

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 764 454**

51 Int. Cl.:

C07J 41/00 (2006.01)

A61K 31/57 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2016 PCT/GB2016/050059**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016 WO16113549**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2016 E 16704468 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3245217**

54 Título: **3alfa-etinil, 3beta-hidroxi-5alfa-pregnan-20-oxima para usar en el tratamiento de trastornos del SNC**

30 Prioridad:

12.01.2015 SE 1500018

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

03.06.2020

73 Titular/es:

**UMECRINE COGNITION AB (100.0%)
Karolinska Institutet Science Park Fogdevreten 2
171 65 Solna, SE**

72 Inventor/es:

**BÄCKSTRÖM, TORBJÖRN y
RAGAGNIN, GIANNA**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 764 454 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

3alfa-etinil, 3beta-hidroxi-5alfa-pregnan-20-oxima para usar en el tratamiento de trastornos del SNC

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un compuesto esteroide novedoso y a este compuesto para usar en terapia, tal como en el tratamiento de la encefalopatía hepática, el síndrome de Down, la enfermedad de Alzheimer y el deterioro cognitivo en general, así como a composiciones farmacéuticas que comprenden el compuesto.

Antecedentes de la invención

10 Los metabolitos de las hormonas esteroideas endógenas, tal como las pregnanonas (que incluyen pregnenolona, progesterona, desoxicorticosterona, cortisona y cortisol), testosterona, androstendiona y deshidroepiandrosterona, han sido objeto de varios estudios.

15 Es sabido que muchos ejemplos de 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides actúan sobre el complejo del receptor ionóforo de cloruro del ácido gamma-aminobutírico (GABA_A-R) y, por lo tanto, se los denomina esteroides que modulan el receptor de GABA_A (GAMS). Los mecanismos de interacción en el sitio del receptor aún no se han elucidado completamente, debido a la complejidad estructural del complejo GABA_A-R. Sin embargo, la familia de los receptores de GABA incluye varios componentes subunitarios, algunos de los cuales son conocidos por estar relacionados con funciones y trastornos específicos del SNC.

20 Los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides se producen en altas cantidades durante varios días/ semana, y pueden causar directamente la inhibición de las funciones del SNC. Los ejemplos de trastornos y síntomas causados por la acción directa de los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides incluyen el trastorno disfórico premenstrual, el síndrome premenstrual, la demencia, la enfermedad de Alzheimer, el síndrome de Down, la sedación, el cansancio, el síndrome de fatiga crónica, problemas de memoria, problemas de aprendizaje, problemas de la función motriz, fracturas, torpeza, aumento del apetito y antojos alimenticios, obesidad, recaída del alcoholismo y abuso de sustancias, reducción de la audición y la visión, empeoramiento de la epilepsia Petit Mal y síndrome de agotamiento.

25 La exposición continua y/o prolongada a los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides produce tolerancia al desarrollo en el sistema de los receptores de GABA_A. Esta tolerancia es la primera etapa en un procedimiento que puede finalmente conducir a sensibilidad al estrés, dificultades de concentración y pérdida del control de los impulsos y depresión. Además, se ha descubierto que la acción de los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides es un factor que refuerza la dependencia a las drogas.

30 La exposición continua, aunque no prolongada, por el otro lado genera el efecto de abstinencia cuando se interrumpe la exposición. Este fenómeno ocurre, por ej., durante la menstruación, cuando la producción de 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides a través del *corpus luteum* del ovario se interrumpe. Este fenómeno de abstinencia ocurre después de dar a luz cuando su producción realizada por la placenta se interrumpe, o al final de un período de estrés (las glándulas adrenales producen 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides durante el estrés).

35 Los ejemplos de afecciones que están influenciadas por dicha discontinuación y/o abstinencia incluyen la epilepsia parcial, "epilepsia catamenial", migraña, cambios en el estado de ánimo y cefalea "del fin de semana".

El receptor de GABA_A es un canal de cloruro y ejerce su acción mediante el cambio del flujo de cloruro a través del canal. Es sabido en la técnica que la actividad neuronal en el cerebro se reduce cuando el receptor de GABA_A está abierto y grandes cantidades iones de cloruro fluyen hacia la célula. Es sabido que existe una relación entre la cantidad de cloruro ingresante, y el efecto clínico de un fármaco activo del receptor de GABA_A.

40 Las benzodiazepinas, los barbitúricos y, hasta cierto punto, el alcohol, ejercen su acción a través de este mecanismo. Esto, sin embargo, también explica los efectos adversos de estas sustancias.

45 Un problema que ocurre con el receptor de GABA_A es que ejerce su acción en la mayoría de las partes del cerebro. En vista de esto, los bloqueadores completos de la acción de GABA son peligrosos y pueden causar síntomas psicóticos y convulsiones. Es decir, cuando se debe antagonizar la acción de los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-pregnan-esteroides es deseable usar los compuestos que antagonizan específicamente los efectos de los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-pregnan-esteroides, mientras que no antagonizan el efecto del propio GABA.

50 Por consiguiente, la presente invención intenta resolver el problema de la provisión de agentes específicos que sean capaces de bloquear los receptores de GABA, cuyos compuestos pueden además ser útiles en el tratamiento de anomalías en la excitación de los receptores de GABA u otros neurotransmisores relacionados con los receptores de GABA.

La Solicitud de Patente Internacional WO 2008/063128 desvela 3-alfa-hidroxi esteroides y 3-beta-hidroxi esteroides. La Solicitud de Patente Internacional WO 99/45931 desvela los efectos antagonistas del esteroide 3-beta-OH-5alfa-pregnan-20-ona. La Solicitud de Patente Internacional WO 03/059357 desvela los 3-beta-hidroxi esteroides y su efecto antagonista sobre el receptor de GABA_A.

Las Patentes de los Estados Unidos US 5.232.917, US 5.925.630, US 5.939.545, US 6.143.736 y US 6.277.838 desvelan 3-alfa-hidroxi esteroides y 3-beta-hidroxi esteroides como moduladores agonistas del receptor de GABA_A con un foco específico sobre los 3-alfa-hidroxi esteroides y su efecto similar a la benzodiazepina. En la Solicitud de Patente de los Estados Unidos US 2004/0242549, se desvela una cantidad de esteroides.

- 5 El efecto antagonista de 3-beta-OH-5-alfa-pregnan-20-ona y otros 3-beta-OH-5-alfa/beta pregnan-esteroides se explica por Wang *et al.* (Acta Physiol. Scand., 169, 334 (2000) y J. Neurosci., 22, 3366 (2002)).

Los compuestos de la técnica anterior que incluyen aquellos mencionados más arriba no son específicos para ciertos subtipos de GABA_A-R. Por consiguiente, existe una necesidad de lograr compuestos que sean más selectivos a los subtipos del receptor.

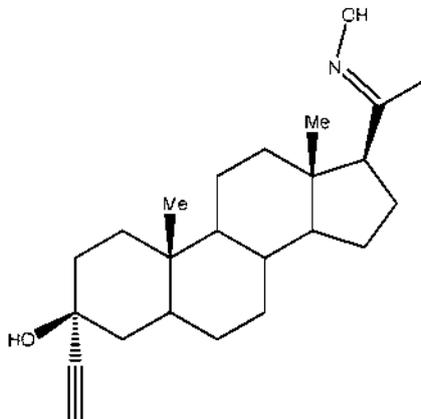
- 10 Además, los esteroides de la técnica anterior, y los naturales, están sujetos al metabolismo, y a menudo no son adecuados para administración oral, y, normalmente, tienen poca permeabilidad.

Esto hace que la administración de dichos compuestos sea muy difícil. Por consiguiente, también existe una necesidad de compuestos que sean menos fácilmente metabolizados/degradados en el cuerpo, y/o que tengan una permeabilidad/biodisponibilidad mejorada.

15 **Descripción de la invención**

Se ha descubierto que el compuesto 3 α -etilil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima puede actuar como antagonista para el receptor de GABA_A, y que puede hacerlo al modular la potenciación de los esteroides del complejo de GABA_A-R, por ejemplo, mediante la modulación del efecto de señalización de GAMS como un antagonista de la subunidad alfa 5 del receptor de GABA.

- 20 De acuerdo con la invención, se proporciona el compuesto 3 α -etilil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, cuyo compuesto y sales se denominan en adelante en la presente memoria en conjunto "los compuestos de la invención".



- 25 Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición con ácido y sales de adición con base.

Dichas sales de adición con ácido y sales de adición con base pueden formarse mediante medios convencionales, por ejemplo, mediante hacer reaccionar una forma de ácido libre o de base libre de un compuesto de la fórmula I con uno o más equivalentes de un ácido o de una base adecuados, opcionalmente en un disolvente, o en un medio en el cual la sal sea insoluble, seguido del retiro de dicho disolvente, o de dicho medio, con el uso de técnicas estándar (por ej., al vacío, por liofilización o por filtración). Las sales también pueden prepararse mediante el intercambio de un contra ión de un compuesto de la invención en forma de una sal con otro contra ión, por ejemplo, por el uso de una resina de intercambio de iones adecuada.

- Los ejemplos de sales de adición con ácido que pueden mencionarse incluyen las sales de carboxilato (por ej., sales de formiato, acetato, trifluoroacetato, propionato, isobutirato, heptanoato, decanoato, caprato, caprilato, estearato, acrilato, caproato, propiolato, ascorbato, citrato, glucuronato, glutamato, glicolato, α -hidroxibutirato, lactato, tartrato, acetato de fenilo, mandelato, propionato de fenilo, butirato de fenilo, benzoato, clorobenzoato, metilbenzoato, hidroxibenzoato, metioxibenzoato, dinitrobenzoato, *o*-acetoxibenzoato, salicilato, nicotinato, isonicotinato, cinamato, oxalato, malonato, succinato, suberato, sebacato, fumarato, malato, maleato, hidroximaleato, hipurato, ftalato o tereftalato), sales de haluro (por ej., sales de cloruro, bromuro o yoduro), sales de hidrohaluro (por ej., clorhidrato, bromhidrato o yodhidrato), sales de sulfonato (por ej., sales de bencensulfonato, bencensulfonato de metilo, bromo o cloro, xilensulfonato, metansulfonato, etansulfonato, propansulfonato, hidroxietansulfonato, 1- o 2-naftalensulfonato

o 1,5-naftalendisulfonato) o sales de sulfato, piro-sulfato, bisulfato, sulfito, bisulfito, fosfato, mono-hidrógenofosfato, di-hidrógenofosfato, metafosfato, pirofosfato o nitrato, y similares.

5 Los ejemplos de las sales de adición con base que pueden mencionarse incluyen las sales formadas con metales alcalinos (tal como sales de Na y K), metales alcalino térreos (tal como sales de Mg y Ca), bases orgánicas (tal como etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina y lisina) y bases inorgánicas (tal como amoníaco e hidróxido de aluminio). Más en particular, las sales de adición con base que pueden mencionarse incluyen sales de Mg, Ca y, más en particular, K, y mucho más en particular, Na.

10 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona la sal de clorhidrato de 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima. De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona la sal de sodio de 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima.

Los compuestos de la invención pueden prepararse, por ejemplo, como se describe más adelante en la presente memoria.

Usos médicos y farmacéuticos

15 Los compuestos de la invención están indicados como productos farmacéuticos. Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un compuesto como se define anteriormente, para usar como producto farmacéutico y/o para usar en terapia, tal como en medicina.

20 Como se describe anteriormente en la presente memoria, se ha demostrado inesperadamente que los compuestos de la invención pueden potenciar el efecto de GABA en los receptores de GABA_A que contienen la composición subunitaria $\alpha 1, \beta 2, \gamma 2$, mientras que no tienen efecto directo en sí mismos sobre el flujo de cloruro cuando se aplica solo en el receptor de GABA_A que contiene una $\alpha 1, \beta 2, \gamma 2$.

25 En particular, se ha descubierto que los compuestos de la invención pueden potenciar el efecto de GABA sobre los receptores $\alpha 1, \beta 2, \gamma 2$ mientras que al mismo tiempo son un antagonista para los receptores $\alpha 5, \beta 2, \gamma 2$. Inesperadamente, el tratamiento simultáneo con 3-alfa-hidroxi-pregnan-esteroides y los compuestos de la invención inhibe el flujo de cloruro a través del receptor de GABA_A humano del tipo alfa 5 cuando se expresa de manera recombinante en células HEK (Riñón embrionario humano, HEK) inducido por el 3-alfa-hidroxi-pregnan-esteroide, pero tienen poco efecto sobre el flujo de cloruro inducido por GABA solo.

Se ha descubierto, además, que esta acción puede lograrse en concentraciones farmacológicamente y fisiológicamente adecuadas.

30 Por consiguiente, dado que los compuestos de la invención pueden bloquear la acción de los 3-alfa-hidroxi-pregnan-esteroides en el receptor de GABA_A humano, potencialmente son útiles en el tratamiento de los trastornos del SNC relacionados con esteroides, normalmente en pacientes humanos.

35 Los "trastornos del SNC relacionados con esteroides" incluyen epilepsia, epilepsia dependiente del ciclo menstrual, depresión, depresión relacionada con el estrés, migraña, cansancio y en particular cansancio relacionado con el estrés, síndrome premenstrual, trastorno disfórico premenstrual, cambios del estado de ánimo relacionados con el ciclo menstrual, deterioro cognitivo (incluyendo deterioro cognitivo mínimo), cambios en la memoria relacionados con el ciclo menstrual, cambios en la memoria relacionados con el estrés, dificultades del aprendizaje relacionadas con el estrés, encefalopatía hepática, síndrome de Down, enfermedad de Alzheimer, dificultades en la concentración relacionada con el ciclo menstrual, trastornos del sueño y cansancio relacionados con el ciclo menstrual. También existen fuertes indicaciones de que también las obesidades y el aumento del apetito, así como las recaídas en el alcoholismo y/o el abuso de sustancias, algunas formas de alteraciones/trastornos del equilibrio, trastornos del movimiento y dificultades en la coordinación, están relacionados con los esteroides o son inducidos por los esteroides, y los "trastornos del SNC relacionados con esteroides" de este modo también incluyen aumento del apetito, sobreingesta de comida y obesidad, recaída del alcoholismo y el abuso de sustancias. De este modo, la presente invención ofrece compuestos y procedimientos para el tratamiento, el alivio o la prevención de estas afecciones.

45 Las afecciones que pueden mencionarse específicamente incluyen el síndrome de Down, la enfermedad de Alzheimer y, especialmente, la encefalopatía hepática.

50 Los trastornos de encefalopatía hepática pueden ser manifiestos y/o caracterizarse por síntomas que incluyen deterioro de uno o más de los ciclos de sueño-vigilia, cognición, memoria, aprendizaje, coordinación motriz y/o conciencia, así como reducción de los niveles de energía, cambio de personalidad, deterioro cognitivo, desorientación y/o coma, e incluyen encefalopatía hepática Tipo A, encefalopatía hepática Tipo B, encefalopatía hepática Tipo C, encefalopatía hepática mínima y encefalopatía hepática evidente.

La "encefalopatía hepática Tipo A" normalmente se refiere a la encefalopatía hepática asociada con insuficiencia hepática aguda, normalmente asociada con edema cerebral.

La "encefalopatía hepática Tipo B" normalmente se refiere a la encefalopatía hepática (por bypass) causada por

derivación portosistémica sin enfermedad hepática intrínseca asociada.

La "encefalopatía hepática Tipo C" normalmente se refiere a la encefalopatía hepática que ocurre en pacientes con cirrosis. Este tipo frecuentemente se subdivide en encefalopatía hepática "episódica", "persistente" y "mínima".

5 La "encefalopatía hepática mínima" normalmente se refiere a la encefalopatía hepática que no conduce a disfunción cognitiva abierta, pero que puede demostrarse con estudios neuropsicológicos.

La "encefalopatía hepática evidente" normalmente se refiere a encefalopatía hepática clínicamente evidente manifiesta como síndrome neuropsiquiátrico con un gran espectro de trastornos mentales y motrices. La encefalopatía hepática evidente puede surgir episódicamente, durante un período de horas o días en pacientes que son previamente estables o en pacientes que pueden presentarse con anomalías neuropsiquiátricas persistentes.

10 Además de lo anterior, aunque la mayoría de las operaciones de trasplante de hígado usan hígados de donantes fallecidos de otro modo sanos, los hígados pueden también provenir de un donante vivo (una porción del hígado de una persona sana). Los pacientes con, por ej., cirrosis, comúnmente experimentan encefalopatía hepática y encefalopatía hepática prequirúrgica, lo cual es un indicador significativo de complicaciones neurológicas posteriores al trasplante. El compuesto reivindicado o sus sales farmacéuticamente aceptables para usar en el tratamiento de la encefalopatía hepática en pacientes que están cerca de someterse a un trasplante hepático se incluyen dentro del ámbito de la invención.

El término "hiperamonemia" normalmente se refiere a una alteración metabólica caracterizada por un acceso de amoníaco en la sangre.

20 El término "insuficiencia hepática aguda sobre crónica" normalmente se refiere a la descompensación aguda de la cirrosis, al menos a la falla de un órgano, o pertenece a un subgrupo con alto índice de mortalidad a corto plazo.

25 Por el término "cirrosis descompensada" normalmente se pretende incluir cirrosis hepática avanzada con un rango de evidencia clínica tal como ictericia, ascitis, edema, encefalopatía hepática, hemorragia gastrointestinal, hipertensión portal, infecciones bacterianas o cualquiera de sus combinaciones. esta se ha de contrastar con "cirrosis compensada", que normalmente se refiere a cirrosis hepática sin ninguna evidencia clínica pero que puede incluir várices asintóticas esofágicas o gástricas y síntomas tempranos tal como fatiga y pérdida de energía, pérdida del apetito y pérdida de peso, náuseas o dolor abdominal.

El término "hipertensión portal" normalmente se refiere a un gradiente de presión venosa hepática posterior a la cirrosis hepática, con o sin desviación postsistémica intrahepática transyugular asociada (TIPS).

30 Los compuestos de la invención están indicados para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de todas las afecciones mencionadas con anterioridad.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporcionan compuestos de la invención para usar en un procedimiento de tratamiento de un trastorno asociado con el SNC de acuerdo con lo mencionado con anterioridad en la presente memoria, cuyo procedimiento comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de un compuesto de la invención a un paciente necesitado de dicho tratamiento.

35 Se proporcionan además compuestos de la invención para usar en un procedimiento para el tratamiento y/o prevención de trastornos de la memoria y el aprendizaje relacionados con esteroides o inducidos por esteroides, insuficiencia cognitiva, demencia y/o trastornos del estado de ánimo, tal como los que se describen con anterioridad mediante la administración de un compuesto de la invención a un paciente necesitado de dicho tratamiento.

40 Los compuestos de la invención pueden tener la ventaja de que pueden prevenir el desarrollo de tolerancia y/o regulación por disminución del receptor de GABA_A. Los compuestos de la invención pueden tener la ventaja de que pueden perjudicar los efectos de abstinencia una vez que se interrumpe la administración de esteroides. De este modo, los compuestos de la invención pueden tener la ventaja de que pueden preservar la sensibilidad del sistema de GABA_A e inhibir el desarrollo de una afección menos sensible durante la fase luteínica, por ejemplo, del ciclo menstrual, previniendo de este modo los síntomas tal como migraña y/o convulsiones epilépticas.

45 Otra realización de la presente invención es, en consecuencia, los compuestos de la invención para usar en un procedimiento para el tratamiento o la prevención de afecciones o síntomas de desarrollo de tolerancia a los esteroides y/o de afecciones o síntomas de abstinencia de los esteroides, mediante la administración de un compuesto de la invención a un paciente necesitado de dicho tratamiento.

50 Los ejemplos de dichos síntomas y/o afecciones que pueden mencionarse son sedación, cansancio, alteraciones de la memoria, alteraciones del aprendizaje, alteración de la función motriz, torpeza, por ej., síntomas en la encefalopatía hepática, aumento del apetito y antojos alimenticios, recaídas en el alcoholismo o abuso de sustancias, estado de ánimo negativo tal como tensión, irritabilidad y depresión, que son síntomas cardinales en el síndrome premenstrual, y el empeoramiento de la epilepsia Petit Mal.

Las afecciones y los síntomas causados por el desarrollo de tolerancia después de marcos de tiempo más extensos

(por ej., varios días) de exposición a los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides son, por ej., sensibilidad al estrés, dificultades en la concentración, dificultades en la concentración relacionadas con el estrés o el ciclo menstrual, trastornos del sueño, cansancio, pérdida del control de impulsos y depresión, alteraciones de la memoria y el aprendizaje. Los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides también refuerzan la dependencia a las drogas. De acuerdo con la presente invención, estas afecciones o síntomas pueden prevenirse, aliviarse o tratarse mediante la administración de un compuesto de la invención a un paciente necesitado de dicho tratamiento.

Una exposición continua pero más corta a los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides da un efecto de abstinencia cuando se termina la exposición. Este fenómeno ocurre durante la menstruación, cuando la producción de 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides a través del *corpus luteum* del ovario se interrumpe. Este fenómeno de abstinencia también ocurre después de dar a luz (*post partum*) cuando la producción de 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides realizada por la placenta se interrumpe. El mismo fenómeno también se observa cuando termina un período de estrés y los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides producidos por la glándula adrenal durante el estrés se interrumpan. Los ejemplos de las afecciones que están influenciadas por este fenómeno de discontinuación/abstinencia son la epilepsia parcial en la que el paciente tiene un foco epiléptico en la corteza cerebral en el que ocurre un empeoramiento en el período de abstinencia durante la menstruación. Este fenómeno se denomina "epilepsia catamenial". Otros ejemplos son la migraña relacionada con el período menstrual y la migraña relacionada con el estrés y los cambios en el estado de ánimo *post partum*. El fenómeno de abstinencia es un signo de una tolerancia desarrollada anterior.

Una realización de la invención, que aborda un problema que afecta a numerosas mujeres, consiste en los compuestos de la invención para usar en un procedimiento para el tratamiento y/o la prevención de los efectos colaterales del esteroide antiinflamatorio y la terapia posmenopáusica en pacientes humanos. Estas afecciones o síntomas pueden prevenirse, aliviarse o tratarse mediante la administración de un compuesto de la invención a un paciente necesitado de dicho tratamiento.

Otra realización de la invención consiste en los compuestos de la invención para usar en el tratamiento y/o la prevención de los efectos colaterales de anticonceptivos orales en pacientes humanas. Estas afecciones o síntomas pueden prevenirse, aliviarse o tratarse mediante la administración de un compuesto de la invención a una paciente necesitada de dicho tratamiento. En este contexto, los compuestos de la invención pueden administrarse junto con el anticonceptivo oral, el cual ya puede estar tomando la paciente. Las administraciones nasales y percutáneas también son vías de administración adecuadas.

En otras palabras, los compuestos de la invención pueden actuar para tratar las afecciones relacionadas con el estrés y/o inducidas por estrés producidas por uno o más de los tres posibles mecanismos por los cuales los esteroides actúan sobre el sistema nervioso central: es decir por medio de:

- (a) acción directa,
- (b) inducción de tolerancia, y/o
- (c) efecto de abstinencia.

Además, dentro del ámbito de la realización anterior, las dosis de los compuestos de la invención pueden ajustarse a los niveles de los esteroides endógenos durante el período de estrés o menstrual.

"Pacientes" incluye pacientes mamíferos (y especialmente seres humanos).

El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad de un compuesto, que confiere un efecto terapéutico sobre el paciente tratado. El efecto puede ser objetivo (es decir, mensurable mediante algún análisis o marcador) o subjetivo (es decir, el sujeto da una indicación de un efecto, o lo siente).

Los compuestos de la invención normalmente se administran por vía oral, intravenosa, subcutánea, bucal, rectal, dérmica (por ej., percutánea), nasal, traqueal, bronquial, sublingual, por cualquier otra vía parenteral o a través de inhalación, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable.

Los compuestos de la invención pueden administrarse en forma de comprimidos, cápsulas o elixires para administración oral, supositorios para administración rectal, soluciones o suspensiones estériles para administración parenteral, incluyendo administración intravenosa o intramuscular, y similares.

La formulación de composiciones que comprenden los compuestos de la invención puede adaptarse o ajustarse de acuerdo con los procedimientos normales, en una forma química adecuada para la vía seleccionada, junto con los adyuvantes, vehículos, diluyentes y vehículos, usados convencionalmente y bien conocidos para un experto en la técnica. De este modo, dichas formulaciones pueden prepararse, de acuerdo con la práctica farmacéutica estándar y/o aceptada.

De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona de este modo una formulación farmacéutica que incluye un compuesto de la invención, como se define con anterioridad en la presente memoria, en una mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

- Dependiendo, por ej., de la potencia y las características físicas del compuesto de la invención (es decir, el principio activo), las formulaciones farmacéuticas que pueden mencionarse incluyen aquellas en las que el principio activo está presente en al menos 1% (o al menos 10%, al menos 30% o al menos 50%) en peso. Es decir, la proporción de principio activo a los otros componentes (es decir, la adición de adyuvante, diluyente y vehículo) de la composición farmacéutica es de al menos 1:99 (o al menos 10:90, al menos 30:70 o al menos 50:50) en peso.
- 5 La invención además proporciona un procedimiento para la preparación de una formulación farmacéutica, como se define con anterioridad en la presente memoria, cuyo procedimiento comprende asociar un compuesto de la invención, como se define con anterioridad en la presente memoria con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 Los compuestos de la invención también pueden combinarse con otros agentes terapéuticos que son útiles en uno o más de:
- (a) el tratamiento de un trastorno del SNC relacionado con esteroides;
 - (b) el tratamiento de una afección o un síntoma causado por el desarrollo de tolerancia después de la exposición a 3-alfa-hidroxi- 5-alfa/beta-esteroides;
- 15 (c) el tratamiento de una afección que está influenciada por la discontinuación/abstinencia a la exposición a 3-alfa-hidroxi- 5-alfa/beta-esteroides;
- (d) el tratamiento de uno o más efectos colaterales de un esteroide antiinflamatorio;
 - (e) el tratamiento de uno o más efectos colaterales de la terapia posmenopáusica; y/o
 - (f) el tratamiento de uno o más efectos colaterales de un anticonceptivo oral,
- 20 o con un anticonceptivo oral *per se*. Dichos agentes terapéuticos, o anticonceptivos orales, se denominan en adelante en conjunto en la presente memoria otro u otros "agente(s) terapéutico(s) como se definen con anterioridad en la presente memoria".
- Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden incluirse en una formulación o en un régimen de tratamiento junto con un anticonceptivo oral con el fin de aliviar y/o eliminar:
- 25 (i) los efectos colaterales de los anticonceptivos orales; y/o
 - (ii) cualquier efecto no deseado de los cambios periódicos en esteroides endógenos.
- Otros aspectos de la invención proporcionan composiciones farmacéuticas y kits de partes que comprenden dosis terapéuticamente adecuadas de otros agentes terapéuticos como se definen con anterioridad en la presente memoria, en combinación con una dosis terapéuticamente adecuada de un compuesto de la invención.
- 30 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona un producto combinado que comprende:
- (A) un compuesto de la invención, como se define con anterioridad en la presente memoria; y
 - (B) al menos un otro agente terapéutico como se define con anterioridad en la presente memoria,
- en el que cada uno de los componentes (A) y (B) se formula en una mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 Dichos productos combinados proporcionan la administración de un compuesto de la invención en conjunción con el otro agente terapéutico, y pueden de este modo presentarse como formulaciones separadas, en las que al menos una de esas formulaciones comprende un compuesto de la invención, y al menos una comprende el otro agente terapéutico, o bien pueden presentarse (es decir, formularse) como una preparación combinada (es decir, presentada como una formulación individual que incluye un compuesto de la invención y el otro agente terapéutico).
- 40 De este modo, además se proporciona:
- (1) una formulación farmacéutica que incluye un compuesto de la invención como se define en la presente memoria, al menos un otro agente terapéutico como se define con anterioridad en la presente memoria, y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y
 - (2) un kit de partes que comprende los componentes:
- 45 (a) una formulación farmacéutica que incluye un compuesto de la invención, como se define con anterioridad en la presente memoria, en una mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y

(b) una formulación farmacéutica que incluye al menos un otro agente terapéutico como se define con anterioridad en la presente memoria en una mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable,

5 cuyos componentes (a) y (b) se proporcionan cada uno en una forma que es adecuada para administración en conjunción uno con otro.

La invención además proporciona un procedimiento para la preparación de un producto combinado como se define con anterioridad en la presente memoria, cuyo procedimiento comprende asociar un compuesto de la invención, como se define con anterioridad en la presente memoria, con el al menos un otro agente terapéutico como se define con anterioridad en la presente memoria, y al menos un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 El término "asociar", significa que los dos componentes se tornan adecuados para administración uno en conjunción con el otro. Los compuestos de la invención pueden emplearse como parte de un "tratamiento suplementario" en el tratamiento que incluye el al menos un otro agente terapéutico como se define con anterioridad en la presente memoria.

15 De este modo, con relación al procedimiento para la preparación de un kit de partes como se define con anterioridad en la presente memoria, "asociar" los dos componentes entre sí, incluye que los dos componentes del kit de partes pueden:

(i) proporcionarse como formulaciones separadas (es decir, independientemente una de la otra), que después se unen para usar en conjunción una con la otra en terapia combinada; o

20 (ii) empacarse y presentarse en conjunto como componentes separados de un "pack combinado" para usar en conjunción uno con el otro en la terapia combinada.

Los compuestos de la invención pueden administrarse en dosis variadas. Por ej., para las dosis parenterales (por ej., intravenosas) un intervalo adecuado es de aproximadamente 0,2 a 200 mg por kg de peso corporal, tal como aproximadamente 20 a 100 mg por kg de peso corporal. Las dosis pueden administrarse de manera continua o en dosis divididas una vez, dos veces, tres veces o cuatro veces o más veces por día.

25 En cualquier caso, el médico, o el experto en la técnica, serán capaces de determinar la dosis real que será la más adecuada para un paciente individual, la cual es probable que varíe con la vía de administración, el tipo y la severidad de la afección a tratar, así como la especie, la edad, el peso, el sexo, la función renal, la función hepática y la respuesta del paciente particular a tratar. Las posologías mencionadas con anterioridad se presentan a modo de ejemplo del caso promedio; por supuesto puede haber casos individuales en los que se justifiquen intervalos posológicos más altos o más bajos, y los mismos están dentro del ámbito de esta invención.

Los compuestos de la invención tienen la ventaja de que son capaces de bloquear la acción de los 3-alfa-hidroxi-pregnan-esteroides en el receptor de GABA_A humano.

35 El término "bloquear" se emplea en este contexto para definir un efecto en el que mediante un compuesto de la invención se evita que los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides actúen sobre el receptor de GABA-R. De este modo, el término "bloquear" es un término diferente al que normalmente se entiende por "modulación" o "represión" o términos similares, lo que sugiere que la acción farmacológica aún tiene lugar, pero a un grado menor o una tasa más lenta. De este modo, un "antagonista" significa una sustancia que impide que otra sustancia, por ej., un agonista, induzca su efecto. En la presente memoria descriptiva, los términos "antagonista" y "bloqueador" pueden usarse indistintamente.

40 Como se explicó con anterioridad en la presente memoria, los compuestos de la invención también tienen la ventaja de que bloquean selectivamente la acción de los 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-pregnan-esteroides sobre el receptor de GABA_A mediante la administración simultánea, sólo con efectos limitados en (como máximo antagonistas parciales del) efecto de GABA.

45 En adición a las ventajas mencionadas con anterioridad en la presente memoria, los compuestos de la invención además pueden tener la ventaja de que pueden ser más eficaces que, menos tóxicos que, tener acción más prolongada que, ser más potentes que, producir menos efectos colaterales que, absorberse más fácilmente que y/o tener un mejor perfil de farmacocinética (por ej., mayor biodisponibilidad, resultante por ejemplo de una solubilidad mejorada en disolventes acuosos, y/o menor depuración) que, y/o tener otras propiedades farmacológicas, físicas o químicas útiles sobre, los compuestos conocidos en la técnica anterior, ya sea para usar en las indicaciones indicadas anteriormente o de otro modo.

50 Siempre que se emplee el término "aproximadamente" en la presente memoria, por ejemplo, en el contexto de cantidades (por ej., dosis de principio activo), o períodos de tiempo, se apreciará que dichas variables son aproximadas y como tales pueden oscilar a razón de $\pm 10\%$, por ejemplo $\pm 5\%$ y preferentemente $\pm 2\%$ (por ej., $\pm 1\%$) de los números especificados en la presente memoria.

La invención se ilustra, pero sin limitación, mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Síntesis de 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima

5 Se ha identificado que una reacción del reactivo de Grignard de etnilo con 3, 20/17 esteroides de dicetona es selectiva en la mayoría de los casos para la posición 3 y no hay necesidad de protección/desprotección para la otra funcionalidad de cetona. Se forman ambos isómeros alfa y beta, los cuales pueden separarse mediante procedimientos cromatográficos, y recristalizarse.

10 Los materiales de partida para sintetizar 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima son los esteroides correspondientes con sustituyente 3-hidroxilo y el grupo ceto en las posiciones 20. Pueden convertirse en las dionas respectivas mediante oxidación con reactivo IBX. La reacción avanza suavemente y con conversión completa. Otros esteroides oportunos pueden emplearse como material de partida cuando se requiera. Las reacciones se llevaron a cabo con disolventes oportunos tal como metanol, etanol, agua, THF, éter dietílico, diclorometano u otros disolventes que un experto en la técnica puede reconocer como oportunos. Los reactivos se seleccionan de modo de evitar, cuando sea posible, el uso de reactivos, tal como los metales pesados, que son tóxicos incluso en trazas o son difíciles de retirar completamente en el procedimiento de procesamiento.

15 Las reacciones que implican reactivos o productos sensibles al aire o a la humedad se llevaron a cabo en una atmósfera inerte, tal como nitrógeno o argón gaseoso, en presencia de disolventes anhidros. El éter dietílico y el tetrahidrofurano se secaron sobre Na en presencia de benzofenona. Las jeringas purgadas con gas inerte se usaron para la transferencia de reactivos y disolventes anhidros. El tiempo y la temperatura optimizados de las reacciones se determinaron mediante la monitorización de la formación de productos y la pérdida de material de partida con el uso de una técnica cromatográfica adecuada, tal como TLC o GC/MS.

20 Las purificaciones se llevaron a cabo por el uso de técnicas cromatográficas tal como cromatografía flash con sílice o cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa (HPLC) por el uso de un aparato de HPLC. Los expertos en la técnica pueden reconocer que pueden emplearse procedimientos de purificación alternativos, y las técnicas cromatográficas de laboratorio pueden adaptarse a la escala industrial por el uso de columnas cromatográficas para preparaciones a escala aumentada. La identificación de los productos se lleva a cabo por el uso de técnicas analíticas adecuadas tal como ¹H-RNM, ¹³C-RNM, espectrometría de masa, espectroscopia IR, espectroscopia por rayos X y cualquier otro análisis que pueda reconocer un experto en la técnica como oportuno para la identificación estructural y la determinación de la pureza de la 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima. Un experto en la técnica reconocerá que pueden usarse reactivos, disolventes, condiciones y parámetros similares en las reacciones, dependiendo del sustrato. Los datos de RNM se registran con el uso de un espectrómetro Bruker 400 MHz.

3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-ona

35 3,20-5 α -pregnandiona (1,580 g, 5,0 mmol) se disolvió en 50 ml de THF anhidro a temperatura ambiente (ta) bajo nitrógeno. Se añadió bromuro de etnil magnesio (1,1 equiv.) gota a gota a ta con agitación y la solución se dejó agitar durante la noche a ta bajo flujo de nitrógeno.

40 La solución amarillenta se inactivó con NH₄Cl_(ac.) saturado y la fase acuosa se extrajo con diclorometano (3 x 30 ml). Las fases orgánicas recolectadas se evaporaron bajo presión reducida, el aceite amarillo resultante se disolvió en diclorometano, se lavó con salmuera y se secó sobre MgSO₄. La solución se redujo al vacío, y el residuo se purificó por cromatografía flash en columna de sílice (1:4 éter dietílico:diclorometano). Los rendimientos típicos fueron de 72%. Las trazas eventuales de subproductos pueden eliminarse mediante recristalización adicional a partir de éter dietílico.

¹H RNM (400 MHz, CDCl₃-d₆): δ 2,51 (t, 1H); 2,47 (s, 3H); 2,14 (m, 1H); 2,11 (s, 3H); 0,81 (s, 1H); 0,60 (s, 3H).

3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-ona

Este compuesto se obtuvo como subproducto a partir de la reacción descrita con anterioridad y se separó por cromatografía flash en columna de sílice. El rendimiento típico fue de 13%.

45 ¹H RNM (400 MHz, CDCl₃-d₆): δ 2,52 (t, 1H); 2,43 (s, 1H); 2,11 (s, 3H); 0,80 (s, 3H); 0,60 (s, 3H).

3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima

50 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-ona (10 mmol) se disolvió en 5 ml de diclorometano y 50 ml de etanol a ta y atmósfera de aire, en un balón de 250 ml. 4 equiv. de clorhidrato de NH₂OH y 4 equiv. de acetato de sodio se disolvieron en 5 ml de H₂O y después se añadieron a la solución de esteroides. Se añadió 20 ml de etanol y la mezcla se puso a reflujo durante la noche. Después, la mezcla se enfrió y el disolvente se retiró bajo presión reducida. Después, el residuo blanco se trató con 50 ml de H₂O y 50 ml de diclorometano, la fase acuosa se extrajo con 3 x 30 ml de diclorometano. Después, las fases orgánicas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y el disolvente se retiró bajo presión reducida. El residuo final se purificó por cromatografía flash en columna de sílice y diclorometano:éter dietílico 4:1, con rendimientos típicos de 95-100%.

¹H RNM (400 MHz, CDCl₃-d₆): δ 2,47 (s, 1H); 2,22 (t, 1H); 2,05 (m, 1H); 1,88 (s, 3H); 1,86 (s, 3H); 0,81 (s, 3H), 0,62 (s, 3H).

Ejemplo 2

Efectos de 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima sobre el subtipo alfa 5 y alfa 1 del receptor de GABA_A

5 Se usaron células HEK-293, transfectadas en forma permanente con el GABA_A α1β2γ2 humano y el receptor de GABA_A α5β3γ2 que expresa receptores de GABA_A α1β2γ2L y α5p3γ2L. Las líneas celulares que expresan de manera permanente el receptor de GABA_A humano funcional se realizaron en las siguientes etapas. Las subunidades α1 (308-1727 NM_000806), β2 (214-1679 NM_000813), y γ2L (290-1785 NM_198904) del receptor GABA_A, que incluyen las secuencias de Kozac introducidas inmediatamente antes de los codones de inicio, se subclonaron en vectores de expresión de mamífero que contienen resistencia a Geneticina, Higromicina B, y Zeocina, respectivamente. Una línea celular HEK-293 que expresa en forma estable las tres subunidades del receptor de GABA_A se produjo mediante la transfección de las subunidades de una a la vez. A la transfección le siguió la selección con los antibióticos adecuados, la separación celular con el uso de los anticuerpos específicos de la subunidad (β2 y γ2), y la producción de colonias celulares individuales. Las líneas celulares producidas se analizaron con inmunohistoquímica para las tres subunidades del receptor de GABA_A, seguido de la selección de una línea celular adecuada que muestra el receptor de GABA_A normal y buena reactividad en un análisis de fijación de la placa (véase a continuación) hacia GABA y la tetrahydrodesoxicorticosterona GAMS (THDOC).

Procedimientos para probar los efectos del receptor de GABA_A de 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima

20 Se llevaron a cabo experimentos para investigar el efecto de 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima sobre la función del receptor de GABA_A en ausencia o presencia de la tetrahydrodesoxicorticosterona GAMS (THDOC) mediante el sistema DynafloTM sobre células HEK-293. En estas pruebas, se optimizó el protocolo de modo que sea similar a las condiciones fisiológicas en la hendidura sináptica.

25 **Cultivo celular:** Las células HEK-293, transfectadas de manera permanente con los subtipos del receptor de GABA_A α1β2γ2 y GABA_A α5β3γ2 humano, se sembraron a una densidad de 3 x 10⁴/25 cm² en un matraz de cultivo para unión celular. Las células transfectadas se usaron para los experimentos de fijación de la placa 3 días después de la siembra. Cuando se usan las células para los experimentos de fijación de la placa, las células se lavaron dos veces con solución de EC con burbujeo de O₂ (véase a continuación). Después, se añadieron aproximadamente 5 ml de EC y las células se mantuvieron en la incubadora durante aproximadamente 15 minutos. Después de 15 minutos, las células se liberaron de la base del matraz y se separaron mediante succión cuidadosa en un par de oportunidades con una pipeta de Pasteur.

30 **Sistema DynafloTM:** El sistema DynafloTM con chips de resolución se usó para todos los experimentos de fijación de la placa. Los chips de resolución se realizan con materiales no pegajosos. El ancho del canal es de 150 μm y la altura es de 50 μm. El volumen del pocillo es de 280 μl. El tiempo de ejecución al caudal de 26 μl/min es de 180 min. Las configuraciones de la bomba fueron las siguientes: Se usó jeringa Omnifix de 2 ml con diámetro interno de 9,65 mm. El caudal de la bomba de la jeringa fue de 26 μl/min.

35 **Esteroides y GABA:** GABA se disolvió en solución de EC por ultrasonido durante aproximadamente 40 minutos hasta la concentración de 10 mM a temperatura ambiente. Todos los esteroides se disolvieron hasta la concentración de 6 mM en etanol. La concentración de etanol fue de 0,1% en todas las soluciones finales, incluyendo la solución de lavado (EC) y la solución con GABA solo. Las soluciones finales son soluciones añadidas en los pocillos del chip.

40 **Electrofisiología:** Los electrodos adhesivos se retiraron de vidrio con capilares de borosilicato sin filamento de 1,5 mm de O.D., 0,86 mm de I.D. Los electrodos típicos tenían una resistencia de 2-5 MΩ cuando se llenaron con soluciones intracelulares. La solución intracelular consistía en (en mM): 140 de Cs-gluconato, 3,0 de NaCl, 1,2 de MgCl₂, 1,0 de EGTA, 10 de HEPES. El pH se ajustó a 7,2 con CsOH. La solución extracelular (EC) usada durante los registros contenía (en mM): 137 de NaCl, 5,0 de KCl, 1,0 de CaCl₂, 1,2 de MgCl₂, 10 de HEPES, 10 de glucosa. El pH se ajustó con NaOH hasta 7,4. Después de compensar el potencial de unión de líquidos se usó un potencial de retención estacionario de -17 mV en todos los experimentos. En las condiciones fisiológicas, las HEK-293 tienen un potencial de reposo a -40 mV y una baja concentración de iones de cloruro dentro de la célula. Mediante el uso del potencial de retención de -17 mV y la solución intracelular con concentración baja de iones de cloruro los iones de cloruro fluyen hacia la célula cuando los receptores se activan. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (21 a 23°C). Se usó un protocolo estándar para todos los experimentos.

Protocolo

45 **Aplicaciones de GABA:** Por el uso del equipamiento Dynaflo es posible estudiar las células HEK-293 transfectadas durante condiciones casi fisiológicas. El sistema Dynaflo permite la aplicación de soluciones desde un periodo de apenas 40 ms hasta minutos. Fisiológicamente, en la hendidura sináptica, GABA se libera en un intervalo de mM durante aproximadamente 2 ms, esto es válido para los receptores alfa1. En sitios sinápticos extra, los niveles de GABA son más bajos, pero permanecen durante un tiempo más extenso; esto es válido para los receptores alfa5. En los experimentos con α1β2γ2L se aplicó GABA ± esteroide durante 40 ms; en experimentos con α5β3γ2L, se aplicó

GABA ± esteroide durante 6 s. Se ha descubierto que, en casi todas las células, la primera aplicación de GABA dio una respuesta menor que la segunda aplicación de GABA. No hubo diferencia en la respuesta entre la segunda y la tercera aplicación de GABA. Por lo tanto, la primera aplicación de GABA siempre se repite dos veces y la segunda respuesta se usa en el análisis. Eliminación: GABA es bastante soluble en agua y fácil de eliminar del receptor. El tiempo de eliminación se fijó en 1 minuto después de la aplicación con GABA solamente. Los esteroides, por otro lado, son difíciles de disolver en agua y también difíciles de eliminar del receptor. En los experimentos de la presente, se usó THDOC como agonista de GABA. Con un tiempo de eliminación de 2 minutos, se habían eliminado completamente 200 nM de THDOC como se muestra por la ausencia de un efecto acumulativo o de insensibilización.

Incubación: Para ver el efecto de los esteroides y lograr resultados estables se ha descubierto que los esteroides tienen que incubarse sobre el receptor antes de la aplicación de GABA. Este hallazgo se respalda por la sugerencia de que el sitio de unión para THDOC está ubicado en el receptor (Hosie *et al.* 2006). Se estudiaron diferentes tiempos de incubación para lograr el tiempo óptimo para lograr resultados estables y minimizar el tiempo de eliminación. Se demostró que el tiempo de incubación de 20 segundos es el tiempo óptimo para el tiempo de eliminación de 2 minutos.

Conclusión de la optimización: El protocolo optimizado es de la siguiente manera: 20 segundos de incubación de esteroides, 40 ms o 6 s. Aplicación de GABA ± esteroides, eliminación de 2 minutos. La primera aplicación de GABA se repitió dos veces con un tiempo de eliminación de 1 min entre la primera y la segunda aplicación.

Resultados de la prueba de 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima sobre el receptor de GABA_A α1β2γ2L y α5β3γ2

Los resultados de la prueba de fijación de la placa de 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima en los dos subtipos diferentes del receptor de GABA_A α1β2γ2L y α5β3γ2L dieron un resultado inesperado y sorprendente. Como se muestra en la Tabla 2, 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima no tenía, en el receptor de α1β2γ2L, efecto antagonista contra el efecto potenciador de THDOC, los GAMS usados en los experimentos. 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima sola no tenía un efecto potenciador o antagonista sobre el flujo de cloruro. 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima tenía un leve efecto antagonista sobre la apertura de GABA del receptor de GABA_A α1β2γ2L. Este efecto agonista es tan pequeño que no tiene relevancia en el intervalo del vehículo.

Inesperadamente, sobre el subtipo del receptor de α5β3γ2L, 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima es un antagonista en todas las situaciones probadas con GAMS y GABA (Tabla 2). 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima muestra de este modo especificidad dependiente del subtipo del receptor. Por lo tanto, 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima muestra selectividad en esta acción y, por lo tanto, es adecuada como un medicamento. Dado que 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima es específica y no activa sobre el receptor de α1β2γ2, 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima tiene menos efectos colaterales debido al receptor alfa1 más general. La inhibición del efecto como un antagonista da un mayor impacto que un cambio positivo similar como agonista.

Tabla 2. Estudios sobre la respuesta actual mediada por el flujo de iones de cloruro a través de los receptores de GABA_A que expresan la subunidad α1 y α5. La técnica de fijación de la placa combinada con el sistema de aplicación Dynaflo™, que proporciona rápidas aplicaciones y retiros de sustancias, se usó en este estudio. "Compuesto" se refiere a 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima. "GAMS" se refiere a "esteroides de modulación del receptor de GABA_A" en este caso tetrahydrodesoxicorticosterona (THDOC).

Subtipo del receptor de GABA _A	Compuesto + GAMS + GABA	Compuesto solo	Compuesto + GAMS	Compuesto + GABA
α 1 β2γ2L	Sin efecto	Sin efecto	N.D.	+ 11 ± 4
α 5β3γ2	-15,26±2,8	Sin efecto	-29,7 ± 6,5	-18,8 ± 2,2

Receptores α1β2γ2-GABA_A

1 μM de 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima aumentó la repuesta actual mediada por GABA sobre los receptores de α1β2γ2L- GABA_A a razón de aproximadamente 10% (Tabla 2). 1 μM de 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima no activó el receptor de GABA_A directamente, en ausencia de GABA. Los resultados de este estudio muestran que 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima no modula las corrientes evocadas por GABA negativamente en los receptores de α1β2γ2- GABA_A. Además, el aumento observado del 10% en las corrientes evocadas por GABA en el tipo de subunidad α1 puede considerarse un efecto menor. En resumen, 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima no tiene efectos considerables sobre las corrientes evocadas por GABA en los receptores de α1β2γ2L-GABA_A.

Receptores de α5β3γ2-GABA_A

Un claro efecto de antagonización dependiente de la concentración se detectó para 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima sobre 200 nM de GAMS (THDOC) y 0,3 μM de corrientes evocadas por GABA (Tabla 3). 3α-etinil, 3β-hidroxi, 5α-pregnan-20-oxima también tenía un efecto antagonista sobre la corriente evocada por 200 nM de THDOC, es decir,

la activación directa del receptor de GABA_A POR GAMS. Este antagonismo tenía la misma magnitud que el de la corriente evocada por 200 nM de THDOC y 0,3 μ M de GABA.

Tabla 3. 0,1-3 μ M de 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima ("Compuesto") en presencia de 200 nM de THDOC + 0,3 μ M de GABA. Efecto relativo para controlar 200 nM de THDOC + 0,3 μ M de GABA, fijado en 0.

Dosis de Compuesto (μ M)	Media del efecto relativo (%)	Mediana	SEM	n	Mín.	Máy.	Valor de p
0,1	- 3,0	- 1,6	2,0	10	- 19,6	2,8	0,093
0,3	- 6,6	- 6,9	3,2	10	- 22,8	6,0	0,114
1	- 15,2	- 11,0	2,8	11	- 30,0	- 2,5	0,003
3	- 20,7	- 23,6	2,3	9	- 30,0	- 10,4	0,008

5

Ejemplo 3

Efectos comparativos de 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima y su epímero sobre el subtipo alfa 5 del receptor de GABA_A

10 Mediante el empleo de los procedimientos descritos en el Ejemplo 2 anterior, 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima y su epímero, 3 β -etnil, 3 α -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima se probaron para determinar los efectos sobre el subtipo alfa 5 del receptor de GABA_A.

La única diferencia metodológica en los procedimientos empleados en comparación con el Ejemplo 2 fue que los esteroides se disolvieron en etanol hasta una concentración de 2 mM en la solución estándar, con una concentración final de etanol de 0,1% en todas las soluciones. Los resultados se tabulan en la Tabla 4 a continuación.

15 **Tabla 4.** Efectos de los esteroides UC 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima ("Compuesto") y 3 β -etnil, 3 α -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima ("Comparador") en concentraciones de 1 μ M probados contra el esteroide GABA THDOC medido como cambio en el flujo de cloruro a través del receptor α 5 β 3 γ 2L de GABA_A.

Esteroides	Media % (SEM) de Compuesto + THDOC + GABA	Media % (SEM) de Compuesto +THDOC	Media % (SEM) de Compuesto + GABA	Media % (SEM) de Compuesto solo
Compuesto	- 15 (3) antagonista	- 30 (6) antagonista	- 19 (2) antagonista	sin efecto
Comparador	+ 80 (8) agonista	+ 128 (22) agonista	+ 210 (23) agonista	+ 50 (12) agonista

20 Los resultados muestran que el compuesto de la invención actúa como un antagonista de la subunidad alfa 5 del receptor de GABA, mientras que el epímero actúa como un agonista.

REIVINDICACIONES

1. 3 α -etinil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-oxima o una de sus sales farmacéuticamente aceptables.
2. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto como se define en la Reivindicación 1, en una mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 5 3. Un compuesto como se define en la Reivindicación 1, para su uso en terapia.
4. Un compuesto como se define en la Reivindicación 1, para su uso en un procedimiento de tratamiento de:
 - a) un trastorno del SNC relacionado con esteroides;
 - b) una afección o síntomas causados por el desarrollo de tolerancia después de la exposición a 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides;
 - 10 c) una afección que está influenciada por la discontinuación/abstinencia de la exposición a 3-alfa-hidroxi-5-alfa/beta-esteroides;
 - d) uno o más efectos colaterales de un esteroide antiinflamatorio;
 - e) uno o más efectos colaterales de la terapia posmenopáusica; y/o
 - f) uno o más efectos colaterales de un anticonceptivo oral.
- 15 5. Un compuesto para su uso como se reivindica en la Reivindicación 4, en el cual el trastorno del SNC relacionado con esteroides se selecciona del grupo de epilepsia, epilepsia dependiente del ciclo menstrual, depresión, depresión relacionada con el estrés, migraña, cansancio y en particular cansancio relacionado con el estrés, síndrome premenstrual, trastorno disfórico premenstrual, cambios del estado de ánimo relacionados con el ciclo menstrual, deterioro cognitivo, insuficiencia cognitiva mínima, insuficiencia cognitiva, cambios en la memoria relacionados con el ciclo menstrual, cambios en la memoria relacionados con el estrés, dificultades del aprendizaje relacionadas con el estrés, encefalopatía hepática, síndrome de Down, enfermedad de Alzheimer, dificultades en la concentración relacionadas con el ciclo menstrual, trastornos del sueño y cansancio relacionados con el ciclo menstrual, aumento del apetito, sobreingesta de comida y obesidad, recaída del alcoholismo y abuso de sustancias, trastornos del equilibrio, trastornos del movimiento y dificultades de coordinación.
- 20 6. Un compuesto para usar como se reivindica en la Reivindicación 5, en el cual el trastorno es encefalopatía hepática.
7. Un compuesto para usar como se reivindica en la Reivindicación 6, en el cual la encefalopatía hepática es encefalopatía hepática Tipo A, encefalopatía hepática Tipo B, encefalopatía hepática Tipo C, encefalopatía hepática mínima, o encefalopatía hepática evidente.
- 30 8. Un compuesto para usar como se reivindica en la Reivindicación 5, en el cual el trastorno es síndrome de Down y enfermedad de Alzheimer.
9. Un producto combinado que comprende:
 - (A) un compuesto como se define en la Reivindicación 1; y
 - (B) al menos un otro agente terapéutico que es útil en el tratamiento de un trastorno del SNC relacionado con esteroides,
 - 35 en el que cada uno de los componentes (A) y (B) se formula en una mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Un producto combinado como se reivindica en la Reivindicación 9 que comprende una formulación farmacéutica que incluye un compuesto como se define en la Reivindicación 1, al menos un otro agente terapéutico que es útil en el tratamiento de un trastorno del SNC relacionado con esteroides, y un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 11. Un producto combinado como se reivindica en la Reivindicación 9 que comprende un kit de partes que comprende los componentes:
 - a) una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de la fórmula I como se define en la Reivindicación 1, en una mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable; y
 - 45 b) una formulación farmacéutica que comprende al menos un otro agente terapéutico que es útil en el tratamiento de un trastorno del SNC relacionado con esteroides en una mezcla con un adyuvante,

diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable,

cuyos componentes (a) y (b) se proporcionan cada uno en una forma que es adecuada para administración en conjunción uno con otro.

- 5 **12.** Un procedimiento de preparación de un compuesto de la fórmula I como se define en la Reivindicación 1, cuyo procedimiento comprende hacer reaccionar 3 α -etnil, 3 β -hidroxi, 5 α -pregnan-20-ona con hidroxilamina.
- 13.** Un procedimiento de preparación de una formulación farmacéutica, como se define en la Reivindicación 2, cuyo procedimiento comprende asociar un compuesto como se define en la Reivindicación 1 con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 **14.** Un procedimiento de preparación de un producto combinado como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 9 a 11, cuyo procedimiento comprende asociar un compuesto como se define en la Reivindicación 1, con el otro agente terapéutico que es útil en el tratamiento de un trastorno del SNC relacionado con esteroides, y al menos un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.