

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 834**

51 Int. Cl.:

C07D 215/52 (2006.01)
A61K 31/47 (2006.01)
A61P 25/18 (2006.01)
A61P 25/22 (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2006 E 06835833 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 1968944**

54 Título: **Alquilsulfonamida quinolinas**

30 Prioridad:

12.12.2005 US 749431 P
01.08.2006 US 821016 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.05.2016

73 Titular/es:

ASTRAZENECA AB (100.0%)
151 85 Södertälje, SE

72 Inventor/es:

SIMPSON, THOMAS;
KANG, JAMES;
ALBERT, JEFFREY;
ALHAMBRA, CRISTOBAL;
KOETHER, GERARD;
WOODS, JAMES y
LI, YAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 571 834 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

Alquilsulfonamida quinolinas

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a un derivado de quinolina, a las composiciones farmacéuticas que lo comprenden, y al compuesto cuando se utiliza en el tratamiento del sistema nervioso central y enfermedades o trastornos periféricos. Este compuesto puede utilizarse además en combinación con uno u otros agentes más del SNC para potenciar los efectos de los demás agentes del SNC. El compuesto de esta invención es también útil como sonda para la localización de receptores de la superficie celular.

Antecedentes de la invención

10 Los receptores de taquicinina son las dianas de una familia de péptidos estructuralmente relacionados que incluyen la sustancia P (SP), neurocinina A (NKA) y neurocinina B (NKB), en conjunto "taquicininas". Las taquicininas se sintetizan en el sistema nervioso central (SNC), y en los tejidos periféricos, donde ejercen diversas actividades biológicas. Se conocen tres receptores de taquicinina que se denominan receptores de neurocinina-1 (NK-1),
15 neurocinina-2 (NK-2) y neurocinina-3 (NK-3). Los receptores de NK-1 y NK-2 se expresan según una amplia variedad de tejidos periféricos y los receptores de NK-1 se expresan además en el SNC mientras que los receptores de NK-3 se expresan principalmente en el SNC.

Los receptores de neurocinina intervienen como mediadores en una variedad de efectos biológicos estimulados por la taquicinina que incluyen: transmisión de señales neuronales excitadoras en el SNC y la periferia (p. ej. señales de dolor), modulación de la actividad contráctil de los músculos lisos, modulación de respuestas inmunitarias e
20 inflamatorias, inducción de efectos hipotensores por dilatación de los vasos sanguíneos periféricos y estimulación de las secreciones de las glándulas endocrinas y exocrinas.

En el SNC, se ha demostrado que la activación de los receptores de NK-3 modula la liberación de dopamina, acetilcolina y serotonina, sugieren una utilidad terapéutica para ligandos de NK-3 para el tratamiento de diversos trastornos incluidas la ansiedad, depresión, esquizofrenia y obesidad. Los estudios en el cerebro de primates han
25 demostrado la presencia de ARNm de NK-3 en diversas regiones relevantes para estos trastornos. Los estudios en ratas han mostrado receptores de NK-3 que están situados en neuronas que contienen MCH en el hipotálamo lateral y la *zona incerta*, de nuevo sugiriendo una utilidad terapéutica para los ligandos de NK-3 para obesidad.

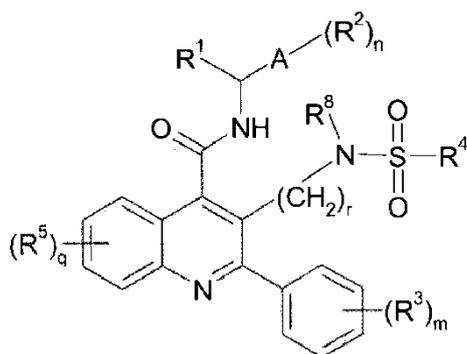
Se han desarrollado ligandos sin péptidos para cada uno de los receptores de taquicinina, sin embargo los known antagonistas del receptor de NK-3 sin péptidos adolecen de una serie de problemas tal como la selectividad de la especie que limita el potencial para evaluar estos compuestos en muchos modelos de enfermedad apropiados. Se
30 desean por consiguiente nuevos ligandos del receptor de NK-3 sin péptido para su utilización como agentes terapéuticos y como herramientas para investigar las consecuencias biológicas de la modulación del receptor de NK-3.

El documento WO 95/32948 describe derivados de quinolina como antagonistas del receptor de NK3 taquicinina. El documento WO 00/31037 describe derivados de quinolina-4-carboxamida como antagonistas de los receptores de NK-2 y NK-3. El documento WO 02/38548 describe derivados de quinolina-4-carboxamida como antagonistas de los receptores de NK-2 y NK-3. El documento WO 00/64877 describe 2-aminoquinolinacarboxamidas como ligandos del receptor de neurocinina. El documento WO 97/19926 describe derivados de quinolina-4-carboxamida, su
35 preparación y su utilización como antagonistas de los receptores de neurocinina 3 (NK-3) y de neurocinina 2 (NK-2). El documento WO 2006/050991 describe compuestos que tienen actividad en el receptor de NK3 y sus usos en medicina.

Sumario de la invención

Se describe un compuesto con una afinidad por los receptores de NK-3 (NK-3r). Este compuesto tiene potencial para el tratamiento de un amplio conjunto de enfermedades, trastornos y afecciones incluidas pero sin limitarse a
45 depresión, ansiedad, trastornos cognitivos, psicosis, obesidad, enfermedades inflamatorias incluidas el síndrome del intestino irritable y el trastorno inflamatorio del intestino, emesis, preeclampsia, neumonía obstructiva crónica, trastornos relacionados con excesivas gonadotropinas y/o andrógenos incluidos dismenorrea, hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata y cáncer testicular en que la modulación de la actividad de los receptores de NK-3 es beneficiosa.

50 Los ligandos para receptores de NK-3 descritos o una de sus sales farmacéuticamente aceptable están representados por un compuesto de fórmula I,



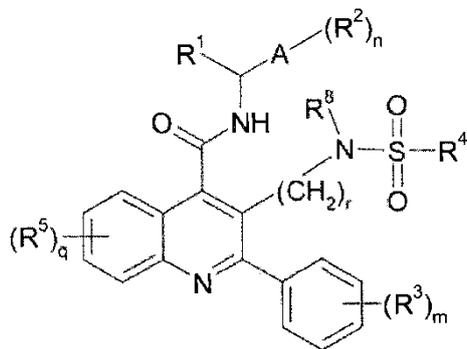
seleccionado de:

3-[(metilsulfonyl)amino]-2-fenil-N-[(1S)-1-fenilpropil]quinolin-4-carboxamida.

- 5 También se describen composiciones farmacéuticas y formulaciones que contienen el compuesto, su utilización en el tratamiento de enfermedades y afecciones ya sea solo o en combinación con otros compuestos o principios terapéuticamente activos, procesos y productos intermedios utilizados para prepararlos, sus empleos como medicamentos, sus empleos en la preparación de medicamentos y sus empleos para diagnóstico y análisis clínico. En especial se describe un compuesto, composiciones que lo contienen y su empleo en el tratamiento o prevención de enfermedades y trastornos relacionados con una amplia gama de enfermedades o trastornos en los que los receptores de NK-3 se considera que desempeñan una función.

Descripción detallada de la invención

El compuesto de la invención es un compuesto de fórmula I,



seleccionado de:

- 15 3-[(metilsulfonyl)amino]-2-fenil-N-[(1S)-1-fenilpropil]quinolin-4-carboxamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.

- 20 El compuesto de la presente invención tiene la ventaja de que puede ser más soluble, ser absorbido más fácilmente y ser más eficaz *in vivo*, producir menos efectos secundarios, ser menos tóxico, ser más potente, más selectivo, actuar durante más tiempo, estar menos metabolizado y/o tener mejores propiedades farmacocinéticas que compuestos conocidos o tener otras propiedades farmacológicas o fisicoquímicas útiles que éstos. Utilizando ensayos para actividad funcional descritos en la presente memoria, el compuesto de la invención se encontrará que tiene una IC₅₀ inferior a aproximadamente 1 μM para receptores de NK-3 potencialmente menos de aproximadamente 100 nM para receptores de NK-3.

Abreviaturas y definiciones

- 25 Tal como se utiliza en la presente memoria, a menos que se indique de otra manera, halo o halógeno se refiera a flúor, cloro, bromo o yodo;

EDC se refiera a 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida;

EDTA se refiera a ácido etilendiamintetraacético;

HEPES se refiera a la sal monosódica del ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina etansulfónico, y

TEA se refiera a la trietilamina.

En los procedimientos descritos en la presente memoria, donde sea necesario, hidroxilo, amino u otros grupos reactivos pueden protegerse utilizando un grupo protector como se describe en el texto ordinario "Protecting groups in Organic Synthesis", 3ª Edición (1999) de Greene y Wuts.

- 5 A menos que se exprese de otra manera, las reacciones se realiza en atmósfera inerte, preferiblemente en una atmósfera de nitrógeno y suelen realizarse a una presión de aproximadamente una a aproximadamente tres atmósferas, preferiblemente a presión ambiente (aproximadamente una atmósfera).

El compuesto de la invención y los productos intermedios pueden aislarse a partir de sus mezclas de reacción por técnicas normalizadas.

- 10 Las sales de adición de ácido del compuesto de fórmula I que pueden mencionarse incluyen sales de ácidos minerales, por ejemplo las sales de hidrocloreuro e hidrobromuro; y las sales formadas con ácidos orgánicos tales como las sales de formato, acetato, maleato, benzoato, tartrato y fumarato.

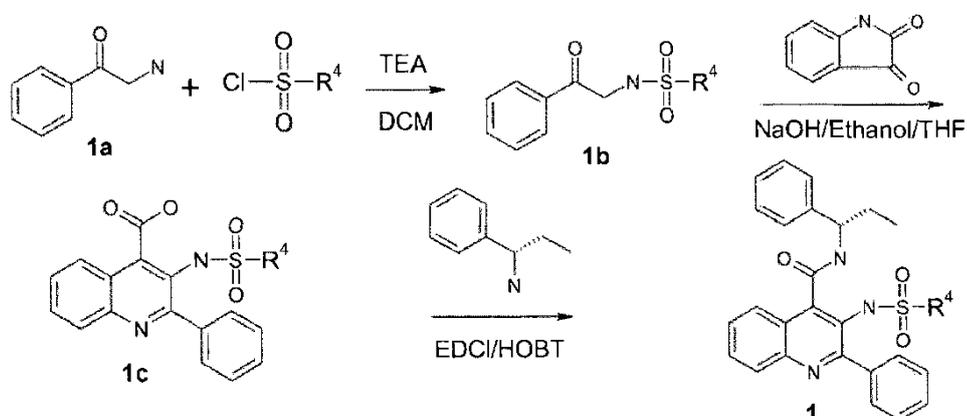
- 15 Las sales de adición de ácido del compuesto de fórmula I pueden formarse haciendo reaccionar la base libre o una sal, enantiómero o uno de sus derivados protegidos, con uno o más equivalentes del ácido apropiado. La reacción puede llevarse a cabo en un disolvente o medio en el que la sal es insoluble o en un disolvente en el que la sal es soluble, p. ej., agua, dioxano, etanol, tetrahidrofurano o éter dietílico, o una mezcla de disolventes, que puede eliminarse al vacío o por liofilización. La reacción puede ser un proceso de metátesis o puede llevarse a cabo en una resina de intercambio iónico.

- 20 El compuesto de fórmula I puede existir en formas tautómeras, todas las cuales están incluidas dentro del alcance de la invención. Los isómeros ópticos pueden aislarse por separación de una mezcla racémica de los compuestos que utilizan técnicas convencionales, p. ej. cristalización fraccionada o HPLC quiral. Alternativamente cada enantiómero puede prepararse por reacción del material de partida ópticamente activo apropiado en condiciones de reacción que no produzcan racemization.

Síntesis y esquemas

- 25 Los compuestos de fórmula I pueden prepararse por los métodos ilustrados en los esquemas siguientes.

Esquema 1



El esquema 1 ilustra la síntesis del ejemplo 1.

- 30 En un aspecto adicional la invención se refiere a compuestos descritos en la presente memoria en donde uno o más de los átomos es un radioisótopo del mismo elemento. En una forma específica de este aspecto de la invención el compuesto está marcado con tritio. Dichos compuestos radiomarcados se sintetizan ya sea por incorporación de materiales de partida radiomarcados con radio o, en el caso del tritio, intercambio de hidrógeno por tritio por métodos conocidos. Los métodos conocidos comprenden (1) halogenación electrofílica, seguida de reducción del halógeno en presencia de una fuente de tritio, por ejemplo, por hidrogenación con gas tritio en presencia de un catalizador de paladio, o (2) intercambio de hidrógeno por tritio realizada en presencia de gas tritio y un catalizador organometálico adecuado (p. ej. paladio).

- 35 Los compuestos de la invención marcados con tritio son útiles para el descubrimiento de nuevos compuestos medicinales que se unen a un receptor de NK-3 y modulaten la actividad, por agonismo, agonismo parcial o antagonismo de éste. Dichos compuestos marcados con tritio pueden utilizarse en ensayos que miden el desplazamiento de dichos compuestos para evaluar la fijación de ligandos que se unen a receptores de NK-3.

- 40 En un aspecto adicional la invención se refiere a compuestos descritos en la presente memoria que comprenden

5 además uno o más átomos es un radioisótopo de un radioisótopo. En una forma específica de este aspecto de la invención el compuesto comprende un halógeno radioactivo. Dichos compuestos radiomarcados se sintetizan incorporando materiales de partida radiomarcados por métodos conocidos. Dichos compuestos que comprenden uno o más átomos de un radioisótopo son útiles como ligandos de tomografía de emisión de positrones (PET) y para otros usos y técnicas para determinar la posición de los receptores de NK3.

Usos terapéuticos de compuestos:

10 Un aspecto adicional de la invención es el compuesto según la invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, para su utilización en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o afección seleccionada de depresión, ansiedad, trastornos cognitivos, psicosis, obesidad, enfermedades inflamatorias incluidas el síndrome del intestino irritable y el trastorno inflamatorio del intestino, emesis, preeclampsia, neumonía obstructiva crónica, trastornos relacionados con excesivas gonadotropinas y/o andrógenos incluidos dismenorrea, hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata y cáncer testicular. Más realizaciones específicas comprenden el compuesto o una de sus sales farmacéuticamente aceptable para su utilización en el tratamiento o profilaxis de la ansiedad, depresión u obesidad.

15 Un aspecto adicional de la invención es la utilización del compuesto según la invención, o de una de sus sales farmacéuticamente aceptable, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de enfermedades o afecciones seleccionadas de depresión, ansiedad, trastornos cognitivos, psicosis, obesidad, enfermedades inflamatorias incluidas el síndrome del intestino irritable y el trastorno inflamatorio del intestino, emesis, preeclampsia, neumonía obstructiva crónica, trastornos relacionados con excesivas gonadotropinas y/o andrógenos incluidos dismenorrea, hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata y cáncer testicular.

20 Composiciones farmacéuticas

El compuesto de la invención o una de sus sales farmacéuticamente aceptable, puede utilizarse por sí mismo o en forma de preparados medicinales apropiados para administración intestinal o parenteral. Según un aspecto adicional de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la invención o una de sus sales terapéuticamente aceptable, junto con al menos un diluyente, lubricante o excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 Preferiblemente la composición comprende menos del 80% y más preferiblemente menos del 50% en peso del compuesto de la invención mezclado con un diluyente, lubricante o excipiente inerte, farmacéuticamente aceptable.

Ejemplos de diluyentes, lubricantes y excipientes son:

- para comprimidos y grageas: lactosa, almidón, talco, ácido esteárico;
- 30 • para cápsulas: ácido tartárico o lactosa;
- para soluciones inyectables: agua, alcoholes, glicerina, aceites vegetales;
- para supositorios: aceites naturales o hidrogenados o ceras.

35 Se ha descrito también un procedimiento para la preparación de dicha composición farmacéutica, procedimiento que comprende el mezclado o composición de los ingredientes conjuntamente y la elaboración de los ingredientes mezclados en comprimidos o supositorios, encapsulación de los ingredientes en cápsulas o disolución de los ingredientes para formar soluciones inyectables.

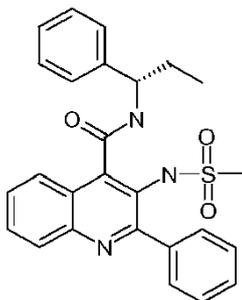
40 Los derivados farmacéuticamente aceptables comprenden solvatos y sales. Por ejemplo, el compuesto de la invención puede formar sales de adición de ácido con ácidos, tales como los ácidos convencionales farmacéuticamente aceptables incluidos los ácidos maleico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, acético, fumárico, salicílico, cítrico, láctico, mandélico, tartárico y metansulfónico.

45 Las sales de adición de ácido del compuesto de fórmula I que pueden mencionarse comprenden sales de ácidos minerales, por ejemplo las sales de hidrócloruro e hidrobromuro; y las sales formadas con ácidos orgánicos tales como las sales de formato, acetato, maleato, benzoato, tartrato y fumarato. Las sales de adición de ácido del compuesto de fórmula I pueden formarse haciendo reaccionar la base libre o una sal, enantiómero o uno de sus derivados protegidos, con uno o más equivalentes del ácido apropiado. La reacción puede llevarse a cabo en un disolvente o medio en el que la sal es insoluble o en un disolvente en el que la sal es soluble, p. ej., agua, dioxano, etanol, tetrahidrofurano o éter dietílico, o una mezcla de disolventes, que puede eliminarse al vacío o por liofilización. La reacción puede ser un proceso de metátesis o puede llevarse a cabo en una resina de intercambio iónico.

50 Para los usos, medicamentos y composiciones mencionados en la presente memoria la cantidad de compuesto utilizado y la dosis administrada variará, desde luego, con el compuesto empleado, el modo de administración y el tratamiento deseado. Sin embargo, en general, se obtienen resultados satisfactorios cuando el compuesto de la invención se administra a una dosis diaria de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal del animal. Dichas dosis pueden administrarse en dosis divididas 1 a 4 veces al día o en forma de liberación

lenta. Para una persona, la dosis diaria total está comprendida en el intervalo de 5 mg a 1.400 mg, más preferiblemente desde 10 mg a 100 mg, y las presentaciones en dosis individuales adecuadas para administración oral comprenden de 2 mg a 1.400 mg del compuesto mezclado con excipientes, lubricantes y diluyentes farmacéuticos sólidos o líquidos.

- 5 El compuesto de la invención puede existir en formas tautómeras, todas las cuales están incluidas dentro del alcance de la invención. El isómero óptico puede aislarse por separación de una mezcla racémica de los compuestos que utilizan técnicas convencionales, p. ej. cristalización fraccionada o HPLC quiral. Alternativamente cada enantiómero puede prepararse por reacción de los materiales de partida ópticamente activos apropiado en condiciones de reacción que no produzcan racemización.
- 10 Ejemplo 1. 3-[(metilsulfonyl)amino]-2-fenil-N-[(1S)-1-fenilpropil]quinolin-4-carboxamida (1) (los identificadores en el ejemplo 1 se refieren al esquema 1).



- Una solución de ácido 3-[(metilsulfonyl)amino]-2-fenilquinolina-4-carboxílico (1c) (342 mg, 1,0 mmol), HOBT hidratado (231 mg, 1,5 mmol), 4-metilmorfolina (276 µl, 1,5 mmol) en tetrahidrofurano (50 ml) se añadió EDCI (289 mg, 1,5 mmol) a t.a. en N₂. Se añadió a continuación (S)-1-fenilpropilamina (135 mg, 1,0 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 12 h. Se eliminaron todos los disolventes al vacío y el residuo se repartió entre acetato de etilo y solución acuosa al 10% de bicarbonato sódico, se secó sobre sulfato sódico y a continuación se concentró al vacío. El residuo se purificó por cromatografía eluyendo con 15-25% de acetato de etilo / hexano para dar el compuesto del título (70 mg, 15%) en forma sólida. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 0,94 (t, 3H), 1,97 (m, 2H), 3,44 (s, 3H), 5,17 (q, 1 H), 5,47 (m, 2H), 7,32 (d, 2H), 7,34 (d, 2H), 7,39 (m, 1 H), 7,78 (m, 2H), 7,84 (m, 2H), 8,08 (m, 1 H), 8,30 (m, 2H), 8,42 (m, 2H). MS APCI, m/z = 460 (M+1). LCMS: 2,51 min.

El ácido inicial, ácido 3-[(metilsulfonyl)amino]-2-fenilquinolina-4-carboxílico (1c), se preparó de la siguiente manera:

N-(2-oxo-2-feniletil)metansulfonamida (1b)

- A una solución de hidrocloreto de 2-amino-1-feniletanona (1.715 mg, 10 mmol) en DMF (20 ml), se añadió TEA (2,8 mg, 20 mmol). Tras el enfriamiento en un baño de agua con hielo, se añadió lentamente cloruro de metilsulfonylo (0,77 ml, 10 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a t.a. durante 12 h. La mezcla se repartió entre diclorometano y salmuera, se secó sobre sulfato sódico y a continuación se concentró al vacío para dar el compuesto del título (2.100 mg, 98%) como un sólido blanco apagado. MS APCI, m/z = 214 (M+1). LCMS: 1,19 min.

Ácido 3-[(metilsulfonyl)amino]-2-fenilquinolina-4-carboxílico (1c)

- Se añadió una solución de hidróxido sódico (1,15 g, 29,0 mmol) en agua (2,5 ml) a isatina (441 mg, 3 mmol). El precipitado marrón resultante se agitó vigorosamente a t.a. durante 20 minutos antes de calentarlo a 85°C. A continuación se añadió gota a gota durante 30 minutos una solución de N-(2-oxo-2-feniletil)metansulfonamida (1 b) (639 mg, 3,0 mmol) en etanol/THF/agua (6,3 ml/1,25 ml/63 ml). La mezcla de reacción se agitó a 85°C durante 4 h más antes de enfriar a t.a. Se eliminaron al vacío todos los disolventes orgánicos y el residuo acuoso se redujo a un volumen de aproximadamente 6 ml. El residuo acuoso se lavó con éter (3 x 10 ml) y a continuación el residuo acuoso se acidificó enfriando a pH 4 con ácido acético. El precipitado formado se recogió, se lavó con agua y se secó para dar el compuesto del título en forma sólida (721 mg, 70,3%). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) δ 3,11 (s, 3H), 7,05 (d, 1 H), 7,39 (d, 2H), 7,64 (m, 2H), 7,78 (m, 1 H), 8,06 (m, 1 H), 8,19 (m, 1 H), 8,47 (m, 1H), 10,03 (b, 2H), MS APCI, m/z = 343 (M+1). LCMS: 1,07 min.

40 Pruebas biológicas

Actividad de fijación del receptor de NK-3:

- Generalmente, la actividad de fijación del NK-3r puede evaluarse utilizando ensayos realizados como se describe en Krause *et al.*, (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 310-315, 1997). El ADN complementario del NK-3r se clona en ARN hipotalámico humano utilizando procedimientos normalizados. El ADNc del receptor se inserta en un vector de expresión adecuado transfectado en una estirpe celular de ovario de hamster chino, y puede aislarse una estirpe celular clonal que se expresa de manera estable, caracterizada y utilizada para experimentos.

Las células pueden cultivarse en medio de cultivo tisular por técnicas conocidas por los expertos en la técnica y recuperarse por centrifugación a baja velocidad. Pueden homogeneizarse los sedimentos celulares, aislarse todas las membranas celulares por centrifugación a alta velocidad y ponerse en suspensión en solución salina tamponada. Generalmente, pueden realizarse ensayos de fijación al receptor incubando cantidades adecuadas de preparados de membranas purificadas con [¹²⁵I]-metilPhe7-neurocinina B, en presencia o ausencia de compuestos de ensayo. Pueden recolectarse proteínas de la membrana por filtración rápida y puede cuantificarse la radioactividad en un contador de centelleo de placa de radiaciones β. La fijación inespecífica puede distinguirse de la fijación específica mediante el empleo de referencias adecuadas y la afinidad de compuestos por el receptor expresado puede determinarse empleando diferentes concentraciones de compuestos.

10 Preparación de membranas a partir de células CHO transfectadas con receptores clonados de NK-3:

Se clonó un gen del receptor de NK-3 humano utilizando métodos similares a los descritos para otros receptores de NK humanos (Aharony *et al.*, *Mol. Pharmacol.* 45:9-19, 1994; Caccese *et al.*, *Neuropeptides* 33, 239-243, 1999). La secuencia del ADN del receptor de NK-3 clonado difería de la secuencia publicada (Buell *et al.*, *FEBS Letts.* 299,90-95, 1992; Huang *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184,966-972, 1992) que tiene un solo cambio de base T>C imperceptible en el nucleótido 1320 de la secuencia codificadora. Dado que el cambio es imperceptible, el gen clonado proporciona una secuencia de aminoácidos principal para la proteína del receptor de NK-3 codificada idéntica a la secuencia publicada. El ADNc de receptor se utilizó para transfectar células CHO-K1 utilizando métodos normalizados y se aisló y caracterizó un clon que expresa de manera estable al receptor. Se prepararon membranas plasmáticas de estas células como se publicó (Aharony *et al.*, 1994).

20 Se recolectaron y centrifugaron las células para eliminar el medio. Las células sedimentadas se homogeneizaron (Brinkman Polytron, tres arranques de 15 s en hielo) en un tampón consistente en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 120 mM, KC 5 mM, EDTA 10 mM e inhibidores de proteasa (0,1 mg/ml inhibidor de tripsina de semillas de soja, y yodoacetamida 1 mM). Se centrifugó el homogeneizado a 1000xg durante 10 min a 4°C para eliminar el residuo celular. Se lavaron una vez los sedimentos con tampón de homogeneización. Los sobrenadantes se combinaron y centrifugaron a 40.000xg durante 20 min a 4°C. El sedimento que contiene membranas se homogeneizó con una Polytron como anteriormente. La suspensión se centrifugó a 40.000xg durante 20 min a 4°C, el sedimento se puso en suspensión en tampón (HEPES 20 mM, pH 7,4 que contenía MgCl₂ 3 mM, KCl 30 mM y tiorfan 100 μM) y se determinó la concentración de proteínas. La suspensión de membranas se diluyó a continuación hasta 3 mg/ml con tampón que contenía 0,02% de BSA, y se congeló rápidamente. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Ensayo para la actividad de fijación del receptor de NK-3:

Un método de ensayo de fijación del receptor con [¹²⁵I]-MePhe7-NKB se modificó a partir del descrito por Aharony *et al.*, *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 274:1216-1221, 1995.

35 Se realizaron experimentos de competencia en membranas (2 μg proteína/reacción) que contenían 0,2 ml de tampón de ensayo (Tris-HCl 50 mM, MnCl₂ 4 mM, tiorfan 10 μM, pH 7,4), competidores probados y [¹²⁵I]-MePhe7NKB (0,2 nM). Se utilizó ligando homólogo sin marcar (0,5 μM) para definir fijaciones inespecíficas. Se llevaron a cabo incubaciones a 25°C durante 90 min. Se aisló el ligando fijado al receptor por filtración al vacío en un Packard Harvester sobre placas GF/C empapadas previamente en BSA al 0,5%. Las placas se lavaron con Tris 0,02 M, pH 7,4. El cálculo de las constantes de equilibrio de fijación (K_D y K_i), la densidad del receptor (B_{max}) y el análisis estadístico se realizó como se publicó anteriormente (Aharony *et al.*, 1995) empleando los programas informáticos GraphPad Prism o IDBS XLfit.

Actividad funcional de NK-3:

45 Generalmente, la actividad funcional de NK-3 puede evaluarse utilizando ensayos de movilización de calcio en estirpes celulares que expresan NK-3r estable. La movilización de calcio inducida por el agonista de metilPhe7-neurocinina B puede controlarse utilizando un instrumento FLIPR (Molecular Devices) en la manera descrita por el fabricante. Pueden añadirse agonistas a las células y registrarse continuamente respuestas de fluorescencia durante hasta 5 min. Las acciones de los antagonistas pueden evaluarse preincubando células antes de la administración del agonista metilPhe7-neurocinina B. La acción de los agonistas puede evaluarse observando su actividad intrínseca en dicho sistema.

50 Ensayo para actividad funcional de NK-3:

Las células CHO que expresan el receptor de NK-3 se mantuvieron en medio de cultivo (medio F12 de Ham, FBS al 10%, L-glutamine 2 mM, e 50 mg/ml de Higromicina B). Un día antes del ensayo las células se dispensaron en placas de 384 pocillos en medio Ultraculture (Cambrex Bio Science) con L-glutamina 2 mM para conseguir 70-90% de confluencia. Para cuantificar la movilización del calcio inducida por el receptor de NK-3, las células se lavaron en primer lugar con tampón de ensayo consistente en solución salina equilibrada de Hanks, HEPES 15 mM, y probenecid 2,5 mM, pH 7,4. Las células se cargaron a continuación con colorante Fluo4/AM (4,4 μM) en tampón de ensayo. Se incubaron células durante una hora y a continuación se lavaron con tampón de ensayo, se expusieron a senktide 0,02 - 300 nM y se registró la respuesta a la fluorescencia utilizando un instrumento FLIPR (Molecular

5 Devices Corporation). Para cuantificar el antagonismo de la respuesta del agonista, se preincubaron células con concentraciones variables de compuesto de ensayo durante 2-20 min y a continuación se expusieron a senktide 2 nM, una concentración que sol provoca aproximadamente un 70% de respuesta de calcio máxima. Los datos resultantes se analizaron utilizando el programa informático XLfit (fabricante IDBS) para determinar los valores de EC₅₀ e IC₅₀.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es 3-[(metilsulfonil)amino]-2-fenil-N-[(1S)-1-fenilpropil]quinolin-4-carboxamida o una de sus sales farmacéuticamente aceptable.
- 5 2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto de la reivindicación 1 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con al menos un diluyente, lubricante o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 3. Un compuesto como el definido en la reivindicación 1 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o afección seleccionada de depresión, ansiedad, trastornos cognitivos, psicosis, obesidad, enfermedades inflamatorias incluidas el síndrome del intestino irritable y el trastorno inflamatorio del intestino, emesis, preeclampsia, neumonía obstructiva crónica, trastornos relacionados con excesivas gonadotropinas y/o andrógenos incluidos dismenorrea, hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata y cáncer de testículos.
- 15 4. Un compuesto como el definido en la reivindicación 1 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables para su utilización en el tratamiento o profilaxis de la ansiedad, depresión u obesidad.
- 20 5. Utilización de un compuesto como el definido en la reivindicación 1 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o afección, de un compuesto como el definido en la reivindicación 1 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su utilización en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad o afección seleccionada de depresión, ansiedad, trastornos cognitivos, psicosis, obesidad, enfermedades inflamatorias incluidas el síndrome del intestino irritable y el trastorno inflamatorio del intestino, emesis, preeclampsia, neumonía obstructiva crónica, trastornos relacionados con excesivas gonadotropinas y/o andrógenos incluidos dismenorrea, hiperplasia prostática benigna, cáncer de próstata y cáncer de testículos.
- 25 6. Utilización de un compuesto como el definido en la reivindicación 1 o una de sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de la ansiedad, la depresión o la obesidad.