

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 959**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/12** (2006.01)

**C07C 233/60** (2006.01)

**C07D 231/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2007 E 12001852 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2510925**

54 Título: **Moduladores de pequeñas moléculas de la actividad de TRP-P8**

30 Prioridad:

**15.02.2006 US 773435 P**

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

**02.12.2016**

73 Titular/es:

**DENDREON PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)  
400 Somerset Corporate Boulevard  
Bridgewater, NJ 08807, US**

72 Inventor/es:

**MORENO, OFIR;  
NATARAJAN, SATEESH y  
DUNCAN, DAVID F.**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 592 959 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

Moduladores de pequeñas moléculas de la actividad de TRP-P8.

5 **Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica los derechos de prioridad de la solicitud de patente provisional US nº 60/773.435, presentada el 15 de febrero de 2006.

10 La presente invención se refiere generalmente a los campos de biología celular, bioquímica, y química orgánica. Más particularmente, la presente invención proporciona moduladores de pequeñas moléculas de la actividad de Trp-p8, que incluye agonistas de Trp-p8 y antagonistas de Trp-p8, así como a composiciones que comprenden moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas. También se proporcionan procedimientos para identificar y  
15 caracterizar nuevos moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas, así como compuestos para su utilización en procedimientos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión, activación y/o señalización de Trp-p8. Las enfermedades ejemplificativas tratadas adecuadamente por las composiciones y compuestos de la presente invención incluyen cánceres, tales como cánceres de pulmón, de mama, de colon, y/o de próstata.

20 **Antecedentes de la invención**

El carcinoma de próstata es el cáncer más habitual diagnosticado en hombres en los Estados Unidos de América, y tiene la segunda tasa de mortalidad por cáncer más elevada, cediendo únicamente ante el adenocarcinoma pulmonar. Parker *et al.*, CA Cancer J. Clin. 46:5-27 (1996). Aunque es posible tratar eficazmente cáncer de próstata confinado en el órgano, existen opciones de tratamiento muy limitadas para la enfermedad metastásica. De este  
25 modo, es de gran importancia encontrar nuevas formas de diagnosticar la enfermedad en la etapa temprana y monitorizar cuidadosamente tanto la progresión como el tratamiento de la enfermedad, así como desarrollar nuevos enfoques terapéuticos. Para lograr esto, es importante comprender los mecanismos moleculares del desarrollo del cáncer de próstata e identificar nuevos marcadores bioquímicos para el diagnóstico y progresión de la enfermedad.

30 Actualmente se dispone muy pocos marcadores específicos para la próstata. Los marcadores mejor conocidos y bien caracterizados de valor de diagnóstico probado para el cáncer de próstata son las proteínas ácido prostático fosfatasa (PAP), antígeno específico de la próstata (PSA), y antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA). Cada una de estas proteínas también se ha convertido en la diana para nuevos enfoques  
35 inmunoterapéuticos para el tratamiento de la enfermedad. Horoszewicz *et al.*, Anticancer Res. 7:927-935 (1987); Barren *et al.*, Prostate 30:65-68 (1997); Murphy *et al.*, Prostate 33:281-285 (1997); Murphy *et al.*, Prostate 26:164-168 (1995); Rochon *et al.*, Prostate 25:219-223 (1995); Correale *et al.*, J. Immunol. 161:3186-3194 (1998); y Murphy *et al.*, Prostate 38:73-78 (1999).

40 Se ha dado a conocer que una proteína de canales catiónicos, denominada de forma diversa Trp-p8 (potencial del receptor transitorio-p8), TRPM8, y CMR1 (receptor 1 de frío y de mentol), se expresa preferentemente en la próstata. La clonación de ADNc de *Trp-p8* humano de longitud completa reveló un transcrito que corresponde a un polipéptido de 1104 aminoácidos que comparte homología con la familia *trp* de canales de calcio. Clapham *et al.*, Nature Reviews 2: 387-396 (2001) y Clapham *et al.*, IUPHAR Compendium, TRP Channels (2002). Trp-p8 muestra homología particularmente elevada con el gen TRPC7 humano - una proteína putativa del canal de Ca<sup>2+</sup> de la  
45 familia *trp* que está muy expresada en el tejido cerebral. Nagamine *et al.*, Genomics 54: 124-131 (1998). Trp-p8 también muestra homología significativa con melastatina humana, otra proteína relacionada con la familia Trp expresada en melanocitos y que se cree que es un gen supresor de tumores. Duncan *et al.*, Cancer Res. 58: 1515-1520 (1998) y Hunter *et al.*, Genomics 54: 116-123 (1998). Quizás el mayor interés es la observación de que el gen *Trp-p8* parece estar expresado en un gran espectro de lesiones neoplásicas no prostáticas, además de prostáticas.  
50 Tsavaler *et al.*, Cancer Res. 61 (9): 3760-9 (2001).

La superfamilia Trp comprende más de 20 proteínas de canales de calcio relacionadas que se han visto implicadas en procesos que incluyen fisiología sensorial a vasorrelajación y fertilidad masculina. Los defectos en los canales de Trp se han asociado con cambios en el control del crecimiento y supresión de tumores. Mientras que todas las  
55 proteínas de Trp son canales de calcio, varían significativamente en su selectividad y modo de activación. Los miembros de la superfamilia Trp comparten una homología de secuencia significativa y similitudes estructurales predichas, tales como tamaño de segmentos transmembranarios predichos.

El Trp-p8 está sobreexpresado en un abanico de cánceres, incluyendo de próstata, de mama, pulmonar y de colon, mientras que, en tejidos normales, está expresada predominantemente en la próstata humana [Tsavaler *et al.*, *más arriba*] y ganglios de la raíz dorsal (DRG), (Dendreon, observación no publicada). Fuessel *et al.* dio a conocer que Trp-p8 es un gen muy específico de la próstata y asociado con carcinoma de próstata, clasificándolo así como una  
60 diana potencial para terapias específicas. International J. of Oncology 23: 221-228 (2003). Entre otras especies, se da a conocer que los ortólogos de Trp-p8 se expresan en un subconjunto de DRG y neuronas de ganglios trigeminales (TG) en rata [McKemy *et al.*, Nature 416 (6876): 52-8 (2002)] y ratón [Peier *et al.*, Cell 108 (5): 705-15 (2002)] igualmente. De este modo, el Trp-p8 es un marcador expresado en todos los tumores, con uso potencial

significativo en el diagnóstico de la enfermedad y monitorización de la progresión de la enfermedad durante el tratamiento, así como una diana viable para la terapia contra el cáncer.

5 La asociación de Trp-p8 con los cánceres de próstata, pulmonar, de mama, y de colon, y los diversos papeles importantes que ejerzan los canales iónicos en funciones celulares vitales sugieren que el canal de Trp-p8 puede tener una función significativa en la señalización y/o proliferación de células cancerosas. La modulación de la actividad de Trp-p8, ya sea mediante activación vía un agonista, o mediante inhibición vía un antagonista, a una temperatura fisiológica, puede ser valiosa como un terapéutico para modular de manera específica las células que expresan Trp-p8. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente US 10/923.413. El documento WO 2005/020897 describe composiciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de Trp-p8.

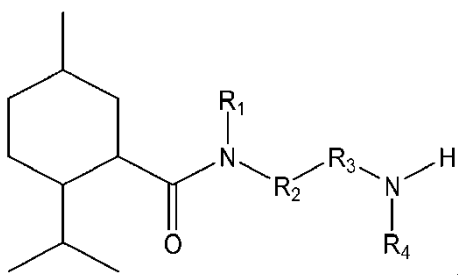
15 En consecuencia, continúa existiendo la necesidad en la técnica de moduladores de pequeñas moléculas de la actividad de Trp-p8, composiciones que comprendan uno o más moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas, y métodos para la identificación y uso de pequeñas moléculas para modular la actividad de Trp-p8 en una célula y para el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión aberrante de Trp-p8.

### Breve resumen de la invención

20 La presente invención satisface estas y otras necesidades relacionadas al proporcionar moduladores de pequeñas moléculas de la actividad de Trp-p8, incluyendo agonistas de Trp-p8 y antagonistas de Trp-p8, así como composiciones que comprenden tales moduladores de Trp-p8, y procedimientos para identificar y usar moduladores de Trp-p8. Dentro de ciertas formas de realización, los compuestos de la presente invención se unen a y activan Trp-p8 y/o estimulan el influjo catiónico, incluyendo, pero sin limitarse a, influjo de calcio, en una célula en la que el influjo de calcio se correlaciona con la toxicidad inducida por el modulador de Trp-p8. De este modo, en estas y otras formas de realización, los agonistas de Trp-p8 de la presente invención son eficaces inhibiendo el crecimiento de y/o induciendo apoptosis y/o necrosis en una célula que expresa Trp-p8. En las formas de realización alternativas se proporcionan antagonistas de Trp-p8 que son eficaces reduciendo la actividad basal de Trp-p8 en una célula, reduciendo de ese modo la viabilidad de células que expresan Trp-p8. Por lo tanto, ventajosamente, los agonistas y antagonistas de la presente invención se pueden usar para tratar enfermedades que comprenden de manera no limitativa, cánceres de mama, pulmón, colon y/o próstata, que están asociados con la expresión de Trp-p8.

35 Uno o más moduladores de Trp-p8 se pueden formular en composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables y/o uno o más compuestos terapéuticos adicionales. Tales composiciones encontrarán utilidad en procedimientos para el tratamiento de una o más enfermedades asociadas con la expresión de Trp-p8.

40 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas de la siguiente Fórmula I:

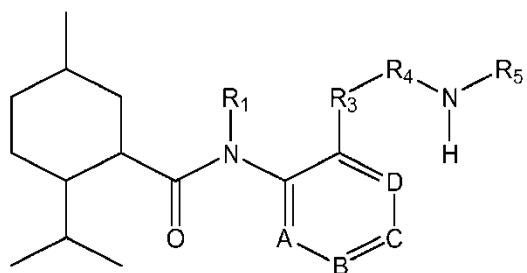


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

45  $R_1$  es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilalquilo y arilo, o  $R_1$  y  $R_2$  junto con el grupo nitrógeno pueden formar un grupo heterocíclico o cíclico de hasta 25 átomos;  $R_2$  es seleccionado de entre arilo y arilalquilo;  $R_3$  es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo,  $R_4$  es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo; o  $R_3$  y  $R_4$  junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

Dentro de determinados compuestos ejemplificativos de fórmula I,  $R_1$  es H;  $R_2$  es fenilo; o  $R_4$  es H y/o metilo.

55 En una forma de realización preferida del primer aspecto, los moduladores de moléculas pequeñas de Trp-p8 presentan la fórmula I-A siguiente:



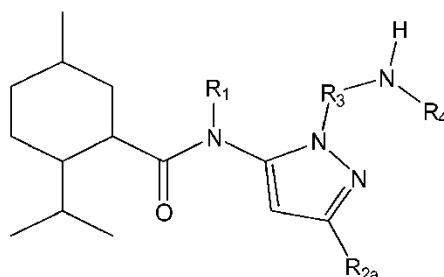
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

- 5 A, B, C y D son seleccionados independientemente de entre CR<sub>2</sub> y N; en el que por lo menos uno de entre A, B, C y D es CR<sub>2</sub>; en el que R<sub>2</sub> es un elemento seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, halógeno, y arilalquilo, R<sub>6</sub>O-, y R<sub>6</sub>S-, en el que R<sub>6</sub> es alquilo; en el que cuando dos adyacentes de A, B, C, y D son CR<sub>2</sub>, los dos R<sub>2</sub> pueden combinarse para formar un único grupo arilo, cicloalquilo, o heterocicloalquilo;
- 10 R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, y arilalquilo;
- R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo, arilo, arilalquilo, -NR<sub>7</sub>C(O)-, -C(O)NR<sub>7</sub>-, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, y -NR<sub>7</sub>-, en el que R<sub>7</sub> es un elemento seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, y arilalquilo;
- 15 R<sub>4</sub> es seleccionado de entre -C(O)R<sub>8</sub>-, alquilo, arilalquilo, y heteroalquilo, en el que R<sub>8</sub> es seleccionado de entre alquilo y heteroalquilo;
- R<sub>5</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo; o
- 20 R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

Dentro de determinados compuestos ejemplificativos de la fórmula I-A, R<sub>1</sub> es H; R<sub>7</sub> es H; R<sub>8</sub> comprende 2, 3 o 4 carbonos; R<sub>4</sub> es seleccionado de entre propionilo, etilo, butirilo, hidroxipropionilo, y 3-hidroxibutirilo; R<sub>5</sub> es seleccionado de entre H y metilo; R<sub>6</sub> comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 carbonos; y/o R<sub>2</sub> es seleccionado de entre metoxi, metilsulfanilo, fenilo y H.

Son ejemplificados en la presente memoria unos compuestos de fórmula I-A que comprenden un grupo seleccionado de entre 2-(2-amino-propionilamino)-4-metoxi-fenilo, N-(2-amino-etil)-2-amino-5-metilsulfanil-fenilo, 1-(2-amino-etoxi)-naftalen-2-ilo, 2-(2-amino-etilamino)-4-metilsulfanil-fenilo, N-(2-amino-etil)-5-metoxi-benzamida, 2-(2-amino-butirilamino)-4-metoxi-fenilo, 2-(2-amino-3-hidroxi-propionilamino)-4-metoxi-fenil, 3-(2-amino-etilamino)-naftalen-2-ilo, N-(2-amino-etil)-benzamida, 2-(2-amino-acetilamino)-fenil, 2-(2-amino-3-hidroxi-butirilamino)-4-metoxi-fenilamida, y 2-(2-amino-acetilamino)-4-metoxi-fenilo.

En otra forma de realización preferida del primer aspecto, los moduladores de moléculas pequeñas de Trp-p8 presentan la fórmula I-B siguiente:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

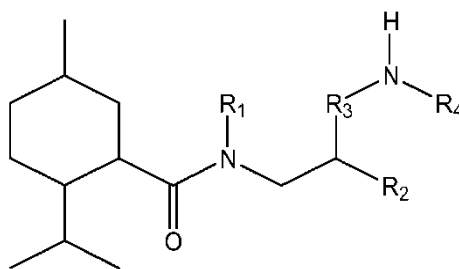
- 40 R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo y arilalquilo;
- R<sub>2a</sub> es seleccionado de entre arilo, alquilo, heteroalquilo y arilalquilo;
- R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo y arilalquilo;
- 45 R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo y arilalquilo; o
- R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

Dentro de determinados compuestos ejemplificativos de fórmula I-B, R<sub>1</sub> es H; R<sub>3</sub> es seleccionado de entre metileno, etileno, propileno y butileno; R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H y metilo; y/o R<sub>2a</sub> es seleccionado de entre fenilo, furano,

metilpirrol, metilbenzoato, aminofenilo, hidroxifenilo, cianofenilo y metoxifenilo.

Son ejemplificados en la presente memoria los compuestos de fórmula I-B que comprenden un grupo seleccionado de entre 2-(2-amino-etil)-5-furan-2-il-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-propil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(3-amino-propil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(4-amino-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(4-hidroxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-metilamino-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(3-ciano-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(3-metoxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, éster metílico de ácido 4-{1-(2-amino-etil)-1H-pirazol-3-ilo} benzoico, 2-(2-amino-etil)-5-(3-amino-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, y 2-(2-amino-etil)-5-(3-hidroxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona unos moduladores de moléculas pequeñas de Trp-p8 que presentan la fórmula I-C siguiente:



o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, y arilalquilo;

R<sub>2</sub> es seleccionado de entre arilo y arilalquilo;

R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo, arilalquilo, -NHC(O)R<sub>5</sub>-, -OR<sub>5</sub>-, y -NHR<sub>5</sub>-, en el que R<sub>5</sub> es alquilo o heteroalquilo;

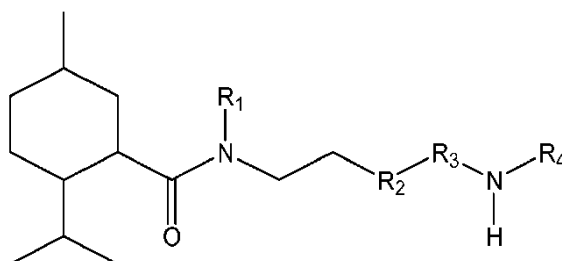
R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo; o

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

Dentro de determinados compuestos ejemplificativos de fórmula I-C, R<sub>1</sub> es H; R<sub>2</sub> es fenilo; R<sub>5</sub> es seleccionado de entre metileno, etileno, propileno, y butileno; R<sub>3</sub> es seleccionado de entre propionilamino, etoxi, propoxi, y etilamino; y/o R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H y metilo.

Son ejemplificados en la presente memoria los compuestos de fórmula I-C que comprenden un grupo seleccionado de entre 2-(2-amino-propionilamino)-2-fenil-etilo, 2-(2-amino-etoxi)-2-fenil-etilo, 2-(3-amino-propoxi)-2-fenil-etilo, 2-(2-dimetilamino-etoxi)-2-fenil-etilo, y 2-(2-amino-etilamino)-2-fenil-etilo.

En otra forma de realización preferida del primer aspecto, los moduladores de moléculas pequeñas de Trp-p8 presentan la fórmula I-D siguiente:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo y arilalquilo;

R<sub>2</sub> es seleccionado de entre arilo y arilalquilo;

R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo y arilalquilo;

R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo y arilalquilo; o

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

Dentro de determinados compuestos ejemplificativos de fórmula I-D, R<sub>1</sub> es H; R<sub>2</sub> es seleccionado de entre fenilo y fenilamino; R<sub>3</sub> es seleccionado de entre metileno, etileno, propileno, butileno, metilamino, etilamino, propilamino, butilamino, y acetilo; y/o R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H y metilo.

5 Son ejemplificados en la presente memoria los compuestos de fórmula I-D que comprenden un grupo seleccionado de entre 2-[2-(2-amino-etilamino)-fenil]-etilo, 2-(2-aminometilo-fenil)-etilo, y 2-[(2-amino-acetil)-fenil-amino]-etilo.

10 Otros aspectos de la presente invención proporcionan composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D en combinación con un excipiente, vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Se ejemplifican en la presente memoria en los Ejemplos agonistas y antagonistas de Trp-p8 de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D; procedimientos para sintetizar agonistas y antagonistas de Trp-p8  
15 ejemplares de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D; y datos de EC50 que demuestran la eficacia *in vitro* y la actividad específica de cada uno de los agonistas y antagonistas de Trp-p8 descritos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D.

Todavía en otros aspectos, las composiciones de la presente invención comprenden uno o más compuestos de  
20 Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D formulados junto con uno o más agentes terapéuticos del cáncer. Alternativamente, las composiciones de la presente invención comprenden un compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D formulado independientemente con uno o más agentes terapéuticos del cáncer. Esto es, uno o más compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D y el agente terapéutico del cáncer se formulan separadamente.

25 Los agentes terapéuticos del cáncer adecuados comprenden de manera no limitativa, agentes antimetabólicos, que comprenden de manera no limitativa, paclitaxel, vincristina, y etopósido; agentes alquilantes, que comprenden de manera no limitativa, mecloretamina, ciclofosfamida, y carmustina; antimetabolitos, que comprenden de manera no limitativa, metotrexato, gemcitabina, lometrexol, 5-fluorouracilo, y 6-mercaptopurina; antibióticos citotóxicos, que comprenden de manera no limitativa, doxorubicina, daunorubicina, bleomicina, mitomicina C, y estreptozocina;  
30 agentes de platino, que comprenden de manera no limitativa cisplatino y carboplatino; agentes hormonales, que comprenden de manera no limitativa antiestrógenos tales como tamoxifeno y dietilestilbestrol, así como antiandrógenos tales como flutamida; agentes antiangiogénicos; e inhibidores de farnesil transferasa.

35 En ciertos aspectos, los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D se administran en combinación con agentes terapéuticos del cáncer que por sí mismos son ineficaces para modular la actividad de Trp-p8 en una célula que expresa Trp-p8. Sorprendentemente, estos tipos de terapias de combinación dan como resultado una eficacia potenciada con respecto al uso de un único compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D solo.

40 En otros aspectos, los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D se administran en combinación con uno o más moduladores de Trp-p8 adicionales.

Otras formas de realización de la presente invención proporcionan un compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D para su utilización en procedimientos para disminuir la viabilidad celular y/o inhibir  
45 el crecimiento celular, procedimientos para inducir la apoptosis y/o necrosis en una célula que expresa Trp-p8, procedimientos para modular la función de receptor de Trp-p8, o terapia o diagnóstico médicos. Los ejemplos de tales procedimientos comprenden la etapa de poner en contacto una célula con un compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D en una concentración y durante un tiempo requerido para disminuir la viabilidad celular y/o inhibir el crecimiento celular, para elevar el calcio intracelular, y/o para inducir apoptosis y/o  
50 necrosis de la célula.

En todavía otras formas de realización, la presente invención proporciona un compuesto y/o composición de la presente invención para su utilización en procedimientos para tratar una enfermedad en un mamífero, muy típicamente un ser humano. En determinadas formas de realización, los métodos incluyen la administración de una  
55 composición que comprende una combinación de un compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D con uno o más agentes terapéuticos del cáncer suministrados de manera simultánea, tal como en una única formulación. En otras determinadas formas de realización, los procedimientos incluyen terapia de combinación, en la que el compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D se administra primero en una formulación, seguido del agente terapéutico del cáncer en una formulación distinta. Los  
60 procedimientos también incluyen un agente terapéutico del cáncer que se suministra primero en una formulación, seguido de un compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D en una formulación distinta.

Los procedimientos terapéuticos descritos en la presente memoria son particularmente eficaces en el tratamiento de  
65 cánceres asociados con la expresión de Trp-p8 que comprenden de manera no limitativa ciertos cánceres de colon, de pulmón, de mama, y de próstata.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para identificar un agonista de Trp-p8, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de poner en contacto una célula que expresa Trp-p8 y una célula que no expresa Trp-p8 con un compuesto de los primer o segundo aspectos *in vitro* durante un periodo y en una cantidad suficientes para disminuir la viabilidad de dicha célula que expresa Trp-p8 pero no de dicha célula que no expresa Trp-p8.

Las características mencionadas anteriormente y características adicionales de la presente invención, y la manera de obtenerlas, se pondrán de manifiesto, y la invención se entenderá mejor haciendo referencia a la siguiente descripción con mayor detalle, a partir de las figuras adjuntas.

### Breve descripción de las figuras

Las figuras 1A-1B son gráficas que representan un ensayo de viabilidad de ATP ejemplificativo adecuado para someter a ensayo y caracterizar moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas de la presente invención. En un ensayo preliminar (figura 1A), los compuestos se ensayaron a 1  $\mu$ M, y la muerte específica de células CHO que expresan Trp-p8 (CHO/Trp-p8) se midió a 37°C. En un ensayo de seguimiento (figura 1B), los compuestos se sometieron a ensayo a diversas concentraciones, y la destrucción de células CHO que expresan Trp-p8 (CHO/Trp-p8) se midió a 37°C. Se derivó un valor de EC<sub>50</sub> a partir de una gráfica de viabilidad celular en función de la concentración.

Las figuras 2A-2C son gráficas que representan los incrementos en calcio intracelular inducidos por el modulador de Trp-p8, según se determina mediante un ensayo de flujo de calcio realizado a 37°C. La figura 2A es un control positivo que demuestra que las células CHO y CHO/Trp-p8 responden de forma similar a 2  $\mu$ M de ionomicina a 37°C en el ensayo de flujo de calcio. La figura 2B es un control negativo que demuestra que las células CHO progenitoras que no expresan Trp-p8 endógena o exógena no responden a agonistas de Trp-p8 a una concentración de 10  $\mu$ M. La figura 2C demuestra que un agonista de Trp-p8 indujo una respuesta específica, dependiente de la concentración, en células CHO/Trp-p8 a 37°C.

La figura 3 son gráficas de datos de citometría de flujo que demuestran que un agonista de Trp-p8 es capaz de inducir específicamente apoptosis en células CHO que expresan Trp-p8 a 37°C, de una manera dependiente de la dosis.

La figura 4 es una gráfica que representa resultados ejemplificativos de un cribado primario para antagonistas de Trp-p8 usando el ensayo de viabilidad de ATP, descrito en la presente memoria, con células CHO/Trp-p8 a 37°C. Las células CHO/Trp-p8 se expusieron a compuestos, a diferentes concentraciones, en 1% de DMSO o 1% de DMSO en combinación con una concentración tóxica de un agonista de Trp-p8. La viabilidad de las células se midió después de 24-26 horas a 37°C usando el ensayo de ATP. Los compuestos que protegieron a las células del efecto tóxico del agonista de Trp-p8 se clasificaron como antagonistas de Trp-p8 (Compuestos A-B). Un compuesto inactivo (Compuesto C) no tuvo ningún efecto protector, y se muestra en la presente memoria con el fin de ilustrar el ensayo.

La figura 5 es una gráfica que representa el cribado y caracterización de antagonistas de Trp-p8 mediante el ensayo de flujo de calcio realizado a 37°C. Se cargaron células CHO/Trp-p8 con el colorante indicador de calcio, Fura-2, y se determinó el incremento en calcio intracelular en respuesta a los compuestos mediante el incremento en la fluorescencia. Las células CHO/Trp-p8 cargadas con el colorante Fura-2 se expusieron a 1% de DMSO o a un antagonista, a diferentes concentraciones, en 1% de DMSO a 37°C. Tres minutos más tarde, se añadió un agonista a las células. Cuando las células se expusieron a concentraciones eficaces del antagonista, su capacidad para responder al agonista se redujo significativamente o se eliminó completamente.

Las figuras 6A-6B son gráficas que representan resultados de un modelo animal ejemplificativo adecuado para someter a ensayo y caracterizar moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas de la presente invención. Se inyectó subcutáneamente a ratones con células CHO/Trp-p8, dando como resultado la formación de tumores sólidos. La longitud (dimensión más grande) y anchura (dimensión perpendicular a y en el mismo plano que la longitud) de cada tumor se midieron con calibres Vernier, y el volumen tumoral se aproximó mediante una fórmula para el volumen de un elipsoide:  $0,52 * L * W^2$ . Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó aproximadamente 100 mm<sup>3</sup>, los ratones se distribuyeron al azar en grupos. En la figura 6A, a los ratones se les administró una única dosis de un compuesto de estudio como una formulación acuosa, o vehículo solo, mediante sonda gasonástrica oral. En la figura 6B, a los ratones se les dosificó repetidamente un compuesto de estudio como una formulación acuosa, o vehículo solo, mediante sonda nasogástrica oral. Los tumores se midieron subsiguientemente entonces en los días indicados. Los datos se presentan como volúmenes tumorales medios  $\pm$  error estándar de la media.

La figura 7 es una gráfica que representa las concentraciones plasmáticas de varios compuestos, como una función del tiempo y la dosis, en ratones tras la administración vía una única inyección intraperitoneal. Los compuestos se disolvieron todos ellos en una formulación acuosa, y se administraron a niveles de dosis

comparables. La sangre se recogió en los puntos de tiempo indicados, y se analizó para determinar los niveles de fármaco.

Las figuras 8A-8B son gráficas que representan la eficacia demostrada por varios compuestos en un modelo de xenoinjerto tumoral murino que expresa Trp-p8. A los ratones se les inyectó subcutáneamente con células CHO/Trp-p8, dando como resultado la formación de tumores sólidos. La longitud (L; dimensión más grande) y anchura (W; dimensión perpendicular a y en el mismo plano que la longitud) de cada tumor se midieron con calibres, y el volumen tumoral se aproximó mediante una fórmula para el volumen de un elipsoide:  $0,52 \cdot L \cdot W^2$ . Cuando el volumen tumoral medio alcanzó aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones se distribuyeron al azar en grupos, y se les administró un compuesto como una formulación acuosa, o vehículo solo, mediante inyección intraperitoneal, en los días indicados. Todos los compuestos se administraron a niveles de dosis comparables. Los tumores se midieron repetidamente en los días indicados. Los datos se presentan como volúmenes tumorales medios  $\pm$  error estándar de la media.

Las figuras 9A y 9B son gráficas que representan las concentraciones plasmáticas de varios compuestos, como una función del tiempo y de la dosis, en ratas (figura 9A) y perros (figura 9B), tras una única dosis oral. Los compuestos se disolvieron todos ellos en una formulación acuosa, y se administraron a niveles de dosis comparables mediante sonda nasogástrica oral. Se recogió sangre en los puntos de tiempo indicados, y se analizó para determinar los niveles de fármaco.

Las figuras 10A y 10B son gráficas que representan la eficacia demostrada por varios grupos en un modelo de xenoinjerto tumoral murino que expresa Trp-p8. A los ratones se les inyectó subcutáneamente con células CHO/Trp-p8, dando como resultado la formación de tumores sólidos. La longitud (L; dimensión más grande) y anchura (W; dimensión perpendicular a y en el mismo plano que la longitud) de cada tumor se midieron con calibres Vernier, y el volumen tumoral se aproximó mediante una fórmula para el volumen de un elipsoide:  $0,52 \cdot L \cdot W^2$ . Cuando el volumen tumoral medio alcanzó aproximadamente  $100 \text{ mm}^3$ , los ratones se distribuyeron al azar en grupos, y se les administró una única dosis de un compuesto como una formulación acuosa, o vehículo solo, mediante sonda gasonástrica oral. Los tumores se midieron subsiguientemente entonces en los días indicados. Los datos se presentan como volúmenes tumorales medios  $\pm$  error estándar de la media.

La figura 11 es una gráfica que representa la falta de eficacia demostrada por un compuesto ejemplificativo en un modelo de xenoinjerto tumoral murino que carece de expresión de Trp-p8. A los ratones se les inyectaron subcutáneamente células CHO-K1 que carecen de Trp-p8, dando como resultado la formación de tumores sólidos. La longitud (L; dimensión más grande) y anchura (W; dimensión perpendicular a y en el mismo plano que la longitud) de cada tumor se midieron con calibres Vernier, y el volumen tumoral se aproximó mediante una fórmula para el volumen de un elipsoide:  $0,52 \cdot L \cdot W^2$ . Cuando el volumen tumoral medio alcanzó aproximadamente  $50 \text{ mm}^3$ , los ratones se distribuyeron al azar en grupos, y se les administró una única dosis del compuesto como una formulación acuosa, o vehículo, mediante sonda gasonástrica oral. Los tumores se midieron subsiguientemente entonces en los días indicados. Los datos se presentan como volúmenes tumorales medios  $\pm$  error estándar de la media.

La figura 12 es una gráfica que representa la eficacia demostrada por un compuesto ejemplificativo en un modelo de xenoinjerto tumoral murino que expresa Trp-p8. El modelo tumoral LuCaP se obtuvo de Robert L. Vassella, Dr., profesor de Urología en la School of Medicine de la University of Washington. La longitud (L; dimensión más grande) y anchura (W; dimensión perpendicular a y en el mismo plano que la longitud) de cada tumor se midieron con calibres Vernier, y el volumen tumoral se aproximó mediante una fórmula para el volumen de un elipsoide:  $0,52 \cdot L \cdot W^2$ . Cuando el volumen tumoral promedio alcanzó aproximadamente  $150 \text{ mm}^3$ , a los ratones se les administró el compuesto, como una formulación acuosa, mediante inyección peritoneal, una vez al día durante 5 días. Los tumores se midieron subsiguientemente entonces en los días indicados. Los datos se presentan como volúmenes tumorales medios  $\pm$  error estándar de la media.

SEC ID nº: 1 es la secuencia nucleotídica de un ADNc de Trp-p8 humano (número de acceso GenBank AY090109).

SEC ID nº: 2 es la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia nucleotídica de SEC ID nº: 1 (número de acceso GenBank NP\_076985).

### Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que ciertos moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas, incluyendo agonistas de la actividad de Trp-p8, son capaces de inhibir el crecimiento de y/o inducir apoptosis y/o necrosis en células que expresan Trp-p8. Sin desear estar limitados por ningún modo de acción específico, se cree que la activación del receptor de Trp-p8 mediada por el agonista de Trp-p8 aumenta sustancialmente el influjo de cationes, que está correlacionado con la toxicidad celular. Se cree además que los antagonistas de Trp-p8 pueden inhibir el nivel basal y/o la actividad nativa inducida por ligandos de la activación de Trp-p8 endógena, lo que, consiguientemente, conduce a crecimiento reducido o a muerte de células que expresan esta proteína de los canales catiónicos.



De este modo, la presente invención proporciona moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas, incluyendo agonistas y antagonistas de la actividad de Trp-p8, así como composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que comprenden uno o más moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas en combinación con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. La presente invención también proporciona composiciones de combinación que comprenden uno o más moduladores de Trp-p8 y uno o más compuestos terapéuticos adicionales tales como, por ejemplo, un agente terapéutico del cáncer. Los moduladores de Trp-p8 y las composiciones que comprenden moduladores de Trp-p8 encontrarán utilidad en procedimientos para activar el influjo de cationes mediado por Trp-p8 en una célula, en procedimientos para inducir la apoptosis y/o necrosis en una célula, así como en procedimientos para el tratamiento de enfermedades asociados con la expresión de Trp-p8, que comprenden de manera no limitativa cánceres, tales como cánceres de mama, de colon, de pulmón y de próstata.

### Definiciones

La expresión “moduladores de Trp-p8” se refiere colectivamente a compuestos que son agonistas y antagonistas de pequeñas moléculas que se unen a e incrementan o disminuyen, respectivamente, la actividad de Trp-p8 en una célula. Los agonistas de Trp-p8 incluyen compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D y sus derivados químicos. Los antagonistas de Trp-p8 de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D se pueden sintetizar fácilmente y caracterizar por un experto utilizando la metodología proporcionada expresamente en la presente memoria y/o como ya está disponible en la técnica.

La expresión “activar Trp-p8” significa la activación, mediada por agonistas, de Trp-p8 expresada sobre la superficie de una célula. Por ejemplo, en ciertas formas de realización, los agonistas de la presente invención, cuando se ponen en contacto con una célula y/o se administran *in vivo* a un sujeto mamífero, activan Trp-p8, facilitando de ese modo el influjo de cationes, tales como iones calcio, hasta tal nivel intracelular y/o durante tal duración que es suficiente para provocar toxicidad a las células según se evidencia por una disminución en el crecimiento celular y/o un comienzo de muerte celular necrótica y/o apoptótica.

La expresión “amina alifática” significa un átomo de nitrógeno sustituido en el que cualquier sustituyente, distinto de H, está unido al nitrógeno mediante un átomo de carbono saturado.

El término “alquilo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa, excepto que se señale de otro modo, un grupo hidrocarbonado de cadena lineal o ramificado o cíclico, o combinación de los mismos, que está completamente saturado y puede incluir grupos di- y multivalentes, que tiene el número de átomos de carbono designado (es decir, C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> significa uno a 10 carbonos). Los ejemplos de grupos hidrocarbonados saturados incluyen grupos tales como metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, t-butilo, isobutilo, sec-butilo, homólogos e isómeros de, por ejemplo, n-pentilo, n-hexilo, n-heptilo, n-octilo, y similares.

El término “alqueno” representa cadenas hidrocarbonadas ramificadas o no ramificadas que contienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono.

El término “alquino” se refiere a cadenas hidrocarbonadas ramificadas o no ramificadas que contienen uno o más triples enlaces carbono-carbono.

El término “alquileo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un grupo divalente derivado de un alcano, como se ejemplifica mediante -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. Típicamente, un grupo alquileo tendrá de 1 a 24 átomos de carbono, prefiriéndose en la presente invención que esos grupos tengan 10 o menor número de átomos de carbono. Un “alquilo inferior” o “alquileo inferior” es un grupo alquilo o alquileo de cadena más corta, que presenta generalmente ocho átomos de carbono o menos.

El término “cicloalquileo”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un grupo divalente derivado de un cicloalcano, como se ejemplifica mediante ciclohexileno. Típicamente, un grupo cicloalquileo tendrá de 5-8 átomos de carbono, prefiriéndose en la presente invención aquellos grupos que tienen 6 átomos de carbono.

El término “alquenoileno”, por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un grupo divalente derivado de un alqueno, como se ejemplifica mediante -CH=CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-. Típicamente, los grupos alquenoileno tendrán de 2 a 24 átomos de carbono, prefiriéndose en la presente invención aquellos grupos que tienen 10 átomos de carbono o menos.

Los términos “alcoxi”, “alquilamino” y “alquiltio” se refieren a aquellos grupos que tienen un grupo alquilo unido al resto de la molécula a través de un átomo de oxígeno, nitrógeno o azufre, respectivamente. De forma similar, el término “dialquilamino” se usa en un sentido convencional para referirse a -NR'R”, en el que los grupos R pueden ser grupos alquilo iguales o diferentes.

El término “heteroalquilo”, por sí mismo o en combinación con otro término, significa, excepto que se señale de otro

modo, un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada, o cíclico, estable, o sus combinaciones, completamente saturado o que contiene 1 a 3 grados de insaturación, que consiste en el número de átomos de carbono señalado y en uno a tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N, Si y S, y en el que los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El heteroátomo o heteroátomos O, N y S pueden estar colocados en cualquier posición interior del grupo heteroalquilo. El heteroátomo Si puede estar colocado en cualquier posición del grupo heteroalquilo, incluyendo la posición en la que el grupo alquilo se une al resto de la molécula. Los ejemplos incluyen  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ ,  $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ , y  $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ . Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, tales como, por ejemplo,  $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$  y  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ . También se incluyen en el término "heteroalquilo" aquellos grupos descritos con más detalle más abajo como "heterocicloalquilo". El término "heteroalquileo", por sí mismo o como parte de otro sustituyente, significa un grupo divalente derivado de heteroalquilo, como se ejemplifica mediante  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-$  y  $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ . Para grupos heteroalquileo, los heteroátomos también pueden ocupar uno cualquiera o ambos de los 15 términos de la cadena. Aún más, para grupos enlazantes alquilénicos y heteroalquilénicos, no se insinúa ninguna orientación del grupo enlazante.

El término "acilo" se refiere a aquellos grupos derivados de un ácido orgánico mediante eliminación de la porción hidroxil del ácido. En consecuencia, acilo incluye, por ejemplo, acetilo, propionilo, butirilo, decanoilo, pivaloilo, benzoilo y similar.

Un grupo "carbonilo activado" es un grupo carbonilo cuya electrofilia está potenciada como resultado de los grupos unidos a cualquier lado del carbonilo. Los ejemplos de tales grupos carbonilo activados son (polifluoroalquil)etonas, (polifluoroalquil)aldehídos, alfa-cetoésteres, alfa-cetoácidos, alfa-cetoamidas, 1,2-dicetonas, 2-aciltiazoles, 2-acilimidazoles, y similares.

Los términos "cicloalquilo" y "heterocicloalquilo", por sí mismos o en combinación con otros términos, representan, excepto que se señale de otro modo, versiones cíclicas de "alquilo" y "heteroalquilo", respectivamente. Adicionalmente, para heterocicloalquilo, un heteroátomo puede ocupar la posición en la que el heterociclo está unido al resto de la molécula. Los ejemplos de cicloalquilo incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, 1-ciclohexenilo, 3-ciclohexenilo, cicloheptilo, y similares. Los ejemplos de heterocicloalquilo incluyen 1-(1,2,5,6-tetrahidropiridilo), 1-piperidinilo, 2-piperidinilo, 3-piperidinilo, 4-morfolinilo, 3-morfolinilo, tetrahidrofuran-2-ilo, tetrahidrofuran-3-ilo, tetrahidrotien-2-ilo, tetrahidrotien-3-ilo, 1-piperazinilo, 2-piperazinilo, y similares.

Los términos "halo" o "halógeno", por sí mismos o como parte de otro sustituyente, significan, excepto que se establezca de otro modo, un átomo de flúor, cloro, bromo, o yodo. Adicionalmente, los términos tales como "fluoroalquilo" incluyen monofluoroalquilo y polifluoroalquilo.

El término "arilo", utilizado solo o en combinación con otros términos (*por ejemplo*, ariloxi, ariltioxi, arilalquilo), significa, excepto que se señale de otro modo, un sustituyente aromático que puede ser un único anillo o múltiples anillos (hasta tres anillos), que están condensados juntos o enlazados covalentemente. El término "heteroarilo" incluye aquellos anillos arílicos que contienen de cero a cuatro heteroátomos seleccionados de N, O y S, en los que los átomos de nitrógeno y azufre están opcionalmente oxidados, y el átomo o átomos de nitrógeno están opcionalmente cuaternizados. Los grupos "heteroarilo" pueden estar unidos al resto de la molécula a través de un heteroátomo. Los ejemplos no limitativos de grupos arilo y heteroarilo incluyen 3-pirazolilo, 2-imidazolilo, 4-imidazolilo, pirazinilo, 2-oxazolilo, 4-oxazolilo, 2-fenil-4-oxazolilo, 5-oxazolilo, 3-isoxazolilo, 4-isoxazolilo, 5-isoxazolilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo, 5-tiazolilo, 2-furilo, 3-furilo, 2-tienilo, 3-tienilo, 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 2-pirimidilo, 4-pirimidilo, 5-benzotiazolilo, purinilo, 2-bencimidazolilo, 5-indolilo, 1-isoquinolilo, 5-isoquinolilo, 2-quinoxalinilo, 5-quinoxalinilo, 3-quinolilo, y 6-quinolilo. Los sustituyentes para cada uno de los sistemas de anillos arílicos señalados anteriormente se seleccionan del grupo de sustituyentes aceptables descritos a continuación. El término "arilalquilo" incluye aquellos grupos en los que un grupo arilo o heteroarilo está unido a un grupo alquilo (*por ejemplo*, bencilo, fenetilo, piridilmetilo y similar) o a un grupo heteroalquilo (*por ejemplo*, fenoximetilo, 2-piridiloximetilo, 3-(1-naftiloxi)propilo, y similares).

Cada uno de los términos anteriores (*por ejemplo*, "alquilo", "heteroalquilo" y "arilo") incluyen formas sustituidas y no sustituidas del grupo indicado. A continuación se proporcionan los sustituyentes preferidos para cada tipo de grupo.

Los sustituyentes para los grupos alquilo y heteroalquilo (incluyendo aquellos grupos denominados a menudo como alquileno, alquenilo, heteroalquileno, heteroalquenilo, alquinilo, cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalquenilo, y heterocicloalquenilo) pueden ser una variedad de grupos seleccionados de:  $-\text{OR}'$ ,  $=\text{O}$ ,  $=\text{NR}'$ ,  $=\text{N}-\text{OR}'$ ,  $-\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{SR}'$ ,  $-\text{halógeno}$ ,  $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{CO}_2\text{R}'$ ,  $\text{CONR}'\text{R}''$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ ,  $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ ,  $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ ,  $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ ,  $-\text{NR}'\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ ,  $-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NR}'$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ ,  $\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}''\text{R}'''$ ,  $-\text{CN}$  y  $-\text{NO}_2$  en un número comprendido entre cero y  $(2\text{N} + 1)$ , en el que N es el número total de átomos de carbono en tal grupo. R', R'' y R''' se refieren, cada uno independientemente, a hidrógeno, alquilo y heteroalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) no sustituido, arilo no sustituido, arilo sustituido con 1-3 halógenos, grupos alquilo, alcoxi o tialcoxi no sustituidos, o grupos aril-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>). Cuando R' y R'' están unidos al mismo átomo de nitrógeno, se

pueden combinar con el átomo de nitrógeno para formar un anillo de 5, 6 o 7 miembros. Por ejemplo, -NR'R'' incluye 1-pirrolidinilo y 4-morfolinilo. A partir de la discusión anterior de los sustituyentes, el experto en la materia apreciará que el término "alquilo" incluye grupos tales como haloalquilo (por ejemplo, -CF<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>) y acilo (*por ejemplo*, -C(O)CH<sub>3</sub>, -C(O)CF<sub>3</sub>, -C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, y similar).

De forma similar, los sustituyentes para los grupos arilo son diversos, y se seleccionan de: -halógeno, --OR', --OC(O)R', --NR'R'', --SR', --R', --CN, --NO<sub>2</sub>, --CO<sub>2</sub>R', --CONR'R'', --C(O)R', --OC(O)NR'R'', --NR''C(O)R', --NR''C(O)<sub>2</sub>R', --NR'-C(O)NR''R''', --NH-C(NH<sub>2</sub>)=NH, --NR'C(NH<sub>2</sub>)=NH, --NH-C(NH<sub>2</sub>)=NR', --S(O)R', --S(O)<sub>2</sub>R', --S(O)<sub>2</sub>NR'R'', --NR''-S(O)<sub>2</sub>-R', -N<sub>3</sub>, --CH(Ph)<sub>2</sub>, y perfluoroalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), en un número comprendido entre cero y el número total de valencias abiertas en el sistema anular aromático; y en los que R', R'' y R''' se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo y heteroalquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>), arilo no sustituido, (arilo no sustituido)-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>), y (arilo no sustituido)oxi-alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>).

Dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arílico pueden estar sustituidos opcionalmente por un sustituyente de la fórmula --T-C(O)--(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>--U--, en la que T y U son independientemente --NH--, --O--, --CH<sub>2</sub>-- o un enlace sencillo, y el subíndice q es un número entero de 0 a 2. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arílico pueden estar sustituidos opcionalmente por un sustituyente de la fórmula --A--(CH<sub>2</sub>)<sub>r</sub>--B-, en la que A y B son independientemente --CH<sub>2</sub>--, --O--, --NH--, --S--, --S(O)--, --S(O)<sub>2</sub>--, --S(O)<sub>2</sub>NR'-- o un enlace sencillo, y r es un número entero de 1 a 3. Uno de los enlaces sencillos del nuevo anillo así formado puede estar opcionalmente sustituido por un doble enlace. Alternativamente, dos de los sustituyentes en átomos adyacentes del anillo arílico pueden estar opcionalmente sustituidos por un sustituyente de la fórmula --(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>--X--(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>--, en la que s y t son independientemente números enteros de 0 a 3, y X es --O--, --NR'--, --S--, --S(O)--, --S(O)<sub>2</sub>--, o --S(O)<sub>2</sub>NR'--. El sustituyente R' en -NR' - y --S(O)<sub>2</sub>NR'-- se selecciona de hidrógeno o alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) no sustituido.

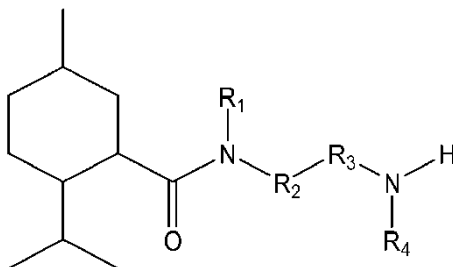
Como se usa en la presente memoria, el término "heteroátomo" incluye oxígeno (O), nitrógeno (N), y azufre (S).

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" incluye sales de los compuestos activos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en la presente memoria. Los ejemplos de sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables comprenden de manera no limitativa sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico, magnesio, u otra sal similar. Los ejemplos de sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables comprenden de manera no limitativa los derivados de ácidos inorgánicos como ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, yodhídrico, o fosforoso, y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, oxálico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-tolilsulfónico, cítrico, tartárico, metanosulfónico, y similares.

#### Moduladores de pequeñas moléculas de la actividad de Trp-p8

Los moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas que se utilizan adecuadamente en las composiciones y los procedimientos descritos en la presente memoria son ejemplificados en la presente memoria mediante los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D descritos en la presente memoria, y sus derivados.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas de la siguiente Fórmula I:



en los que R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilalquilo y arilo, o, R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> junto con el grupo nitrógeno pueden formar un grupo heterocíclico o cíclico de hasta 25 átomos;

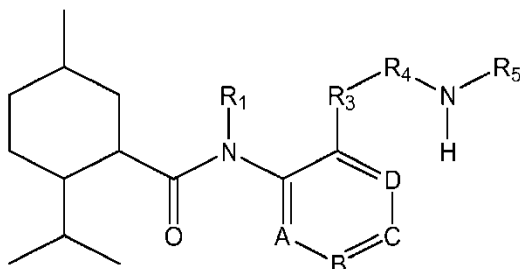
R<sub>2</sub> es seleccionado de entre arilo y arilalquilo;

R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo,

R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo; o

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

5 En una forma de realización preferida, los moduladores de moléculas pequeñas de Trp-p8 presentan la fórmula I-A siguiente:



10 en los que A, B, C y D son seleccionados independientemente de entre CR<sub>2</sub> y N; en los que por lo menos uno de entre A, B, C y D es CR<sub>2</sub>; en los que R<sub>2</sub> es un elemento seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, halógeno, y arilalquilo, R<sub>6</sub>O-, y R<sub>6</sub>S-, en los que R<sub>6</sub> es alquilo; en los que cuando dos adyacentes de A, B, C, y D son CR<sub>2</sub>, los dos R<sub>2</sub> pueden combinarse para formar un único grupo arilo, cicloalquilo, o heterocicloalquilo;

15 R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, y arilalquilo;

20 R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo, arilo, arilalquilo, -NR<sub>7</sub>C(O)-, -C(O)NR<sub>7</sub>-, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, y -NR<sub>7</sub>-, en los que R<sub>7</sub> es un elemento seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, y arilalquilo;

25 R<sub>4</sub> es seleccionado de entre -C(O)R<sub>8</sub>-, alquilo, arilalquilo, y heteroalquilo, en los que R<sub>8</sub> es seleccionado de entre alquilo y heteroalquilo;

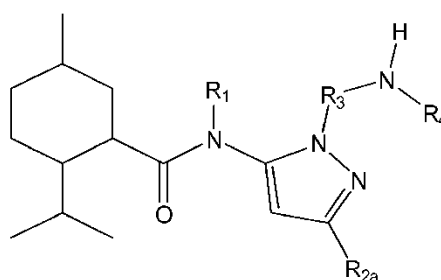
30 R<sub>5</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo; o

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

Dentro de determinados compuestos ejemplificativos de la fórmula I-A, R<sub>1</sub> es H; R<sub>7</sub> es H; R<sub>8</sub> comprende 2, 3 o 4 carbonos; R<sub>4</sub> es seleccionado de entre propionilo, etilo, butirilo, hidroxipropionilo, y 3-hidroxibutirilo; R<sub>5</sub> es seleccionado de entre H y metilo; R<sub>6</sub> comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 carbonos; y/o R<sub>2</sub> es seleccionado de entre metoxi, metilsulfanilo, fenilo y H.

35 Son ejemplificados en la presente memoria unos compuestos de fórmula I-A que comprenden un grupo seleccionado de entre 2-(2-amino-propionilamino)-4-metoxi-fenilo, N-(2-amino-etil)-2-amino-5-metilsulfanil-fenilo, 1-(2-amino-etoxi)-naftalen-2-ilo, 2-(2-amino-etilamino)-4-metilsulfanil-fenilo, N-(2-amino-etil)-5-metoxi-benzamida, 2-(2-amino-butirilamino)-4-metoxi-fenilo, 2-(2-amino-3-hidroxi-propionilamino)-4-metoxi-fenil, 3-(2-amino-etilamino)-naftalen-2-ilo, N-(2-amino-etil)-benzamida, 2-(2-amino-acetilamino)-fenil, 2-(2-amino-3-hidroxi-butirilamino)-4-metoxi-fenilamida, y 2-(2-amino-acetilamino)-4-metoxi-fenilo.

40 En otra forma de realización preferida, los moduladores de moléculas pequeñas de Trp-p8 presentan la fórmula I-B siguiente:



45 en los que R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo y arilalquilo;

R<sub>2a</sub> es seleccionado de entre arilo, alquilo, heteroalquilo y arilalquilo;

R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo y arilalquilo;

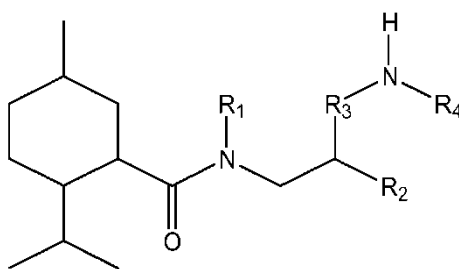
R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo y arilalquilo; o

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

5 Dentro de determinados compuestos ejemplificativos de fórmula I-B, R<sub>1</sub> es H; R<sub>3</sub> es seleccionado de entre metileno, etileno, propileno y butileno; R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H y metilo; y/o R<sub>2a</sub> es seleccionado de entre fenilo, furano, metilpirrol, metilbenzoato, aminofenilo, hidroxifenilo, cianofenilo y metoxifenilo.

10 Son ejemplificados en la presente memoria los compuestos de fórmula I-B que comprenden un grupo seleccionado de entre 2-(2-amino-etil)-5-furan-2-il-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-propil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(3-amino-propil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(4-amino-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(4-hidroxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-metilamino-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(3-ciano-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(3-metoxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, éster metílico de ácido 4-{1-(2-amino-etil)-1H-pirazol-3-ilo} benzoico, 2-(2-amino-etil)-5-(3-amino-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, y 2-(2-amino-etil)-5-(3-hidroxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo.

15 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona unos moduladores de moléculas pequeñas de Trp-p8 que presentan la fórmula I-C siguiente:



20 en los que R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, y arilalquilo;

R<sub>2</sub> es seleccionado de entre arilo y arilalquilo;

25 R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo, arilalquilo, -NHC(O)R<sub>5</sub>-, -OR<sub>5</sub>-, y -NHR<sub>5</sub>-, en los que R<sub>5</sub> es alquilo o heteroalquilo;

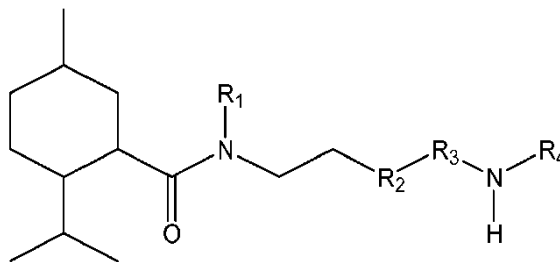
R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo; o

30 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

Dentro de determinados compuestos ejemplificativos de fórmula I-C, R<sub>1</sub> es H; R<sub>2</sub> es fenilo; R<sub>5</sub> es seleccionado de entre metileno, etileno, propileno, y butileno; R<sub>3</sub> es seleccionado de entre propionilamino, etoxi, propoxi, y etilamino; y/o R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H y metilo.

35 Son ejemplificados en la presente memoria los compuestos de fórmula I-C que comprenden un grupo seleccionado de entre 2-(2-amino-propionilamino)-2-fenil-etilo, 2-(2-amino-etoxi)-2-fenil-etilo, 2-(3-amino-propoxi)-2-fenil-etilo, 2-(2-dimetilamino-etoxi)-2-fenil-etilo, y 2-(2-amino-etilamino)-2-fenil-etilo.

40 En otra forma de realización preferida del primer aspecto, los moduladores de moléculas pequeñas de Trp-p8 presentan la fórmula I-D siguiente:



45 en los que R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo y arilalquilo;

R<sub>2</sub> es seleccionado de entre arilo y arilalquilo;

R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo y arilalquilo;

R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo y arilalquilo; o

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

Dentro de determinados compuestos ejemplificativos de fórmula I-D, R<sub>1</sub> es H; R<sub>2</sub> es seleccionado de entre fenilo y fenilamino; R<sub>3</sub> es seleccionado de entre metileno, etileno, propileno, butileno, metilamino, etilamino, propilamino, butilamino, y acetilo; y/o R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H y metilo.

- 5 Son ejemplificados en la presente memoria los compuestos de fórmula I-D que comprenden un grupo seleccionado de entre 2-[2-(2-amino-etilamino)-fenil]-etilo, 2-(2-aminometilo-fenil)-etilo, y 2-[(2-amino-acetil)-fenil-amino]-etilo.

#### Síntesis de moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas

- 10 Como se menciona anteriormente, los compuestos de la presente invención son compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D. En ciertos aspectos, los compuestos se pueden obtener usando materiales de partida comercialmente disponibles empleando metodología sintética fácilmente disponible en la técnica. Los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D se pueden aislar usando técnicas típicas de aislamiento y purificación conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, métodos  
15 cromatográficos y de recristalización.

- Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que los compuestos incluidos adecuadamente en las composiciones y los procedimientos descritos en la presente memoria pueden existir en un número de isómeros cis y trans, formas E/Z, diastereómeros, así como también isómeros ópticos. De este modo, los compuestos usados en las composiciones y los procedimientos descritos en la presente memoria incluyen todas las mencionadas combinaciones y variaciones.  
20

- En compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D, los átomos de carbono a los que están enlazados cuatro sustituyentes no idénticos son asimétricos. En consecuencia, los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D pueden existir como enantiómeros, diastereómeros o una mezcla de los mismos. Los enantiómeros y diastereómeros se pueden separar mediante métodos cromatográficos o de cristalización, o mediante otros métodos conocidos en la técnica. El átomo de carbono asimétrico puede estar en una de dos configuraciones, R o S, las cuales están dentro del alcance de la presente invención. La presencia de pequeñas cantidades del enantiómero o diastereómero opuesto en el producto purificado final no afecta a la aplicación terapéutica de tales compuestos.  
25  
30

- Los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D se pueden tratar adicionalmente para formar sales farmacéuticamente aceptables. El tratamiento de un compuesto de la invención con un ácido o base puede formar, respectivamente, una sal de adición de ácidos farmacéuticamente aceptable o una sal de adición de bases farmacéuticamente aceptable, cada una como se define anteriormente. Para efectuar la conversión a la sal, se pueden usar diversos ácidos y bases inorgánicos y orgánicos conocidos en la técnica, incluyendo los descritos en la presente memoria anteriormente.  
35

- La presente invención también se refiere a isómeros farmacéuticamente aceptables, hidratos, y solvatos de compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D. Los compuestos de estas fórmulas también pueden existir en diversas formas isómeras y tautómeras, incluyendo sales farmacéuticamente aceptables, hidratos y solvatos de tales isómeros y tautómeros.  
40

- Se describen derivados profármacos de los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D. El término "profármaco" se refiere a un derivado de una molécula de fármaco progenitora que requiere biotransformación, ya sea espontánea o enzimática, en el organismo para liberar el fármaco progenitor. Los profármacos son variaciones o derivados de los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D de la presente invención que tienen grupos escindibles en condiciones metabólicas. Los profármacos se convierten en los compuestos de la invención que son farmacéuticamente activos *in vivo* cuando sufren solvolisis en condiciones fisiológicas o sufren degradación enzimática. Una tecnología de profármaco ejemplificativo que se puede utilizar adecuadamente con los compuestos de la presente invención es la tecnología de terapia del cáncer activada por proteasas (PACT), descrita con detalle en la solicitud de patente US n° 0/156.214 y en la publicación de solicitud PCT n° WO 02/095007.  
45  
50

- La síntesis de compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D se puede lograr haciendo reaccionar un cloruro de ácido, obtenido haciendo reaccionar ácido p-mentano-3-carboxílico con cloruro de tionilo, con la amina apropiada. Como se señala a continuación, típicamente, la reacción se lleva a cabo en disolución a temperatura ambiente en presencia de un receptor de cloruro de hidrógeno (*por ejemplo*, hidróxido de sodio).  
55  
60

- La estructura de p-mentano básica es una molécula con forma de silla que puede existir en forma cis o trans. La sustitución del grupo carboxilo o amida en la posición 3 da lugar a cuatro isómeros configuracionales o geométricos, dependiendo de si la sustitución es axial o ecuatorialmente en el isómero cis o trans, denominándose los cuatro isómeros mentol, neomentol, isomentol, y neoisomentol.  
65

En las formas de realización ejemplificativas, los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y

Fórmula I-D se sintetizan con una estereoquímica particular, en la que la estereoquímica relativa alrededor del anillo de mentano es la de mentol, y/o en la que la estereoquímica absoluta alrededor del anillo de mentano es la de (-)-mentol.

- 5 En los Ejemplos 1-8 se presentan en la presente memoria procedimientos sintéticos para la preparación de moduladores ejemplificativos de Trp-p8 de pequeñas moléculas de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D de la presente invención.

#### Composiciones que comprenden moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas

10 Como se explica anteriormente, la presente invención se refiere a moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas, incluyendo agonistas de Trp-p8 y antagonistas de Trp-p8 que se unen a y alteran la actividad de Trp-p8. En ciertas formas de realización, los moduladores de Trp-p8 son agonistas que, en ciertos casos, son capaces de estimular el  
 15 flujo de cationes en, y la toxicidad de, una célula que expresa la proteína de los canales de Trp-p8. En las formas de realización alternativas, los moduladores de Trp-p8 son antagonistas de la actividad de Trp-p8 que son capaces de reducir la actividad de Trp-p8 expresada en una célula. De este modo, los moduladores de Trp-p8 de la presente invención encontrarán utilidad en composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, que son útiles en el  
 20 tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de Trp-p8. Las composiciones adecuadas, según la presente invención, comprenden uno o más agonistas de Trp-p8 de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D y/o uno o más antagonistas de Trp-p8 de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y Fórmula I-D, como se describen anteriormente, en combinación con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 En una forma de realización, la presente invención proporciona moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable tal como disolución salina estéril u otro medio, agua, gelatina, aceite, etc., para formar composiciones farmacéuticamente aceptables. Las composiciones y/o agonistas se pueden administrar solos o en combinación con cualquier vehículo, diluyente, etc., conveniente, y tal administración se puede proporcionar en dosis individuales o múltiples. Los vehículos útiles comprenden de manera no limitativa medio sólido, semisólido o líquido, incluyendo agua y disolventes orgánicos no tóxicos.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden preparar mezclando uno o más agonistas de Trp-p8 de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D con un vehículo o agente farmacéuticamente aceptable. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas se pueden preparar mezclando uno o más antagonistas de Trp-p8 de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D con un  
 35 vehículo o agente farmacéuticamente aceptable. Además, las composiciones farmacéuticas pueden incluir además excipientes, estabilizantes, diluyentes, y similares, y se pueden proporcionar en formulaciones de liberación sostenida o de liberación en el tiempo. Los vehículos, agentes, excipientes, estabilizantes, diluyentes, y similares adecuados para uso terapéutico son bien conocidos en el campo farmacéutico, y se describen, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences", (Mack Publishing Co., ed. A.R Gennaro, 1985). Tales materiales son no  
 40 tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, acetato, y otras sales de ácidos orgánicos, antioxidantes tales como ácido ascórbico, péptidos de bajo peso molecular tales como poliarginina, proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulina, polímeros hidrófilos tales como seroalbúmina, gelatina, o inmunoglobulina, polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidina, aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, o arginina, monosacáridos, disacáridos, y otros  
 45 hidratos de carbono, incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, alcoholes de azúcares tales como manitol o sorbitol, contraiones tales como sodio, y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN, o polietilenglicol.

50 Todavía en otras formas de realización, las composiciones de la presente invención comprenden un compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D formulado junto con uno o más agentes terapéuticos del cáncer. Alternativamente, las composiciones de la presente invención comprenden un compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D formulado independientemente con uno o más agentes terapéuticos del cáncer. Esto es, el compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o  
 55 Fórmula I-D y el agente terapéutico del cáncer se formulan separadamente.

60 Los agentes terapéuticos del cáncer adecuados comprenden de manera no limitativa, agentes antimetabólicos, que comprenden de manera no limitativa paclitaxel, vincristina, y etopósido; agentes alquilantes que comprenden de manera no limitativa mecloretamina, ciclofosfamida, y carmustina; antimetabólicos, que comprenden de manera no limitativa metotrexato, gemcitabina, lometrexol, 5-fluorouracilo, y 6-mercaptopurina; antibióticos citotóxicos, que comprenden de manera no limitativa doxorubicina, daunorrubicina, bleomicina, mitomicina C, y estreptozocina; agentes de platino, que comprenden de manera no limitativa cisplatino y carboplatino; agentes hormonales, que comprenden de manera no limitativa antiestrógenos tales como tamoxifeno y dietilestilbestrol, así como antiandrógenos tales como flutamida; agentes antiangiogénicos; e inhibidores de farnesil transferasa.

65 En determinadas formas de realización, los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D se administran en combinación con un agente terapéutico del cáncer que es ineficaz en la estimulación

del influjo de cationes mediado por Trp-p8.

En otras formas de realización, los compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D se administran en combinación con uno o más moduladores de Trp-p8 adicionales.

Dependiendo del régimen de tratamiento particular contemplado, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar parenteralmente, tópicamente, oralmente, o localmente. En ciertos aspectos, las composiciones farmacéuticas se administran parenteralmente, por ejemplo intravenosamente, subcutáneamente, intradérmicamente, o intramuscularmente. En una forma de realización, la presente invención proporciona composiciones para la administración parenteral que comprenden un compuesto de la presente invención, disuelto o suspendido en un vehículo tal como un vehículo acuoso.

Para formulaciones sólidas, los compuestos se pueden mezclar con vehículos sólidos no tóxicos convencionales, tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similar.

Para la administración en aerosol, los compuestos de la presente invención se pueden suministrar en una forma finamente dividida junto con un tensioactivo no tóxico y un propelente. Los ejemplos de tales agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de 6 a 22 átomos de carbono, tales como ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, olestérico y oleico.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar mediante inyección, *es decir*, intravenosamente, intramuscularmente, intracutáneamente, subcutáneamente, intraduodenalmente, o intraperitonealmente. Alternativamente, las composiciones se pueden administrar mediante inhalación, tal como intranasalmente, y se pueden administrar transdérmicamente, tal como a través de un parche o similar.

Se apreciará que la formulación preferida real de las composiciones, incluyendo composiciones farmacéuticas, variarán según el modo de administración así como de la enfermedad particular que se esté tratando. Las formulaciones y modos de administración óptimos se determinarán de forma habitual en una base de enfermedad por enfermedad y de paciente por paciente por los expertos en la materia.

#### Procedimientos para identificar y caracterizar la eficacia *in vitro* e *in vivo* de moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas

Como se expone anteriormente, la presente invención se refiere a moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas, incluyendo agonistas y antagonistas de la actividad de Trp-p8. Se describen en la presente memoria moduladores de Trp-p8 de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D descritos en la presente memoria anteriormente. La presente invención contempla además que también se pueden emplear adecuadamente moduladores de Trp-p8 adicionales en las composiciones y procedimientos descritos en la presente memoria.

Los agonistas y antagonistas de Trp-p8 adicionales o alternativos se pueden identificar mediante la metodología descrita en los ejemplos adjuntos. Por ejemplo, los agonistas de Trp-p8 que tienen eficacia en el tratamiento de enfermedad o enfermedades asociadas con la expresión de Trp-p8 incluyen pequeñas moléculas que dan como resultado uno o más de los siguientes (1) inhiben el crecimiento o disminución de la viabilidad de una célula que expresa Trp-p8; (2) estimulan el influjo de calcio y/u otro catión en una célula que expresa Trp-p8; (3) inducen apoptosis y/o necrosis en una célula que expresa Trp-p8; y/o (4) tienen eficacia en uno o más sistemas de modelos animales de enfermedad humana. Los antagonistas de Trp-p8 que tienen eficacia en el tratamiento de enfermedad o enfermedades asociadas con la expresión de Trp-p8 incluyen pequeñas moléculas que dan como resultado uno o más de los siguientes: (1) protegen a células que expresan Trp-p8 del efecto citotóxico de agonistas en sistema modelo *in vitro*; (2) inhiben el crecimiento de y/o exterminan estirpes celulares cancerosas con expresión de Trp-p8 endógena; (3) son eficaces en uno o más sistemas de modelos de animales de enfermedad humana.

De este modo, en ciertas formas de realización, los procedimientos para identificar agonistas de Trp-p8 comprenden la etapa de poner en contacto una célula que expresa Trp-p8 con un agonista de Trp-p8 candidato durante un tiempo y en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento y/o disminuir la viabilidad de una célula que expresa Trp-p8, en el que el crecimiento inhibido y/o la viabilidad reducida indican que el agonista de Trp-p8 candidato es capaz de activar Trp-p8 expresada por la célula.

En otras formas de realización, los procedimientos para identificar agonistas de Trp-p8 comprenden la etapa de poner en contacto una célula que expresa Trp-p8 con un agonista de Trp-p8 candidato durante un tiempo y en una cantidad suficiente para inducir influjo de calcio y/u otros cationes en la célula, en el que el influjo incrementado de cationes se correlaciona con una mayor toxicidad celular.

En todavía otras formas de realización, los procedimientos para identificar agonistas de Trp-p8 comprenden la etapa de administrar un agonista de Trp-p8 candidato a un animal que tiene una o más células neoplásicas que expresan Trp-p8 durante un tiempo y en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de y/o inducir apoptosis y/o



necrosis en las células, incrementando de ese modo la supervivencia del animal, en el que uno cualquiera o más de la inhibición del crecimiento celular, la inducción de apoptosis, la inducción de necrosis, y/o el aumento de supervivencia del animal indican eficacia del agonista de Trp-p8.

5 Se describen en la presente memoria unos procedimientos para la identificación de antagonistas de Trp-p8 además de los antagonistas de Trp-p8. Tales procedimientos incluyen (1) sistemas de ensayos *in vitro* para detectar la protección de células que expresan Trp-p8 frente a la toxicidad inducida por agonistas de Trp-p8; (2) sistemas de ensayos *in vitro* e *in vivo* para detectar la inhibición del crecimiento de una célula cancerosa y/o estirpe celular cancerosa que expresa endógenamente Trp-p8; (3) sistemas de modelos animales *in vivo* mediante los cuales se administran uno o más antagonistas de Trp-p8 candidatos a un animal que tiene una o más células neoplásicas que expresan Trp-p8, durante un tiempo y en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento de y/o inducir apoptosis y/o necrosis en las células, incrementando de ese modo la supervivencia del animal.

#### 15 Procedimientos para la utilización de moduladores de Trp-p8

Los moduladores de Trp-p8 de pequeñas moléculas de la presente invención se pueden utilizar adecuadamente en procedimientos para modificar (*es decir*, activar o reducir) el influjo de calcio mediado por Trp-p8 en una célula, y en procedimientos terapéuticos para el tratamiento de una o más enfermedades asociadas con la expresión de Trp-p8. Por ejemplo, y como se menciona anteriormente, se ha apreciado que la expresión anormal de Trp-p8 está asociada con un fenotipo neoplásico en una variedad de tejidos cancerosos, incluyendo tejidos de mama, de colon, de pulmón, y de próstata. Tsavaler *et al.*, Cancer Research, *más arriba*.

De este modo, en determinados aspectos, un agonista de Trp-p8 puede ser para la utilización en procedimientos para activar el influjo de calcio mediado por Trp-p8 en una célula, comprendiendo tales procedimientos la etapa de poner en contacto la célula que expresa Trp-p8 con una cantidad del agonista de Trp-p8 durante un tiempo suficiente para inhibir el crecimiento de la célula y/o para inducir necrosis y/o apoptosis en la célula. En los ejemplos presentados en la presente memoria se proporcionan procedimientos ejemplificativos para activar Trp-p8.

En otros aspectos de la presente invención, una composición que comprende un agonista de Trp-p8 puede ser para la utilización en procedimientos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la expresión de Trp-p8, comprendiendo tales procedimientos la etapa de administrar a un mamífero, típicamente un ser humano, una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición que comprende un agonista de Trp-p8, durante un tiempo suficiente para inhibir el crecimiento de la célula y/o para inducir necrosis y/o apoptosis en la célula. Como se usa en la presente memoria, la frase "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un mamífero para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar tal tratamiento para la enfermedad. La "cantidad terapéuticamente eficaz" variará dependiendo del compuesto, de la enfermedad, y su gravedad, y de la edad, peso, *etc.*, del mamífero a tratar.

Como se usan en la presente memoria, los términos "tratar", "tratando", y "tratamiento" incluyen: (1) prevenir la enfermedad, *es decir*, hacer que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un mamífero que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no ha experimentado ningún síntoma de la enfermedad; (2) inhibir la enfermedad, *es decir*, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos; o (3) aliviar la enfermedad, *es decir*, provocar regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos.

Aunque la frecuencia y la dosis de los regímenes de tratamiento variarán dependiendo de factores tales como la enfermedad y el paciente tratado, las composiciones que comprenden uno o más compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D se administran típicamente en el intervalo de aproximadamente 0,001 mg de compuesto/kg de masa corporal a aproximadamente 1000 mg/kg. Típicamente, el tratamiento se inicia con dosis más pequeñas, que son menores que la dosis óptima del compuesto. Después, la dosis se puede incrementar hasta que se logra una eficacia óptima.

En la mayoría de los casos, la administración de una composición o composiciones de la presente invención se logra mediante cualquier procedimiento que asegure la exposición sistémica al compuesto de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D. De este modo, las composiciones se pueden administrar oralmente, parenteralmente, intraduodenalmente, e intranasalmente. Típicamente, tales composiciones comprenden uno o más de tales compuestos en combinación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, como se describe con mayor detalle en la presente memoria anteriormente.

Otras formas de realización son terapias de combinación en las que se administran uno o más compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D conjuntamente con uno o más agentes terapéuticos del cáncer, como se describe con mayor detalle en la presente memoria anteriormente, tal como un agente antimetabólico, un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico citotóxico, un agente de platino, un agente hormonal, y/o un antiandrógeno. Todavía otras formas de realización son terapias de combinación en las que se administran dos o más compuestos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C, y/o Fórmula I-D simultánea o secuencialmente para lograr el resultado terapéutico deseado.

De este modo, como se usa en la presente memoria, el término "combinación" significa que se pueden suministrar al menos dos compuestos de manera simultánea, en terapia de combinación, en la que el primer compuesto se administra en primer lugar, seguido del segundo compuesto, así como también en la que el segundo compuesto se administra en primer lugar, seguido del primer compuesto. El resultado deseado puede ser un alivio subjetivo de un síntoma o síntomas, o una mejora objetivamente identificable en el receptor de las dosis.

Los siguientes ejemplos son proporcionados a título ilustrativo y no limitativo. Los ejemplos que no están comprendidos por las reivindicaciones son proporcionados únicamente a título comparativo.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 (ejemplo comparativo)

#### Síntesis de compuestos de mentano-3-carboxamida

Este ejemplo describe la metodología para la síntesis de compuestos de mentano-3-carboxamida.

#### Ácido mentano-3-carboxílico

Se colocó agua (300 ml) en un matraz Erlenmeyer de 2 l con una barra agitadora grande. Se añadió cuidadosamente, con agitación, ácido sulfúrico (500 ml). La disolución se dejó enfriar hasta 75°C, y se añadió N-etil-p-mentano-3-carboxamida (62,5 g). La temperatura se mantuvo a 75°C con una placa caliente, y se añadió cuidadosamente nitrito de sodio (31 g). Se añadieron dos porciones más de 31 gramos de NaNO<sub>2</sub> a intervalos de 1 hora, y la mezcla se agitó toda la noche a 75°C.

La mezcla se enfrió hasta la temperatura ambiente, se diluyó con ~1 l de agua con hielo, y se extrajo con ~500 ml de éter. La capa etérea se separó, se lavó con agua, y se extrajo con 2 x 350 ml de NaOH 1M. La capa acuosa se acidificó con HCl concentrado y se extrajo con éter. La capa etérea se secó con MgSO<sub>4</sub> y se evaporó para proporcionar ácido mentano-3-carboxílico (33,2 g, 61%) como un sólido cristalino, 50,3 grados (c = 1, CHCl<sub>3</sub>, 25°C).

#### Cloruro de mentano-3-carbonilo

Se puso a reflujo ácido mentano-3-carboxílico (54,35 g) con 80 ml de cloruro de tionilo durante 3 horas. El SOCl<sub>2</sub> se eliminó mediante destilación, y el cloruro de ácido se destiló a 114-115°C (8 Torr). (Lit. p.e. 84-85°C a 3,5 Torr). Rendimiento: 50 g (84%).

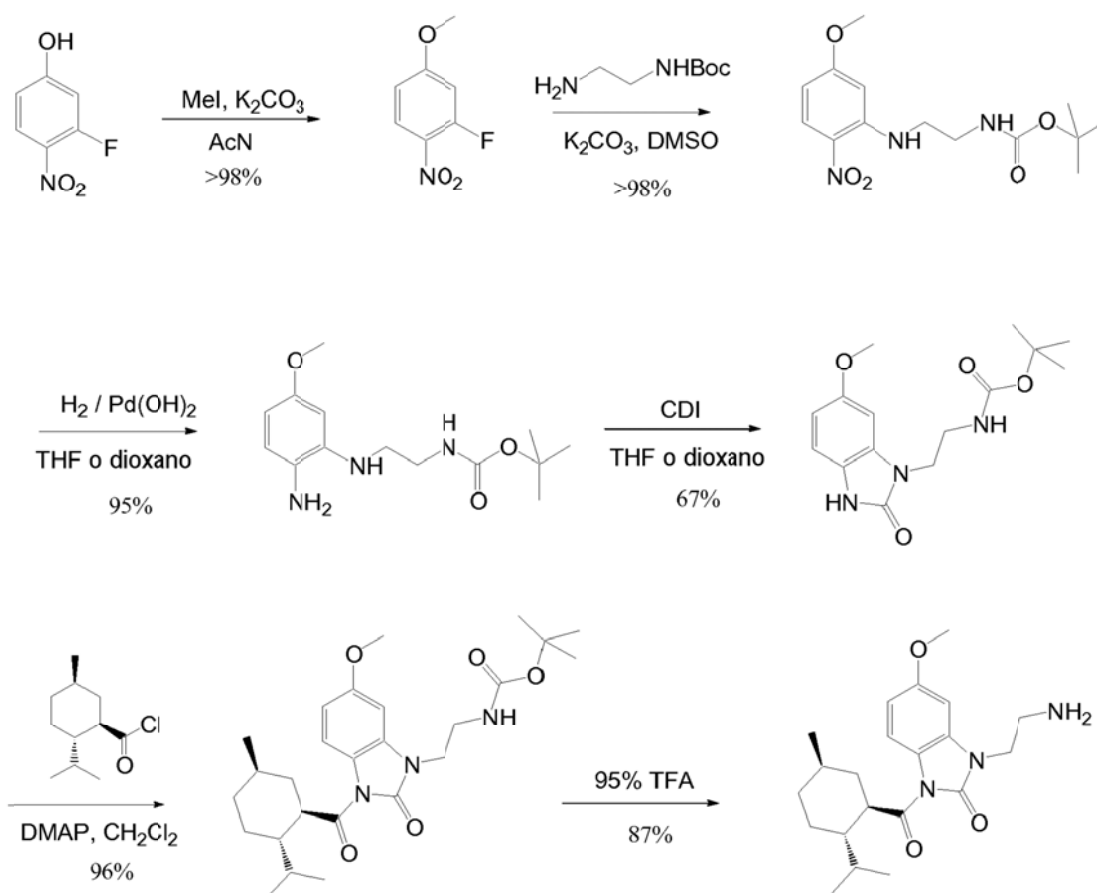
#### Procedimiento general para la preparación de mentano-3-carboxamidas

A una disolución agitada de 0,2 mmoles de la amina en 1 ml de acetonitrilo o NMP y 0,4 mmoles de DIPEA se le añadieron 0,022 ml de cloruro de mentano-3-carbonilo. La mezcla de reacción se agitó durante 3 horas. Para aminas menos reactivas, la mezcla se calentó (60°C) y se agitó durante 24 horas. El producto se purificó a partir de la mezcla de reacción bruta mediante HPLC (40-95% de gradiente durante 10 minutos usando 0,05% de TFA en CH<sub>3</sub>CN y 0,05% de TFA en H<sub>2</sub>O) y se evaporó hasta sequedad.

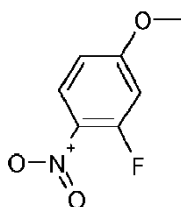
### Ejemplo 2 (ejemplo comparativo)

#### Síntesis de los compuestos #36 y #50

Este ejemplo describe metodología para la síntesis de moduladores dihidrobenzoimidazólicos de Trp-p8 comparativos.



Esquema 1

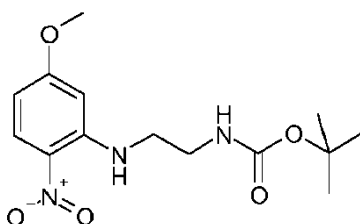


5

4-Metoxi-2-fluoro-1-nitrobenzeno

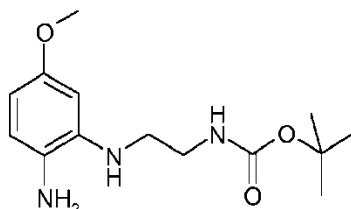
Un matraz de 2 l de fondo redondo provisto de una barra agitadora y un condensador de reflujo se cargó con acetonitrilo (1 l),  $K_2CO_3$  (263 g, 1,9 moles) y 4-hidroxi-2-fluoro-nitrobenzeno 100 g, 0,64 moles). Se añadió yoduro de metilo (271 g, 1,9 moles) a la mezcla de reacción y se calentó a temperaturas de reflujo con agitación vigorosa durante 5 h. El acetonitrilo se eliminó, y se añadieron acetato de etilo (1 l) y  $H_2O$  (700 ml). La mezcla heterogénea se transfirió a un embudo de separación en el que la fase acuosa se separó y se volvió a extraer con acetato de etilo (2 x 200 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con  $H_2O$  (2 x 500 ml), salmuera (500 ml), se secaron sobre  $MgSO_4$ , se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar el producto deseado como un sólido ligeramente amarillo (107 g, 98%).

15

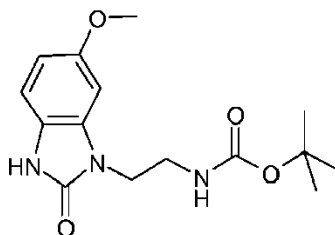


Éster *tert*-butílico del ácido [2-(5-metoxi-2-nitrofenilamino)-etil]-carbámico

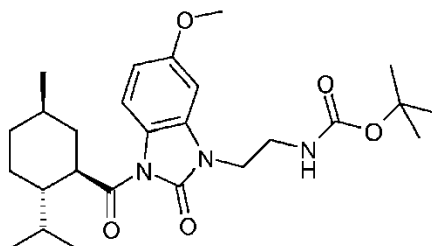
Un matraz de 2 l provisto de una barra agitadora se cargó con DMSO (800 ml), K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (161 g, 1,6 moles) y 4-metoxi-2-fluoro-nitrobenzoceno 100 g, 0,58 moles). Se añadió mono-N-Boc-1,2-diaminoetano (94 g, 0,55 moles) a la mezcla de reacción y se agitó durante 12 h a 60°C. La mezcla de reacción se trituró con agua enfriada con hielo (1,2 l), y el precipitado amarillo resultante se recogió mediante filtración a vacío. El precipitado se lavó varias veces con agua (5 x 1 l) y se secó a alto vacío durante 48 h para dar el producto deseado como un sólido amarillo brillante (178 g, 98%).

Éster *tert*-butílico del ácido [2-(5-metoxi-2-amino-fenilamino)-etil] carbámico

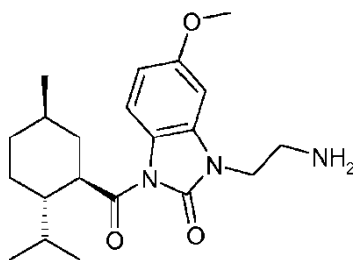
Un matraz de 2 litros de fondo redondo equipado con una barra agitadora se cargó con una suspensión de Pd(OH)<sub>2</sub> al 20% (5 g) y 1,4-dioxano (800 ml). Se añadió a la suspensión éster *tert*-butílico del ácido [2-(5-metoxi-2-nitrofenilamino)-etil]-carbámico (100 g, 0,32 moles). La mezcla de reacción se hidrogenó (balón) durante 48 h (hasta que el material de partida se había consumido) seguido de la adición de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (100 g) a la mezcla, y se agitó durante 12 h adicionales para eliminar trazas de agua. La suspensión se filtró para eliminar el Pd(OH)<sub>2</sub> y el K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El filtrado se usó en la etapa siguiente sin purificación adicional (rendimiento no determinado).

Éster *tert*-butílico del ácido [2-(6-metoxi-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-il)-etil]-carbámico

La disolución anterior se trató con un exceso de carbonildiimidazol (104 g, 0,64 moles) y se calentó a 90°C durante 4 h. El 1,4-dioxano se eliminó, y el residuo se trituró con agua (1,5 l). El precipitado resultante se recogió mediante filtración a vacío y se lavó varias veces con agua (5 x 500 ml). El producto bruto se secó a 70°C a alto vacío durante 12 h y se usó sin purificación adicional (66 g, 67% de rendimiento para 2 etapas).

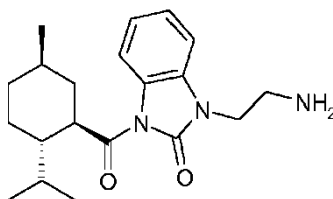
Éster *tert*-butílico del ácido {2-[3-(2-isopropil-5-metilciclohexanocarbonil)-6-metoxi-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-il]-etil}-carbámico

Un matraz de 2 l provisto de una barra agitadora se cargó con éster *tert*-butílico del ácido [2-(2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-il)-etil]-carbámico (40 g, 0,20 moles), DMAP (48 g, 0,39 moles) y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 ml). Se añadió gota a gota durante un período de 15 minutos cloruro de mentolilo (40 g, 0,20 moles), y se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se paralizó con HCl 1N y se agitó durante 20 min. adicionales. La mezcla heterogénea se transfirió a un embudo de separación en el que la fase acuosa se separó, y se volvió a extraer con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 x 200 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con HCl 1N (2 x 300 ml), H<sub>2</sub>O (300 ml), NaHCO<sub>3</sub> saturado (ac.) (2 x 300 ml), salmuera (300 ml), se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El producto bruto se disolvió en una cantidad mínima de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se eluyó a través de un tapón de gel de sílice (10% de hexano/acetato de etilo para elución) para producir el producto deseado como un sólido incoloro (93 g, 96%).



5 Sal de TFA de 3-(2-aminoetil)-1-(2-isopropil-5-metilciclohexanocarbonil)-5-metoxi-1,3-dihidro-benzoimidazol-2-ona (Compuesto # 36).

10 Un matraz de 500 ml de fondo redondo se cargó con éster *terc*-butílico del ácido {2-[3-(2-isopropil-5-metilciclohexanocarbonil)-2-oxo-2,3-dihidrobenzoimidazol-1-il]-etil}-carbámico (90 g, 0,19 moles) y 95% de TFA/H<sub>2</sub>O (200 ml). La reacción se agitó durante 2 h, y el TFA se eliminó a presión reducida para proporcionar el producto  
bruto como un aceite espeso (que solidificó para formar una espuma frágil al dejar reposar a vacío). El producto  
bruto se disolvió en 30% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O y se purificó mediante HPLC preparativa (Ulto 120 (10  $\mu$ m) C18Q)  
usando un gradiente de 40-60% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (con 1% de TFA). Las fracciones puras se combinaron, se  
concentraron y se liofilizaron para proporcionar un sólido incoloro ligeramente esponjoso (79 g, 94%). MS (ESI) *m/z*  
374 ( $M^+ + 1$ ).



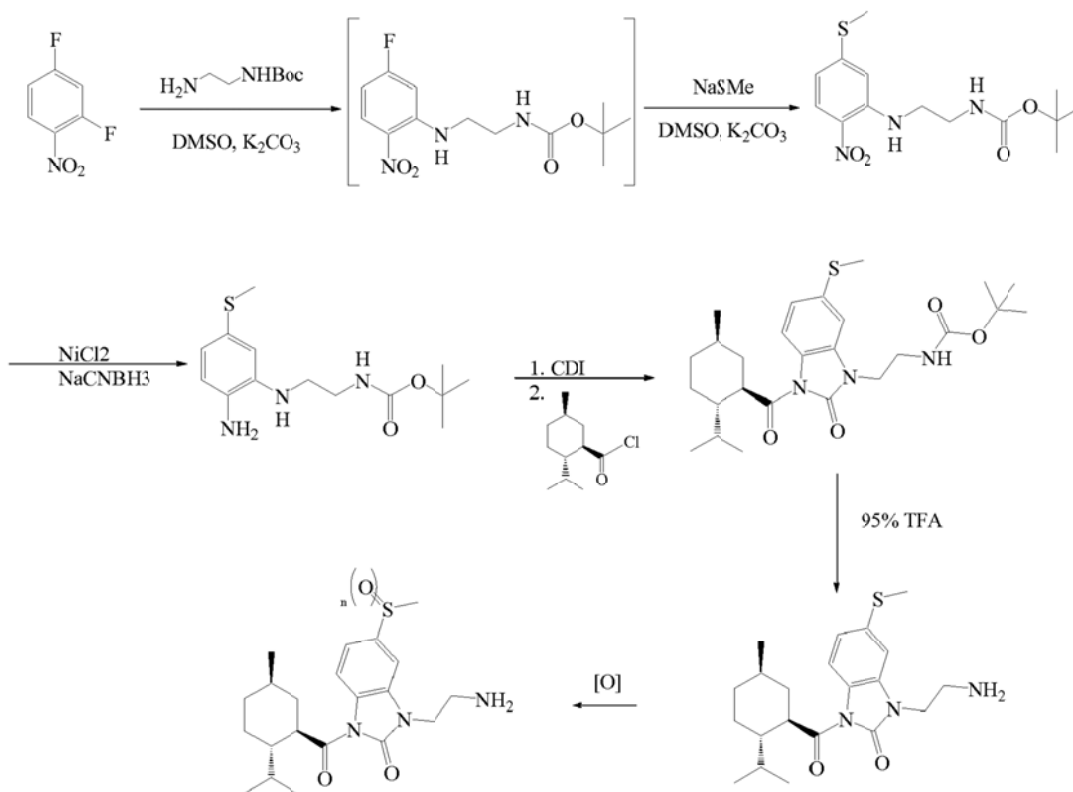
20 Sal de TFA de 1-(2-aminoetil)-3-(2-isopropil-5-metilciclohexanocarbonil)-1,3-dihidro-benzoimidazol-2-ona (Compuesto # 50)

En un procedimiento similar a la síntesis del Compuesto # 36, se preparó el Compuesto # 50 a partir de 2-fluoro-1-nitrobenzoceno. MS (ESI) *m/z* 344 ( $M^+ + 1$ ).

### 25 **Ejemplo 3 (ejemplo comparativo)**

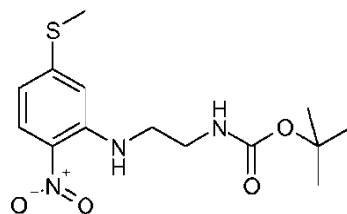
#### Síntesis del compuesto #42

30 Este ejemplo describe la metodología para la síntesis de un modulador dihidrobenzoimidazólico de Trp-p8 comparativo adicional.



Esquema 2

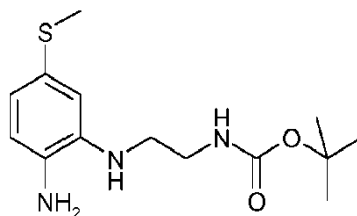
5



Éster *tert*-butílico del ácido [2-(5-metil-sulfanil-2-nitro-fenilamino)-etil]-carbámico

Un matraz de 1 litro de fondo redondo provisto de una barra agitadora se cargó con DMSO (200 ml),  $K_2CO_3$  (13 g, 0,10 moles) y 2,4-difluoro-1-nitrobenzoceno (5 g, 0,03 moles). La mezcla de reacción se trató con mono-N-Boc-1,2-diaminoetano (5 g, 0,32 moles) y se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. Se añadió tiometóxido de sodio (2,24 g, 0,03 moles) a la mezcla de reacción y se agitó durante 12 h a 60°C. La mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C y se trituroó con agua (800 ml), y el precipitado amarillo que se formó se recogió mediante filtración a vacío. El precipitado se lavó varias veces con agua (5 x 500 ml) y se secó a alto vacío durante 48 h para proporcionar el producto deseado como un sólido amarillo brillante (8,7 g, 71%).

15



Éster *tert*-butílico del ácido [2-(2-amino-5-metil-sulfanil-fenilamino)-etil]-carbámico

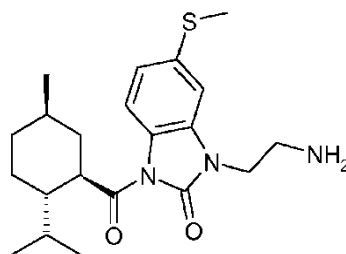
20

Un matraz de 500 ml de fondo redondo provisto de una barra agitadora se cargó con MeOH (200 ml), éster *tert*-butílico del ácido [2-(5-metil-sulfanil-2-nitro-fenilamino)-etil]-carbámico (5 g, 0,02 moles) y  $NiCl_2$  (19 g, 0,05 moles), y se enfrió hasta 0°C. Se añadió  $NaBH_4$  (1,7 g, 0,05 moles) (en cuatro porciones iguales) a la mezcla de reacción durante un período de 1 h. Una vez que la adición estaba terminada, la mezcla de reacción se agitó durante 2 h adicionales. Se añadieron a la mezcla de reacción salmuera (100 ml) y acetato de etilo (200 ml). La mezcla

25

heterogénea se transfirió a un embudo de separación en el que la fase acuosa se separó y se volvió a extraer con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con H<sub>2</sub>O (3 x 100 ml), salmuera (100 ml), se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida para dar un residuo negro. El producto bruto se disolvió en 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se separó en dos rondas de 100 ml (50 ml en cada una), y ambas se concentraron a presión reducida y se usaron sin purificación adicional.

5



3-(2-Amino-etil)-1-(2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxil)-5-metilsulfanil-13-dihidro-benzoimidazol-2-ona  
(Compuesto # 42)

10

En un procedimiento similar a la síntesis del Compuesto # 36, el Compuesto # 42 se preparó a partir del éster *tert*-butílico del ácido [2-(2-amino-5-metil-sulfanil-fenilamino)-etil]-carbámico bruto, MS (ESI) *m/z* 390,1 (M<sup>+</sup> + 1).

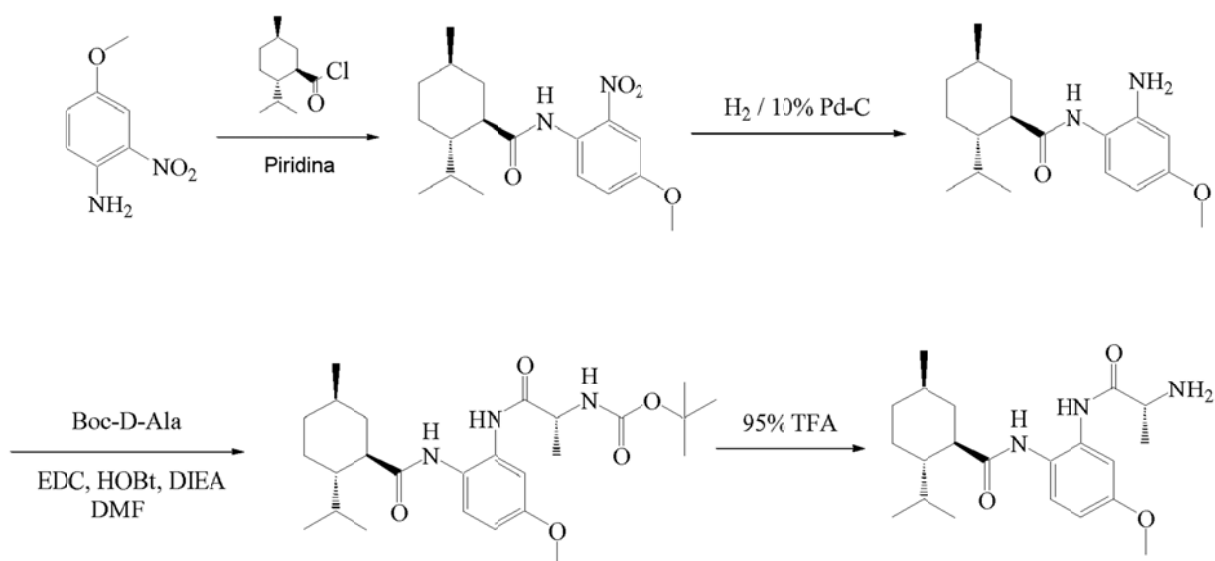
15

#### Ejemplo 4

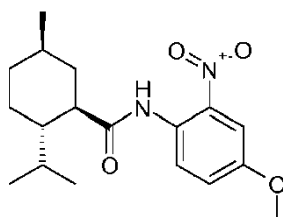
Síntesis de los compuestos de Fórmula I-A

Este ejemplo divulga una metodología para la síntesis de moduladores dihidrobenzoimidazólicos de Trp-p8 de Fórmula I-A.

20



25 Esquema 3

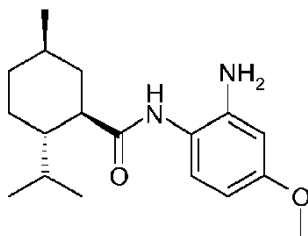


(4-metoxi-2-nitrofenil)-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico

30

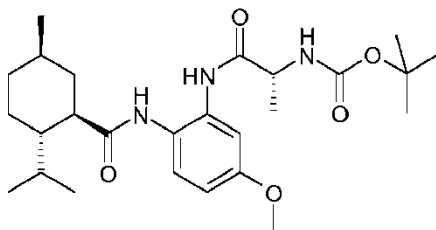
Se disuelve 4-metoxi-2-nitroanilina (5 g, 0,018 mol) en piridina (50) y se trata con cloruro de mentoilo (3,57 g, 0,018 mol). La mezcla de reacción es calentada hasta 50°C y es agitada vigorosamente durante 6 h. La mezcla de

reacción es enfriada a temperatura ambiente y vertida en una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 ml) y 1N HCl (100 ml). La mezcla heterogénea es transferida a un embudo de decantación en el que la fase acuosa es separada y reextraída con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 100 ml). Las fases orgánicas son combinadas y lavadas con 1N HCl (8 x 100 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 100 ml), 1N NaOH (2 x 100 ml), salmuera (100 ml), secadas en  $\text{MgSO}_4$ , filtradas y concentradas bajo presión reducida. El residuo es purificado mediante cromatografía en columna rápida en gel de sílice (20 a 50% de acetato de etilo/hexano para elución) proporcionando los compuestos base como sólido incoloro (4,9 g, 83%).



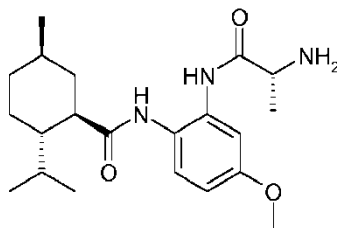
10 (2-amino-4-metoxifenil)-amida de 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico

Se disuelve (4-metoxi-2-nitrofenil)-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (4,9 g) en una suspensión de 10% de Pd-C (5 g) y THF (150 ml). La mezcla de reacción es hidrogenada en 20% de  $\text{Pd}(\text{OH})_2$  durante 48 h con un globo. La mezcla de reacción es filtrada y concentrada para proporcionar el compuesto deseado en una pureza suficiente para utilizar en la reacción próxima sin una purificación adicional.



20 Éster *tert*-butílico del ácido (1-{2-[2-isopropilo-5-metil-ciclohexanocarbonil-amino]-5-metoxi-fenilcarbamoil}-etil)carbámico

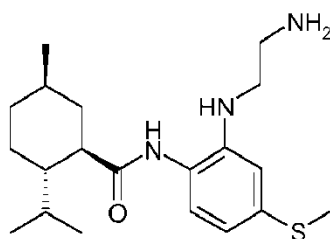
Se disuelven (2-amino-4-metoxifenil)-amida de 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (5 g, 0,016 mol), EDC (4,2 g, 0,022 mol), HOBt (2,97 g, 0,022 mol) y DIEA (8,53 g, 0,066 mol) en DMF (50 ml) y son agitados a 45°C durante 6 h. La mezcla de reacción es enfriada a la temperatura ambiente y vertida en una mezcla de acetato de etilo y 1N HCl (100 ml). La mezcla heterogénea es transferida a un embudo de decantación y las fases son separadas. La fase acuosa es reextraída con acetato de etilo y las fases orgánicas son combinadas, lavadas con 1N HCl (5 x 100 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (100 ml), 1N NaOH saturado (2 x 100 ml), salmuera (100 ml), secadas ( $\text{MgSO}_4$ ), filtradas y concentradas para proporcionar un sólido ligeramente sólido (7,5 g). Una parte del producto en bruto (1,5 g) es purificada mediante cromatografía en columna rápida con gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ , 30% de acetato de etilo/hexano para elución) para proporcionar el producto deseado como un sólido incoloro (1,6 g).



35 Sal de TFA de [2-(2-aminopropionilamino)-4-metoxifenil]-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (Compuesto # 1)

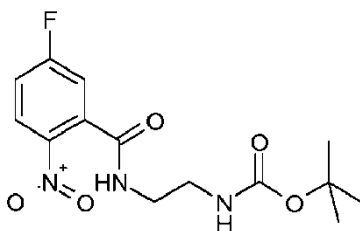
Es disuelto éster *tert*-butílico de ácido (1-{2-[2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarbonil-amino]-5-metoxi-fenilcarbamoil}-etil)carbámico (1 g) en 95% de TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  y agitado durante 1 h. La mezcla de reacción es concentrada y el producto en bruto es disuelto en 30% de acetonitrilo/ $\text{H}_2\text{O}$  y purificado mediante HPLC preparativa (Ulto 120 (10  $\mu\text{m}$ ) C18Q) usando un gradiente de 40-60% de acetonitrilo/ $\text{H}_2\text{O}$  (con 0,1% de TFA). Las fracciones puras se combinaron, se concentraron y se liofilizaron para proporcionar un sólido incoloro ligeramente esponjoso (880 mg). MS (ESI)  $m/z$  376 ( $\text{M}^+ + 1$ ).





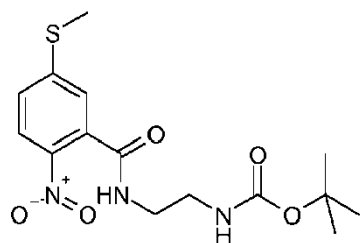
Sal de TFA de [2-(2-amino-etilamino)-4-metilsulfanil-fenil]amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (compuesto #4)

5 Se carga un matraz de fondo redondo de 100 ml provisto de una barra agitadora que contiene éster *tert*-butílico de ácido [2-(2-amino-5-metil-sulfanil-fenilamino)-etil]-carbámico en bruto con THF (50 g) y DMAP (1,8 g, 0,02 mol). La mezcla de reacción es enfriada hasta 0°C y se añade el cloruro de mentoilo (1,5 g, 0,008 mo) gota a gota durante un periodo de 5 min. Se deja calentar la mezcla de reacción hasta la temperatura ambiente y se agita durante 30 min  
10 adicionales. El producto en bruto es disuelto en una cantidad mínima de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y purificado mediante cromatografía en columna rápida en gel de sílice (10% de hexano/acetato de etilo para elución) que da como resultado un sólido ligeramente amarillo (1,76 g, 61%). El material purificado es disuelto en 20 ml de 95% de TFA/H<sub>2</sub>O y agitado durante 1 h y concentrado. El producto en bruto es disuelto en 30% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O y purificado mediante HPLC preparativa (Ultron 120 (10 µm) C18Q) usando un gradiente de 40-60% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (con 0,1% de TFA). Las  
15 fracciones puras se combinaron, se concentraron y se liofilizaron para proporcionar un sólido incoloro ligeramente esponjoso (1,41 g). MS (ESI) *m/z* 364 (M<sup>+</sup> + 1).



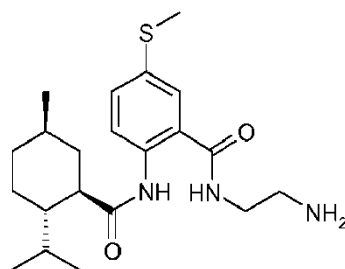
20 Éster *tert*-butílico de ácido [2-(4-fluoro-2-nitro-benzoylamino)-etil]-carbámico

Se cargan en un matraz de fondo redondo de 100 ml provisto de una barra agitadora acetonitrilo (40 ml), EDC (1,12 g, 5,9 mmol), HOBt (0,796 g, 5,9 mmol), DIEA (3,76 ml, 21,6 mmol) y mono-*N*-Boc-1,2-diaminoetano (0,865 g, 5,4 mmol). La mezcla de reacción es agitada durante ~18 h y concentrada. El residuo es disuelto en una mezcla de acetato de etilo (50 ml) y 1N HCl (50 ml). La mezcla heterogénea es transferida a un embudo de decantación en el que se separa la fase acuosa y se reextrae con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las fases orgánicas son combinadas y lavadas con 1N HCl (2 x 50 ml), H<sub>2</sub>O (1 x 50 ml), NaHCO<sub>3</sub> saturado (3 x 50 ml), salmuera (100 ml), secadas en MgSO<sub>4</sub>, filtradas y concentradas bajo una presión reducida. El residuo es purificado mediante cromatografía en columna rápida en gel de sílice (30% a 50% de acetato de etilo/hexano para elución) para proporcionar los  
25 compuestos base como un sólido ligeramente púrpura (1,12 g, 63%).



35 Éster *tert*-butílico de ácido [2-(5-metil-sulfanil-2-nitro-fenilamino)-etil]carbámico

Son cargados en una vasija de reacción 10 provisto de una barra agitadora DMF (5 ml), NaSMe (0,162 g, 2,3 mmol) y éster *tert*-butílico de ácido [2-(4-fluoro-2-nitro-benzoylamino)-etil]-carbámico (0,757 g, 2,3 mmol). La mezcla de reacción es agitada a temperatura ambiente durante 2 h y vertida en una mezcla de acetato de etilo (20 ml) y H<sub>2</sub>O (25 ml). La mezcla heterogénea es transferida a un embudo de decantación en el que la fase acuosa es separada y reextraída con acetato de etilo (2 x 10 ml). Las fases orgánicas son combinadas y lavadas con 1N HCl (2 x 10 ml), secadas en MgSO<sub>4</sub>, filtradas y concentradas bajo una presión reducida. El residuo es purificado mediante cromatografía en columna rápida en gel de sílice (30% a 50% de acetato de etilo/hexano para elución) para proporcionar los compuestos base como un sólido ligeramente amarillo (500 mg, 61%).



5 N-(2-amino-etil)-2-[(2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarbonil)-aminol-5-metilsulfanil]-benzamida (compuesto # 2)

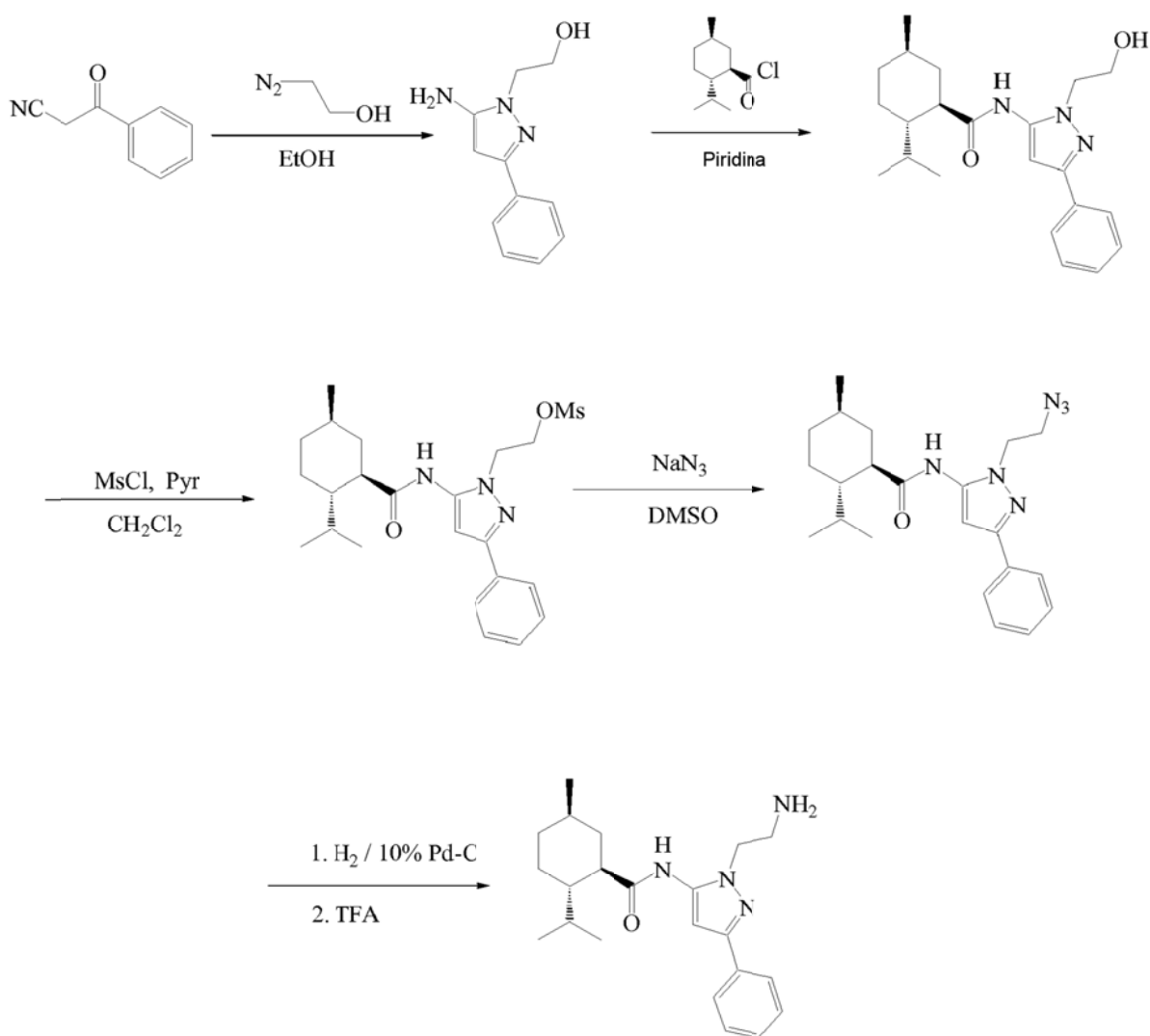
En un procedimiento similar a la síntesis del compuesto # 42, se prepara el compuesto # 2 a partir de éster *terc*-butílico de ácido [2-(5-metil-sulfanil-2-nitro-fenilamino)-etil]-carbámico. MS (ESI)  $m/z$  392 ( $M^+ + 1$ ).

10 **Ejemplo 5**

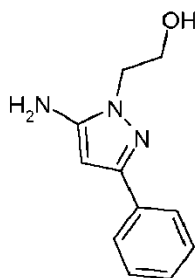
Síntesis de los compuestos de fórmula I-B

Este ejemplo describe la metodología para la síntesis de moduladores dihidrobenzoimidazólicos de Trp-p8 de Fórmula I-B.

15

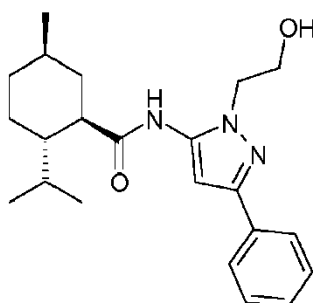


Esquema 4.



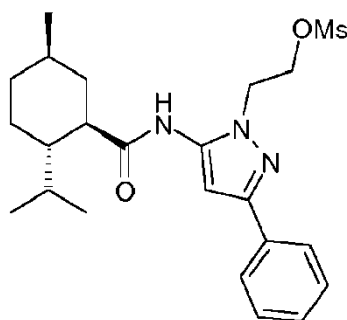
5 2-(5-Amino-3-fenil-pirazol-1-il)-etano

Se suspendió benzoilacetonitrilo (25 g, 0,17 moles) en una mezcla de 125 ml de alcohol anhidro de grado reactivo y 20 ml de ácido acético glacial. Se añadió de una vez 2-hidroxietilhidrazina (14,4 g, 1,1 equiv.) disuelta en 35 ml de alcohol. La mezcla se calentó a reflujo durante 4 h, se enfrió, se añadió agua para obtener un volumen total de 500 ml, y la disolución se enfrió en un frigorífico toda la noche. Los cristales se filtraron fríos en un embudo Buchner, se lavaron con agua fría y se secaron a alto vacío para proporcionar el producto deseado (27,2 g, 79%).



15 [2-(2-Hidroxi-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-]amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico

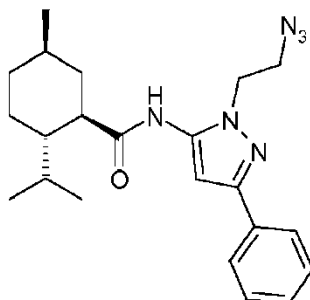
El 2-(5-amino-3-fenil-pirazol-il)-etanol (87,3 g, 0,43 moles) se suspendió en una mezcla de diclorometano (500 ml) y piridina (40 ml) y se enfrió en un baño de hielo. Se disolvió cloruro de mentoilo (,00 g, 1,15 equiv.) en diclorometano (200 ml) y se añadió gota a gota desde el embudo de adición protegido mediante un tubo de secado de CaCl<sub>2</sub>. Después de los 45 min. requeridos para terminar la adición, el baño de hielo se retiró, y la agitación continuó durante 3 h. Se añadió HCl 1M (ac., 200 ml)), y las fases se separaron. La fase orgánica se volvió a extraer con HCl 1M (ac., 100 ml). Se añadió HCl 1M de nuevo, y el diclorometano se eliminó a presión reducida, dando como resultado una precipitación abundante. El precipitado se recogió mediante filtración a vacío, y el sólido se lavó con agua varias veces. El residuo sólido se trituró con 400 ml de éter/hexanos 1:1 (agitación rápida durante 2 h). El sólido se filtró en un embudo Buchner y se lavó con hexanos. Tras secar con aire toda la noche, se efectuó un secado adicional a alto vacío durante 24 h para proporcionar un sólido incoloro (144,4 g).



30 Éster 2-{5-[2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxil]-amino-3-fenil-pirazol-1-il}etílico del ácido metanosulfónico

Se suspendió [2-(2-hidroxi-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-]amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (140 g, 0,38 moles) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 ml), y se añadió piridina (47 ml, 15 equiv.) seguido de cloruro de metanosulfonilo (44 ml, 15 equiv.) a temperatura del baño de hielo. La disolución se dejó calentar hasta la temperatura ambiente, y se agitó durante 12 h adicionales. Se añadió agua (500 ml), y la mezcla se agitó durante 0,5 h. El diclorometano se eliminó mediante evaporación, dejando un precipitado de trozos granulares amarillos claros. La decantación se siguió de tratamiento con 500 ml adicionales de agua y decantación de nuevo. Se usó una cantidad final de 500 ml

de agua para transferir el sólido a un embudo Buchner, en el que se secó por succión (rendimiento no determinado).

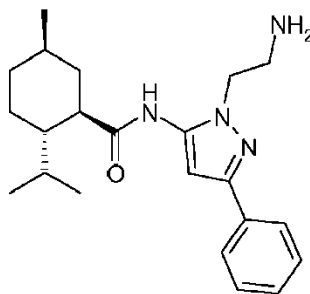


5 [2-Azido-etil]-5-fenil-2H-pirazol-3-il]-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico

El mesilato bruto (0,38 moles) se disolvió en DMSO (500 ml) con azida sódica (37 g, 15 equiv.). La mezcla se calentó a 70°C durante 6 h. Después de enfriar, se añadieron agua (1 l) y acetato de etilo (500 ml), y la mezcla se agitó en un embudo de separación. Las capas se separaron, y la capa orgánica se lavó secuencialmente con cantidades de 200 ml de agua, NaHCO<sub>3</sub> saturado, y salmuera. La capa orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se decantó, y el disolvente se eliminó en un evaporador giratorio. El rendimiento no se determinó debido a que el producto no estaba totalmente libre de disolvente antes de pasarlo a la etapa siguiente.

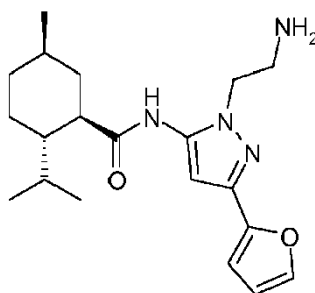
15 [2-(amino-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-il]-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico

El compuesto azídico bruto se disolvió en 500 ml de alcohol absoluto de grado reactivo y se trató con 5 g carbón activado. Esto se agitó durante varias horas y se filtró a través de Celite. Se eliminaron aproximadamente 300 ml de disolvente en el evaporador giratorio, y se sustituyeron con disolvente reciente. Se añadió Pd al 10%-C (4,8 g, ~50% en peso de H<sub>2</sub>O), y se mantuvo una corriente constante de hidrógeno sobre la mezcla de reacción con agitación rápida durante 24 h. El hidrógeno se desconectó y se añadió lentamente HCl conc. (32 ml). Después de filtrar a través de Celite, el filtrado se concentró en el evaporador giratorio, dando como resultado una precipitación abundante. Se añadió éter diisopropílico todavía húmedo al residuo, y la suspensión se agitó rápidamente durante 0,5 h. El sólido se filtró en un embudo Buchner y se lavó con éter dietílico. Se produjo un polvo blanco secado por aire. Rendimiento: 108,6 g (71% durante tres etapas).



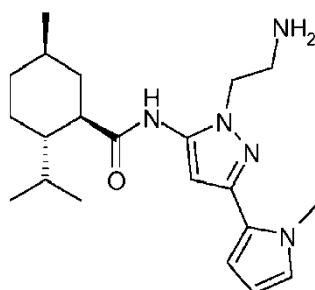
30 Sal de TFA de [2-(amino-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-il]-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (Compuesto # 16)

Conversión a la sal del trifluoroacetato: el sólido se neutralizó y se repartió en un embudo de separación mediante agitación con 500 ml de éter y 150 ml de NaOH 2 N. Cuando el sólido estaba completamente disuelto, las capas se separaron, y la fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La decantación y el mezclado con 23 ml de ácido trifluoroacético fueron seguidas de la evaporación del disolvente y el secado a alto vacío. La espuma se machacó y se trituró con 300 ml de hexanos (agitación rápida durante 3 h), que, después de filtrar, produjo un polvo blanco que contiene mucho menos éter. El disolvente se eliminó finalmente por completo calentándolo en un matraz de fondo redondo a 80°C durante 6 h.



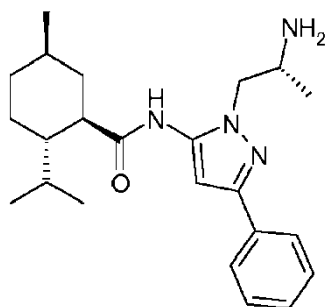
5 Sal de TFA de [2-(amino-etil)-5-furan-2-il-2H-pirazol-3-il]-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexano carboxílico (compuesto # 14)

10 En un procedimiento similar a la síntesis del compuesto # 16, se prepara el compuesto # 14 a partir de 2-furoilacetronitrilo y 2-hidroxietilhidrazina. Este material es purificado mediante HPLC preparativa (Ultron 120 (10 µm) C18Q) usando un gradiente de 40-60% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (con 0,1% de TFA). MS (ESI) *m/z* 344 (M<sup>+</sup> + 1).



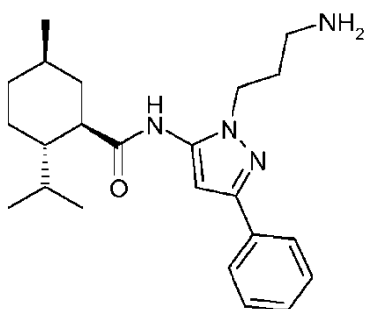
15 Sal de TFA de [2-(amino-etil)-5-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-2H-pirazol-3-il]-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexano carboxílico (compuesto # 17)

En un procedimiento similar a la síntesis del compuesto # 16, es preparado el compuesto # 17 a partir de 1-metil-1H-pirrol-2-carbaldehído y 2-hidroxietilhidrazina. Este material es purificado mediante HPLC preparativa (Ultron 120 (10 µm) C18Q) usando un gradiente de 40-60% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (con 0,1% de TFA). MS (ESI) *m/z* 372 (M<sup>+</sup> + 1).



20 Sal de TFA de [2-(2-amino-propil)-5-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-2H-pirazol-3-il]-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexano carboxílico (compuesto # 15)

25 En un procedimiento similar a la síntesis del compuesto # 16, es preparado el compuesto # 15 a partir de 2-benzoilacetronitrilo y éster *terc*-butílico de ácido (1-diazenil-propan-2-il)-carbámico. Este material es purificado mediante HPLC preparativa (Ultron 120 (10 µm) C18Q) usando un gradiente de 40-60% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (con 0,1% de TFA). MS (ESI) *m/z* 383 (M<sup>+</sup> + 1).



Sal de TFA de [2-(3-amino-propil)-5-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-2H-pirazol-3-il] de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexano carboxílico (compuesto # 18)

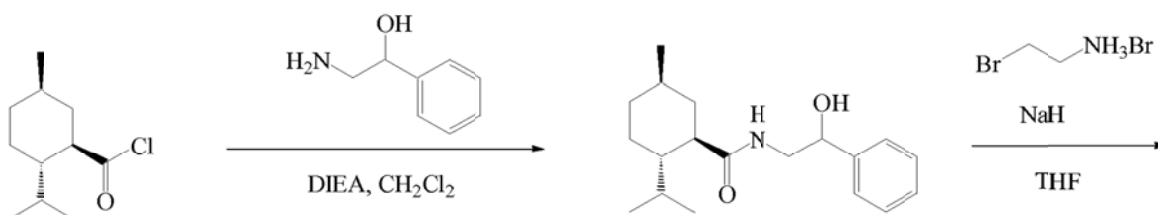
5 En un procedimiento similar a la síntesis del compuesto # 16, es preparado el compuesto # 18 a partir de 2-benzoilacetronitrilo y éster *terc*-butílico de ácido (3-diazenil-propil)-carbámico. Este material es purificado mediante HPLC preparativa (Ultra 120 (10  $\mu$ m) C18Q) usando un gradiente de 40-60% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (con 0,1% de TFA). MS (ESI)  $m/z$  383 ( $M^+ + 1$ ).

10

### Ejemplo 6

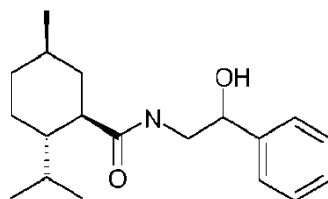
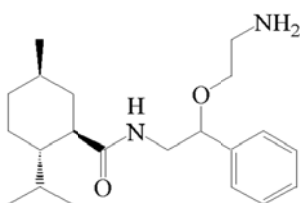
Síntesis de los compuestos de fórmula I-C

15 Este ejemplo describe la metodología para la síntesis de moduladores dihidrobenzoimidazólicos de Trp-p8 de Fórmula I-C.



20

Esquema 5.

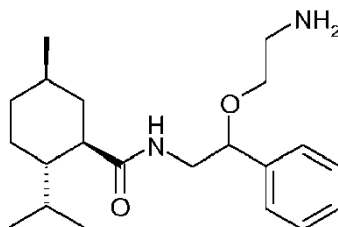


25 (2-hidroxi-2-fenil-etil)-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico

Un matraz de fondo redondo de 500 ml provisto de una barra agitadora es cargado con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml), DIEA (28 g, 0,219 mol), y 2-amino-1-fenil-etanol (10 g, 0,073 mol) y enfriado hasta 0°C. Es añadido cloruro de mentoilo (14,8 g, 0,073 mol) gota a gota durante un periodo de 15 min. Una vez se completa la adición se permite que la reacción sea calentada hasta la temperatura ambiente y agitada 2 h. Se añaden CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 ml) y 1N HCl (100 ml) a la mezcla de

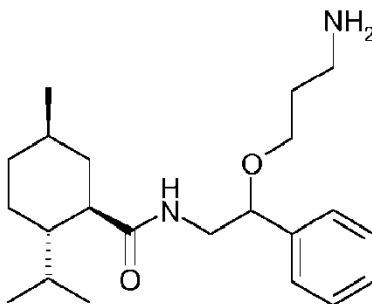
30

reacción y se agita durante 20 min adicionales. La mezcla heterogénea se transfiere a un embudo de separación en el que la fase acuosa se separa y se reextrae con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 100 ml). Las fases orgánicas son combinadas y lavadas con 1N HCl (8 x 100 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 100 ml), 1N NaOH (2 x 100 ml) salmuera (100 ml), secadas en  $\text{MgSO}_4$ , filtradas y concentradas a una presión reducida. Se eluye el residuo a través de un tapón de gel de sílice (50% de acetato de etilo/hexano para elución) para proporcionar los compuestos base como un sólido incoloro (18,8 g, 85%).



Sal de TFA de [2-(2-amino-4-etoxi)-2-fenil-etil]-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (compuesto # 30)

Un matraz de fondo redondo de 500 ml provisto de una barra agitadora es cargado con THF anhidro (200 ml) y (2-hidroxi-2-feniletíl)-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (10 g, 0,03 mol). Es añadido NaH (0,87 g, 0,04 mol) en una parte y agitado durante 10 min (hasta que es producido  $\text{H}_2$  interrumpido). Se añaden bromuro de hidrógeno de 1-bromoetil-2-amina (6,74 g, 0,033 mol) y NaH (0,87 g, 0,036 mol) a la mezcla de reacción y son agitados durante 2 h. Se añade y agita un equivalente adicional de NaH (0,87 g, 0,036 mol) 2 h adicionales. El NaH en exceso es extinguido vertiendo la mezcla de reacción sobre hielo. Son añadidos acetato de etilo (200 ml) y  $\text{H}_2\text{O}$  y agitados durante 20 min. La mezcla heterogénea es transferida a un embudo de separación en el que la fase acuosa es separada y reextraída con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las fases orgánicas son combinadas y lavadas con  $\text{H}_2\text{O}$  (1 x 100 ml), salmuera (100 ml), secadas en  $\text{MgSO}_4$ , filtradas y concentradas bajo una presión reducida. El producto de reacción es disuelto en 30% de acetonitrilo/ $\text{H}_2\text{O}$  y purificado mediante HPLC preparativa (Ultras 120 (10  $\mu\text{m}$ ) C18Q) usando un gradiente de 30-60% de acetonitrilo/ $\text{H}_2\text{O}$  (con 0,1% de TFA). Las fracciones puras son combinadas, concentradas y liofilizadas para proporcionar un sólido ligeramente esponjoso (9,4 g, 62%). MS (ESI)  $m/z$  347 ( $\text{M}^+ + 1$ ).



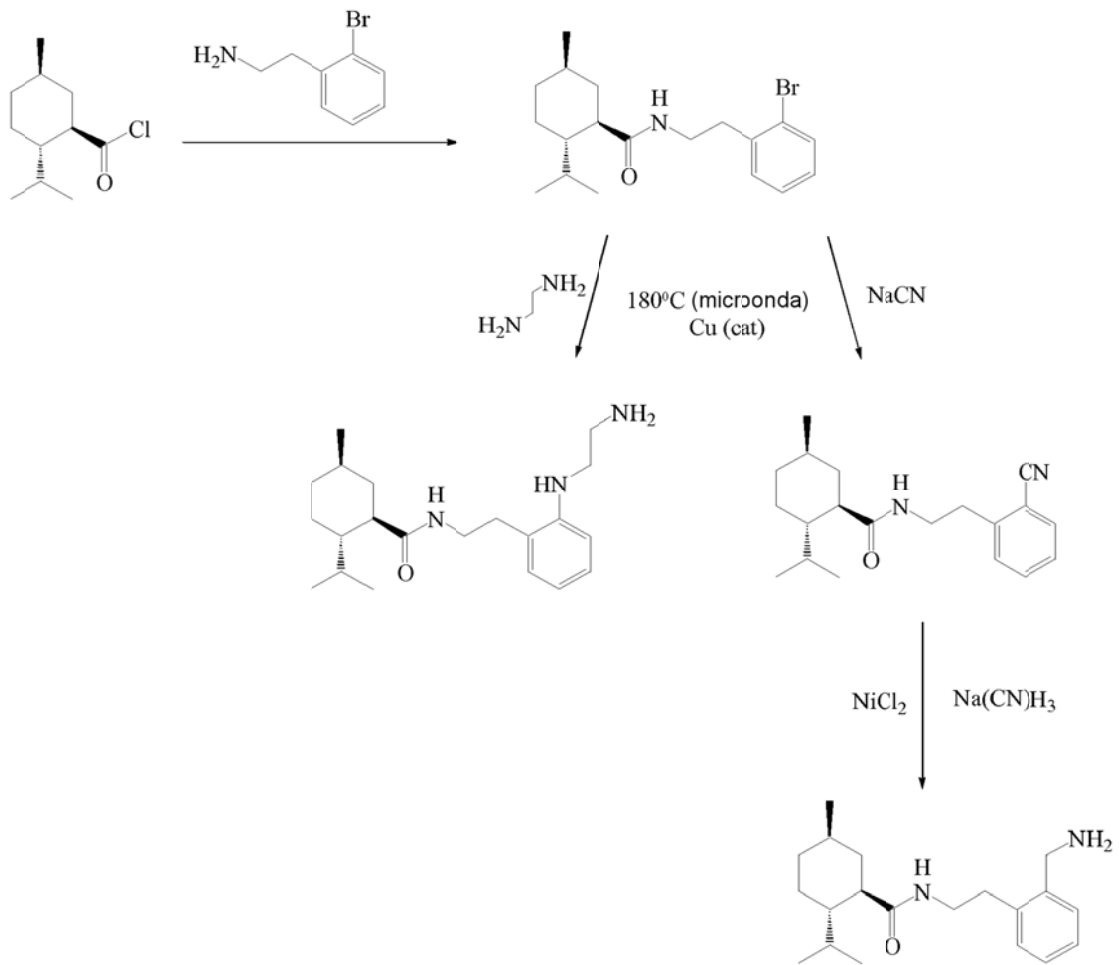
Sal de TFA de [2-(3-amino-4-propoxi)-2-fenil-etil]-amida de 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (compuesto # 31)

En un procedimiento similar a la síntesis del compuesto #30, se prepara el compuesto #31 a partir de (2-hidroxi-2-fenil-etil)-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico y bromuro de hidrógeno de 1-bromopropil-3-amina. Este material es purificado mediante HPLC preparativa (Ultras 120 (10  $\mu\text{m}$ ) C18Q) utilizando un gradiente de 40-60% de acetonitrilo/ $\text{H}_2\text{O}$  (con 0,1% de TFA). MS (ESI)  $m/z$  361 ( $\text{M}^+ + 1$ ).

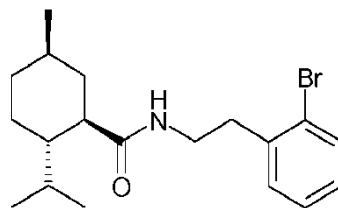
### Ejemplo 7

#### Síntesis de compuestos de dihidrobenzoimidazol adicionales de fórmula I-D

Este ejemplo divulga la metodología para la síntesis de moduladores de Trp-p8 dihidrobenzoimidazólicos de fórmula I-D.



Esquema 6

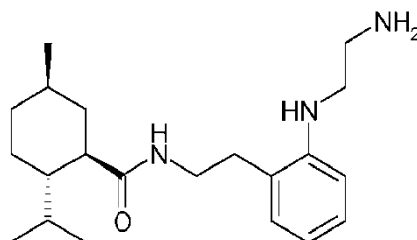


5

[2-(2-bromo-fenil)-etil]-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico

Es cargado un matraz de fondo redondo de 100 ml provisto de una barra agitadora con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml), 2-bromo-fenetilamina (1,0 g, 5,00 mmol) y trietilamina (648 µl, 5,05 mmol). La disolución de reacción es tratada con cloruro de mentoilo (1,02 g, 5,00 mmol) en una parte y agitada a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se diluye con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml) y lavada con agua (3 x 100 ml). La capa orgánica es secada en sulfato sódico anhidro y concentrada a presión reducida para proporcionar un aceite espeso (1,8 g). El producto es utilizado para la próxima etapa sin purificación.

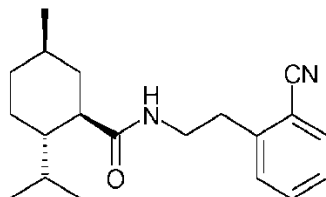
15



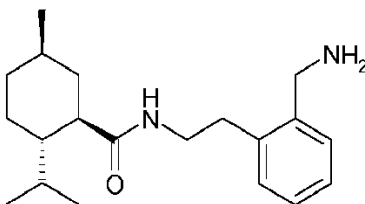


Sal de TFA de {2-[2-(2-amino-etilamino)-fenil]-etil}-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (compuesto # 33)

5 Es cargada una vasija de reacción de microondas de 25ml provisto de una barra agitadora con diaminoetano puro (10 ml), [2-(2-bromo-fenil)-etil]-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (1,5 g, 4,1 mmol) y polvo de Cu (390 mg, 6,147 mmol, 1,5 eq.). La vasija de reacción es sometida a microondas a 180°C durante 40 minutos. La mezcla de reacción es transferida a un matraz de fondo redondo y concentrada. El residuo es disuelto en DMSO (1 ml) y purificado mediante HPLC preparativa (Ultras 120 (10 µm) C18Q) utilizando un gradiente de 10-40% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (con 0,1% de TFA). Las fracciones puras son combinadas, concentradas y liofilizadas para  
10 proporcionar un sólido incoloro (1 g, 52%) MS (ESI)  $m/z$  346 ( $M^+ + 1$ ).

[2-(2-ciano-fenil)-etil]amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico

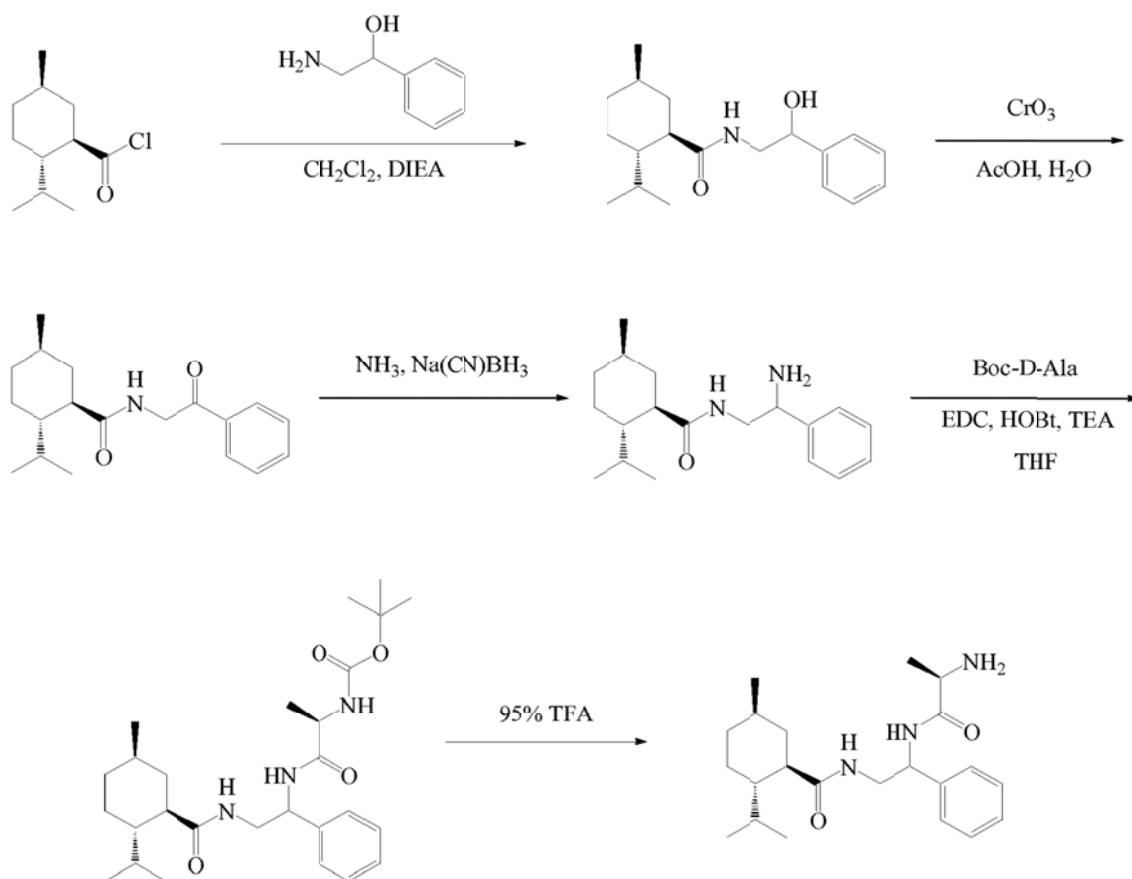
15 Una vasija de reacción de microondas de 20 ml provista de una barra agitadora es cargada con [2-(2-bromo-fenil)-etil]-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (1,54 g, 4,2 mmol), CuCN (0,60 g, 6,4 mmol) y NMP (10 ml). La vasija de reacción es sometida a microondas a 180°C durante 40 minutos. La mezcla de reacción es transferida a un matraz de fondo redondo y concentrada. El residuo es purificado mediante cromatografía en columna rápida en gel de sílice (10% de acetato de etilo/hexano para elución) para proporcionar un sólido incoloro  
20 (1,25 g, 81%).

[2-(2-aminometil-fenil)-etil]amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (compuesto #34)

25 Un matraz de fondo redondo de 100 ml provisto de una barra agitadora es cargada con [2-(2-ciano-fenil)-etil]-amida de ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (1,25 g, 4,0 mmol) y metanol (50 ml). NiCl<sub>2</sub> (1,14 g, 8,8 mmoles) y NaBH<sub>4</sub> (0,64 g, 16,8 mmol). Se añade NaBH<sub>4</sub> en una parte pequeña durante un periodo de 30 min y se agita durante 1 h. Se añade NaBH<sub>4</sub> (0,20 g) y la mezcla de reacción es agitada 20 minutos adicionales. La mezcla de reacción se hace pasar a través de una torta de celita y se concentra bajo una presión reducida. Se disuelve el residuo negro en una cantidad mínima de acetonitrilo y se hace pasar a través de un cartucho de gel de sílice y se purifica mediante HPLC preparativa (Ultras 120 (10 µm) C18Q) utilizando un gradiente de 10-40% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (con 0,1% de TFA). Las fracciones puras son combinadas, concentradas y liofilizadas para proporcionar un sólido  
30 incoloro (1,1) MS (ESI)  $m/z$  317 ( $M^+ + 1$ )  
35

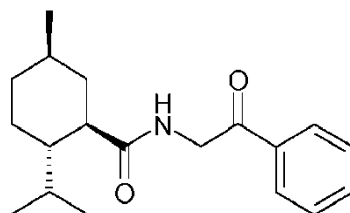
**Ejemplo 8**Síntesis de los compuestos adicionales de fórmula I-C

40 Este ejemplo divulga la metodología para la síntesis de los moduladores de Trp-p8 de fórmula I-C.



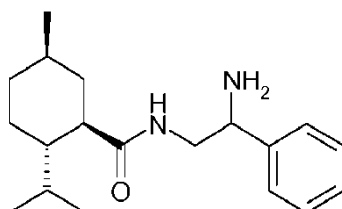
Esquema 7

5

(2-oxo-2-fenil-etil)-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico

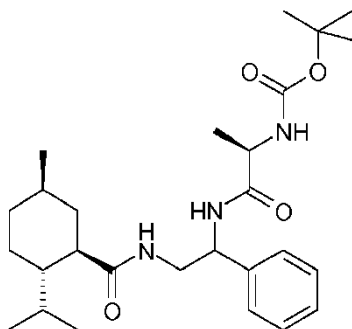
Un matraz de 20 ml de fondo redondo provisto de una barra agitadora se cargó con (2-hidroxi-2-fenil-etil)-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexano-carboxílico (100 mg, 0,33 mmoles) y ácido acético (1 ml). Se añadió lentamente a la mezcla de reacción una disolución de  $\text{CrO}_3$  (36 mg, 0,363 mmoles, 1,1 eq) en acético ácido (500  $\mu\text{l}$ ) y agua (100  $\mu\text{l}$ ). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. y se diluyó con acetato de etilo (30 ml) y  $\text{NaHCO}_3$  saturado (ac.) (30 ml). La mezcla heterogénea se transfirió a un embudo de separación en el que la fase acuosa se separó y se volvió a extraer con acetato de etilo (2 x 10 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con  $\text{NaHCO}_3$  sat. (3 x 10 ml),  $\text{H}_2\text{O}$  (10 ml), salmuera (10 ml), se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (30% hasta 50% de acetato de etilo/hexano para elución) para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco (92 mg, 93%).

20



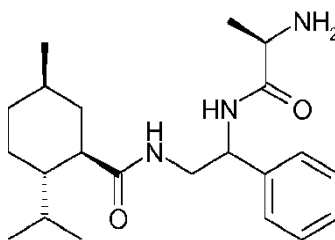
(2-Amino-2-fenil-etil)-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico

Una vasija de reacción de 25 ml de microondas provista de una barra agitadora se cargó con (2-oxo-2-fenil-etil)-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (80 mg) y amoníaco (1,5 ml, 7 M en metanol). Se añadieron a la mezcla de reacción una gota de ácido acético y NaCNBH<sub>3</sub> (20 mg), y se sometió a microondas a 80°C durante 80 min. El residuo se recogió en acetato de etilo (30 ml) y NaHCO<sub>3</sub> saturado (ac.) (30 ml). La mezcla heterogénea se transfirió a un embudo de separación en el que la fase acuosa se separó y se volvió a extraer con acetato de etilo (2 x 10 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> sat. (3 x 10 ml), H<sub>2</sub>O (10 ml), salmuera (10 ml), se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar un sólido (75 mg).



15 Éster *terc*-butílico del ácido (1-{2-[(2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarbonil)-amino]-1-fenil-etilcarbamoil}-etil)-carbámico

Una vasija de reacción de 15 ml provista de una barra agitadora se cargó con THF (15 ml), Boc-(*R*)-alanina (52 mg, 0,273 mmoles), HOBT (37,87 mg, 0,273 mmoles), EDCI (53 mg, 0,273 mmoles) y TEA (37 µl, 0,273 mmoles). La mezcla de reacción se agitó durante 15 min., con lo que después se añadió (2-amino-2-fenil-etil)-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (75 mg, 0,248 mmoles) y se agitó durante 3 h adicionales. Se añadieron a la mezcla de reacción acetato de etilo (10 ml) y H<sub>2</sub>O (10 ml). La mezcla heterogénea se transfirió a un embudo de separación en el que la fase acuosa se separó y se volvió a extraer con acetato de etilo (2 x 10 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con HCl 1N (2 x 10 ml), H<sub>2</sub>O (1 x 10 ml), NaHCO<sub>3</sub> sat. (3 x 10 ml), salmuera (10 ml), se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (20% de acetato de etilo/hexano para elución) para proporcionar el compuesto del título como un sólido incoloro (30 mg).



30 Sal de TFA de [2-(2-amino-propionilamino)-2-fenil-etil]-amida del ácido 2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarboxílico (Compuesto # 28).

Un matraz de 5 ml de fondo redondo provisto de una barra agitadora se cargó con 10% de TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y éster *terc*-butílico del ácido (1-{2-[(2-isopropil-5-metil-ciclohexanocarbonil)-amino]-1-fenil-etilcarbamoil}-etil)-carbámico (30 mg) y se agitó durante 1 h. El TFA se eliminó a presión reducida, y el residuo se disolvió en 30% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (con 0,1% de TFA) y se purificó mediante HPLC preparativa (Ulto 120 (10 µm) C18Q) usando un gradiente de 10-40% de acetonitrilo/H<sub>2</sub>O (con 0,1% de TFA). Las fracciones puras se combinaron, se concentraron y se liofilizaron para proporcionar un sólido incoloro (17,7 mg) (MS (ESI) *m/z* 374 (M<sup>+</sup> + 1).

40 **Ejemplo 9**

Expresión de Trp-p8 en células CHO

Se generaron células CHO transfectadas con Trp-p8 humana (denominadas en la presente memoria CHO/Trp-p8) para uso en experimentos de la presente invención. La expresión del polipéptido Trp-p8 en este transfectante, y la ausencia de cualquier expresión endógena en la célula CHO no transfectada, se confirmó mediante transferencia western e inmunofluorescencia usando un anticuerpo específico para Trp-p8 (GS2.20), así como el ensayo de flujo de calcio con Icilina (1-[2-hidroxifenil]-4-[3-nitrofenil]-1,2,3,6-tetrahidropirimidin-2-ona) y mentol (2-isopropil-5-metil-

ciclohexanol). Las células CHO no transfectadas se usaron para establecer la especificidad de los efectos de los compuestos observados con CHO/Trp-p8.

### Ejemplo 10

5 Disminución mediada por Trp-p8 en la viabilidad celular tras la exposición de células CHO/Trp-p8 con compuestos agonistas de Trp-p8 candidatos a 37°C

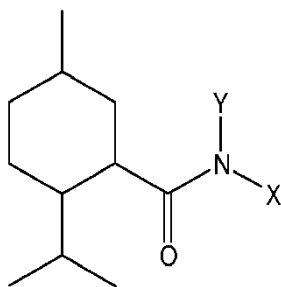
10 Este Ejemplo describe un ensayo de viabilidad de ATP adecuado para el cribado de agonistas de Trp-p8 eficaces. El ensayo de viabilidad de ATP descrito emplea células CHO que expresan un ADN de Trp-p8 exógeno. Este ejemplo establece además que los agonistas de Trp-p8 de la presente invención son eficaces disminuyendo la viabilidad de células que expresan Trp-p8.

15 La concentración de ATP intracelular disminuye muy rápidamente cuando las células metabólicamente activas sufren necrosis y/o apoptosis. La concentración de ATP, y consiguientemente la viabilidad celular relativa, se puede medir por métodos establecidos usando reactivos comercialmente disponibles. En la metodología de cribado de agonistas descrita en la presente memoria, un compuesto que disminuye específicamente la viabilidad de células CHO/Trp-p8 se denomina agonista.

20 Como un cribado primario para la eficacia y especificidad para agonistas, se expusieron tanto las células CHO no transfectadas como las células CHO/Trp-p8 a 1 ó 10  $\mu\text{M}$  de compuestos de ensayo en 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) o 1% de DMSO (control) en una placa tratada de cultivo celular, de fondo negro, de paredes negras, de 96 pocillos. DMSO fue el disolvente para todos los compuestos ensayados. Después de 24-26 horas a 37°C, las células se lisaron, y se determinó la concentración de ATP vía un ensayo de quimioluminiscencia usando un kit de reactivos comercialmente disponible - Cell Titer-Glo (Promega; Madison, WI). La viabilidad relativa (%), expresada como el nivel de ATP en células tratadas con compuestos expresada como un porcentaje de niveles de ATP en células tratadas con el DMSO solo, fue una medida de la actividad agonista del compuesto candidato - cuanto menor es el % de la viabilidad, más potente es el agonista de Trp-p8. Se determinaron valores de  $\text{EC}_{50}$  para los agonistas de Trp-p8 candidatos más activos a 37°C midiendo la viabilidad a 8-10 concentraciones de agonistas. ( $\text{EC}_{50}$  se define en la presente memoria como la concentración de agonista a la que existe una reducción del 50% en la viabilidad celular relativa).

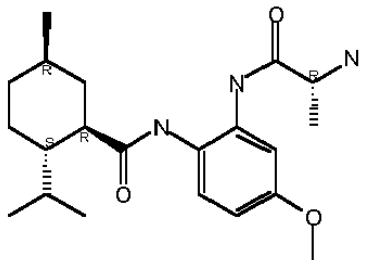
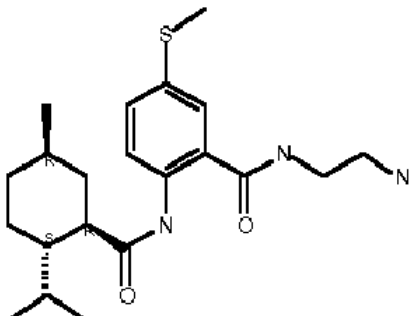
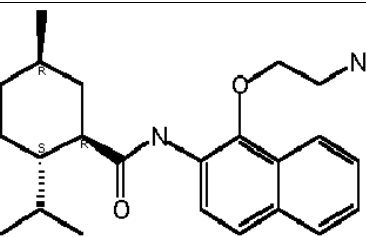
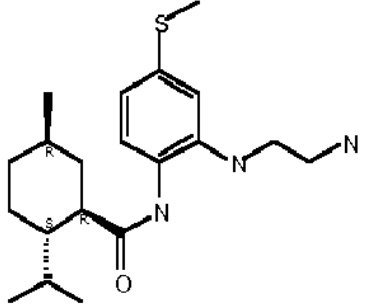
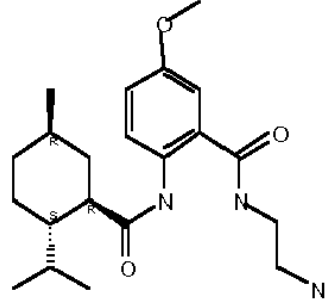
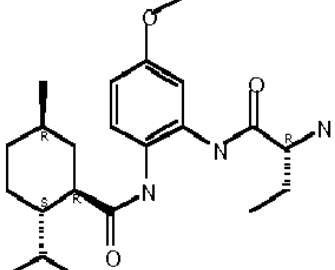
35 Los agonistas de Trp-p8 ejemplificativos de Fórmula I, Fórmula I-A, Fórmula I-B, Fórmula I-C y fórmula I-D, que fueron eficaces en el ensayo de viabilidad de ATP, se presentan en la presente memoria en las tablas 1 a 4. Los datos de  $\text{EC}_{50}$  se designan según lo siguiente: A = < 0,020  $\mu\text{M}$ ; B = 0,021 - 0,050  $\mu\text{M}$ ; C=0,051 - 0,10  $\mu\text{M}$ .

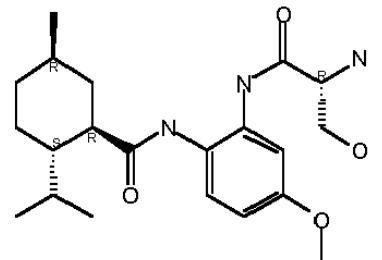
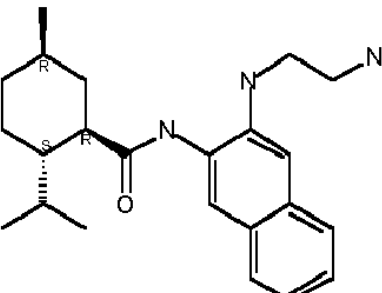
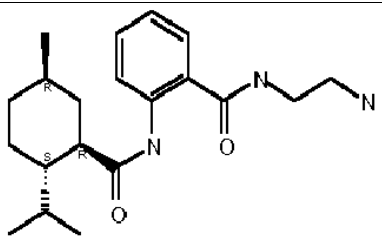
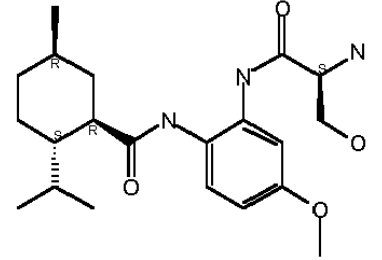
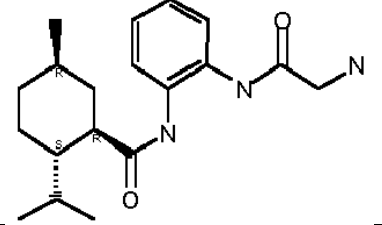
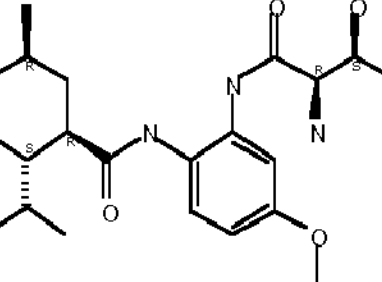
En las tablas 1 a 4, las estructuras proporcionadas presentan la forma:



40 en la que se proporcionan nombres químicos para X y/o Y. Cuando se proporcionan nombres para "X/Y", los nombres son inclusivos del grupo nitrógeno.

45 En la figura 1 se presenta la viabilidad de células CHO/Trp-p8 tras el tratamiento con agonistas de Trp-p8 ejemplificativos.

Compuestos ejemplificativos de Fórmula I-A			
Compuesto #	Estructura	EC50	X
1		A	2-(2-Amino-propionilamino)-4-metoxifenil
2		A	N-(2-amino-etil)-5-metilfulfanil-benzamida-2-ilo
3		A	1-(2-amino-etoxi)-naftalen-2-ilo
4		A	2-(2-amino-etilamino)-4-metilsulfanilo-fenilo
5		A	N-(2-amino-etil)-5-metoxi-benzamida-2-ilo
6		B	2-(2-amino-butirilamino)-4-metoxi-fenilo

Compuestos ejemplificativos de Fórmula I-A			
Compuesto #	Estructura	EC50	X
7		B	2-(2-amino-3-hidroxi-propionilamino)-4-metoxi-fenilo
8		B	3-(2-amino-etilamino)-naftalen-2-ilo
9		B	N-(2-amino-etil)-benzamida-2-ilo
10		B	2-(2-amino-3-hidroxi-propionilamino)-4-metoxi-fenilo
11		C	2-(2-amino-acetilamino)-fenilo
12		C	2-(2-amino-3-hidroxi-butirilamino)-4-metoxi-fenilo

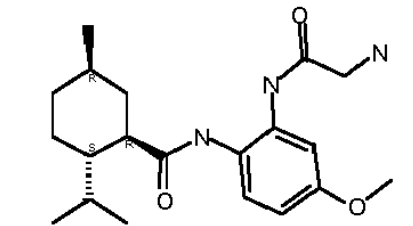
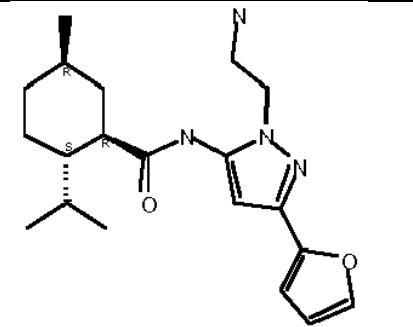
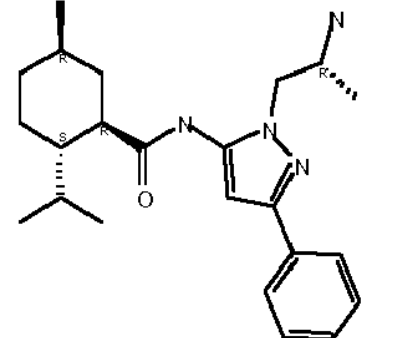
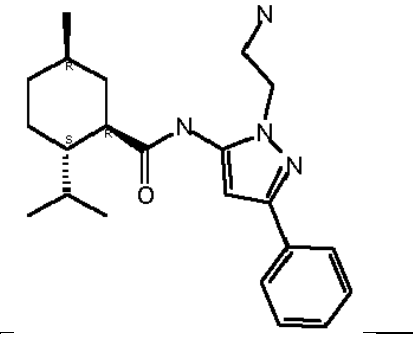
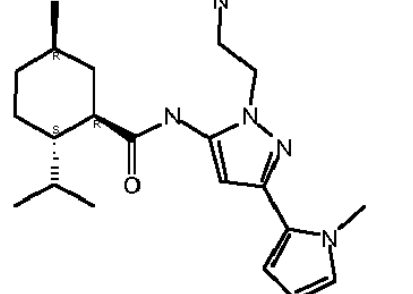
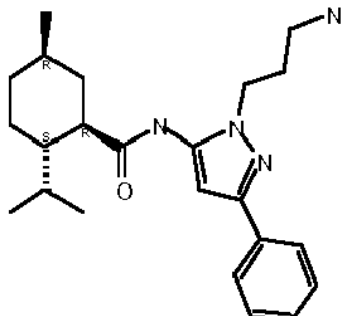
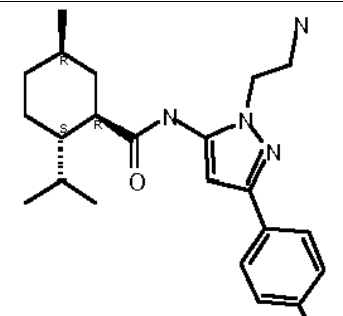
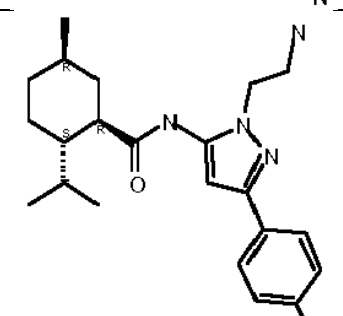
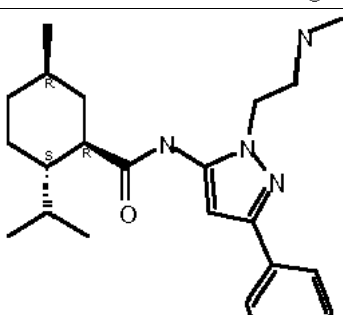
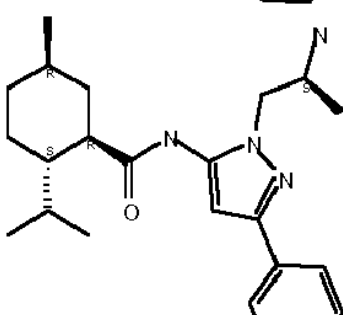
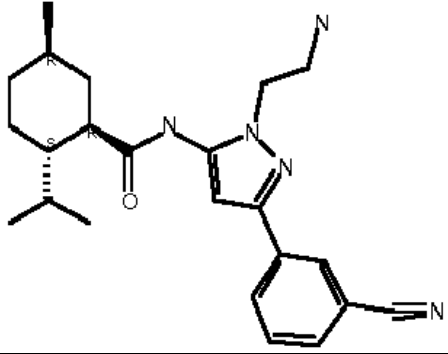
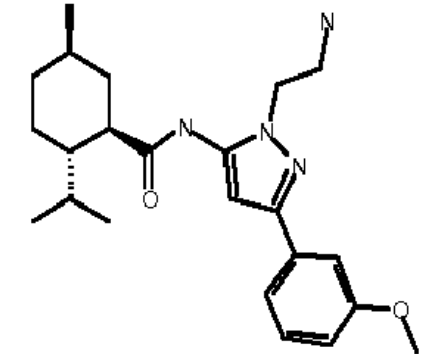
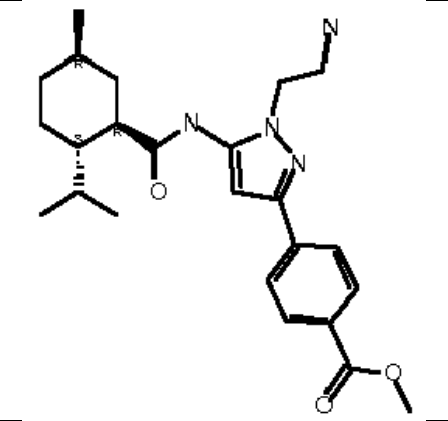
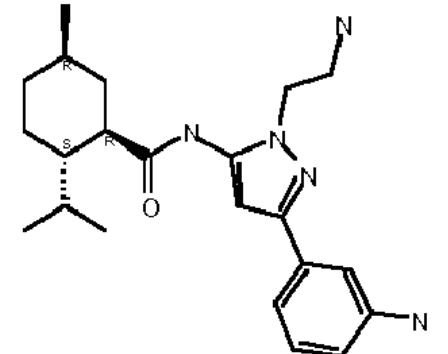
Compuestos ejemplificativos de Fórmula I-A			
Compuesto #	Estructura	EC50	X
13		C	2-(2-amino-acetilamino)-4-metoxi-fenilo

Tabla 2

Compuestos ejemplificativos de Fórmula I-B			
Objeto ID	Estructura	EC50	X
14		A	2-(2-amino-etil)-5-furan-2-il-2H-pirazol-3-ilo
15		A	2-(2-amino-propil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo
16		A	2-(2-amino-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo
17		A	2-(2-amino-etil)-5-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-2H-pirazol-3-ilo

Compuestos ejemplificativos de Fórmula I-B			
Objeto ID	Estructura	EC50	X
18		A	2-(3-amino-propil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo
19		B	2-(2-amino-etil)-5-(4-amino-fenil)-2H-pirazol-3-ilo
20		B	2-(2-amino-etil)-5-(4-hidroxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo
21		B	2-(2-metilamino-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo
22		B	2-(2-amino-propil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo



Compuestos ejemplificativos de Fórmula I-B			
Objeto ID	Estructura	EC50	X
23		B	2-(2-amino-etil)-5-(3-ciano-fenil)-2H-pirazol-3-ilo
24		B	2-(2-amino-etil)-5-(3-metoxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo
25		C	2-(2-amino-etil)-5-[4-(metoxicarbonil)-fenil]-2H-pirazol-3-ilo
26		C	2-(2-amino-etil)-5-(3-amino-fenil)-2H-pirazol-3-ilo

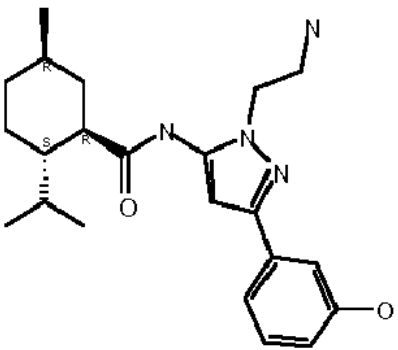
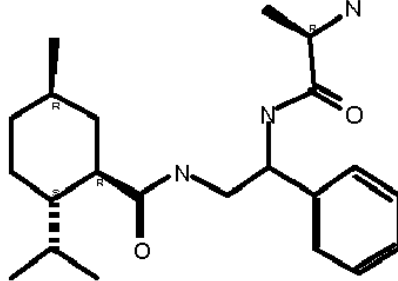
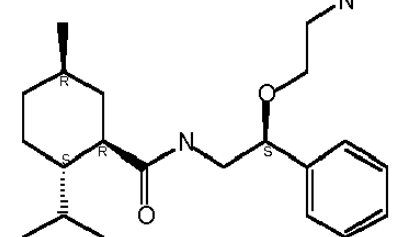
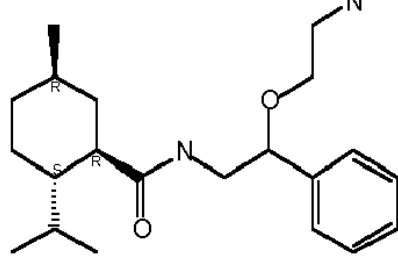
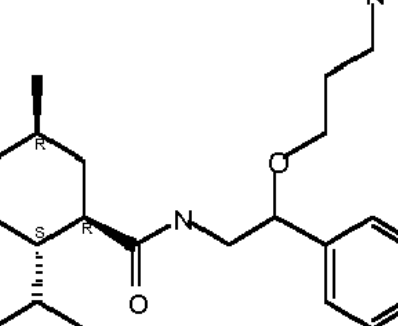
Compuestos ejemplificativos de Fórmula I-B			
Objeto ID	Estructura	EC50	X
27		C	2-(2-amino-etil)-5-(3-hidroxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo

Tabla 3

Compuestos ejemplificativos de Fórmula I-C			
Compuesto #	Estructura	EC50	X
28		A	2-(2-amino-propionilamino)-2-fenil-etilo
29		A	2-(2-amino-etoxi)-2-fenil-etilo
30		A	2-(2-amino-etoxi)-2-fenil-etilo
31		B	2-(3-amino-propoxi)-2-fenil-etilo

Compuestos ejemplificativos de Fórmula I-C			
Compuesto #	Estructura	EC50	X
32		C	2-(3-amino-etilamino)-2-fenil-etilo

Tabla 4

Compuestos ejemplificativos de Fórmula I-D			
Compuesto #	Estructura	EC50	X
33		A	2-[2-(2-amino-etilamino)-fenil]-etilo
34		A	2-(2-aminometil-fenil)-etilo
35		B	2-[(2-amino-acetil)-fenil-amino]-etilo

5

### Ejemplo 11

Cribado y caracterización de compuestos agonistas de Trp-p8 midiendo el influjo de calcio en células CHO/Trp-p8 a 37°C

10

Este ejemplo describe un ensayo de influjo de calcio a base de CHO/Trp-p8 usado para evaluar adicionalmente la actividad de agonistas de Trp-p8 candidatos de la presente invención.

15

El influjo de calcio se midió usando un lector de placas de fluorescencia Flexstation Microplate (Molecular Devices; Sunnyvale, CA). Un ensayo típico para el flujo de calcio se realizó según lo siguiente. Se cultivaron células en medio a base de DMEM/F-12 de Ham, típicamente a una densidad de 30.000 células/pocillo/100 µl, en una placa de cultivo tisular de fondo transparente y de paredes negras de 96 pocillos (Greiner Bio-one), y se incubaron durante 16-20 horas a 37°C. Las células en cada pocillo se incubaron durante una hora a 37°C con una mezcla de colorante fluorescente (Fura2-AM/Pluronic F-27 (Molecular Probes; Eugene, Oregón), y se disolvieron en el medio que contiene probenecida. Las concentraciones finales típicas fueron: 5-8 µM de Fura2-AM, 0,01% de Pluronic F-27, y

20

2,5 mM de probenecida (un inhibidor del intercambio aniónico que reduce el transporte del colorante hidrolizado desde el interior de la célula, minimizando de ese modo la pérdida de colorante durante el experimento. Después de una hora, las células se lavaron en una disolución tamponada (20 mM de HEPES y disolución salina balanceada de Hank con 1,26 mM de CaCl<sub>2</sub>), pH 7,4, que contiene probenecida a una concentración final de 2,5 mM, y se preincubaron durante al menos 30 minutos a la temperatura de ensayo de 37°C.

Típicamente, el tampón a base de HEPES/HBSS descrito anteriormente, que o no contiene calcio adicional o que contiene calcio para incrementar la concentración hasta 2 mM y diversas concentraciones de compuestos (a 5 veces las concentraciones finales), se añadió a cada pocillo usando el pipeteador de múltiples canales robótico. Los compuestos se preincubaron a 37°C durante al menos 30 minutos antes de llevar a cabo el ensayo (a 37°C). Las señales se leyeron con longitudes de onda de excitación duales de 340 y 380 nm y una longitud de onda de emisión de 510 nm, con un filtro de corte a 495 nm. La señal se dio como la relación de emisión cuando se excita a 340 nm a la emisión cuando se excita a 380 nm [Unidades de Fluorescencia Relativas (RFU)]. Como control positivo, se usó normalmente ionomicina.

En el caso del ensayo de agonistas, los compuestos a diferentes concentraciones se añadieron a las células cargadas con colorante (como se describe anteriormente). El incremento en RFU fue una medida de la potencia del compuesto como agonista. En la figura 2 se presentan los resultados ejemplificativos.

## **Ejemplo 12**

Incremento en la apoptosis tras la exposición de células CHO/Trp-p8 con compuestos agonistas de Trp-p8 a 37°C.

Este ejemplo describe la eficacia de los compuestos agonistas de Trp-p8 induciendo apoptosis en células que expresan Trp-p8.

Se usó un ensayo de citometría de flujo con anexina V/yoduro de propidio (PI) para proporcionar conocimiento en el mecanismo de la muerte celular inducida por compuestos agonistas de Trp-p8. La tinción con anexina V detecta translocación de fosfatidilserina hacia la capa externa de la membrana plasmática, un suceso característico de la apoptosis, mientras que la tinción con PI indica células muertas con membranas comprometidas.

Las células se trataron con compuestos en 1% de DMSO o con un 1% de DMSO (control) durante 24-26 horas a 37°C. Las células se tripsinizaron brevemente en condiciones controladas y se tiñeron con un kit de reactivo de anexina V/PI siguiendo la metodología proporcionada por el proveedor (*por ejemplo*, Southern Biotech; Birmingham, Alabama). En la figura 3 se presentan resultados ejemplificativos.

## **Ejemplo 13**

Cribado *in vitro* usando un ensayo de viabilidad celular para compuestos antagonistas de Trp-p8 basado en la protección de células que expresan Trp-p8 de compuestos agonistas tóxicos

Este ejemplo describe un sistema de ensayo para identificar y caracterizar compuestos antagonistas de Trp-p8 candidatos.

Los antagonistas de Trp-p8 se identificaron utilizando un ensayo de viabilidad celular con células CHO/Trp-p8 a 37°C (véase el Ejemplo 10), con la siguiente modificación. En el contexto de la presente invención, un compuesto que protege a las células CHO/Trp-p8 del efecto tóxico de un agonista de control, manteniendo de ese modo la viabilidad de la célula CHO/Trp-p8 expuesta a un agonista de Trp-p8, se define como antagonista. Como un cribado primario para antagonistas, las células CHO/Trp-p8 se expusieron a 10 µM de compuestos de ensayo en 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) o 1% de DMSO más una concentración tóxica de un agonista de control. La viabilidad relativa a 10 µM, determinada como se describe en el Ejemplo 10, fue una medida del potencial del compuesto como un antagonista de Trp-p8 - cuanto mayor es la viabilidad, más potente es el antagonista. En la figura 4 se presentan los resultados ejemplificativos.

## **Ejemplo 14**

Cribado *in vitro* usando un ensayo de flujo de calcio para compuestos antagonistas de Trp-p8 basado en sus capacidades para suprimir el influjo de calcio inducido por agonistas de Trp-p8 en células CHO/Trp-p8

Este ejemplo describe un sistema de ensayo *in vitro* utilizado para cribar y caracterizar adicionalmente antagonistas de Trp-p8 candidatos.

Los antagonistas de Trp-p8 también se cribaron y caracterizaron usando un ensayo de flujo de calcio a 37°C como se describe en el Ejemplo 11, con las siguientes dos distinciones: (1) el compuesto se premezcló con el agonista de control o sólo se añade el agonista de control a las células, y la supresión de la respuesta al agonista es una medida de la potencia del compuesto como antagonista, y (2) el compuesto, a diferentes concentraciones, se añadió a las

células, seguido de la adición del agonista de control tras 2-3 minutos, y la supresión de respuesta inducida por el agonista fue una medida de la potencia del compuesto como un antagonista. En la figura 5 se presentan unos resultados ejemplificativos.

## 5 Ejemplo 15

### Un sistema de modelo animal para ensayar la eficacia *in vivo* de agonistas y antagonistas de Trp-p8 candidatos para el tratamiento de cáncer

10 Este ejemplo proporciona un sistema de modelo animal adecuado para determinar la eficacia *in vivo* de moduladores de Trp-p8 candidatos - incluyendo tanto agonistas como antagonistas.

15 Para establecer modelos de tumores en ratones, se usaron xenoinjertos de cáncer de próstata humano que expresan Trp-p8 (LuCaP, del laboratorio del Dr. Robert Vessella en la University of Washington - según se evalúa mediante hibridación *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, e inmunohistoquímica usando un anticuerpo policlonal de conejo específico para la proteína, T-904), así como estirpes celulares manipuladas para expresar Trp-p8, incluyendo estirpes celulares CHO (ovario de hámster chino) y EL-4 (timoma de ratón). La expresión de Trp-p8 en los transfectantes se confirmó mediante transferencias *western* e inmunofluorescencia usando un anticuerpo específico de Trp-p8 (GS 2.20) así como mediante la respuesta a agonistas conocidos en un ensayo funcional de influjo de calcio. Además, las estirpes celulares transfectadas fueron susceptibles a la destrucción por agonistas de Trp-p8, como resulta evidente a partir de los ensayos de viabilidad de ATP y de apoptosis (como se describen en la presente memoria en los ejemplos 10 y 12).

20 Un modelo de tumor en ratones se estableció inyectando subcutáneamente células CHO/Trp-p8 en ratones SCID. La expresión de Trp-p8 en tumores cortados de estos ratones se confirmó mediante RT-PCR, inmunohistoquímica y análisis de transferencia *western*. Otro desarrollo del modelo de tumores se lleva a cabo usando los xenoinjertos de cáncer de próstata humano descritos anteriormente en ratones atímicos o ratones SCID y usando un transfectante de EL4/Trp-p8 en ratones normales. Los xenoinjertos de próstata procedentes de otras fuentes y de otras estirpes celulares que se pueden manipular para expresar Trp-p8 son también candidatos potenciales para construir más sistemas de modelos.

25 Basándose en resultados de evaluaciones *in vitro* e *in vivo*, se escogerá un conjunto de agonistas de Trp-p8 para determinar la eficacia en ratones. Las evaluaciones *in vitro* incluirían la potencia en el ensayo de exterminio celular, solubilidad acuosa, estudio de unión plasmática y estabilidad metabólica (el potencial de un compuesto para ser metabolizado por el hígado, según se determina usando hepatocitos y/o microsomas de ratón). Las evaluaciones *in vivo* incluirían estudios farmacocinéticos y de toxicidad. Los compuestos seleccionados se administrarán a ratones con tumores que expresan Trp-p8 mediante diferentes vías [oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular]. La reducción tumoral y la supervivencia de estos ratones se evaluarán a diferentes dosis de estos compuestos. El compuesto más eficaz a la hora de luchar contra el tumor se seleccionará para investigaciones posteriores.

## 30 Ejemplo 16

### Caracterización experimental de varios compuestos ejemplificativos

35 Este ejemplo describe la caracterización experimental y los resultados de varios moduladores ejemplificativos de Trp-p8 de pequeñas moléculas de fórmula I, denominados compuesto I, II, III y IV. En la Tabla 5 se resumen sus fórmulas químicas y pesos moleculares.

50 Tabla 5

Fórmulas químicas y pesos moleculares				
Compuesto	I	II	III	IV*
Fórmula química	C <sub>21</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Peso molecular	373	343	368	346

### Actividad *in vitro*

55 Como se resume en la Tabla 6, los compuestos demostraron un grado elevado de potencia y especificidad para exterminar células que expresan Trp-p8. Típicamente, se necesitaron concentraciones mayores de >1000x del compuesto para exterminar células que carecen de Trp-p8, en comparación con células que expresan Trp-p8. Los Compuestos II, III, y IV mostraron actividad similar en este ensayo, mientras que el Compuesto I fue aproximadamente 3 veces más potente.

60

Tabla 6

Resultados del ensayo de viabilidad de ATP para varios compuestos preferidos				
Compuesto	I	II	III	IV*
CHO/Trp-p8 EC <sub>50</sub> (mM)	0,003	0,01	0,01	0,01
CHO Progenitora EC <sub>50</sub> (mM)	>10	>10	>10	>10

Actividad in vivo

5 Como se ilustra en las figuras 9A y 9B, los Compuestos I, II y III produjeron exposición prolongada después de una única administración oral en ambos roedores (figura 9A) y perros Beagle (figura 9B). Comparadas con los ratones, las ratas necesitaron aproximadamente el doble de la dosis oral (basado en el peso corporal) para lograr una exposición comparable, y los perros necesitaron menos de un tercio. Consistente con los niveles plasmáticos sostenidos (t 1/2 ~ 9 h), una única dosis oral produce una respuesta duradera prolongada en el modelo de xenoinjerto de CHO/Trp-p8.

10 Como se ilustra en las figuras 10A y 10B, la dosificación oral de estos compuestos produjo respuestas duraderas en el modelo de xenoinjerto de CHO/Trp-p8. La inhibición sustancial del crecimiento tumoral se observó tras una única dosis tan baja como 10 mg/kg, y no hubo toxicidad significativa a 100 mg/kg; una ventana terapéutica de > 10x.

15 Como se ilustra en la figura 7, los compuestos de la fórmula I generaron una exposición sustancialmente más breve vía una única inyección intraperitoneal en comparación con la administración oral. Como se ilustra en las figuras 8A y 8B, la inyección intraperitoneal de estos compuestos en ratones da como resultado respuestas más breves en el modelo de xenoinjerto de CHO/Trp-p8, y parece ser menos duradera tras el cese de la dosificación IP.

20 Para demostrar que la eficacia está mediada por Trp-p8, la figura 11 ilustra la evaluación del Compuesto I en el modelo de CHO(Trp-p8-) emparejado. Consistente con el mecanismo de acción propuesto, el Compuesto I no mostró eficacia significativa a 100 mg/kg en este modelo, una dosis 10 veces mayor que una dosis eficaz en el modelo de CHO/Trp-p8 análogo.

25 Como se ilustra en la figura 12, el modelo de LuCaP pareció responder comparable o cuestionablemente mejor que el modelo de CHO/Trp-p8. CHO/Trp-p8 es un tumor que crece rápidamente; el tratamiento con el Compuesto I atenuó el crecimiento, pero no provocó regresión. Por el contrario, LuCaP es un tumor que crece más lentamente; el tratamiento provocó una regresión estadísticamente significativa, así como inhibición del crecimiento. En este caso, el modelo de xenoinjerto de LuCaP mostró niveles de Trp-p8 comparables al modelo de CHO/Trp-p8, según se mide mediante inmunohistoquímica de tejidos tumorales cortados de los ratones.

30 La dosis más elevada administrada oralmente a ratones, 100 mg/kg, no dio como resultado toxicidad significativa para ninguno de los compuestos. Puesto que una única dosis oral de 10 mg/kg de Compuesto I produjo eficacia significativa en el modelo de xenoinjerto de CHO/Trp-p8, se puede lograr una ventana terapéutica de > 10 con los compuestos de la fórmula I. Esto se ha expandido mediante experimentos toxicológicos en ratas, en los que los compuestos se pudieron administrar a mayores niveles de dosis. En estudios de toxicología realizados en ratas, las dosis orales de 250 mg/kg no indujeron efectos tóxicos observables. Las dosis de 500 mg/kg y 1000 mg/kg dieron como resultado una toxicidad leve a moderada, pero no se alcanzó la MTD. Estos datos, que representan las ventanas terapéuticas mínimas logrables con los compuestos de la fórmula I, se resumen en la Tabla 7.

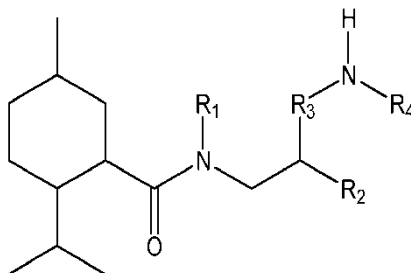
Tabla 7

Dosis oral de rata (mg/kg)	Grado de toxicidad observado	Dosis oral comparable de ratón (mg/kg)	Múltiple de la dosis oral eficaz más baja en ratones
250	Ninguno	125	12,5
500	Leve	250	25
1000	Moderado	500	50

45

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que presenta la fórmula I-C:



5

o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, y arilalquilo;

10

R<sub>2</sub> es seleccionado de entre arilo y arilalquilo;

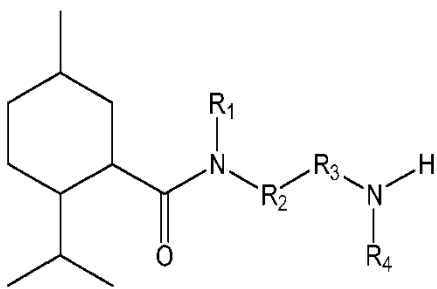
R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo, arilalquilo, -NHC(O)R<sub>5</sub>-, -OR<sub>5</sub>-, y -NHR<sub>5</sub>-, en el que R<sub>5</sub> es alquilo o heteroalquilo;

15

R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo; o

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

20 2. Compuesto que presenta la fórmula I:



25

o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilalquilo y arilo, o

R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> junto con el grupo nitrógeno pueden formar un grupo cíclico o heterocíclico de hasta 25 átomos;

R<sub>2</sub> es seleccionado de entre arilo y arilalquilo;

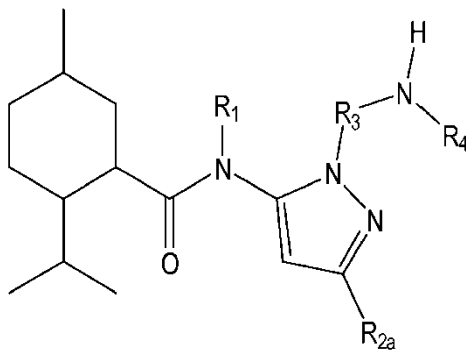
R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo;

30

R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo y arilalquilo; o

R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

3. Compuesto según la reivindicación 2 que presenta la fórmula I-B:

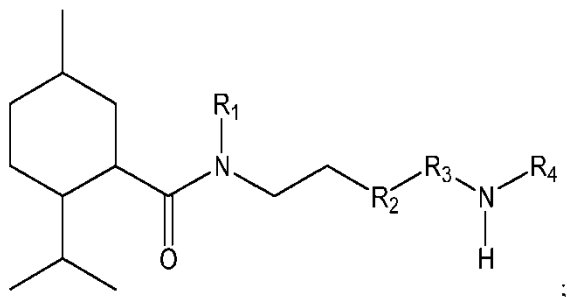


35

o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

- 5 R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo y arilalquilo;  
 R<sub>2a</sub> es seleccionado de entre arilo, alquilo, heteroalquilo y arilalquilo;  
 R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo y arilalquilo;  
 R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo y arilalquilo; o  
 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

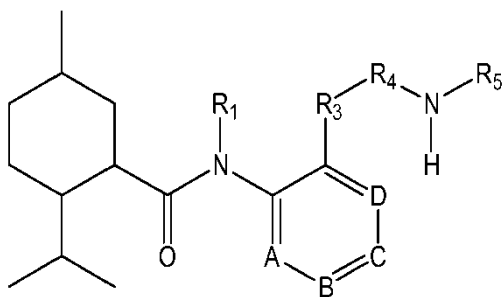
- 10 4. Compuesto según la reivindicación 2 que presenta la fórmula I-D:



o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

- 15 R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo y arilalquilo;  
 R<sub>2</sub> es seleccionado de entre arilo y arilalquilo;  
 R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo y arilalquilo;  
 R<sub>4</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo y arilalquilo; o  
 20 R<sub>3</sub> y R<sub>4</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

5. Compuesto según la reivindicación 2 que presenta la fórmula I-A:



o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que

- 30 A, B, C y D son seleccionados independientemente de entre CR<sub>2</sub> y N; en el que por lo menos uno de A, B, C y D es CR<sub>2</sub>; R<sub>2</sub> es un elemento seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, halógeno, y arilalquilo, R<sub>6</sub>O<sup>-</sup>, y R<sub>6</sub>S<sup>-</sup>, en el que R<sub>6</sub> es alquilo; en el que cuando dos adyacentes de A, B, C, y D son CR<sub>2</sub>, los dos R<sub>2</sub> pueden combinarse para formar un único grupo arilo, cicloalquilo, o heterocicloalquilo;

- 35 R<sub>1</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, y arilalquilo;

R<sub>3</sub> es seleccionado de entre alquilo, heteroalquilo, arilo, arilalquilo, -NR<sub>7</sub>C(O)-, -C(O)NR<sub>7</sub>-, -O-, -S-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, y -NR<sub>7</sub>-, en el que R<sub>7</sub> es un elemento seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, arilo, y arilalquilo;

- 40 R<sub>4</sub> es seleccionado de entre -C(O)R<sub>8</sub>-, alquilo, arilalquilo, y heteroalquilo, en el que R<sub>8</sub> es seleccionado de entre alquilo y heteroalquilo;

R<sub>5</sub> es seleccionado de entre H, alquilo, heteroalquilo, y arilalquilo; o

R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> junto con el grupo nitrógeno forman una amina alifática.

- 45 6. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el



que R<sub>1</sub> es H.

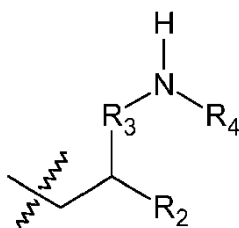
7. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>2</sub> es fenilo.

5 8. Compuesto según la reivindicación 1 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>5</sub> es seleccionado de entre metileno, etileno, propileno, y butileno.

10 9. Compuesto según la reivindicación 1 u 8 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>3</sub> es seleccionado de entre propionilamino, etoxi, propoxi, y etilamino.

10. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que R<sub>4</sub> es H o metilo.

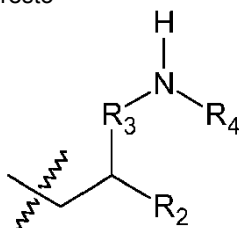
15 11. Compuesto según la reivindicación 1 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el resto



20 es seleccionado de entre el grupo que consiste en 2-(2-amino-propionilamino)-2-fenil-etilo, 2-(2-amino-etoxi)-2-fenil-etilo, 2-(3-amino-propoxi)-2-fenil-etilo, 2-(2-dimetilamino-etoxi)-2-fenil-etilo, y 2-(2-amino-etilamino)-2-fenil-etilo.

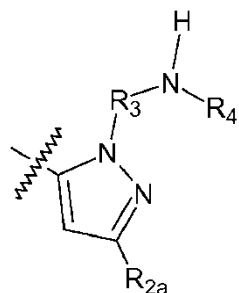
12. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que

(i) el compuesto presenta la fórmula I-C y el resto



25 es seleccionado de entre el grupo que consiste en 2-(2-amino-propionilamino)-2-fenil-etilo, 2-(2-amino-etoxi)-2-fenil-etilo, 2-(3-amino-propoxi)-2-fenil-etilo, y 2-(2-amino-etilamino)-2-fenil-etilo;

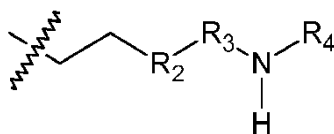
30 (ii) el compuesto presenta la fórmula I-B y el resto



35 es seleccionado de entre el grupo que consiste en 2-(2-amino-etil)-5-furan-2-il-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-propil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(1-metil-1H-pirrol-2-il)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(3-amino-propil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(4-amino-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(4-hidroxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-metilamino-etil)-5-fenil-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(3-ciano-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(3-metoxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-[4-(metoxicarbonil)-fenil]-2H-pirazol-3-ilo, 2-(2-amino-etil)-5-(3-amino-fenil)-2H-pirazol-3-ilo, y 2-(2-amino-etil)-5-(3-hidroxi-fenil)-2H-pirazol-3-ilo;

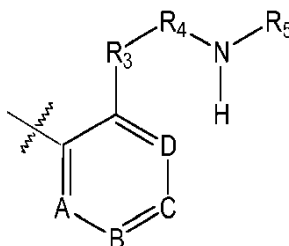
40

(iii) el compuesto presenta la fórmula I-D y el resto



5 es seleccionado de entre el grupo que consiste en 2-[2-(2-amino-etilamino)-fenil]-etilo, 2-(2-aminometil-fenil)-etilo, y 2-[(2-amino-acetil)-fenil-amino]-etilo; o

(iv) el compuesto presenta la fórmula I-A y el resto



10 es seleccionado de entre el grupo que consiste en 2-(2-amino-propionilamino)-4-metoxi-fenilo, N-(2-amino-etil)-5-metilsulfanil-benzamida-2-ilo, 1-(2-amino-etoxi)-naftalen-2-ilo, 2-(2-amino-etilamino)-4-metilsulfanil-fenilo, N-(2-amino-etil)-5-metoxi-benzamida-2-ilo, 2-(2-amino-butirilamino)-4-metoxi-fenilo, 2-(2-amino-3-hidroxi-propionilamino)-4-metoxi-fenilo, 3-(2-amino-etilamino)-naftalen-2-ilo, N-(2-amino-etil)-benzamida-2-ilo, 15 2-(2-amino-acetilamino)-fenilo, 2-(2-amino-3-hidroxi-butirilamino)-4-metoxi-fenilo, y 2-(2-amino-acetilamino)-4-metoxi-fenilo.

20 13. Composición farmacéutica que comprende uno o más compuestos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 14. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o la composición farmacéutica según la reivindicación 13 para disminuir la viabilidad celular y/o inhibir el crecimiento celular, inducir la apoptosis y/o la necrosis en una célula que expresa Trp-p8, modular la función del receptor de Trp-p8, o el diagnóstico o la terapia médicos.

30 15. Compuesto, sal farmacéuticamente aceptable, o composición farmacéutica según la reivindicación 14, en el/la que la terapia médica es seleccionada de entre el grupo que consiste en tratar una enfermedad o afección en un mamífero en la que está indicado un receptor de Trp-p8 y resulta deseada la modulación de la función de receptor, tratar una enfermedad asociada a la expresión de Trp-p8, y tratar el cáncer.

16. Procedimiento para identificar un agonista de Trp-p8, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de poner en contacto una célula que expresa Trp-p8 y una célula que no expresa Trp-p8 con un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 *in vitro* durante un tiempo y en una cantidad suficientes para disminuir la viabilidad de dicha célula que expresa Trp-p8 pero no de dicha célula que no expresa Trp-p8.

Figura 1A

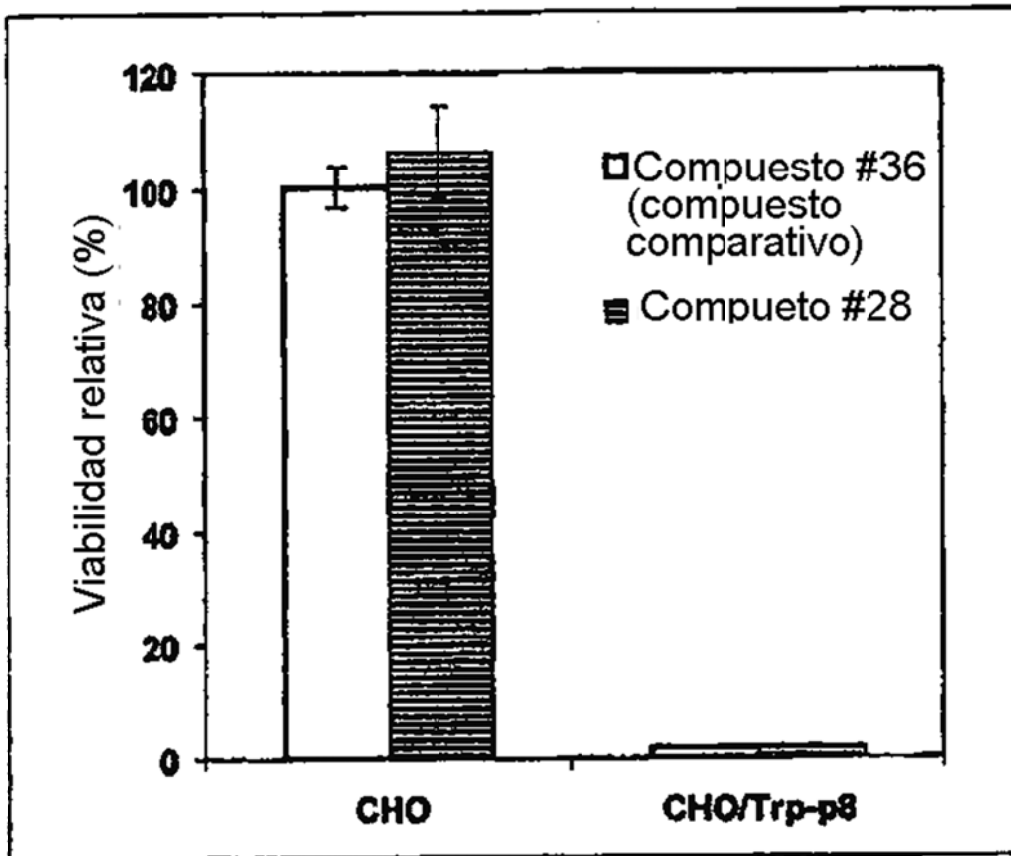


Figura 1B

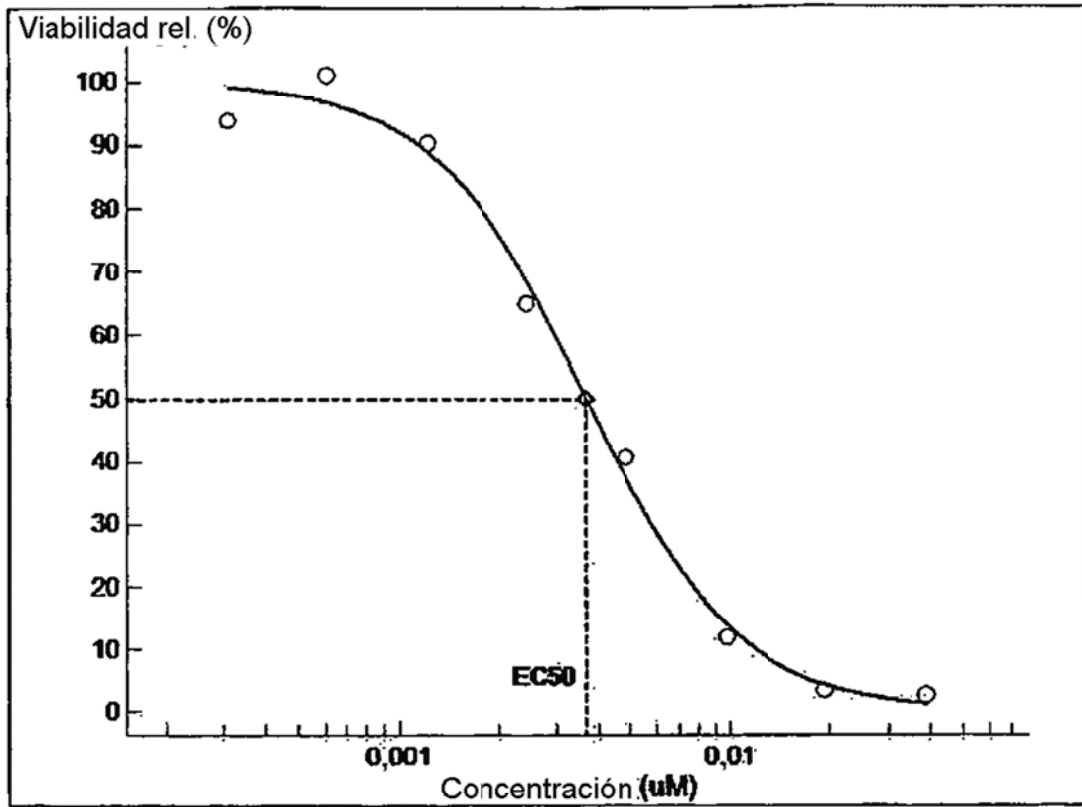


Figura 2A

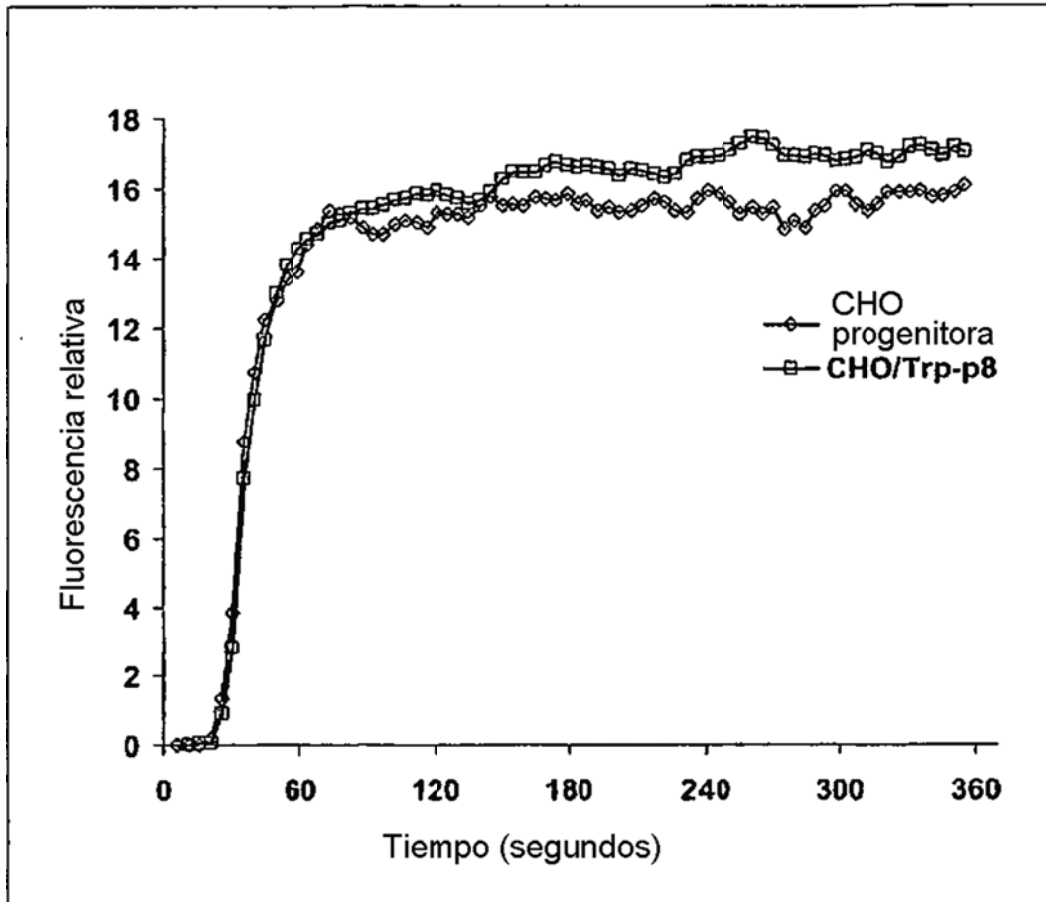


Figura 2B

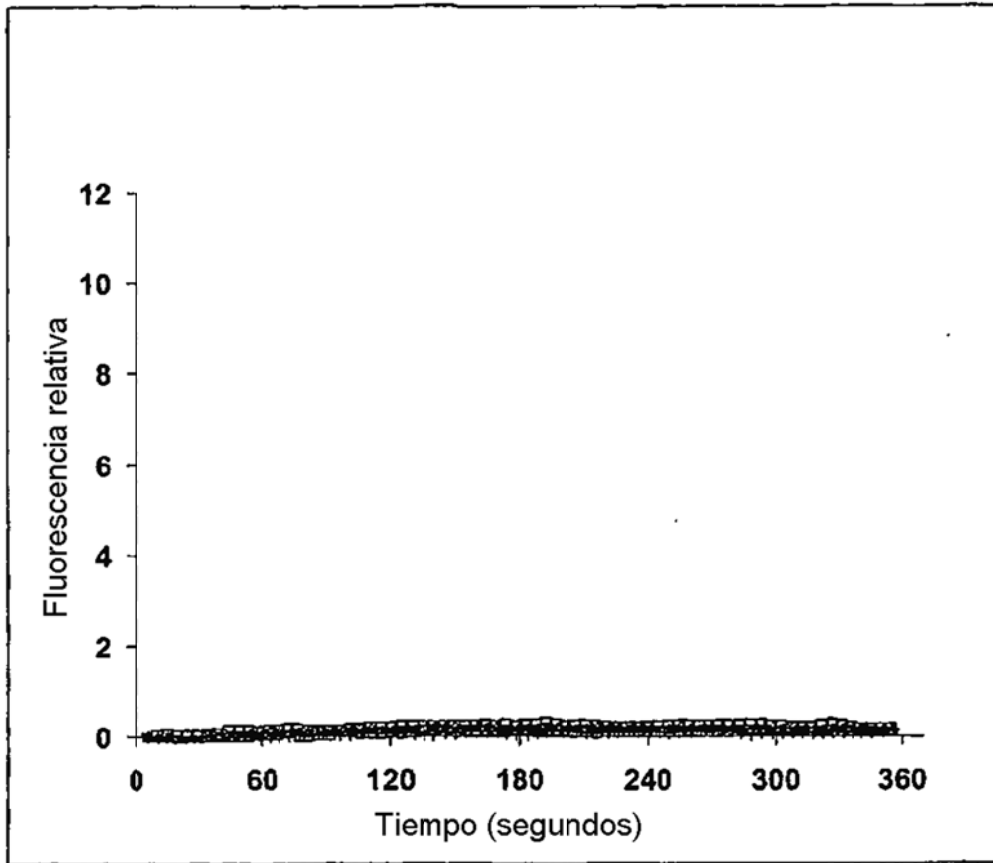


Figura 2C

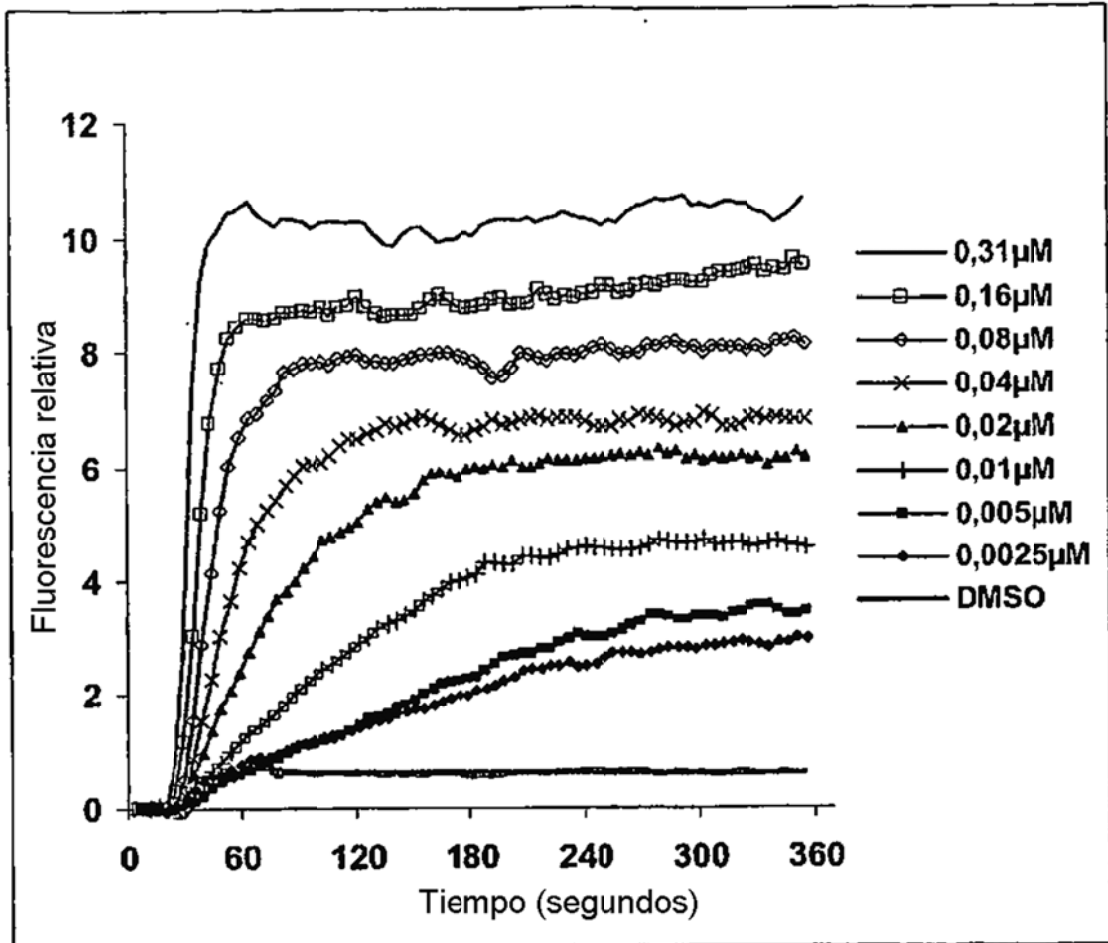


Figura 3

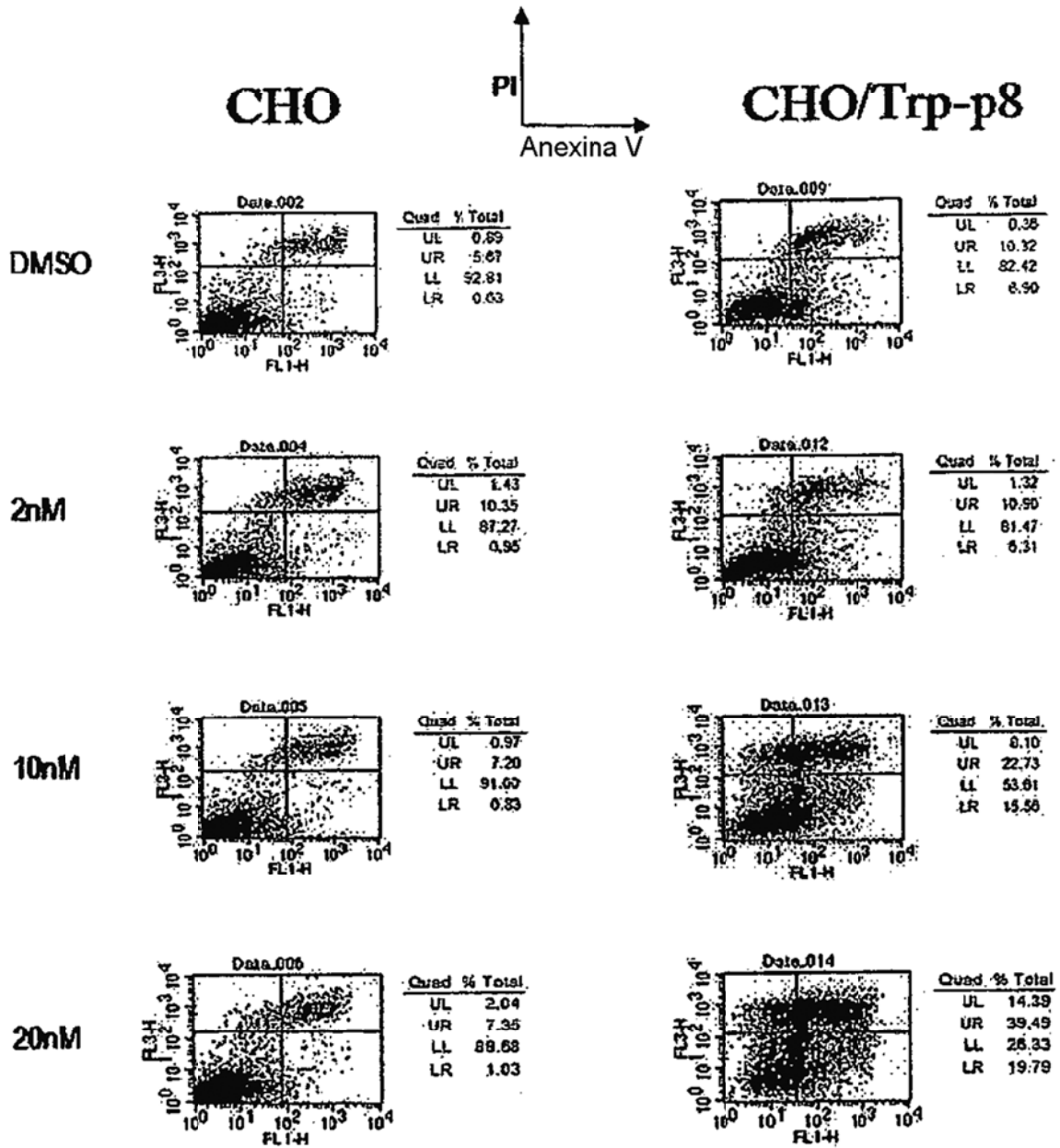




Figura 4

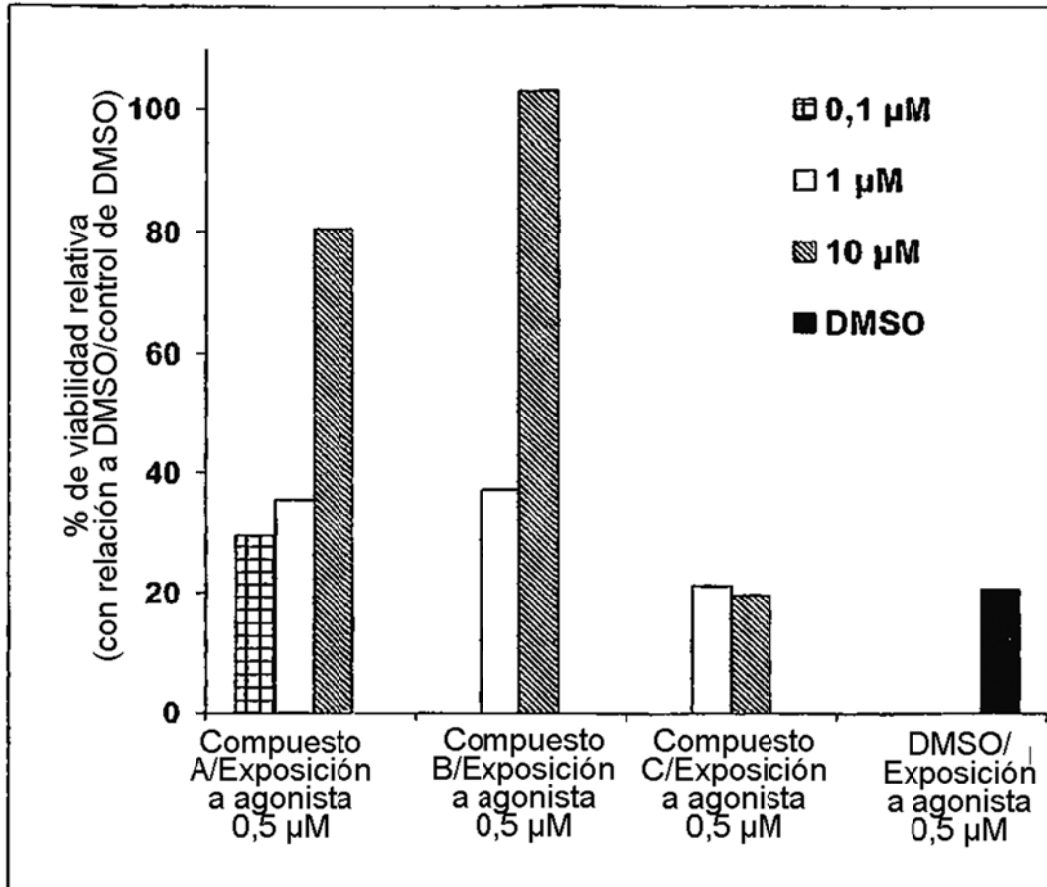


Figura 5

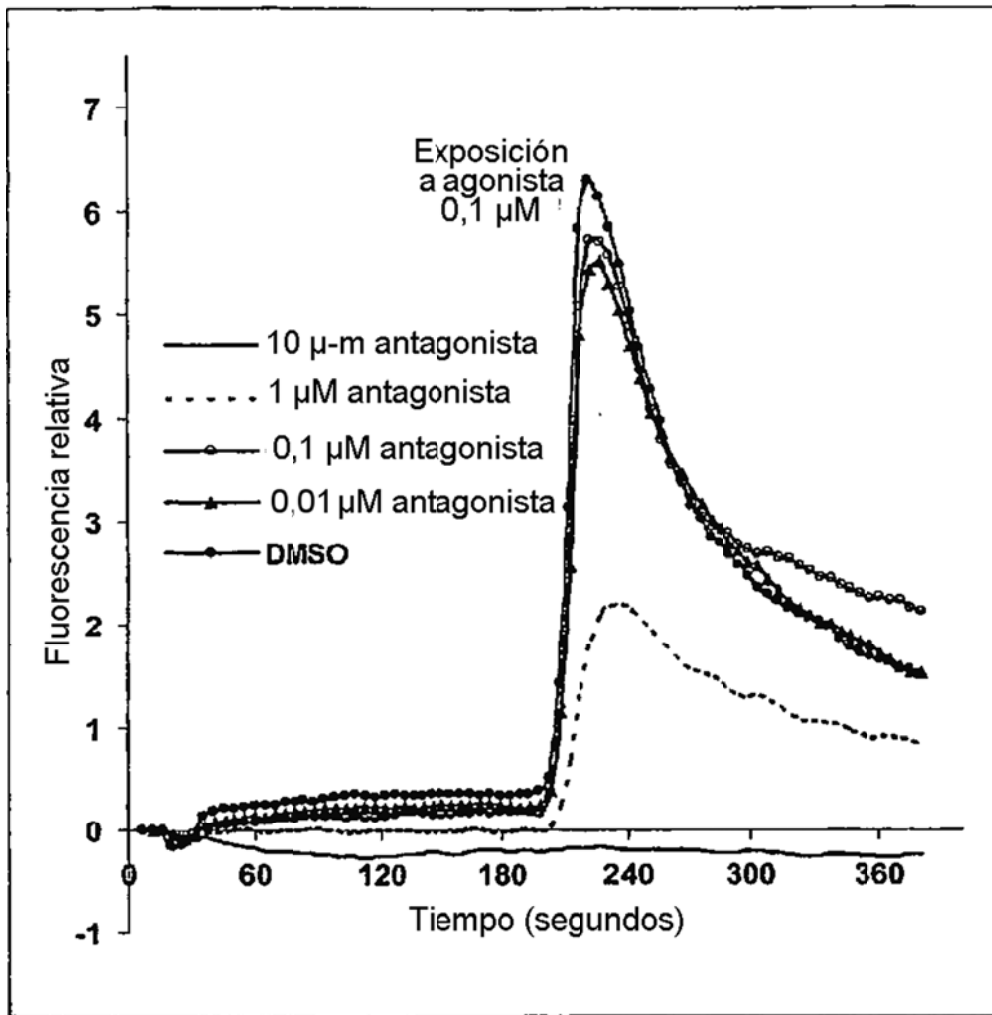


Figura 6A

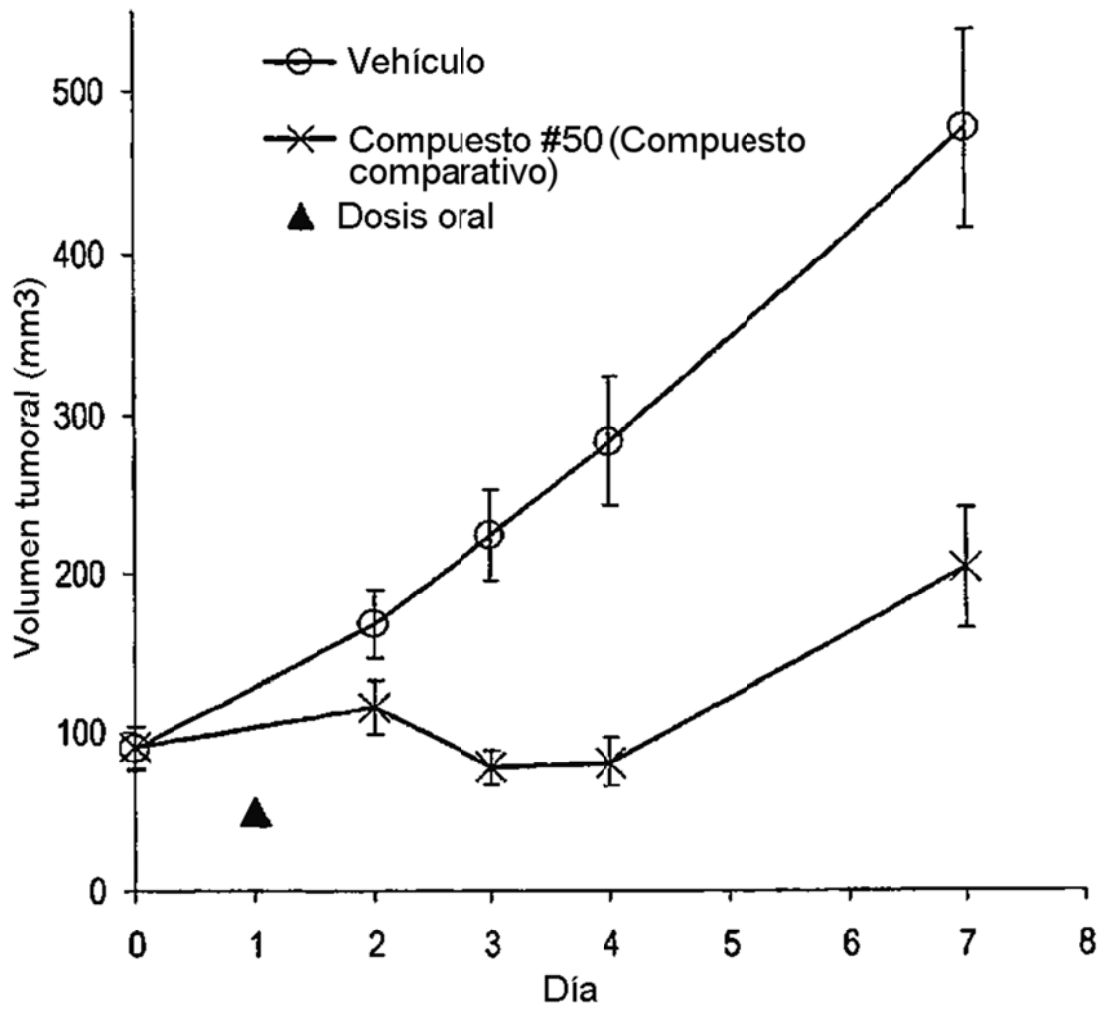


Figura 6B

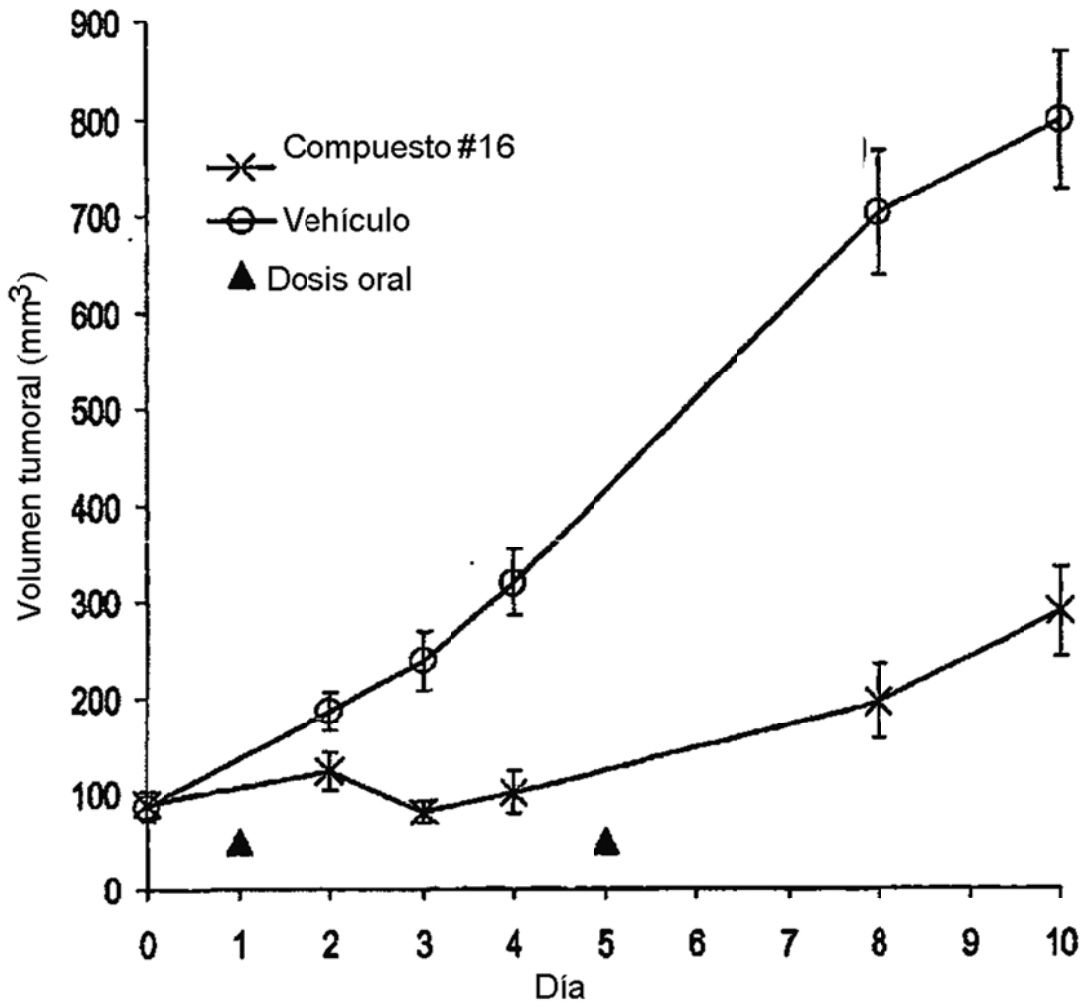


Figura 7

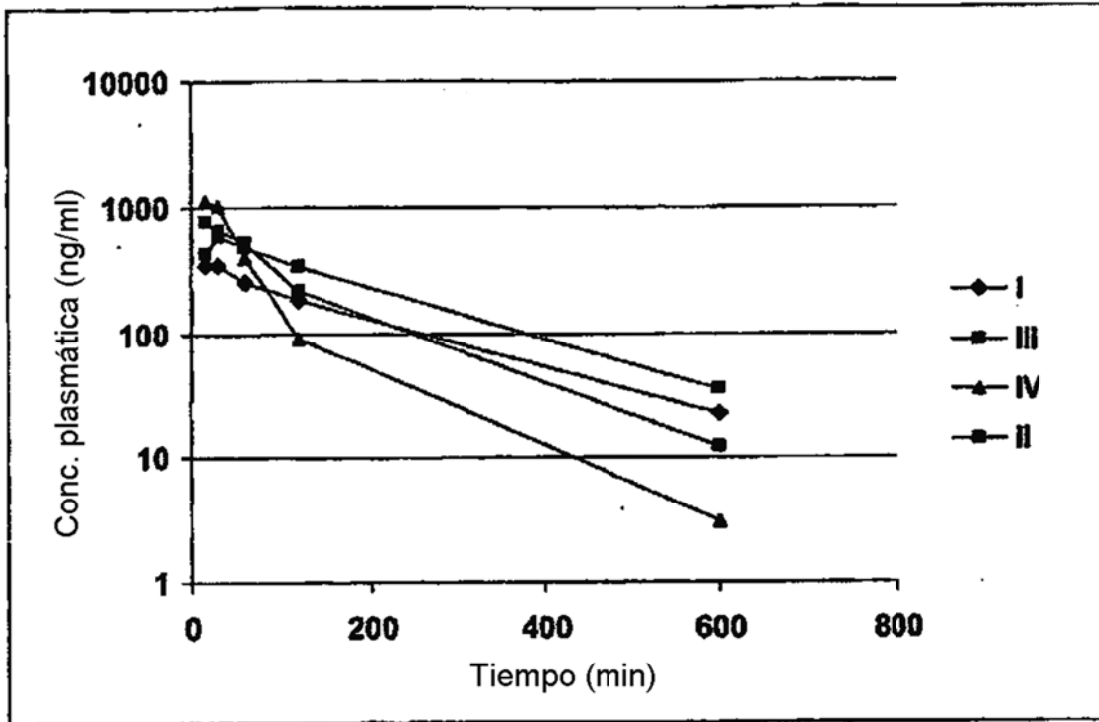


Figura 8A

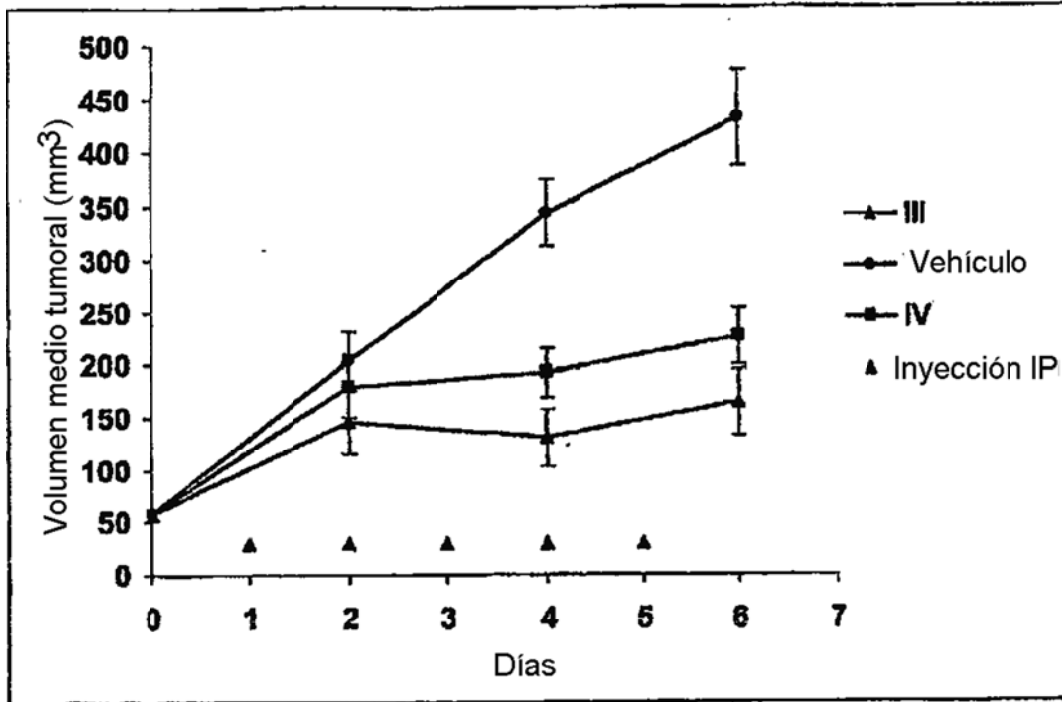


Figura 8B

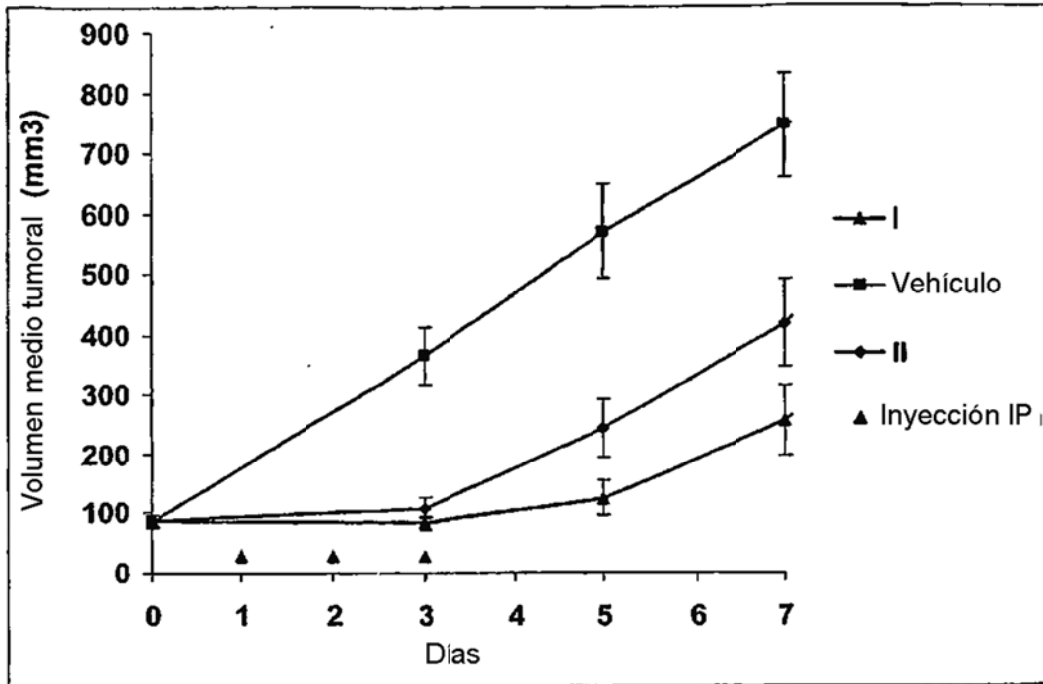


Figura 9A

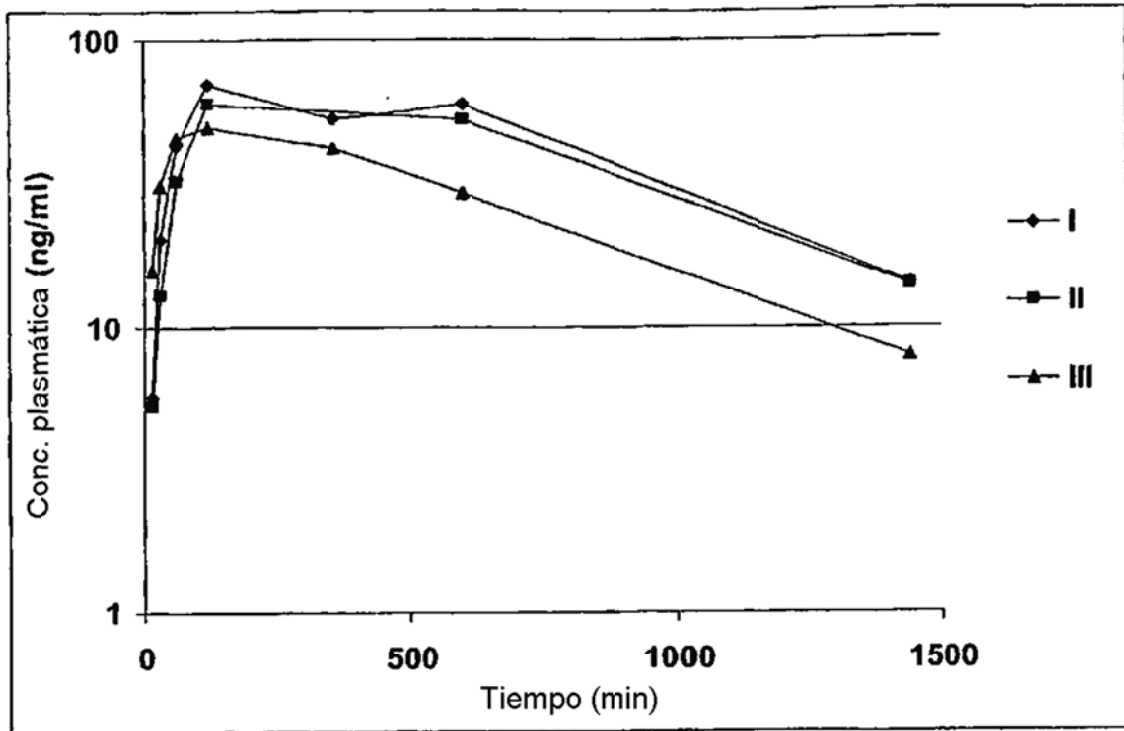




Figura 9B

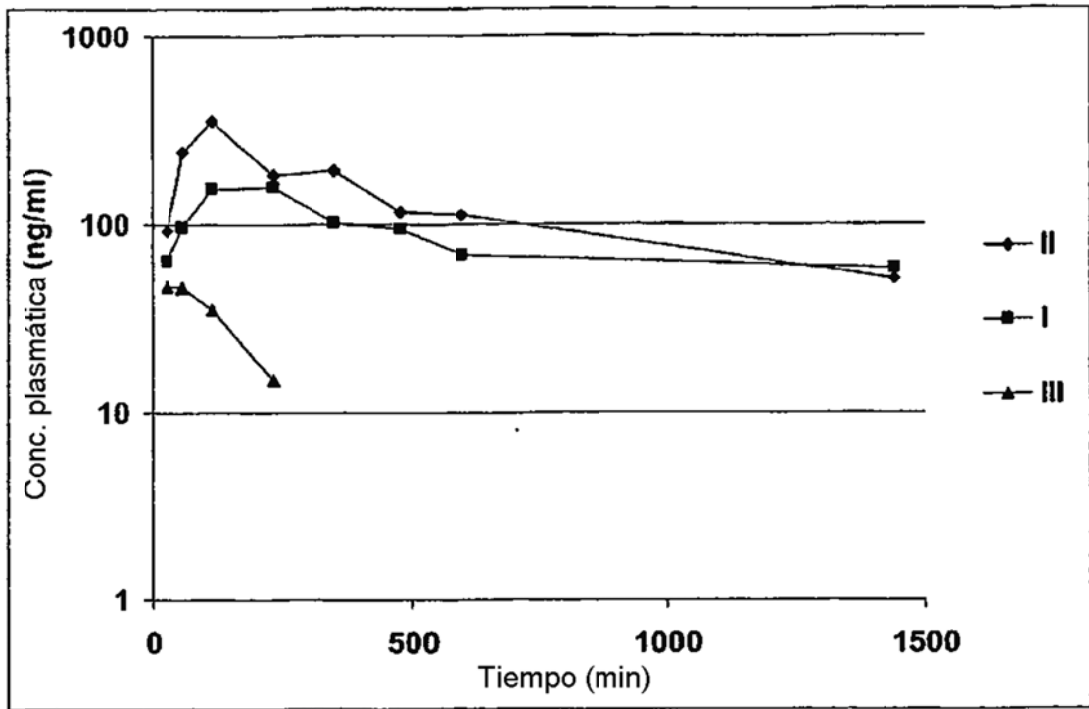


Figura 10A

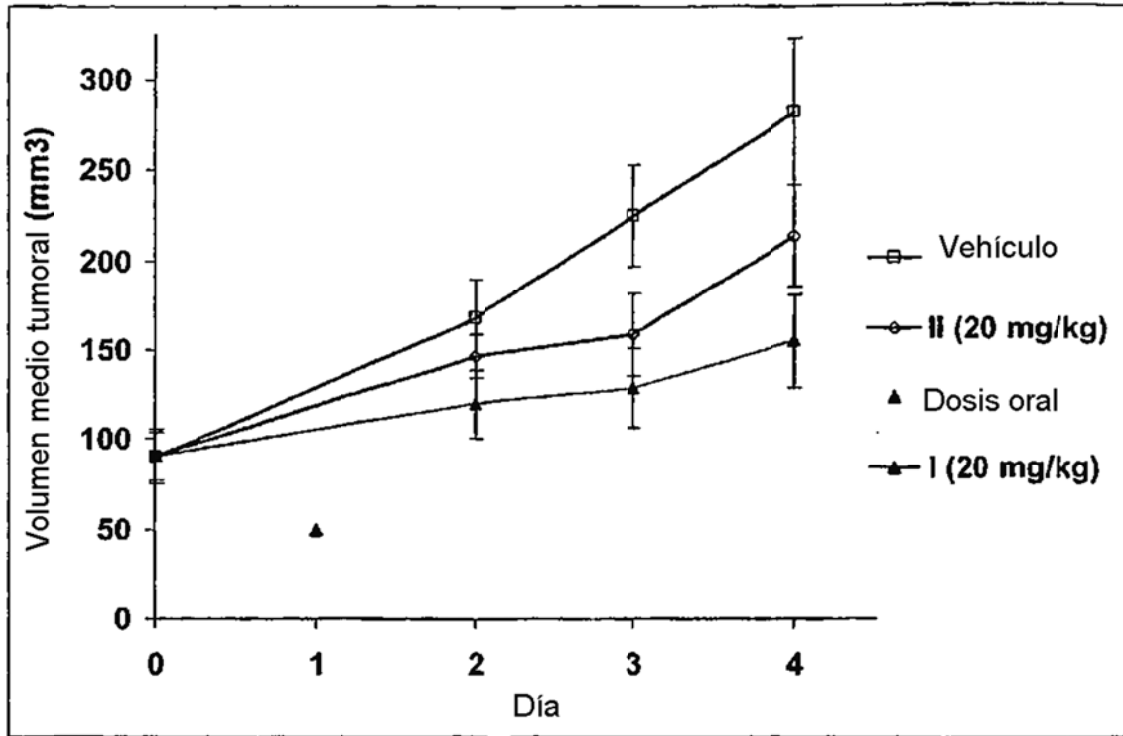


Figura 10B

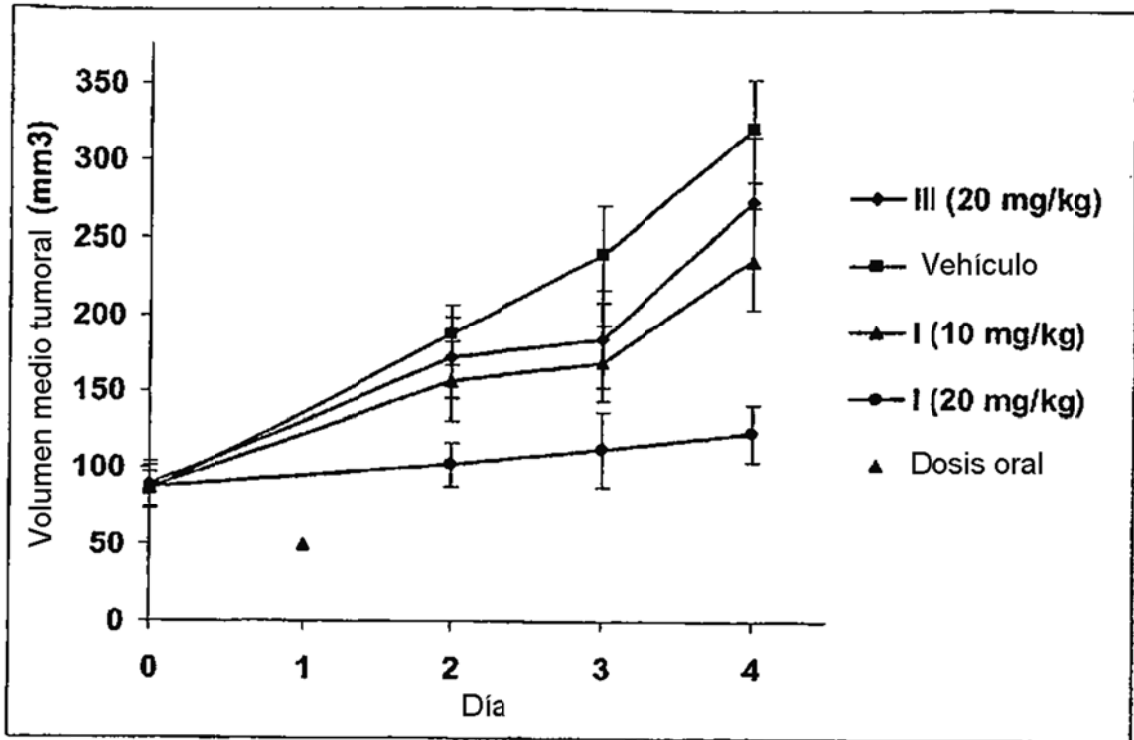


Figura 11

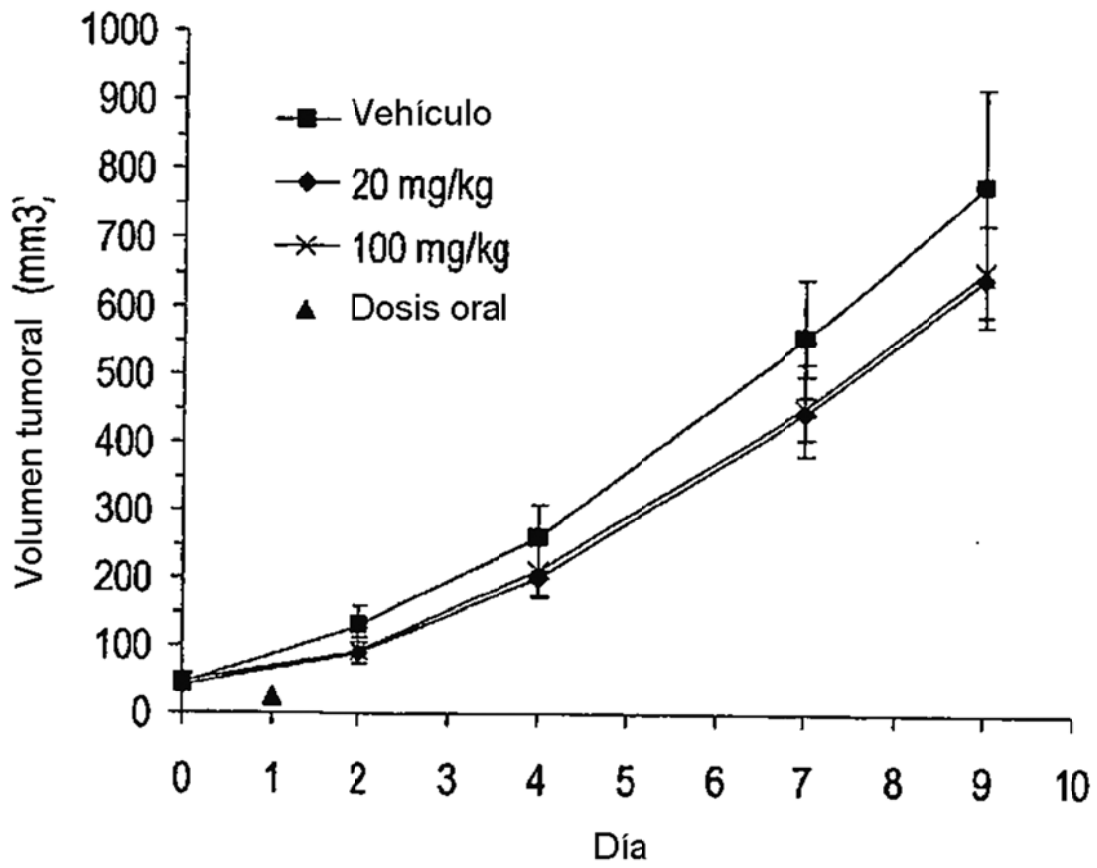


Figura 12

