$  y/o de la  $CE_{50}$  a partir de las curvas de concentración-respuesta. El método de determinación de los valores de la  $CI_{50}$  y/o de la  $CE_{50}$  puede llevarse a cabo de acuerdo con los métodos conocidos.

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende (a) un compuesto que es de la fórmula I:



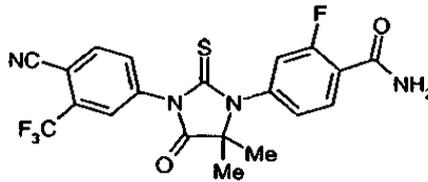
(I)

5 donde:

X es S, y  
R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;

10 o es una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

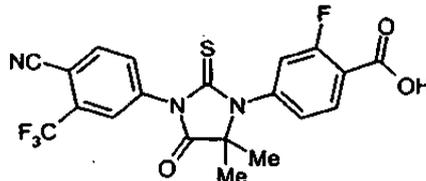
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es de la fórmula (MII):



MII

15 o es una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

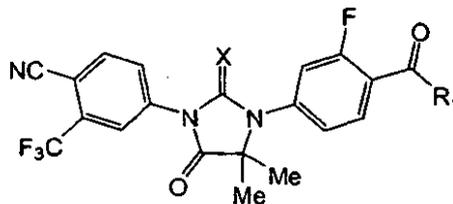
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que el compuesto es de la fórmula (MI):



MI

20 o es una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

4. Un compuesto que es de la fórmula I:



(I)

25 donde:

X es S, y  
R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;

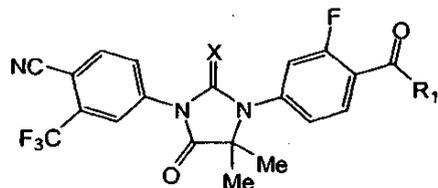
30 o es una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método para el tratamiento de un individuo.

5. El compuesto para su uso según se define en la reivindicación 4 en el que el compuesto es según se define en la reivindicación 2 o 3.

6. El compuesto de la reivindicación 4 o 5 para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata.

5 7. El compuesto de la reivindicación 4 o 5 para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson o de la enfermedad de Alzheimer.

8. Uso de un compuesto que es de la fórmula I:



(I)

10 donde:

X es S, y  
R<sup>1</sup> es OH o NH<sub>2</sub>;

15 o es una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un individuo.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 en el que el compuesto es según se define en la reivindicación 2 ó 3.

20 10. Uso de acuerdo con la reivindicación 8 o 9 en la preparación de un medicamento para el tratamiento del cáncer de próstata, de la enfermedad de Parkinson o de la enfermedad de Alzheimer.

11. Una forma de dosificación unitaria que comprende un compuesto de la fórmula I o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

25 12. Un compuesto aislado de la fórmula I o una sal o un solvato farmacéuticamente aceptable del mismo, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.