

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 978**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4439 (2006.01)

A61P 5/26 (2006.01)

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 21/06 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

C07D 209/94 (2006.01)

C07D 401/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.09.2015 PCT/US2015/048801**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016 WO16040234**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.09.2015 E 15767383 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 3191094**

54 Título: **Tratamiento de los síntomas asociados a una terapia de privación de andrógenos**

30 Prioridad:

11.09.2014 US 201462049192 P

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

21.08.2020

73 Titular/es:

**ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
940 S. East Street
Indianapolis, IN 46206-6288, US**

72 Inventor/es:

BENSON, CHARLES THOMAS

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 779 978 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

Tratamiento de los síntomas asociados a una terapia de privación de andrógenos

La presente invención se refiere al tratamiento de los síntomas asociados con una terapia de privación de andrógenos usando éster isopropílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención pertenece al campo del tratamiento de los síntomas asociados con una terapia de privación de andrógenos. La terapia de privación de andrógenos (ADT, por sus siglas en inglés) o terapia de supresión de andrógenos, es una terapia común utilizada para disminuir la agresividad del cáncer de próstata junto con otras opciones terapéuticas enfocadas a la erradicación del cáncer. Durante una ADT, los niveles de andrógenos, u hormonas masculinas, se reducen en el cuerpo para evitar que lleguen a las células del cáncer de próstata. Andrógenos, tales como la testosterona y la dihidrotestosterona (DHT), estimulan el crecimiento de las células del cáncer de próstata. Sin embargo, se ha descubierto que los cánceres de próstata pueden crecer más lentamente o incluso reducirse si se reducen los niveles de andrógenos. En los Estados Unidos, se estima que aproximadamente un tercio de los pacientes con cáncer de próstata habrán recibido ADT en algún momento durante el tratamiento de su enfermedad.

Existen diversas opciones de tratamiento disponibles para reducir los niveles de andrógenos, tales como una orquiectomía o castración quirúrgica, análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), como leuprolida (comercializada en los Estados Unidos como Lupron®, Eligard®), goserelina (comercializada en los Estados Unidos como Zoladex®), triptorelina (comercializada en los Estados Unidos como Trelstar®) e histrelina (comercializada en los Estados Unidos como Vantas®) y antagonistas de la LHRH, como degarelix (comercializado en los Estados Unidos como Firmagon®) y abiraterona (comercializada en los Estados Unidos como Zytiga®).

La mayoría de los hombres con cáncer de próstata avanzado responden bien a la ADT. La ADT generalmente está indicada cuando los cánceres de próstata se extienden más allá de la cápsula prostática según la estadificación clínica (enfermedad T3), en el caso de tratamiento primario en un cáncer de próstata metastásico con agonistas/antagonistas de GnRH o una castración química.

Existen posibles efectos secundarios asociados con una terapia hormonal que pueden tener efectos perjudiciales sobre la calidad de vida y aumentar los riesgos de interrupción de la terapia ADT por parte del paciente. Por ejemplo, los efectos secundarios pueden incluir una libido reducida o ausente, disfunción eréctil, encogimiento de los órganos sexuales masculinos, sofocos, osteoporosis, anemia, reducción de la masa muscular, disminución de la fuerza muscular, aumento de la grasa corporal y aumento de peso, debido a cambios en los niveles de las hormonas testosterona y estrógeno. Los tratamientos actuales contra los efectos secundarios asociados con ADT son conocidos en la técnica. Véanse los documentos US 2009/0143344 (sofocos - 5HT2A o antagonista de D2R); US 2007/0281977 (sofocos - antagonista del receptor muscarínico); US 2008/0080143 (osteoporosis, fracturas óseas, pérdida de DMO, sofocos, ginocomastia, pérdida de cabello - torimifeno). NARAYANAN RAMESH ET AL: "Selective androgen receptor modulators in preclinical and clinical development", NUCLEAR RECEPTOR SIGNALING, vol. 6, 2008, páginas E010-1, describe el uso de moduladores selectivos de los receptores de andrógenos (SARMs, por sus siglas en inglés) como adyuvantes para combatir los efectos secundarios de la leuprolida sobre la pérdida muscular y ósea. Sin embargo, sigue existiendo una necesidad en la técnica de terapias alternativas en las que ciertos efectos secundarios de ADT se puedan reducir. De hecho, hasta hace poco, se recomendaba una privación intermitente de andrógenos (IAD, por sus siglas en inglés) para intentar minimizar los efectos adversos de la castración médica, retirando el tratamiento en pacientes que habían respondido a la ADT y a continuación reinstituyendo la ADT cuando había una evidencia de enfermedad recurrente o progresiva. Sin embargo, un ensayo con 1749 pacientes asignados al azar para ADT continua frente a IAD para una mediana de seguimiento de 9,8 años, demostró que la ADT continua es superior a la IAD. Una terapia para mejorar la tolerabilidad de los efectos secundarios de ADT podría conducir a mejoras en el cumplimiento terapéutico y dar lugar a mejores resultados en los pacientes.

Se ha encontrado que los moduladores selectivos de los receptores de andrógenos (SARMs) muestran un perfil diferenciado de actividad en los tejidos androgénicos. En particular, esos agentes muestran preferiblemente una actividad agonista de andrógenos en tejidos anabólicos, tales como el músculo o el hueso, pero son solo agonistas parciales o incluso antagonistas en otros tejidos androgénicos, tales como la próstata o las vesículas seminales. Por lo tanto, el uso de un modulador del receptor de andrógenos (AR, por sus siglas en inglés) puede aliviar los síntomas de ADT en los pacientes con cáncer de próstata.

La Figura 1 ilustra que el Ejemplo 1 daba como resultado una falta de acumulación significativa de peso de la vesícula seminal después de un tratamiento de 8 semanas en una rata orquiectomizada hace 8 semanas y que era hipersensible a cualquier estimulación androgénica.

La Figura 2 ilustra que el Ejemplo 1 daba como resultado una acumulación significativa de la densidad mineral ósea trabecular de la vértebra lumbar (LV-TBMD) y mostraba una tendencia hacia un aumento en el contenido en mineral óseo trabecular de la vértebra lumbar (LV-TBMC) y el área de la sección transversal (LV-TA) después de un tratamiento de 8 semanas en una rata orquiectomizada hace 8 semanas.

La Figura 3 ilustra que la combinación con enantato de testosterona (TE, por sus siglas en inglés) (1 mg/kg-día) y varias dosis del Ejemplo 1, sugiere una tendencia a disminuir el peso húmedo de la vesícula seminal en mg normalizado al peso corporal en gramos, que se induce solo con TE.

5 La Figura 4 ilustra que un tratamiento conjunto a ratas SD con el Ejemplo 1 junto con 1 mg/kg de TE daba como resultado una disminución dependiente de la dosis en el peso húmedo de la próstata en miligramos normalizado al peso corporal en gramos.

La Figura 5 ilustra que la combinación con TE (1 mg/kg-día) y varias dosis del Ejemplo 1 sugiere una tendencia a disminuir el peso húmedo de la vesícula seminal en miligramos normalizados al peso corporal en gramos, que se induce solo con TE.

10 La Figura 6 ilustra que el tratamiento conjunto del Ejemplo 1 a ratas SD junto con 1 mg/kg de TE da como resultado una disminución dependiente de la dosis en el peso húmedo de la próstata en miligramos normalizado al peso corporal en gramos.

15 La Figura 7 ilustra un aumento en el área del músculo de la pantorrilla medido mediante formación de imágenes periféricas basadas en tomografía computarizada, en el haz gastrocnemio (área del músculo de la pantorrilla) después de la administración del Ejemplo 1 a voluntarios humanos sanos.

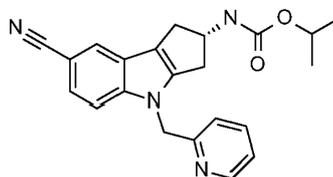
La Figura 8 ilustra un aumento en la masa muscular no adiposa de todo el cuerpo después de la administración del Ejemplo 1 a voluntarios humanos sanos, medido mediante DEXA. El efecto sobre los varones (barra azul) con un nivel de dosis de 5 mg es estadísticamente significativo en comparación con la dosis de placebo de 0 mg, utilizando una prueba de Dunnett ($p < 0,05$).

20 La Figura 9 ilustra que no hay cambios significativos desde el punto basal en los niveles de antígeno prostático específico (SPA, por sus siglas en inglés), en comparación con el placebo en cualquier momento o cualquier dosis del Ejemplo 1.

25 La Figura 10 ilustra una disminución de los niveles de testosterona en suero después de la administración del Ejemplo 1 a voluntarios humanos sanos eugonadales. La disminución después del tratamiento es más pronunciada en los varones debido a sus niveles de testosterona en suero relativamente más altos. La tabla de la derecha refleja la evaluación de la exposición después del estudio de Fase 1a con una dosis de 5 mg.

La Figura 11 ilustra una relación exposición-respuesta positiva para el péptido N-terminal de procolágeno de tipo 1 (P1NP), un biomarcador para el anabolismo óseo, después de la administración del Ejemplo 1 a voluntarios humanos sanos eugonadales.

30 El compuesto modulador del AR, éster isopropílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico, representado alternativamente como ácido carbámico, *N*-[(2S)-7-ciano, -1,2,3,4-tetrahidro-4-(2-piridinilmetil)ciclopent[b]indol-2-il]-, éster 1-metiletilico, representado por la fórmula estructural I, ha mostrado que aumenta la masa muscular no adiposa y disminuye la masa adiposa en voluntarios sanos. Además, no se han observado cambios significativos en el hematocrito o cambios en el antígeno prostático específico (PSA) después de un tratamiento con éster isopropílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico después de 12 semanas en voluntarios sanos. Además, el tratamiento de ratas orquiectomizadas con éster isopropílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico muestra una falta de acumulación significativa de peso de las vesículas seminales.



40 Fórmula I

La invención se define por las reivindicaciones. Cualquier objeto que quede fuera del alcance de las reivindicaciones, se proporciona solo con fines informativos. Además, cualquier referencia en la descripción a los métodos de tratamiento, se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante una terapia.

45 Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para tratar los síntomas que son el resultado de un hipogonadismo secundario inducido por ADT, que comprende administrar a un paciente que necesita ese tratamiento una cantidad eficaz del compuesto de Fórmula I. En una realización adicional, el paciente es un paciente con cáncer de próstata. En una realización adicional, la presente invención proporciona un método para tratar la pérdida de masa ósea, resistencia ósea, masa muscular o fuerza muscular debido a un hipogonadismo secundario
50 inducido por ADT. En otra realización adicional, la presente invención proporciona un método para tratar la pérdida

de libido y los sofocos resultantes de un hipogonadismo secundario inducido por ADT.

Además, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar los síntomas resultantes de un hipogonadismo secundario inducido por ADT en pacientes que lo necesitan. En una realización adicional, el paciente es un paciente con cáncer de próstata.

5

También se describe el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de los síntomas de ADT para pacientes con cáncer de próstata. En otro aspecto, se describe el uso de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar los síntomas de ADT en pacientes con cáncer de próstata. En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar los síntomas resultantes de un hipogonadismo secundario inducido por ADT.

10

15

Además, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar la pérdida de masa ósea, resistencia ósea, masa muscular o fuerza muscular resultante de un hipogonadismo secundario inducido por ADT. Aún más, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de la pérdida de masa ósea, resistencia ósea, masa muscular o fuerza muscular resultante de un hipogonadismo secundario inducido por ADT. En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar la pérdida de masa ósea, resistencia ósea, masa muscular o fuerza muscular resultante de un hipogonadismo secundario inducido por ADT.

20

25

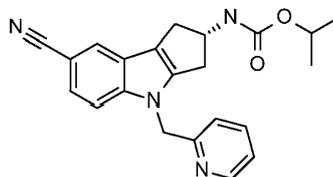
Además, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para tratar la pérdida de libido y los sofocos resultantes de un hipogonadismo secundario inducido por ADT. Aún más, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el tratamiento de la pérdida de libido y los sofocos resultantes de un hipogonadismo secundario inducido por ADT. En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para la preparación de un medicamento para tratar la pérdida de libido y los sofocos resultantes de un hipogonadismo secundario inducido por ADT.

30

Un compuesto modulador del receptor de andrógenos de Fórmula I, y los métodos para preparar y usar dichos compuestos como agentes terapéuticos útiles para indicaciones terapéuticas tales como hipogonadismo, masa o densidad ósea reducida y masa o fuerza muscular reducida, se mencionan en el documento US-2010-0069404, publicado el 18 de marzo, 2010. Véase también el documento WO 2008/063867. Un compuesto modulador del receptor de andrógenos (AR) de Fórmula I es un modulador potente y selectivo del receptor de andrógenos.

35

Más específicamente, la presente invención proporciona un método para tratar los síntomas de un hipogonadismo secundario inducido por ADT en pacientes con cáncer de próstata, que comprende administrar a un paciente que necesita ese tratamiento una cantidad efectiva de un compuesto de Fórmula I, representado estructuralmente como:



40

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Tal y como se emplea en el presente documento, el término "paciente" se refiere a un ser humano.

Tal y como se emplea en este documento, los términos "tratando", "tratar" o "tratamiento" incluyen restringir, ralentizar, detener, reducir o revertir la progresión o la gravedad de un síntoma, trastorno, afección o enfermedad existentes.

45

Tal y como se emplea en este documento, los términos "T1-T4" se refieren a la categoría T del sistema de estadificación TNM del Comité Estadounidense Conjunto sobre el Cáncer (AJCC), para describir hasta qué punto se ha propagado un cáncer. La categoría T indica la presencia de tumores y describe la extensión del tumor primario. Los números más altos indican mayor tamaño, extensión o grado de penetración. Cada tipo de cáncer tiene detalles específicos para estar clasificado con el número. Para el cáncer de próstata, T1 indica que el médico no puede palpar el tumor o verlo con formación de imágenes tal como una ecografía transrectal. T2 indica que el médico

50

puede palpar el cáncer con un examen rectal digital (DRE) o verlo con formación de imágenes tal como una ecografía transrectal, pero aún parece estar limitado a la glándula prostática. T3 indica que el cáncer ha comenzado a crecer y a propagarse fuera de la próstata y se puede haber extendido dentro de las vesículas seminales. T4 indica que el cáncer ha crecido en tejidos próximos a la próstata (distintos de las vesículas seminales), como el esfínter uretral (músculo que ayuda a controlar la micción), el recto, la vejiga y/o la pared de la pelvis.

Tal y como se emplea en el presente documento, la expresión "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o la dosis de compuesto de Fórmula I, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, después de la administración al paciente, que proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento. Al determinar la cantidad efectiva para un paciente, el médico responsable considera una serie de factores, que incluyen, pero no se limitan a, el tamaño, la edad y la salud general del paciente; la enfermedad o el trastorno específico involucrado; el grado, la implicación o la gravedad de la enfermedad o el trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de una medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

El compuesto de Fórmula I y sus sales farmacéuticamente aceptables son generalmente efectivos en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosificaciones por día de agentes individuales, normalmente están dentro del intervalo de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 1000 mg/día, preferiblemente de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 500 mg/día, de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 250 mg/día, de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 100 mg/día, de 1 mg/día a aproximadamente 75 mg/día y de 1 mg/día a aproximadamente 25 mg/día. Lo más preferiblemente, las dosificaciones por día de agentes individuales normalmente están dentro del intervalo de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 5 mg/día. Lo más preferiblemente, el compuesto de Fórmula I se usa con una dosis por día seleccionada a partir de 1 mg, 5 mg, 25 mg y 75 mg por día.

Un compuesto modulador del receptor de andrógenos de Fórmula I se formula preferiblemente como una composición farmacéutica administrada por cualquier vía que haga que el compuesto esté biodisponible. La vía de administración puede variar de cualquier manera, limitada por las propiedades físicas de los fármacos y la conveniencia del paciente y el cuidador. Preferiblemente, un compuesto modulador del receptor de andrógenos de Fórmula I se formula para una administración oral o parenteral que incluye una administración intravenosa o subcutánea. Esas composiciones farmacéuticas y los procedimientos para prepararlas son bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, compilador, 21^a edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006).

Se prefiere que el compuesto de Fórmula I sea la base libre.

Preparaciones y Ejemplo

Los siguientes métodos, preparaciones y ejemplos ilustran adicionalmente la invención y representan una síntesis típica del compuesto de la invención. Los reactivos y los materiales de partida se obtienen fácilmente o un experto en la materia los puede sintetizar fácilmente. Debe entenderse que las Preparaciones y los Ejemplos se exponen a modo de ilustración y no de limitación, y que un experto en la técnica puede realizar diversas modificaciones. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las rutas descritas, se pueden combinar de diferentes maneras, o junto con etapas de diferentes procedimientos, para preparar un compuesto de Fórmula I, o sales del mismo. Los productos de cada etapa se pueden recuperar mediante métodos convencionales bien conocidos en la técnica, que incluyen extracción, evaporación, precipitación, cromatografía, filtración, trituración y cristalización. Además, todos los sustituyentes, a menos que se indique lo contrario, son como se han definido previamente.

A menos que se indique lo contrario, los compuestos ilustrados en este documento se pueden nombrar y numerar utilizando la versión 4.0 de Accelrys® Draw (Accelrys, Inc., San Diego, CA.), IUPACNAME ACDLABS o ChemDraw® Ultra 12.0. La configuración R o S del compuesto de la invención se puede determinar mediante técnicas convencionales, tales como análisis con rayos X y correlación con el tiempo de retención de HPLC quiral. Los isómeros, enantiómeros y diastereómeros individuales pueden estar separados o resueltos por un experto en la técnica en cualquier punto conveniente en la síntesis del compuesto de Fórmula I, por métodos tales como técnicas de cristalización selectiva o cromatografía quiral (véase, por ejemplo, J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981 y E.L. Eliel y S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994). Las designaciones "isómero 1" e "isómero 2" se refieren a los compuestos que eluyen de la cromatografía quiral como primero y segundo, respectivamente, y si la cromatografía quiral se inicia temprano en la síntesis, la misma designación se aplica a compuestos intermedios y ejemplos posteriores. Además, ciertos compuestos intermedios descritos en los siguientes esquemas pueden contener uno o más grupos protectores de nitrógeno. El grupo protector variable puede ser igual o diferente en cada caso, dependiendo de las condiciones de reacción particulares y las transformaciones particulares que se van a realizar. Las condiciones de protección y desprotección son bien conocidas por el experto en la materia y se describen en las publicaciones (véase, por ejemplo, "Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", cuarta edición, por Peter G.M. Wuts y Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007).

Los reactivos y los materiales de partida los obtiene fácilmente un experto en la materia. El documento de patente de EE.UU. nº 7.968.587, describe la síntesis de éster isopropílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico.

- 5 Tal y como se emplea en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados indicados: "ADME" se refiere a absorción, distribución, metabolismo y excreción; "DMAC" se refiere a *N,N*-dimetilacetamida; "DMF" se refiere a dimetilformamida; "ECG" se refiere a electrocardiográfico; "EDTA" se refiere a ácido etilendiaminotetraacético; "ee" se refiere a exceso enantiomérico; "EtOAc" se refiere a acetato de etilo; "EtOH" se refiere a etanol; "HOAc" se refiere a ácido acético; "HPLC" se refiere a cromatografía líquida de alto rendimiento; "LCMS" se refiere a espectrometría de masas por cromatografía líquida; "LY" se refiere al Ejemplo 1; "MeOH" se refiere a metanol; "min" se refiere a minutos; "MS" se refiere a espectrometría de masas; "MTBE" se refiere a éter terc-butilmetílico; "NOAEL" se refiere a nivel sin efecto adverso observable; "Orx" se refiere a orquiectomizado; "SE" se refiere a error estándar; "TE" se refiere a enantato de testosterona; "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético; "THF" se refiere a tetrahidrofurano; y "UV" se refiere a ultravioleta.

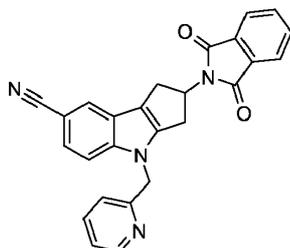
Compuesto intermedio 1

- 15 (±)-2-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-7-carbonitrilo

Mezclar (±)-2-(3-oxo-ciclopentil)-isoindol-1,3-diona (12,7 g, 55,3 mmol) y 4-cianofenilhidrazina-HCl (8,53 g, 50,3 mmol) en HOAc (200 mL) y HCl 4 N en dioxano (50 mL). Usando agitación mecánica, calentar la reacción a 90°C durante 18 h, luego añadir HCl 4 N en dioxano adicional (20 mL). Calentar la reacción a 100°C durante 18 h. Diluir la mezcla de reacción con agua (600 mL) y recoger un sólido negro mediante filtración al vacío. Someter a ultrasonidos el sólido con MeOH (200 mL), luego recoger y secar en un horno de vacío para proporcionar 10,94 g (66%) de un sólido marrón grisáceo. MS (m/z): 328 (M+H), 326 (M-H).

Compuesto intermedio 2

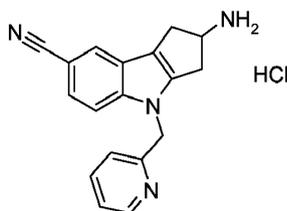
(±)-2-(1,3-Dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-7-carbonitrilo



- 25 Calentar una mezcla de 2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-7-carbonitrilo (5 g, 15,3 mmol) en DMF (25 mL) a 40°C. Añadir carbonato de cesio (10,4 g, 32,4 mmol) y bromhidrato de 2-bromometilpiridina (4,05 g, 16 mmol). Agitar la mezcla a 40°C durante 24 h. Añadir la mezcla a agua (250 mL) y agitar durante 1 h. Filtrar los sólidos y secar el material recogido al vacío. Añadir el sólido a EtOH (25 mL) y someter a reflujo durante 30 min. Enfriar la mezcla a 22°C y filtrar. Secar el sólido al vacío hasta tener un peso constante para proporcionar 4,8 g (75%) del compuesto del título. MS (m/z): 419 (M+H).

Compuesto intermedio 3

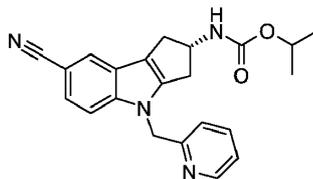
Clorhidrato de (±)-2-amino-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-7-carbonitrilo



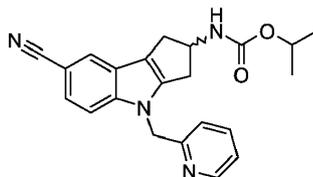
- 35 Añadir 2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-7-carbonitrilo (77 g, 184 mmol) a THF (1,3 L) y EtOH (230 mL). Agitar la mezcla durante 10 minutos y luego añadir monohidrato de hidrazina (20 mL, 400 mmol). Agitar la mezcla a 22°C durante 16 h. Filtrar la mezcla y evaporar las aguas madres. Disolver el residuo en diclorometano (300 mL). Añadir una solución de HCl 4 M en dioxano (50 mL) y agitar la mezcla durante 2 h. Filtrar y secar el sólido aislado al vacío hasta tener un peso constante para proporcionar 54 g (90%) del compuesto del título. MS (m/z): 289 (M+H).

- 40 Ejemplo 1

Éster isopropílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico



Etapa 1: Éster isopropílico de ácido (±)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico



- 5 A una solución de (±)-2-amino-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-7-carbonitrilo (2,32 g, 8,05 mmol) y diisopropiletilamina (9,65 mmol, 1,68 mL) en diclorometano (10 mL), añadir cloroformiato de isopropilo (8,86 mmol, 8,9 mL) y agitar a temperatura ambiente durante la noche. Diluir con acetato de etilo y lavar con 10% de solución de K_2CO_3 (2x). Secar la porción orgánica sobre Na_2SO_4 , filtrar y concentrar para obtener 3,3 g. Purificar mediante cromatografía en columna (0-100% acetato de etilo/diclorometano) para obtener 2,48 g (82%) del producto
10 racémico. LCMS 375,2 (M+H).

Procedimiento alternativo:

- Añadir clorhidrato de (±)-2-amino-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-7-carbonitrilo (35 g, 108 mmol) a una mezcla de diclorometano (350 mL) y piridina (70 mL). Agitar la mezcla bajo atmósfera de nitrógeno y enfriar a 5°C. Añadir cloroformiato de isopropilo (solución 1 M en tolueno, 162 mL, 162 mmol). Retirar el baño de hielo y agitar
15 la mezcla a 22°C. Después de 16 h, evaporar el disolvente. Añadir el residuo resultante a agua (350 mL) y agitar 2 h. Filtrar y secar el sólido recogido al vacío a 45°C. Añadir el sólido a acetato de etilo (400 mL) y calentar la mezcla a reflujo. A continuación enfriar a 22°C y filtrar el sólido. Añadir el sólido húmedo a acetato de etilo (200 mL) y calentar a reflujo durante 30 min. Enfriar la mezcla a 22°C durante una hora y luego enfriar a 0-5°C durante 5 min. Filtrar la mezcla y secar el sólido aislado a vacío hasta tener un peso constante para proporcionar 23 g (62%) del compuesto
20 del título. MS (m/z): 374 (M+H).

Etapa 2: Éster isopropílico de ácido (R)- y (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b] indol-2-il)-carbámico

- Separar los enantiómeros del Ejemplo 1 mediante cromatografía quiral preparativa usando una columna Chiralpak AD (8 x 33 cm), eluyendo con EtOH al 100% a 375 mL/min y 250 nm. Isómero 1 (R): 1,14 g, 99,9% de ee
25 (condiciones analíticas: columna Chiralpak AD-H, eluyendo con EtOH al 100%/dimetiletilamina al 0,2%; LCMS 375,2 (M+H). Isómero 2 (S): 1,67 g, 99,4% de ee; LCMS 375,2 (M+H).

Ruta alternativa al Ejemplo 1, Isómero 2: Éster isopropílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico

- Añadir éster isopropílico de ácido (S)-7-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico (13 g, 41,3 mmol) a DMF (100 mL) y calentar la solución a 40°C. Añadir carbonato de cesio (42 g, 129 mmol) en una porción y agitar la mezcla durante 30 minutos a 40°C. Añadir bromhidrato de 2-bromometilpiridina (21 g, 83 mmol) en porciones durante 4 h. Agitar la mezcla a 40°C durante 18 h. Añadir la mezcla a agua fría (1 L) a 0 a 5°C y agitar durante 30 min. Aislar el sólido mediante filtración y secar al vacío hasta tener un peso constante. Hacer pasar el material sobre una almohadilla de gel de sílice eluyendo con CH_2Cl_2 /EtOAc (7/3). Combinar las fracciones que contienen el
35 producto y evaporar el disolvente para proporcionar un sólido marrón pálido. Recristalizar en acetato de etilo para proporcionar 15,3 g (77%) de los compuestos del título. LC/MS (m/z) 375 (M+H).

Segunda ruta alternativa:

(Condiciones de HPLC - columna: Zorbax® SB-Fenilo, resolución rápida, 4,6 x 75 mm, 3,5 micras; disolvente: 10% de acetonitrilo/90% de agua con 0,05% de TFA; UV a 230 nm)

- 40 Etapa 1: Éster *tert*-butílico de ácido (±)-(7-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico

Equipar un matraz de fondo redondo de 3 bocas y 12 L con agitación superior, termopar, embudo de adición, entrada de nitrógeno y baño de enfriamiento. Cargar el matraz con (±)-2-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-7-carbonitrilo (500 g, 1,53 moles) y THF (5 L). Agitar la suspensión resultante a temperatura ambiente. Añadir monohidrato de hidrazina (185,6 mL, 3,82 moles) en una corriente lenta desde un

embudo de adición durante 10 minutos. Agitar la mezcla resultante a temperatura ambiente durante la noche (aproximadamente 18 h). Añadir agua fría al baño y cargar el embudo de adición con dicarbonato de di-*t*-butilo (875,1 g, 4,01 moles; previamente fundido en un líquido). Añadir a la mezcla de reacción durante 2 horas, manteniendo la temperatura del recipiente por debajo de 30°C. Después de 15 minutos, analizar mediante HPLC para alcanzar un consumo completo de la amina intermedia. Filtrar la mezcla de reacción a través de una almohadilla de polipropileno en un filtro de mesa de acero inoxidable y lavar la torta del filtro resultante con acetato de etilo (2 × 1 L). Concentrar el material filtrado al vacío para eliminar la mayor parte del THF. Purificar la mezcla resultante (aproximadamente 1 L) sobre un tapón de gel de sílice (4 kg de Kieselgel-60), eluyendo con acetato de etilo. Concentrar el eluyente recuperado al vacío hasta tener un aceite oscuro. Añadir heptano (2 L) y acetato de etilo (350 mL) y hacer girar el contenido en un evaporador rotatorio a temperatura ambiente durante 2 h. Añadir hielo al baño y hacer girar la suspensión resultante a 5°C durante 2 h adicionales. Filtrar los sólidos, aclarar con heptano/acetato de etilo 90/10 (2 × 500 mL) y secar al vacío a 35°C. Obtener el compuesto del título como un sólido marrón claro con un rendimiento del 91,6%.

Etapa 2: Éster *terc*-butílico de ácido (±)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[*b*]indol-2-il)-carbámico

Equipar un matraz de salida inferior de 20 L con agitación superior, termopar y entrada de nitrógeno. Cargar el matraz con éster *terc*-butílico de ácido (±)-(7-ciano-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[*b*]indol-2-il)-carbámico (500 g, 1,68 mol) y diclorometano (5 L). Comenzar la agitación y añadir hidrogenosulfato de tetra *n*-butilamonio (58,9 g, 0,168 mol) seguido de bromhidrato de 2-(bromometil)piridina (510,4 g, 2,02 moles). Añadir agua desionizada (2 L) seguido de una solución de NaOH al 50% (445,3 mL, 8,41 moles). Agitar fuertemente la mezcla resultante durante la noche (aproximadamente 21 h). Detener la agitación, permitir que las capas se separen y desechar la capa acuosa (superior). Lavar los materiales orgánicos con agua desionizada (3 × 4 L), secar sobre sulfato de sodio y concentrar al vacío hasta aproximadamente 500 mL. Purificar el material bruto sobre un tapón de gel de sílice (7 kg de Kieselgel 60) usando acetato de etilo/heptano 1:1 como eluyente. Concentrar el eluyente al vacío para proporcionar 560 gramos del compuesto del título como un sólido blanquecino (81,4%).

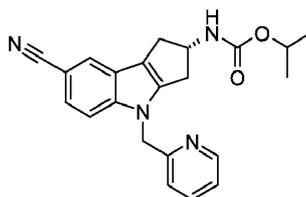
Etapa 3: Isómero 1, éster *terc*-butílico de ácido (R)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[*b*]indol-2-il)-carbámico e Isómero 2, éster *terc*-butílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[*b*]indol-2-il)-carbámico

Usar el siguiente método analítico de HPLC quiral para analizar los enantiómeros: columna Chiralpak AD-H de 4,6 × 150 mm (Chiral Technologies), fase móvil de acetonitrilo/etanol desnaturalizado de grado 3A/dimetiletilamina 20:80:0,2, caudal de 0,6 mL/min, detección UV a 255 nm. El enantiómero 1 eluye a los 4,0 min y el enantiómero 2 eluye a los 5,2 min. Una impureza del 8% (255 nm) eluye a los 3,6 min. Purificar el éster *terc*-butílico de ácido (±)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[*b*]indol-2-il)-carbámico (528 g) mediante HPLC quiral preparativa usando las siguientes condiciones: columna Chiralpak AD de 8 × 33 cm, misma fase móvil que la analítica, caudal de 375 mL/min, detección UV a 270 nm. Disolver 108 g de muestra en la fase móvil hasta tener una concentración final de 75 mg/mL. Cargar 4,0 g/inyección con la fracción de enantiómero 1 que eluye entre 3,5-5,5 min y de enantiómero 2 que eluye entre 6-10 min. Establecer el tiempo de ejecución final en 7,5 min/inyección con apilamiento parcial del perfil del enantiómero 2 que eluye justo después de cada inyección para reducir el consumo de disolvente. Purificar los 420 g restantes sobre un tapón de sílice usando gel de sílice Merck 9385 60 Angstrom malla de 230-400, eluyendo con un sistema de disolvente a base de diclorometano/heptano/éter metil *t*-butílico 1:2:7. Usar una almohadilla de sílice de 3,5 kg con filtración al vacío con 140 g de muestra/tapón. El racemato comienza a emerger después de 5 volúmenes de columna. Usar éter metil *t*-butílico al 100% seguido de acetona al 100% para sacar el racemato restante del tapón. Obtener un total de 358,5 g de racemato puro al 98% de esta manera. Resolver este material como anteriormente mediante HPLC quiral preparativa. Obtener 208,8 g (99,9% de ee) de enantiómero 1 (isómero R) y 197 g (99,6% de ee) de enantiómero 2 (isómero S).

Etapa 4: Clorhidrato de (S)-2-amino-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[*b*]indol-7-carbonitrilo

Equipar un matraz de fondo redondo de 3 cuellos de 3 L con una camisa calefactora, agitador de aire, sonda de temperatura, entrada de nitrógeno y embudo de adición. Cargar el matraz con éster *terc*-butílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[*b*]indol-2-il)-carbámico (85,0 g, 0,22 moles) y EtOH (850 mL). Añadir HCl concentrado (180 mL, 2,20 moles) en una porción. Calentar la solución resultante a 45-50°C y agitar durante 90 minutos, después de lo cual analizar mediante HPLC para indicar un consumo completo del material de partida. Transferir la mezcla a un matraz Buchi, diluir con agua desionizada (595 mL) y concentrar al vacío para eliminar el EtOH. Añadir EtOAc en dos porciones (2 × 170 mL) y volver a raspar para eliminar tanto el EtOAc como el EtOH residual. Transferir el material concentrado acuoso a un matraz de reacción de 5 L y enfriar a 10-15°C. Mientras que se mantiene la temperatura de la reacción a <30°C, ajustar el pH de la solución a 11-12 mediante la adición gota a gota de NaOH 5 M (950 mL). Extraer la mezcla resultante con CH₂Cl₂ (1300 mL, 800 mL). Lavar los extractos combinados de CH₂Cl₂ con agua desionizada (500 mL), secar sobre Na₂SO₄ y concentrar al vacío para proporcionar el compuesto del título como un sólido verde claro (65,0 g, 103%).

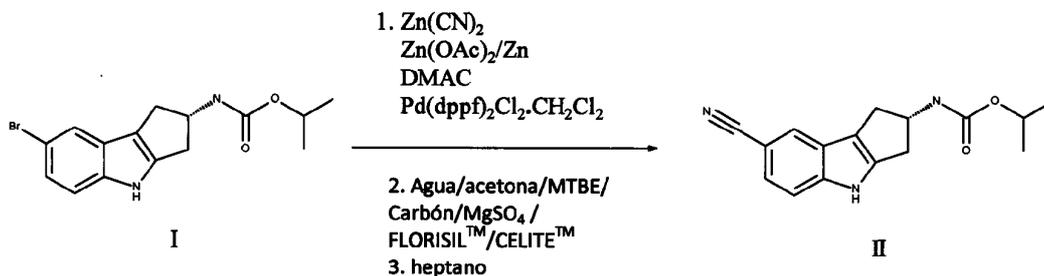
Etapa 5: Éster isopropílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[*b*]indol-2-il)-carbámico



Equipar un matraz de reacción de 2 L con un baño de enfriamiento, agitador de aire, sonda de temperatura y embudo de adición. Cargar el matraz con clorhidrato de (S)-2-amino-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahydrociclopenta[b]indol-7-carbonitrilo (62,8 g, 0,218 moles), DMF (188 mL) y trietilamina (33,4 mL, 0,240 mol). Enfríar la solución resultante a 0°C usando un baño de hielo/acetona. Mientras que se mantiene la temperatura a <10°C, añadir cloroformiato de isopropilo (218 mL, 0,218 mol, 1 M en tolueno) gota a gota a través de un embudo de adición. Cuando se completa la adición, retirar el baño de enfriamiento y permitir que la mezcla se caliente a temperatura ambiente. Después de 1 hora, analizar mediante HPLC para indicar que la reacción se ha completado y verter la mezcla en una solución de agua desionizada (1256 mL) y EtOAc (1884 mL). Separar las capas, filtrar la capa orgánica y volver a lavar con una solución de agua:salmuera 1:1, a continuación secar sobre Na₂SO₄. Concentrar al vacío a 55°C hasta aproximadamente 15 volúmenes, y permitir que la solución resultante se enfríe a temperatura ambiente, proporcionando un precipitado blanco. Añadir heptano (628 mL) y agitar durante 20 min. Concentrar la mezcla de nuevo hasta aproximadamente 15 volúmenes. Filtrar los sólidos, lavar con heptano y secar para proporcionar el compuesto del título como un sólido blanco esponjoso (68,9 g, 84,5%). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆), δ 8,49 (dd, 1H), 7,86 (d, 1H, *J* = 1,5), 7,71-7,75 (m, 1H), 7,60 (d, 1H, *J* = 9,0), 7,57 (d, 1H, *J* = 9,0), 7,36 (dd, 1H), 7,28-7,26 (m, 1H), 7,14 (d, 1H, *J* = 7,5), 5,44 (s, 2 H), 4,79-4,72 (m, 1H), 4,71-4,66 (m, 1H), 3,22-3,20 (m, 1H), 3,16-3,12 (m, 1 H), 2,73 -2,66 (m, 2 H), 1,16 (dd, 6 H).

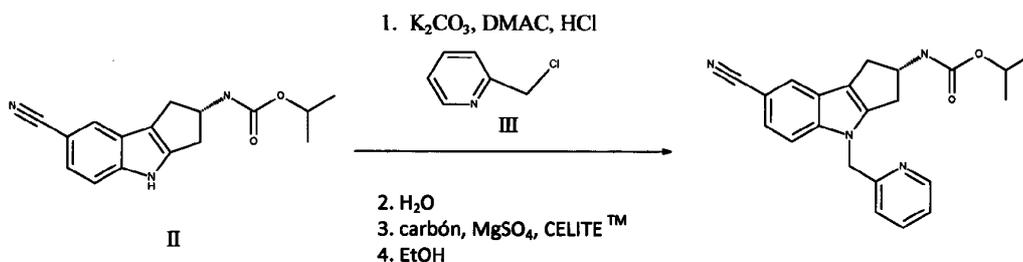
3^a Síntesis alternativa

Etapa 1



Tratar el éster isopropílico de ácido (7-bromo-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indo-2-il)-carbámico (I) con Zn(CN)₂, Zn(OAc)₂, Zn y Pd(dppf)₂Cl₂·CH₂Cl₂ en DMAC para proporcionar el éster isopropílico de ácido 7-ciano-1,2,3,4-tetrahydro-ciclopenta[b]indol-2-il-carbámico (II). Añadir agua para precipitar el grado técnico II. Volver a disolver el compuesto intermedio II en una mezcla de MTBE y acetona y filtrar la suspensión resultante para eliminar los componentes inorgánicos. Tratar el material filtrado que contiene II con carbón, MgSO₄ y FLORISIL™ antes del aislamiento de II como un cristal sólido tras la cristalización de heptano.

Etapa 2



Hacer reaccionar el compuesto intermedio II con clorhidrato de cloruro de 2-picolilo (III) y K₂CO₃ en DMAC para obtener el Ejemplo 1 de grado técnico. Aislar el Ejemplo 1 de grado técnico mediante la adición de agua y filtración. Recristalizar tres veces en EtOH para proporcionar el Ejemplo 1.

Ensayos, estudios *in vivo* y estudios clínicos

Ensayo con ratas orquiectomizadas

Se utiliza un total de 86 ratas Sprague-Dawley macho vírgenes (Harlan Sprague Dawley Inc). Se operaron 14 ratas de manera simulada (Sham) y 72 ratas se castraron a los 6 meses de edad. Las ratas se mantienen en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a 22°C con acceso a voluntad a los alimentos (TD 89222 con 0,5% de Ca y 0,4% de P, Teklad, Madison, WI) y agua. Se permite que las ratas Orx tengan pérdida ósea durante 2 meses, se pesan y se aleatorizan en grupos de tratamiento, como se detalla en la Tabla 1 a continuación. Los grupos 1 y 2 se sacrifican el primer día como controles de punto basal, a los grupos 3 y 4 controles de Sham (simulación) y Orx se les administra vehículo (0,25% de CMC/Twin80). El grupo 5 recibe PTH (1-38) sc como una inyección. Los grupos 6 a 13 reciben SARMS por vía oral mediante sonda. Todos los tratamientos son una vez al día durante 2 meses.

10 Tabla 1

Nº de Grupo	Grupo de tratamiento	Mes 8 día 0	Mes 10 día 60	Vía de administración
1	Simulado		7	po
2	Orx		6	po
3	Pre-Simulado		7	po
4	Pre-Orx		7	po
5	Orx + PTH (10 ug/kg/d)		6	sc
6	Orx + Ejemplo 1 (1 mg/kg/d)		6	po
7	Orx + Ejemplo 1 (3 mg/kg/d)		7	po
8	Orx + Ejemplo 1 (10 mg/kg/d)		7	po
9	Orx + Ejemplo 1 (20 mg/kg/d)		7	po

Para la histomorfometría dinámica, todas las ratas, excepto las del punto basal, reciben xilenol naranja 90 mg/kg s.c. el primer día que se inicia el tratamiento. Todas las ratas reciben 10 mg/kg de calceína s.c. los días 14, 13 y los días 4 y 3 antes de sacrificarlas.

15 Preparaciones de muestras:

PTH (1-38) (Zeneca (Cambridge Research Biochemicals) Ref nº - DG-12-14071, lote 14071): vehículo solución salina acidificada con suero de rata inactivado al 2%.

EJEMPLO 1: 1% de CMC/0,25% de Tween 80 0,5 mL/rata basado en el peso corporal.

Puntos finales y parámetros medidos

20 1. Peso corporal: antes y dos veces por semana, volumen de la dosificación ajustado en consecuencia

2. RMN: al inicio y al final del estudio

3. Músculo: se obtienen pesos húmedos a partir del gastrocnemio izquierdo, cuádriceps, sóleo, elevador del ano, vesícula seminal (SV), próstata y corazón, después se extraen para un análisis de ARN o una histología.

25 4. Las muestras de suero terminal se recogen a partir de todos los animales y se almacenan a -80°C en 1x 100 µl (OCN), 2x 150 (IGF-1 y almacenamiento), 1x 300 µl (Chem 18), 2x 500 µl (una para BSALP y almacenamiento).

5. Extracción de huesos: se fija un fémur y una vértebra lumbar (en 50/50 de etanol/solución salina) para CT y una prueba biomecánica; se extrae una tibia para un análisis con PALP/calceína con desgarro de la epífisis (en etanol al 70%), otra tibia se extrae para un análisis histomorfométrico (etanol al 70%).

30 4. Determinación PK: unos días antes del final, 3 ratas en cada grupo de dosis (n = 3 solo de artículos de la prueba) se someten a un sangrado de la cola para obtener aproximadamente 0,2 mL de sangre en tubos con EDTA en los siguientes puntos de tiempo: 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 8 y 24 horas. Las muestras se transfieren a ADME para un análisis de la concentración plasmática.

Tabla 2

Nº de Grupo	Grupo de tratamiento	Peso de las SV, % de simulado
2	Orx	5,7
5	Orx + PTH (10 ug/kg/d)	5,6
6	Orx + Ejemplo 1 (1 mg/kg/d)	5,6
7	Orx + Ejemplo 1 (3 mg/kg/d)	5,5
8	Orx + Ejemplo 1 (10 mg/kg/d)	6,0
9	Orx + Ejemplo 1 (20 mg/kg/d)	6,1

5 Siguiendo un protocolo esencialmente como se ha descrito anteriormente, el Ejemplo 1 no producía una acumulación significativa de peso de las vesículas seminales después de un tratamiento de 8 semanas en una rata orquiectomizada hace 8 semanas y que era hipersensible a cualquier estimulación androgénica.

Tabla 3

Nº de Grupo	Grupo de tratamiento	LV-TBMC (mg) ±SD	LV-TBMD (mg/cm ³) ±SD	LV-TA (cm ²) ±SD
1	Simulado	1,7871 ± 0,0509	574,471 ± 13,385	0,3463 ± 9,71E-03
2	Orx	1,5814 ± 0,0521	508,314 ± 13,037	0,3456 ± 7,61E-03
3	Orx + Ejemplo 1 (1 mg/kg/d)	1,54 ± 0,0256	507,4 ± 6,931	0,3378 ± 7,08E-03
4	Orx + Ejemplo 1 (3 mg/kg/d)	1,79 ± 0,095	549 ± 15,965	0,362 ± 0,0138
5	Orx + Ejemplo 1 (10 mg/kg/d)	1,7757 ± 0,0607	562,843 ± 16,104	0,3521 ± 0,0125
6	Orx + Ejemplo 1 (20 mg/kg/d)	1,6943 ± 0,0264	529,357 ± 10,052	0,3563 ± 0,0102

10 El tratamiento con el Ejemplo 1 daba como resultado una acumulación significativa de la densidad mineral ósea trabecular de la vértebra lumbar (LV-TBMD) y mostraba una tendencia hacia un aumento en el contenido mineral óseo trabecular de la vértebra lumbar (LV-TBMC) y el área de sección transversal (LV-TA) después de un tratamiento de 8 semanas en una rata orquiectomizada hace 8 semanas como se muestra en la Figura 2 y la Tabla 3.

Estudio *in vivo* para explorar el efecto antagonista directo del Ejemplo 1 en presencia de TE

15 Se emplea un total de 36 ratas macho Wistar ORX y 6 ratas Wistar con operación simulada (orquiectomizadas a las 8 semanas de edad y se dejan que se atrofie durante 4 semanas). Las ratas se mantienen en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a 22°C con acceso a voluntad a los alimentos (TD 5001 con 0,95% de Ca y 0,67% de P, Teklad, Madison, WI) y agua. Las ratas se asignan al azar y se colocan en grupos de tratamiento (n = 6) según el peso corporal. La vía de administración para todos los grupos, excepto para TE, es oral. TE se administra por vía subcutánea. Al final de las 8 semanas de dosificación diaria, las ratas se sacrifican, se pesan y se extraen los tejidos. Elevadores del ano, próstatas y vesículas seminales se extraen de cada animal. Los resultados se muestran como medias ± SE.

Tabla 4

Nº de Grupo	Grupo de tratamiento	Mes 3 Día 0	Mes 5 Día 60	Vía de administración, Ej. 1	Vía de administración, TE
1	Simulado		6	po	sc
2	ORX + TE, 1 mg/kg/día		6	po	sc
3	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 3 mg/kg/d		6	po	sc
4	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 10 mg/kg/d		6	po	sc

ES 2 779 978 T3

Nº de Grupo	Grupo de tratamiento	Mes 3 Día 0	Mes 5 Día 60	Vía de administración, Ej. 1	Vía de administración, TE
5	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 30 mg/kg/d		6	po	sc

La combinación con enantato de testosterona (1 mg/kg-día) y varias dosis del Ejemplo 1 sugieren una tendencia a disminuir el peso húmedo de la vesícula seminal en mg normalizado al peso corporal en gramos, que es inducida solamente por TE como se muestra en la Figura 3 y la Tabla 4.

5 Comparaciones de medias de pesos húmedos de vesículas seminales

Comparaciones con un control usando el método de Dunnett

Grupo de control = d-ORX + TE, 1 mg/kg/d

d	Alfa
2,69715	0,05

10 Tabla 5

Nº de Grupo	Grupo	Abs(Dif)-LSD	Valor de p
1	Simulado	0,979	<,0001
2	ORX + TE, 1 mg/kg/día	-0,52	1,0000
3	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 3 mg/kg/d	-0,34	0,8628
4	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 10 mg/kg/d	0,078	0,0187
5	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 30 mg/kg/d	0,536	<,0001
6	ORX + Ejemplo 1, 10 mg/kg/d	1,411	<,0001
7	ORX, Vehículo	1,422	<,0001

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente diferentes.

El tratamiento conjunto a ratas SD con el Ejemplo 1 junto con 1 mg/kg de TE daba como resultado una disminución dependiente de la dosis del peso húmedo de la próstata en mg, normalizado al peso corporal en gramos, como se muestra en la Figura 4 y la Tabla 5.

15 Comparaciones de medias de pesos de próstatas

Comparaciones con un control usando el método de Dunnett

Grupo de control = d-ORX + TE, 1 mg/kg/d

d	Alfa
2,69715	0,05

20 Tabla 6

Nº de Grupo	Grupo	Abs(Dif)-LSD	Valor de p
1	Simulado	0,509	<,0001*
2	ORX + TE, 1 mg/kg/día	-0,15	1,0000
3	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 3 mg/kg/d	-0,11	0,9774
4	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 30 mg/kg/d	0,025	0,0167*
5	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 10 mg/kg/d	0,036	0,0099*
6	ORX, Vehículo	0,356	<,0001*
7	ORX + Ejemplo 1, 10 mg/kg/d	0,357	<,0001*

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente diferentes del grupo solo con TE.

Tabla 7

Nº de Grupo	Grupo de tratamiento	Peso de las SV, % de simulado	Peso de la próstata, % de simulado
2	ORX + TE, 1 mg/kg/día	58,5	45,5
3	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 3 mg/kg/d	53,5	42,7
4	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 10 mg/kg/d	42,0	30,3
5	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 30 mg/kg/d	29,2	31,2

Tabla 8

	Ki (nM) de hAR	CE50 (nM) de la expresión génica de LnCAP		
		PSA	AR	CLUSTERINA
R1881	0,38	0,034	0,035	0,37
Ejemplo 1	1,95	2,64	1,64	>100

- 5 Las comparaciones del Ejemplo 1 con la testosterona sintética, R1881, muestran que utilizando *in vitro* células de cáncer de próstata humano, el Ejemplo 1 es menos androgénico que R1881. Por el contrario, la afinidad de unión bioquímica con el receptor de andrógenos humano (Ki en nM) solo se reduce discretamente.

Estudio de cuatro semanas de toxicidad oral en ratas

- 10 Este estudio se realiza para evaluar la toxicidad potencial y la toxicocinética del Ejemplo 1 en ratas después de 4 semanas de exposición. Se administró a tres grupos de tratamiento de 10 ratas macho y 10 hembras CD[®] [CrI:CD[®](SD)], el artículo de la prueba con niveles de dosis respectivos de 15, 150 y 1500 mg/kg/día. Un grupo adicional de 10 animales/sexo sirve como control y recibe el vehículo, 5% de vitamina E TPGS, 1% de hidroxietilcelulosa, 0,05% de Antiespumante 1510-US de Dow Corning en agua purificada obtenida por ósmosis inversa. El artículo de la prueba o el vehículo se administra a todos los grupos mediante una sonda oral, una vez al día durante 28 días consecutivos, con un volumen de dosis de 15 mL/kg. Adicionalmente, tres grupos de 15 animales/sexo/grupo sirven como animales toxicocinéticos (TK) y reciben el artículo de la prueba de la misma manera y con el mismo volumen de dosis que los grupos de estudio principales con los niveles de dosis respectiva de 15, 150 y 1500 mg/kg/día. Un grupo adicional de tres animales/sexo sirve como control toxicocinético y recibe el vehículo de la misma manera y con el mismo volumen de dosis que los grupos tratados.

- 20 Las observaciones de la morbilidad, mortalidad, lesiones y la disponibilidad de alimentos y agua se realizan dos veces al día con todos los animales. Las observaciones de los signos clínicos se realizan semanalmente solo con los animales del estudio principal. Los pesos corporales se midieron y se registraron semanalmente en todos los animales y el consumo de alimentos se midió y se registró semanalmente en los animales del estudio principal. Los exámenes oftalmoscópicos se realizan antes de la prueba en todos los animales y antes de la autopsia terminal solo en los animales del estudio principal. Se recogen muestras de sangre para evaluaciones de patología clínica de 25 todos los animales del estudio principal en la autopsia. Las muestras de orina se recogen el último día de la dosificación. Las muestras de sangre para la determinación de las concentraciones plasmáticas del artículo de la prueba, se recogen a partir de animales TK en los puntos de tiempo designados los días 1 y 28. Después de la recogida de sangre final, los animales TK se sacrifican y los cadáveres se desechan sin una evaluación adicional. Las muestras de hígado para el análisis de inducción de enzimas hepáticas se recogen en la autopsia terminal a 30 partir de los animales del estudio principal. Al finalizar el estudio, se realizan exámenes de autopsia, se registran los pesos de los órganos y se examinan microscópicamente los tejidos de la próstata y las vesículas seminales. Se realiza un examen microscópico adicional en el testículo izquierdo de las primeras cinco ratas macho/grupo en la autopsia. Se determina que el ovario, el útero con el cuello uterino, la vagina y la glándula mamaria de las hembras son órganos diana.

- 35 Siguiendo un protocolo esencialmente como se ha descrito anteriormente, la exposición sistémica (AUC_{0-24 horas}) era muy variable y aumentaba de manera proporcional a la dosis con una exposición en las hembras superior a la observada en los machos. No había una evidencia de inducción enzimática microsómica hepática después de 28 días de dosificación.

- 40 No hubo muertes no programadas durante el estudio, ni signos clínicos relacionados con el artículo de la prueba. El peso corporal y el consumo de alimentos eran mayores entre las hembras que recibieron ≥ 150 mg/kg/día en relación con los controles. Estos efectos no afectaban a la salud general de los animales y no se consideraron adversos. No había efectos sobre el peso corporal o el consumo de alimentos evidentes en los machos.

No había efectos relacionados con el artículo de la prueba sobre los parámetros de hematología, coagulación o análisis de orina en ninguno de los sexos y no había efectos relacionados con el artículo de la prueba sobre los parámetros de química clínica en los machos. Los efectos relacionados con el artículo de la prueba sobre los parámetros de química clínica en las hembras se limitaban a aumentos en la fosfatasa alcalina con dosificaciones de 150 y 1500 mg/kg/día (incrementos de 1,33 y 1,45 veces, respectivamente), disminuciones en la proteína total con dosificaciones de 150 y 1500 mg/kg/día (disminuciones de 9% y 10%, respectivamente), disminución en la albúmina con dosificaciones de 150 y 1500 mg/kg/día (disminución del 12% con ambas dosificaciones) y disminución en las globulinas solo con 1500 mg/kg/día (11% de disminución en relación con los controles). Estos cambios son de magnitud mínima y no se consideran adversos.

No había cambios en el peso de los órganos o macroscópicos relacionados con el artículo de la prueba en ninguno de los sexos, ni cambios microscópicos relacionados con el artículo de la prueba en los machos. Los cambios microscópicos relacionados con el artículo de la prueba estaban presentes en las hembras en la glándula mamaria y los ovarios con niveles de dosis ≥ 15 mg/kg/día y en el útero (con cuello uterino) y la vagina con niveles de dosis ≥ 150 mg/kg/día. Estos cambios microscópicos, que son compatibles con una prolongación del ciclo reproductor relacionado con la dosis en las ratas hembras con niveles de dosis ≥ 150 mg/kg/día, se consideran relacionados con la farmacología del artículo de la prueba y no se consideran adversos.

Basándose en los resultados descritos anteriormente, se considera que el NOAEL para este estudio es de 1500 mg/kg/día, la dosis más alta administrada. Una exposición sistémica media en estado estacionario ($AUC_{0-24 \text{ horas}}$) con la dosis de NOAEL de 1500 mg/kg/día era de 102337 ng*h/mL en los machos y de 216853 ng*h/mL en las hembras.

Estudio de seis meses de toxicidad oral en ratas

Los fines de este estudio es investigar la toxicidad y determinar la toxicocinética del Ejemplo 1 en la rata Sprague-Dawley después de una sonda oral diaria durante 26 semanas y evaluar la reversibilidad de cualquier hallazgo después de un período de recuperación de 12 semanas. Los animales tratados reciben el Ejemplo 1 en 5% de vitamina E TPGS, 1% de hidroxietilcelulosa, 0,05% de Antiespumante 1510-US de Dow Corning en agua purificada mediante sonda oral con dosis diarias de 15, 150 o 1500 mg/kg/día. Los controles de vehículo (15 ratas/sexo en el estudio principal y 5 ratas/sexo en el estudio de recuperación) reciben una dosis por sonda oral diaria de 5% de vitamina E TPGS, 1% de hidroxietilcelulosa, 0,05% de Antiespumante 1510-US de Dow Corning en agua purificada. Quince machos y 15 hembras son asignados a cada grupo de tratamiento del estudio principal. Cinco machos y 5 hembras son asignados al estudio de recuperación para los grupos de control de vehículo y los grupos de 150 mg/kg/día. Los grupos satélite adicionales de 6 ratas/sexo para el grupo de control de vehículo y 12 ratas/sexo para los grupos tratados con el Ejemplo 1, se evalúan para determinar la toxicocinética. Todas las administraciones se realizan con un volumen de 15 mL/kg.

Después de una administración diaria mediante sonda oral, una exposición al Ejemplo 1 es muy variable con todas las dosis, aunque se observan valores medios de AUC (0-24 h) no superpuestos en machos y hembras entre las dosis más bajas y más altas, particularmente los días 91 y 182. Generalmente, las exposiciones a una dosis única y a dosis múltiples ($C_{\text{máx}}$ y AUC (0-24 h)) aumentan menos que proporcionalmente de 15 a 1500 mg/kg/día tanto para machos como para hembras. Las hembras muestran todos los días exposiciones más altas que los machos. El día 1, la exposición de las hembras es hasta 7 veces mayor que la de los machos, pero esta diferencia disminuye de 1 a 3 veces el día 182. Después de dosis múltiples, no se observa acumulación del Ejemplo 1 en ningún grupo de dosis hasta el día 182.

Siguiendo un protocolo esencialmente como se ha descrito anteriormente, no había ninguna mortalidad atribuida a la administración del Ejemplo 1 durante el curso del estudio. No había efectos relacionados con el compuesto sobre la oftalmología o los parámetros de análisis de orina.

Los signos clínicos relacionados con el Ejemplo 1 se observaron de una forma dependiente de la dosis en las hembras tratadas y consistían en un aumento de la incidencia de pelaje grasiento y una disminución de la incidencia de cubierta delgada del pelaje. Durante las primeras 6 semanas del período de recuperación, también se observó un pelaje grasiento en las hembras tratadas previamente con 150 mg/kg/día, pero ya no estaba presente en estos animales en la segunda mitad del período de recuperación de 12 semanas. No había ninguna diferencia en la incidencia de la cubierta delgada del pelaje en las hembras tratadas y las de control al final del período de recuperación.

En los machos tratados con el Ejemplo 1, había una disminución en el peso corporal con todos los niveles de dosis, alcanzando -12% cuando se comparaba con los machos de control al final del período de tratamiento. En las hembras, había una tendencia opuesta, ya que las hembras tratadas alcanzaron un 22% más de peso corporal que los controles simultáneos al final del período de tratamiento. El cambio en los machos todavía se observaba al final del período de recuperación, pero no en las hembras.

Los machos tratados mostraban un menor consumo de alimentos, y las hembras tratadas generalmente mostraban un mayor consumo de alimentos que los controles a lo largo del estudio, en correlación con los efectos relacionados

con el tratamiento sobre el peso corporal. El consumo de alimentos para los machos tratados permaneció más bajo que los controles durante el período de recuperación, pero la magnitud de la diferencia se volvió insignificante al final del período de 12 semanas. No había ninguna diferencia en el consumo de alimentos de las hembras tratadas, en comparación con los controles durante el período de recuperación.

- 5 La administración del Ejemplo 1 con dosificaciones ≥ 150 mg/kg/día estaba asociada con un aumento del recuento de neutrófilos, el recuento absoluto de reticulocitos, la fosfatasa alcalina, el potasio y la disminución de las globulinas en las hembras. Había un aumento de la aspartato aminotransferasa, la alanina aminotransferasa, la gamma glutamil transferasa, la fosfatasa alcalina y la bilirrubina total con 1500 mg/kg/día en machos. Se observó una
10 disminución mínima de proteína total y de albúmina en las hembras con todos los niveles de dosis. Después de un período de recuperación de 12 semanas, no había diferencias en los parámetros de hematología, bioquímica clínica y análisis de orina en las ratas que recibieron 150 mg/kg/día, lo que indica una reversibilidad de esos hallazgos.

- Los hallazgos relacionados con el tratamiento con el Ejemplo 1 se asociaron principalmente con tejidos reproductores masculinos y femeninos y, en general, se atribuyeron a la farmacología de la molécula. Los hallazgos
15 adversos se limitaron a los testículos y tuvieron lugar en todos los grupos tratados con el Ejemplo 1. Había una disminución en el peso de los testículos y epidídimos en el grupo de 1500 mg/kg/día, y en machos aislados que recibieron 15 o 150 mg/kg/día que tenían lesiones testiculares. Se observaron hallazgos macroscópicos en tejidos reproductores masculinos relacionados con la administración del Ejemplo 1 en los testículos y epidídimos. Se observaron testículos blandos y/o pequeños y epidídimos pequeños en machos que recibieron ≥ 50 mg/kg/día y en un solo macho que recibió 15 mg/kg/día. Los hallazgos microscópicos en los testículos se observaron con todos los
20 niveles de dosis, tenían una naturaleza degenerativa e incluían un agotamiento de las espermatidas alargadas, atrofia de las células intersticiales y necrosis de células aisladas de espermatoцитos. Los hallazgos testiculares eran compatibles con una disminución de la hormona luteinizante (LH) circulante, lo que daba como resultado una disminución de la señalización de la LH a nivel de las células intersticiales. Además, la disminución de los niveles circulantes de LH daba como resultado una disminución de la secreción de testosterona desde los testículos, reduciendo de este modo la señalización de andrógenos a nivel de los túbulos seminíferos. El tratamiento con el
25 Ejemplo 1 también se asociaba con una disminución del peso de la próstata, observada en machos que recibieron ≥ 150 mg/kg/día. Estos cambios reproductores y endocrinos en los machos podían estar relacionados con la actividad farmacológica del Ejemplo 1, pero no se identificaron previamente en un estudio de 4 semanas. Aunque es compatible con la farmacología relacionada con el Ejemplo 1, basándose en la magnitud, los hallazgos morfológicos en los testículos observados con todos los niveles de dosis, se consideraron que eran adversos. Los efectos sobre los tejidos reproductores masculinos y la LH y la testosterona revirtieron al final del período de recuperación de 12 semanas.

- La administración del Ejemplo 1 estaba asociada con una disminución del peso del ovario y con ovarios macroscópicamente pequeños en hembras con todos los niveles de dosis. Se observó una disminución en el peso
35 de la hipófisis y en los niveles circulantes de LH en las hembras que recibieron ≥ 150 mg/kg/día. Se observaron hallazgos microscópicos en tejidos reproductores femeninos relacionados con la administración del Ejemplo 1. Los hallazgos microscópicos en el útero y la vagina se observaron con niveles de dosis ≥ 150 mg/kg/día, mientras que los hallazgos en el ovario y la glándula mamaria se observaron con todos los niveles de dosis. Los hallazgos microscópicos observados en los tejidos reproductores femeninos y la disminución de los niveles circulantes de LH, probablemente estaban relacionados con la actividad farmacológica del Ejemplo 1. Los hallazgos en los tejidos
40 reproductores femeninos, incluyendo la glándula mamaria, eran compatibles con los descritos previamente en el estudio de toxicidad con dosis repetidas de 4 semanas. Los cambios reproductores femeninos probablemente habían afectado a la capacidad reproductora, pero no a la salud general de los animales. Los efectos sobre los tejidos reproductores femeninos y la LH revirtieron al final del período de recuperación de 12 semanas.

- La administración del Ejemplo 1 estaba asociada con una disminución del peso del timo en las hembras con todos los niveles de dosis y en los machos que recibieron ≥ 150 mg/kg/día. Se observaron hallazgos macroscópicos de timo pequeño en machos que recibieron 1500 mg/kg/día. Se observaron hallazgos microscópicos adicionales relacionados con la administración del Ejemplo 1 en el hígado, el bazo, el timo (machos) y la piel (hembras), con niveles de dosis ≥ 150 mg/kg/día. Se observaron hallazgos microscópicos en la piel con todos los niveles de dosis.
50 Todos estos cambios ya no estaban presentes al final del período de recuperación de 12 semanas. No había ningún otro hallazgo microscópico, cambio en el peso de los órganos ni hallazgo macroscópico relacionado con la administración del Ejemplo 1.

- En conclusión, la administración del Ejemplo 1 mediante una sonda oral, diariamente con niveles de dosis de 0, 15, 150 y 1500 mg/kg/día durante 26 semanas, se asociaba con cambios morfológicos y hormonales en los tejidos
55 reproductores masculinos y femeninos, que en general se atribuían a la farmacología de la molécula, y eran reversibles después de 12 semanas en animales tratados previamente con 150 mg/kg/día. Los hallazgos adversos se limitaron a los testículos y tenían lugar en todos los grupos tratados con el Ejemplo 1. En función de la magnitud de estos cambios testiculares degenerativos, no se pudo establecer un nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) en este estudio y, por lo tanto, se considera que es < 15 mg/kg/día.

- 60 Estudio de la fertilidad masculina y toxicocinética en ratas

Los fines de este estudio es determinar los posibles efectos adversos en el proceso reproductor, resultantes del tratamiento de ratas macho antes y durante el período de apareamiento. Esto incluye la identificación de efectos reproductores funcionales en el macho. Además, se realiza una evaluación toxicocinética de los niveles plasmáticos del Ejemplo 1 en animales satélite.

5 El Ejemplo 1 se administra mediante una sonda oral con dosis de 0, 3, 30 y 1000 mg/kg. Las ratas macho (20/grupo) se tratan diariamente durante 10 semanas antes del apareamiento, durante el período de apareamiento de 3 semanas, y se continúa hasta el día anterior a la eutanasia (para un total de 100 a 101 dosis). Las ratas hembras no se tratan. Todos los animales se observan dos veces al día para estudiar la morbilidad y mortalidad. Las observaciones clínicas se registran diariamente en las ratas macho; el peso corporal y el consumo de alimentos se registran en los machos dos veces por semana. Todos los machos son sacrificados 1 día después de la última administración de la dosis. Las evaluaciones espermatogénicas del punto final realizadas en todos los machos incluyen la motilidad y la morfología y la concentración de espermatozoides epididimarios. Se pesan y se conservan los testículos, el epidídimo, la próstata y la vesícula seminal/glándula coagulante/fluido de todos los machos. Los testículos, el epidídimo, la próstata, las vesículas seminales y las glándulas coagulantes procedentes de los machos que sobreviven, se examinan microscópicamente. El día 15 de la gestación, se realiza una laparohisterectomía en cada hembra con evidencia de apareamiento. Otros 3, 18, 18 y 18 machos asignados a la fase toxicocinética reciben el compuesto con dosis de 0, 3, 30 y 1000 mg/kg, respectivamente, y se toman muestras para la evaluación toxicocinética a intervalos apropiados después de la administración de la dosis, los días 0 y 70 del estudio.

20 Después de una administración oral diaria del Ejemplo 1 a ratas macho, el tiempo hasta la $C_{m\acute{a}x}$ es de entre 2 y 8 horas el día 0 y de 0,5 a 2 horas el día 70. Las exposiciones medias (medidas por AUC_{0-24 h}) aumentan entre 3 y 30 mg/kg aproximadamente 7,8 veces y 4,5 veces el día 0 y 70, respectivamente, pero siguen siendo similares entre las dosis de 30 y 1000 mg/kg, lo que sugiere una meseta en la exposición más allá de 30 mg/kg. Las exposiciones son generalmente similares entre las dosis únicas y las múltiples.

25 Siguiendo un protocolo esencialmente como se ha descrito anteriormente, un macho en el grupo de 30 mg/kg de la fase toxicocinética y un macho en el grupo de control del vehículo de la fase principal, se encontraron muertos los días de estudio 24 y 70, respectivamente. En ausencia de mortalidad en el grupo de 1000 mg/kg, la muerte con 30 mg/kg no se consideró que estaba relacionada con el compuesto. En los exámenes diarios, se observó una mayor incidencia de material rojo alrededor de 1 ojo o ambos en 4 machos en el grupo de 30 mg/kg y 3 machos en el grupo de 1000 mg/kg, a partir de los días 8 y 20 del estudio, respectivamente. No se observaron otros hallazgos clínicos relacionados con el compuesto en los machos de los grupos de 3, 30 y 1000 mg/kg en los exámenes diarios o aproximadamente 1 hora después de la administración de la dosis. El peso medio corporal, el aumento de peso corporal y el consumo de alimentos no se vieron afectados por la administración del compuesto en todos los niveles de dosificación.

35 Se observaron pesos absolutos y relativos (en relación con el peso corporal y cerebral) inferiores dependientes de la dosis de los órganos reproductores masculinos, incluyendo los testículos, epidídimos (intactos y caudales), glándula prostática y vesículas seminales/glándulas coagulantes/fluidos accesorios, en los grupos de 30 y 1000 mg/kg. Los efectos sobre el peso de los órganos observados en los testículos se correspondían con cambios histológicos caracterizados por una atrofia de las células de Leydig intersticiales y del epitelio germinal. Estos hallazgos junto con poblaciones reducidas de espermatozoides maduros en los epidídimos en ambos grupos y secreciones reducidas en las glándulas sexuales accesorias, observados en el grupo de 1000 mg/kg, se consideraron compatibles con una regulación negativa de la síntesis y/o secreción de andrógenos (testosterona) a través de las células de Leydig o mediante una inhibición de los receptores hormonales en los órganos diana. Los efectos observados en los órganos reproductores en el grupo de 1000 mg/kg, se correspondían con una función reproductora reducida. En los grupos de 30 y 1000 mg/kg, los efectos sobre el peso de los órganos observados en las glándulas sexuales accesorias (próstata, vesículas seminales y glándulas coagulantes), se consideró que estaban relacionados con la farmacología del compuesto.

40 Se observaron efectos relacionados con el compuesto sobre los puntos finales espermatogénicos en el grupo de 1000 mg/kg. Se observaron pesos epididimarios más bajos en el grupo de 1000 mg/kg y se correspondían con una concentración media de espermatozoides epididimarios más baja en ese grupo. Además, se observó una disminución relacionada con el compuesto en el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales con 1000 mg/kg, como resultado de un mayor número de espermatozoides con la cabeza ausente o separada del flagelo. Estos efectos se correlacionaban con índices más bajos de apareamiento, fertilidad y cópula en los machos del grupo de 1000 mg/kg. Además, se observó un intervalo precoital ligeramente más largo en el grupo de 1000 mg/kg, en comparación con el grupo de control con vehículo. Los puntos finales espermatogénicos y el rendimiento reproductor en los grupos de 3 y 30 mg/kg no se vieron afectados por la administración del compuesto.

La supervivencia intrauterina de los embriones no se vio afectada por la administración del compuesto a los machos con niveles de dosis de 3, 30 y 1000 mg/kg.

60 En conclusión, no había efectos sobre el peso corporal masculino o el consumo de alimentos o hallazgos clínicos adversos relacionados con el compuesto, con ningún nivel de dosificación. Los efectos adversos relacionados con el compuesto en los tejidos reproductores masculinos y los parámetros espermatogénicos tenían lugar con 30 y 1000

mg/kg. Las disminuciones de los pesos de los órganos reproductores masculinos tenían lugar con 1000 mg/kg y se correspondían con los efectos sobre la concentración y la morfología del esperma epididimario. Además, se observaron alteraciones microscópicas en los testículos, epidídimos, próstata, vesículas seminales y glándula coagulante con 1000 mg/kg, lo que se correspondía con reducciones en los índices de apareamiento, fertilidad y cópula en ese grupo. Aunque la reducción del rendimiento reproductor se correlacionaba generalmente con cambios histológicos en el tejido reproductor masculino sobre una base grupal, la correlación sobre una base de animal individual no era siempre evidente. En el grupo de 30 mg/kg, se observaron disminuciones del peso de los órganos reproductores y alteraciones microscópicas en los testículos y los epidídimos. No se observaron efectos correspondientes sobre la función reproductora con 30 mg/kg, lo que sugiere que la señal farmacológica aunque estaba presente, no era lo suficientemente fuerte como para afectar a la reproducción funcional. Basándose en estos hallazgos, el NOAEL para la toxicidad reproductora masculina y la toxicidad sistémica masculina era de 3 mg/kg. Un nivel de dosis de 3 mg/kg se corresponde con un valor de exposición (AUC₀₋₂₄ horas) el día 70 del estudio de 10,954 ng·h/mL.

Estudio de cuatro semanas de toxicidad oral en perros

Este estudio se realiza para evaluar la toxicidad potencial y la toxicocinética del Ejemplo 1, un modulador selectivo del receptor de andrógenos (SARM), en perros después de una administración de cápsulas orales dos veces al día durante 4 semanas. El artículo de la prueba se administró a tres grupos de tratamiento de tres perros beagle machos y tres hembras, con niveles de dosis respectivos de 6, 60 o 300 mg/kg/día. Un grupo adicional de tres animales/sexo sirve como control y recibe el vehículo, 80% de PEG 3350/20% de vitamina E TPGS (v/v) a través de una cápsula oral. El artículo de la prueba o el vehículo se administra a todos los grupos a través de una cápsula oral, dos veces al día durante 28 días consecutivos, con un volumen de dosis de 1,5 mL/kg/dosis.

Las observaciones de la mortalidad, morbilidad, lesiones y disponibilidad de alimento y agua se realizan dos veces al día en todos los animales. Las observaciones clínicas detalladas se llevan a cabo semanalmente. Los pesos corporales se miden y registran el día posterior a la recepción, antes de la aleatorización, y semanalmente durante el estudio. El consumo de alimentos se mide y registra semanalmente. Los exámenes oftalmoscópicos se realizan antes de la prueba y antes de la autopsia final. Los exámenes físicos se realizan antes de la prueba. Los exámenes neurológicos se llevan a cabo durante las semanas 1 y 4. Los exámenes de ECG se llevan a cabo dos veces antes del inicio de la dosificación y antes y aproximadamente 2 horas (± 15 minutos) después de la administración del artículo de la prueba por la mañana, los días 3 y 26. Se recogen muestras de sangre dos veces antes de la prueba, y se recogen muestras de sangre y orina para evaluaciones de la patología clínica de todos los animales antes de la autopsia final. Las muestras de sangre para la determinación de las concentraciones plasmáticas del artículo de la prueba se recogen de todos los animales en los puntos de tiempo designados, los días 1 y 28. Los parámetros toxicocinéticos se determinan para el artículo de la prueba a partir de los datos de concentración-tiempo en las especies de la prueba. Al finalizar el estudio, se realizan exámenes con autopsia, se registran los pesos de los órganos y se examinan microscópicamente los testículos, los epidídimos y las próstatas. El potencial del Ejemplo 1 para inducir citocromos P450 se determina analizando muestras de hígado congelado para estudiar el contenido total en citocromo P450.

Siguiendo un protocolo esencialmente como se ha descrito anteriormente, no se encontraron concentraciones medibles (<1 ng/mL) del Ejemplo 1 en ninguna de las muestras de plasma procedentes de los animales de control. No se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas del Ejemplo 1 entre machos y hembras, lo que indica que no hay un efecto sobre el género en la exposición. La exposición del Ejemplo 1 aumentaba de manera algo menos a la proporcional a la dosis en los animales a los que se administraron 6 y 60 mg/kg/día y parecía alcanzar una meseta con 60 mg/kg/día, ya que las concentraciones plasmáticas eran similares a las de 300 mg/kg/día.

Estudio de 52 semanas de toxicidad y toxicocinético en perros

Los fines de este estudio es evaluar la toxicidad y determinar la toxicocinética del artículo de la prueba, el Ejemplo 1, cuando se administra diariamente mediante una cápsula a perros durante al menos 52 semanas y evaluar la reversibilidad, la persistencia o la aparición tardía de cualquier efecto después de una recuperación durante 13 semanas.

Los perros beagle de raza pura machos y hembras se asignan a grupos, y las dosis se administran de acuerdo con la Tabla 9 a través de cápsulas orales que contienen 1 mL/kg de 0 [1% (p/v) de carboximetilcelulosa sódica (baja viscosidad/25-50 cps), 0,5% (p/v) de lauril sulfato de sodio y 0,05% (v/v) de antiespumante 1510-US de Dow Corning® en agua de ósmosis inversa], 3, 10 o 100 mg del Ejemplo 1/kg de peso corporal. Todos los animales reciben la misma cantidad de cápsulas, y los animales del Grupo 1 reciben cápsulas que contienen solo el artículo de control con vehículo. Tres animales por sexo de los Grupos 1 y 4 se indican que son animales de recuperación.

Tabla 9

Grupo	Número de animales		Nivel de dosis	Concentración de la dosis
	Macho	Hembra	(mg de Ejemplo 1/kg)	(mg de Ejemplo 1/kg)
1 (Control)	7	7	0	0
2 (Bajo)	4	4	3	3
3 (Medio)	4	4	10	10
4 (Alto)	7	7	100	100

5 La evaluación de la toxicidad se basa en la mortalidad, los signos clínicos, el peso corporal y el cambio de peso corporal, el consumo de alimentos, las evaluaciones oftálmicas y neurológicas, las mediciones de ECG, el análisis hormonal (testosterona, progesterona, hormona luteinizante y hormona estimulante del folículo), la evaluación del semen (volumen de eyaculación y número de espermatozoides, densidad, morfología y motilidad), y la patología clínica y anatómica. Se recogen muestras de sangre para análisis exploratorios de metabolitos y evaluaciones toxicocinéticas.

10 Siguiendo un protocolo esencialmente como se ha descrito anteriormente, una exposición sistémica al Ejemplo 1 aumentaba con el incremento del nivel de dosis desde 3 a 100 mg/kg. Los aumentos en la $C_{m\acute{a}x}$ media y $AUC_{0-24 \text{ horas}}$ eran generalmente inferiores que proporcionales a la dosis. No se observaron diferencias consistentes relacionadas con el sexo en los parámetros toxicocinéticos. Se observó una acumulación del Ejemplo 1 después de una dosificación múltiple del Ejemplo 1 en perros.

15 Todos los animales sobrevivieron hasta el sacrificio programado. Los signos clínicos relacionados con el compuesto eran el aumento de las observaciones de lagrimeo en animales que recibieron >3 mg/kg y la reducción o ausencia del ciclo estral en hembras que recibieron >3 mg/kg.

No se observaron diferencias toxicológicamente importantes en el peso corporal medio, el aumento de peso corporal y el consumo de alimentos. No se produjeron anomalías oftálmicas ni neurológicas.

20 El intervalo QT prolongado y el intervalo QT corregido (QTc) se observaron antes de la dosis y 2 horas después de la dosis los días 3, 86 y 359 de la fase de dosificación en sexos combinados que recibieron 100 mg/kg. La magnitud del aumento en el intervalo QTc medio en sexos combinados que recibieron 100 mg/kg en todos los intervalos de la fase de dosificación, variaba de 14 a 21 ms (6 a 9%) sobre los valores medios para los animales de control. No se observaron cambios relacionados con el compuesto en el intervalo QT o QTc el día 88 de la fase de recuperación en sexos combinados que recibieron 100 mg/kg o los días 3, 86 o 359 de la fase de dosificación en animales que recibieron 3 o 10 mg/kg. No se observaron cambios relacionados con el Ejemplo 1 en el intervalo PR, la duración del QRS, el intervalo RR o la frecuencia cardíaca el día 3, 86 o 359 de la fase de dosificación, en animales que recibieron 3, 10 o 100 mg/kg o el día 88 de la fase de recuperación en animales que recibieron 100 mg/kg. No se atribuyeron al Ejemplo 1 anomalías en el ritmo ni cambios cualitativos en el ECG durante la evaluación cualitativa de los electrocardiogramas.

30 Las disminuciones dependientes de la dosis, relacionadas con el Ejemplo 1, en el recuento total de espermatozoides tuvieron lugar durante la fase de dosificación para los machos con todos los niveles de dosis y se atribuyeron a disminuciones en el peso de la eyaculación. En las evaluaciones de la semana 52 (días 355 y 360 de la fase de dosificación), el recuento total de espermatozoides en relación con los controles disminuyó >55, >50 y >91% en los machos que recibieron 3, 10 o 100 mg/kg, respectivamente. Los efectos sobre el recuento total de espermatozoides reversionaron por completo durante la fase de recuperación. No se observaron efectos relacionados con el Ejemplo 1 sobre la densidad, la motilidad o la morfología media de los espermatozoides en ningún grupo.

40 Se observaron cambios hormonales en machos y hembras que recibieron >3 mg/kg. Los cambios eran compatibles con la farmacología del artículo de la prueba y se correlacionaban con los cambios microscópicos. En los machos, se observaron reducciones en la testosterona y aumentos en la LH. El aumento de la LH y la disminución de la progesterona en las hembras eran compatibles con el anestro y la reducción de los cuerpos lúteos observados microscópicamente. Los niveles hormonales volvieron a los niveles de control durante la fase de recuperación.

45 Los efectos de la patología clínica relacionados con el compuesto se limitaron a una actividad aminotransferasa de alanina incrementada desde una forma mínima hasta levemente en los machos y hembras con todos los niveles de dosis (las hembras que recibieron 100 mg/kg eran las más afectadas) y el colesterol disminuyó de forma mínima a moderada en los machos y hembras que recibieron 3 o 10 mg/kg (los animales que recibieron 3 mg/kg eran los más afectados). El efecto sobre la actividad aminotransferasa de alanina con 100 mg/kg mostraba reversibilidad después de la fase de recuperación. No se pudo evaluar la reversibilidad del efecto sobre la concentración de colesterol con 3 y 10 mg/kg porque no había animales con esos niveles de dosis en la fase de recuperación. Ninguno de esos efectos se asoció con hallazgos microscópicos correlativos.

Se observaron cambios morfológicos relacionados con el compuesto farmacológicamente esperados en los tejidos reproductores de machos y hembras. Una disminución del peso de la próstata, el epidídimo y el hígado/vesícula biliar relacionada con el compuesto y reversible, tuvo lugar en los machos, la cual, con la excepción de los cambios en el hígado/vesícula biliar, se correlacionaba con los hallazgos microscópicos. En la glándula prostática, los machos que recibieron >3 mg/kg tenían una atrofia epitelial acinar reversible de la glándula prostática. Los machos que recibieron >3 mg/kg tenían una disminución reversible del diámetro ductular de la cola del epidídimo, y los machos que recibieron 100 mg/kg tenían una atrofia epitelial ductular epididimaria reversible. Las hembras que recibieron >3 mg/kg tenían cuerpos lúteos disminuidos/ausentes con un estadio de ciclo anestro en el ovario. Este cambio generalmente estaba acompañado por una falta de desarrollo lobular en la glándula mamaria, así como por respuestas esperadas de los tejidos reproductores secundarios frente al anestro: el útero, el cuello uterino, la vagina y la glándula mamaria tenían características de atrofia apropiadas para cada estadio, proporcionales a un anestro prolongado.

Colectivamente, estos hallazgos en las hembras son compatibles con una interrupción del ciclo reproductor normal, relacionada con el compuesto. En la fase de recuperación, 2/3 de las hembras que recibieron 100 mg/kg tenían un estadio de ciclo reproductor diestro y un desarrollo mamario lobular, lo que indicaba un retorno a la actividad cíclica normal, aunque no se observó ninguna evidencia clínica de ciclos reproductores durante la fase de recuperación.

Además, se observaron hallazgos microscópicos reversibles y relacionados con el compuesto en la glándula suprarrenal y la piel/hipodermis. En la glándula suprarrenal, los machos que recibieron >10 mg/kg y las hembras que recibieron 100 mg/kg, tenían una disminución de la vacuolación de la zona fasciculada y reticular. En la piel, se observó una disminución de la vacuolación de las glándulas sebáceas en los animales que recibieron >3 mg/kg.

En resumen, la administración diaria del Ejemplo 1 mediante una cápsula a perros durante 52 semanas, con un nivel de dosis de 3, 10 o 100 mg/kg, no producía resultados adversos relacionados con el compuesto. Se produjeron cambios en la función reproductora en los machos (disminución del recuento de espermatozoides y del volumen de la eyaculación) y en las hembras (reducción/ausencia del ciclo estral) en todos los grupos tratados con el Ejemplo 1 y se correlacionaban con los hallazgos microscópicos. Estos cambios no afectan la salud general de los animales; son compatibles con la acción farmacológica del artículo de la prueba; y son reversibles. Por lo tanto, el NOAEL es de 100 mg/kg. Después de 361 días de dosificación, una dosis de 100 mg/kg correspondía a los valores medios de C_{máx} de 1496 y 1885 ng/mL y los valores de AUC_{0-24h} de 22582 y 31505 ng•h/mL en machos y hembras, respectivamente.

Tabla 10

Resumen de los hallazgos de la próstata en ratas y perros tratados con el Ejemplo 1

Ratas

Duración del tratamiento (meses)	1 ^a			6 ^a			Fertilidad de los machos (3 meses) ^a		
	15	150	1500	15	150	1500	3	30	1000
Dosis (mg/kg/día)	-	-	-	-	↓ 30%	↓ 34%	-	↓ 23%	↓ 39%
Peso de la próstata (% de disminución media)	-	-	-	-	-	4/15	-	-	-
Atrofia de la próstata (nº de afectados/nº de examinados)	-	-	-	-	-	4/15	-	-	-
AUC _{0-24h} media del grupo de machos cerca del deceso (ng•h/mL)	35733	72283	102337	15902	34132	82690	10954	49734	56009

- no se observó ningún efecto

^a Vehículo de 5% de vitamina E TPGS, 1% de hidroxietilcelulosa, 0,05% de antiespumante 2510-US de DC en agua purificada

Perros

Duración del tratamiento (meses)	1 ^a			6 ^a			12 ^b		
	3	30	150	3	30	300	3	10	100
Dosis (mg/kg/día)	-	-	-	↓ 63%	↓ 66%	↓ 75%	↓ 60%	↓ 62%	↓ 80%
Peso de la próstata (% de disminución media)	-	-	-	4/4	4/4	4/4	2/4	3/4	4/4
Atrofia de la próstata (nº de afectados/nº de examinados)	-	-	1/4	4/4	4/4	4/4	2/4	3/4	4/4
AUC _{0-24h} media del grupo de machos cerca del deceso (ng•h/mL)	17984	61674	46528	6492	44448	53032	3621	13408	22582

- no se observó ningún efecto

^a Vehículo de 80% de PEG 1350, 20% de vitamina E TPGS (v/v)

^b Vehículo de 1% (p/v) de carboximetilcelulosa sódica, 0,5% (p/v) de lauril sulfato sódico, 0,05% (v/v) de antiespumante 1510-US de Dow Corning® en agua de ósmosis inversa

El tratamiento con el Ejemplo 1 a ratas o a perros intactos durante los períodos que oscilaban de 1 a 12 meses, da como resultado una disminución significativa del tamaño de la próstata, lo que indica además que no se acumula un riesgo androgénico de hiperplasia de la próstata a lo largo del tiempo.

5 Estudio *in vivo* para explorar cualquier efecto antagonista directo del Ejemplo 1 en presencia de TE

Se utiliza un total de 36 ratas macho Wistar orquiectomizadas (ORX) y 6 ratas Wistar operadas de forma simulada (orquiectomizadas a las 8 semanas de edad y se dejan que se atrofie durante 4 semanas). Las ratas se mantienen en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas a 22°C con acceso a voluntad a los alimentos (TD 5001 con 0,95% de Ca y 0,67% de P, Teklad, Madison, WI) y agua. Las ratas se asignan al azar y se colocan en grupos de tratamiento (n = 6) según el peso corporal. La vía de administración para todos los grupos, excepto TE, es oral. El TE se administra por vía subcutánea. Al final de las 8 semanas de dosificación diaria, las ratas se sacrifican, se pesan y se extirpan los tejidos. Se extrae de cada animal el elevador del ano, la próstata y las vesículas seminales. Los resultados se muestran en un gráfico como medias ± SE.

Comparaciones de medias de pesos húmedos de vesículas seminales

15 Comparaciones con un control usando el método de Dunnett

Grupo de control = d-ORX + TE, 1 mg/kg/d

d	Alfa
2,69715	0,05

Tabla 11

Nº de Grupo	Grupo	Abs(Dif)-LSD	Valor de p
1	Simulado	0,979	<,0001
2	ORX + TE, 1 mg/kg/día	-0,52	1,0000
3	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 3 mg/kg/d	-0,34	0,8628
4	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 10 mg/kg/d	0,078	0,0187
5	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 30 mg/kg/d	0,536	<,0001
6	ORX + Ejemplo 1, 10 mg/kg/d	1,411	<,0001
7	ORX, Vehículo	1,422	<,0001

20

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente diferentes.

La combinación con enantato de testosterona (1 mg/kg-día) y varias dosis del Ejemplo 1, sugiere una tendencia a una disminución del peso húmedo de la vesícula seminal en mg, normalizado al peso corporal en gramos, que es inducida solo por TE como se muestra en la Figura 5 y la Tabla 11.

25 Comparaciones de medias de pesos de la próstata

Comparaciones con un control usando el método de Dunnett

Grupo de control = d-ORX + TE, 1 mg/kg/d

d	Alfa
2,69715	0,05

30 Tabla 12

Nº de Grupo	Grupo	Abs(Dif)-LSD	Valor de p
1	Simulado	0,509	<,0001*
2	ORX + TE, 1 mg/kg/día	-0,15	1,0000
3	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 3 mg/kg/d	-0,11	0,9774
4	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 30 mg/kg/d	0,025	0,0167*
5	ORX + TE, 1 mg/kg/d + Ejemplo 1, 10 mg/kg/d	0,036	0,0099*
6	ORX, Vehículo	0,356	<,0001*

Nº de Grupo	Grupo	Abs(Dif)-LSD	Valor de p
7	ORX + Ejemplo 1, 10 mg/kg/d	0,357	<,0001*

Los valores positivos muestran pares de medias que son significativamente diferentes del grupo de TE solo.

5 El tratamiento conjunto a ratas SD con el Ejemplo 1 junto con 1 mg/kg de TE da como resultado una disminución dependiente de la dosis en el peso húmedo de la próstata en mg normalizado al peso corporal en gramos, como se muestra en la Figura 6 y la Tabla 12.

Tabla 13

	Ki (nM) de hAR	CE50 (nM) de la expresión génica de LnCAP		
		PSA	AR	CLUSTERINA
R1881	0,38	0,034	0,035	0,37
Ejemplo 1	1,95	2,64	1,64	>100

10 Las comparaciones del Ejemplo 1 con la testosterona sintética R1881 muestran que utilizando *in vitro* células de cáncer de próstata humano, el Ejemplo 1 es menos androgénico que R1881. En contraste, la afinidad de unión bioquímica con el receptor de andrógenos humano (hAr; Ki en nM) solo se reduce ligeramente.

Estudio de Fase Ia en voluntarios sanos

15 Este estudio de Fase 1 es un diseño aleatorizado, controlado con placebo, con doble enmascaramiento, de dosis única, cruzado incompleto, con incremento escalonado de la dosis, realizado en 3 cohortes de dosificación que consisten en hombres sanos y mujeres posmenopáusicas. Treinta sujetos (10 por cohorte) se asignan aleatoriamente a cada cohorte de dosificación.

20 Durante ambos períodos de dosificación, los sujetos son admitidos a la unidad de investigación clínica (CRU) para pasar la noche. Los sujetos son dosificados por vía oral después del desayuno el día 1 y permanecen en la CRU durante aproximadamente 24 horas después de la dosificación. Dentro de cada cohorte, el período de descanso farmacológico entre los períodos de dosificación varía de 14 a 45 días. Una consulta para dar el alta del estudio tiene lugar aproximadamente 5 días después de la última dosis, Período 2. La idoneidad de un incremento escalonado de la dosis se determina mediante mediciones de seguridad en cada etapa del escalonamiento. Se utiliza un diseño cruzado con doble enmascaramiento sujeto-investigador para este estudio, para proporcionar datos entre sujetos para todas las mediciones de seguridad y tolerabilidad. Este diseño facilita una evaluación objetiva de los AEs.

25 Se siguió un protocolo esencialmente como se ha descrito anteriormente. Como resultado del diseño cruzado incompleto, aproximadamente el 50% de los sujetos recibió una dosis única de Ejemplo 1 y una dosis de placebo para mejorar la detección de señales significativas de seguridad o tolerabilidad. Aproximadamente el 50% de los sujetos recibieron el Ejemplo 1 con 2 niveles de dosis, lo que permitió un análisis en el sujeto de la dependencia de la dosis de los parámetros PK y otros puntos finales. Se eligió un período de intervalo de dosificación mínimo de 5 días para minimizar los efectos de arrastre entre los períodos de tratamiento.

35 El intervalo de dosis planificado para este estudio era de 5 a 1000 mg de Ejemplo 1 y se basaba en la eficacia *in vivo* en ratas, suponiendo que la exposición requerida para producir un efecto óseo del 80% (promedio de la carga de la diáfisis y la carga del cuello femoral) en las ratas es la misma que la exposición requerida en humanos. Basándose en el aclaramiento humano previsto alométricamente (33 L/h, intervalo de confianza [CI] del 90%: 24 a 46 L/h) y la biodisponibilidad (49%), se espera que esa respuesta en humanos tenga lugar con dosis de aproximadamente 71 mg/día (90% de CI: 29 a 321 mg/día).

Estos datos demuestran un aumento en el área del músculo de la pantorrilla, tal y como se mide mediante formación de imágenes periféricas con tomografía computarizada en el haz gastrocnemio (área del músculo de la pantorrilla) después de la administración del Ejemplo 1 a voluntarios humanos sanos como se muestra en la Figura 7.

40 Tabla 14

Resumen del cambio desde el punto basal para el músculo no adiposo mediante dosis el día 28 - Machos

ES 2 779 978 T3

Grupo de Tratamiento	n	Media LS [95% de CI]	Comparación con el placebo Diferencia [95% de CI] [Valor de P]
Placebo	7	-873.45 [-2318.30, 571.39]	
1mg LY	7	675.52 [-762.14, 2113.18]	1548.97 [-491.88, 3589.82] [.139]
5mg LY	8	587.66 [-757.35, 1932.67]	1461.11 [-510.43, 3432.63] [.139]
15mg LY	2	2329.08 [-453.16, 5111.33]	3202.54 [100.93, 6304.14] [.044]
25mg LY	2	956.18 [-1773.88, 3686.23]	1829.63 [-1281.37, 4940.62] [.236]
75mg LY	4	-1557.21 [-3500.36, 385.94]	-683.76 [-3129.22, 1761.70] [.569]

El modelo mixto: chg=base dose ddfm=kr

Unidad=g

Programa: Home/lillyce/prd/ly2452473/i2n_mc_gpbc/final/programs_stat/gpbc_swin_update.sas

5 Tabla 15

Resumen del cambio desde el punto basal para el músculo no adiposo mediante dosis el día 28 - Hembras

Grupo de Tratamiento	n	Media de LS [95% de CI]	Comparación con el placebo Diferencia [95% de CI] [Valor de P]
Placebo	3	-742.27 [-3136.75, 1652.21]	
5mg LY	3	1555.95 [-1092.94, 4304.84]	2298.22 [-2183.05, 6779.50] [.271]
15mg LY	2	2919.58 [-679.64, 6518.81]	3661.85 [-1742.18, 9065.81] [.157]
25mg LY	4	1482.24 [-1013.85, 3978.33]	2224.51 [48.22, 4400.81] [.046]
75mg LY	2	1583.65 [-506.14, 3673.45]	2335.92 [-1178.94, 5830.78] [.164]

El modelo mixto: chg=base dose ddfm=kr

Unidad=g

10 Programa: Home/lillyce/prd/ly2452473/i2n_mc_gpbc/final/programs_stat/gpbc_swin_update.sas

Estos datos demuestran un aumento en la masa muscular no adiposa de todo el cuerpo después de la administración del Ejemplo 1 a voluntarios humanos sanos, medido por DEXA. El efecto sobre los machos (barra azul) con el nivel de dosis de 5 mg es estadísticamente significativo, en comparación con la dosis de placebo de 0 mg, utilizando una prueba de Dunnett ($p < 0,05$) como se muestra en la Figura 8 y las Tablas 14 y 15.

15

Tabla 16

Resumen del cambio desde el punto basal para el antígeno específico de la próstata por dosis y tiempo - Machos

Grupo de Tratamiento	Tiempo/día	n	Media de LS [95% de CI]	Comparación con el placebo Diferencia [95% de CI] [Valor de P]
Placebo	M4	7	0.04 [-0.11, 0.20]	
	M8	7	0.05 [-0.11, 0.20]	
	M8	7	0.03 [-0.13, 0.18]	
1mg LY	M4	7	-0.06 [-0.21, 0.09]	-0.10 [-0.21, 0.12] 1.0603
	M8	7	-0.08 [-0.23, 0.10]	-0.09 [-0.21, 0.12] 1.0903
	M8	7	0.02 [-0.13, 0.17]	-0.04 [-0.22, 0.21] 1.9403
5mg LY	M4	8	0.20 [0.06, 0.34]	0.16 [-0.05, 0.37] 1.1403
	M8	8	-0.06 [-0.19, 0.14]	-0.05 [-0.19, 0.14] 1.0803
	M8	8	0.20 [0.06, 0.34]	0.17 [-0.04, 0.39] 1.1003
15mg LY	M4	8	-0.11 [-0.26, 0.17]	-0.16 [-0.28, 0.18] 1.0803
	M8	8	-0.12 [-0.27, 0.21]	-0.21 [-0.33, 0.20] 1.0803
	M8	8	0.19 [0.03, 0.35]	0.12 [-0.10, 0.54] 1.1703
25mg LY	M4	8	-0.15 [-0.30, 0.10]	-0.19 [-0.31, 0.19] 1.0403
	M8	8	-0.22 [-0.36, 0.16]	-0.27 [-0.39, 0.20] 1.0903
	M8	8	-0.14 [-0.29, 0.14]	-0.17 [-0.29, 0.16] 1.0903
75mg LY	M4	4	-0.13 [-0.28, 0.17]	-0.17 [-0.29, 0.09] 1.1803
	M8	4	0.07 [-0.18, 0.30]	0.06 [-0.16, 0.30] 1.0903
	M8	4	0.03 [-0.13, 0.20]	0.00 [-0.18, 0.20] 1.9903

El modelo mixto: chg=base dose VISITDY dose*VISITDY/ddfm=kr; repeated VISITDY/subject=subject type=cs
 Unidad=ug/L
 Programa: Home/lillyce/prd/ly2452473/i2n_mc_gpbc/final/programs_stat/gpbc_smlab_update.sas

- 5 Estos datos de la Figura demuestran que no hay cambios significativos desde el punto basal en los niveles de antígeno específico de la próstata (SPA), en comparación con el placebo en cualquier momento o con cualquier dosis del Ejemplo 1 como se muestra en la Figura 9 y la Tabla 16.

Estudio de Fase Ib con voluntarios sanos

- 10 Este es un estudio paralelo de Fase 1, aleatorizado, controlado con placebo, enmascarado para el sujeto y el investigador, de dosis múltiple, con incremento escalonado de la dosis, del Ejemplo 1 en sujetos sanos. Este estudio se realiza en 6 grupos de tratamiento, y los sujetos fueron aleatorizados para recibir dosis diarias tanto de Ejemplo 1 como de placebo durante 4 semanas. Se realiza una evaluación de la seguridad y la tolerabilidad antes de cada aumento de la dosis. Los criterios claves de inclusión/exclusión para este estudio son que los sujetos sean hombres sanos o mujeres postmenopáusicas sanas, entre las edades de 30 y 80 años, inclusive; con un índice de masa corporal (IMC) entre 18 y 32 kg/m2, inclusive.
- 15

Los sujetos ingresan al estudio y se asignan al azar después del escrutinio. Los días 1 y 29, los sujetos se hospitalizan en la Unidad de Investigación Clínica (CRU). Los días 1, 2 y 28, los sujetos son dosificados por vía oral después del desayuno. Todos los análisis de laboratorio de seguridad se recogen antes del desayuno y después de un ayuno nocturno de al menos 12 horas.

- 20 Después del día 1, los sujetos son dados de alta el día 2 siguiendo los procedimientos pautados, desayuno y dosificación (aproximadamente 24 horas después de la dosis del día 1). Después del día 28, los sujetos son dados de alta el día 29 siguiendo los procedimientos pautados (aproximadamente 24 horas después de la dosis del día 28).

- 25 Estos datos demuestran una disminución de los niveles de testosterona en suero después de la administración del Ejemplo 1 a voluntarios humanos sanos eugonadales. La disminución después del tratamiento es más pronunciada en los varones debido a sus niveles de testosterona en suero relativamente más altos. La tabla de la derecha refleja la evaluación de la exposición después del estudio de Fase 1a a la dosis de 5 mg como se muestra en la Figura 10.

Tabla 17

Resumen del cambio desde el punto basal para el péptido N de procolágeno de tipo 1 (P1NP) por dosis y tiempo - Machos

ES 2 779 978 T3

Grupo de Tratamiento	Tiempo/día	n	Media de LS [95% de CI]	Comparación con el placebo Diferencia [95% de CI] [Valor de P]
Placebo	14	7	-1.15 [-7.55, 5.24]	
	28	7	-1.32 [-7.72, 5.07]	
	35	7	-3.44 [-9.83, 2.95]	
1mg LY	14	7	-3.55 [-9.78, 2.59]	-2.40 [-11.09, 6.39] [.560]
	28	7	0.16 [-5.98, 6.30]	1.49 [-7.28, 10.17] [.731]
	35	7	-5.70 [-11.84, 0.45]	-3.76 [-10.94, 6.43] [.602]
5mg LY	14	8	2.11 [-3.56, 7.88]	3.27 [-8.56, 13.99] [.458]
	28	8	2.88 [-2.98, 8.65]	4.20 [-4.62, 13.92] [.341]
	35	8	-2.31 [-8.08, 3.46]	1.13 [-7.79, 9.95] [.797]
15mg LY	14	2	1.34 [-10.64, 13.32]	2.49 [-11.52, 16.60] [.723]
	28	2	2.09 [-9.89, 14.97]	3.41 [-10.70, 17.52] [.627]
	35	2	-3.41 [-15.39, 8.57]	0.03 [-14.08, 14.14] [.997]
25mg LY	14	2	-2.07 [-13.70, 9.56]	-0.92 [-14.54, 13.70] [.892]
	28	2	1.43 [-10.20, 13.96]	2.75 [-10.86, 16.37] [.685]
	35	2	-2.97 [-14.60, 8.66]	0.47 [-13.15, 14.08] [.945]
75mg LY	14	4	-4.96 [-13.82, 3.89]	-3.81 [-14.06, 6.44] [.457]
	28	3	1.48 [-7.27, 10.24]	2.81 [-8.52, 13.54] [.604]
	35	4	-1.09 [-9.15, 6.97]	2.35 [-7.98, 12.60] [.646]

El modelo mixto: chg=base dose VISITDY dose*VISITDY/ddfm=kr; repeated VISITDY/subject=subject type=cs
 Unidad=ug/L
 Programa: Home/lillyce/prd/ly2452473/i2n_mc_gpbc/final/programs_stat/gpbc_smlab_update.sas

- 5 Estos datos demuestran una relación exposición-respuesta positiva para el propéptido N-terminal de procolágeno de tipo 1 (P1NP), un biomarcador para el anabolismo óseo, después de la administración del Ejemplo 1 a voluntarios humanos sanos eugonadales como se muestra en la Figura 11 y la Tabla 16.

REIVINDICACIONES

1. Éster isopropílico de ácido (S)-(7-ciano-4-piridin-2-ilmetil-1,2,3,4-tetrahidro-ciclopenta[b]indol-2-il)-carbámico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en el tratamiento de los síntomas resultantes de un hipogonadismo secundario inducido por una terapia de privación de andrógenos.
- 5 2. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde los síntomas son la pérdida de masa ósea, de resistencia ósea, de masa muscular o de fuerza muscular.
3. El compuesto para uso según la reivindicación 1, en donde los síntomas son la pérdida de libido y los sofocos.

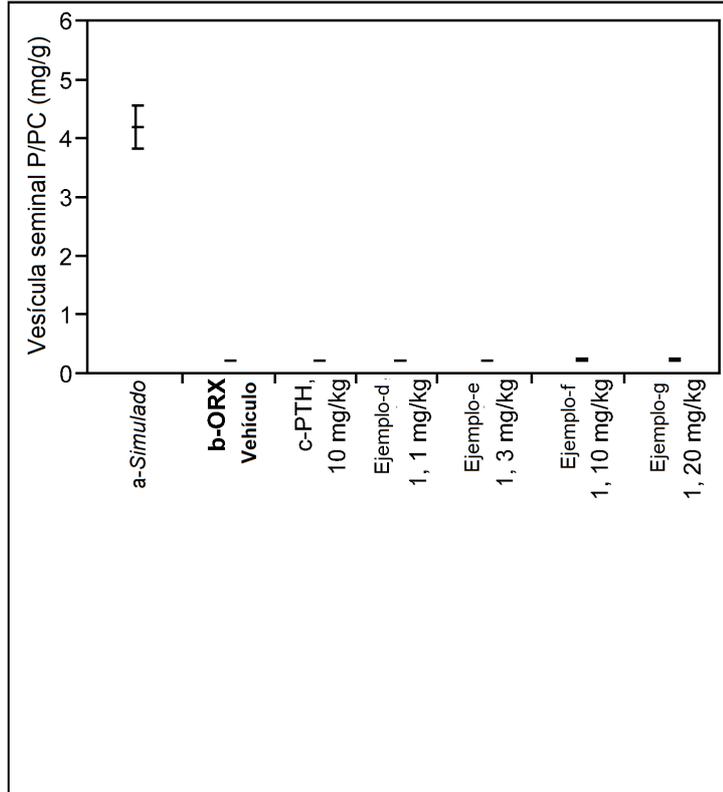


FIG. 1 de 11

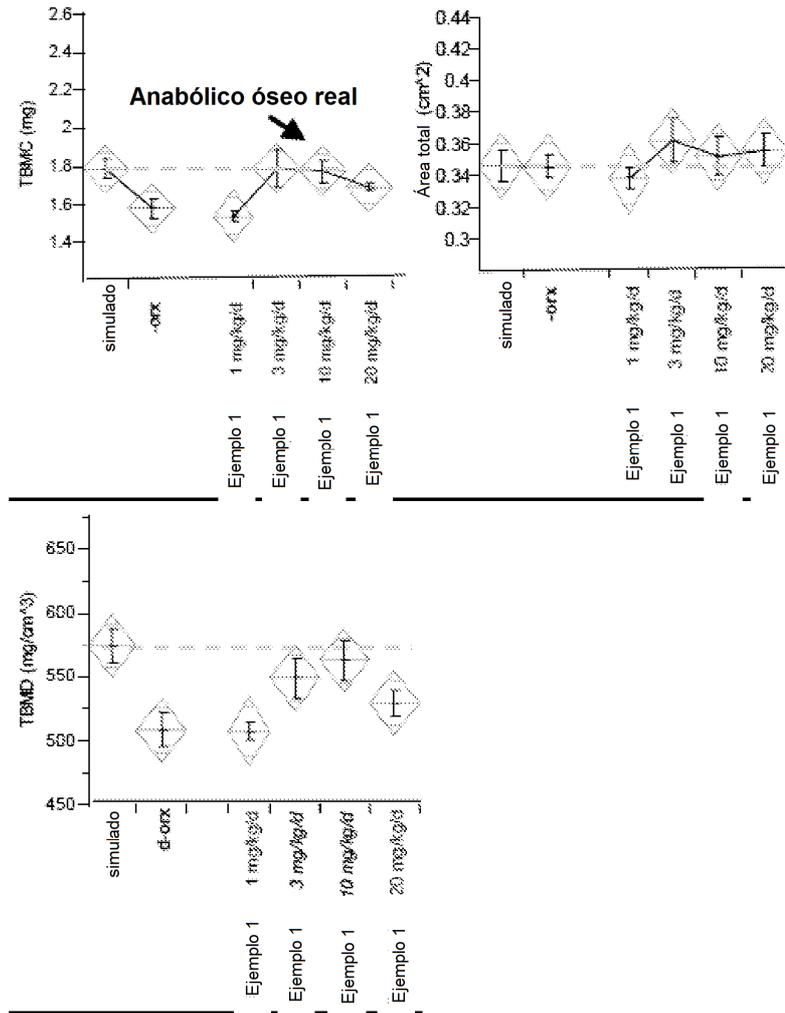


FIG. 2 de 11

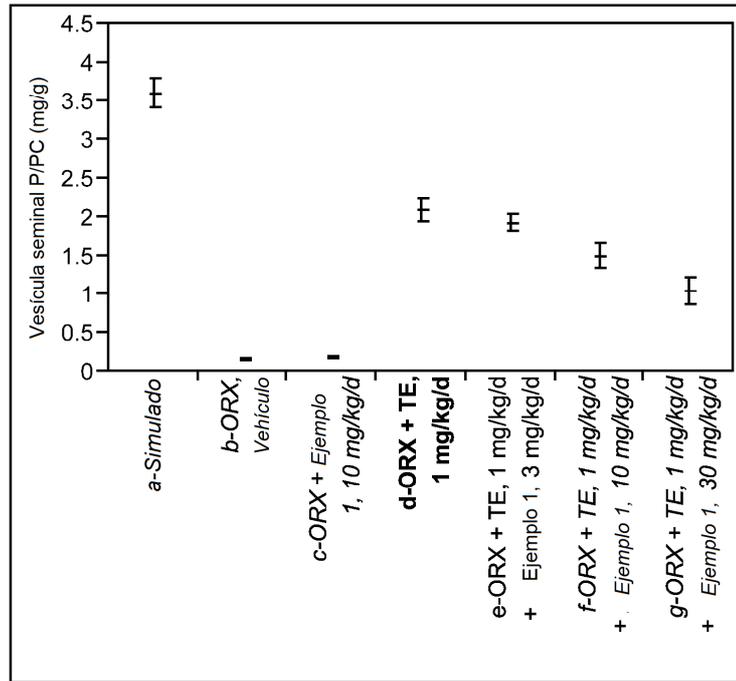


FIG. 3 de 11

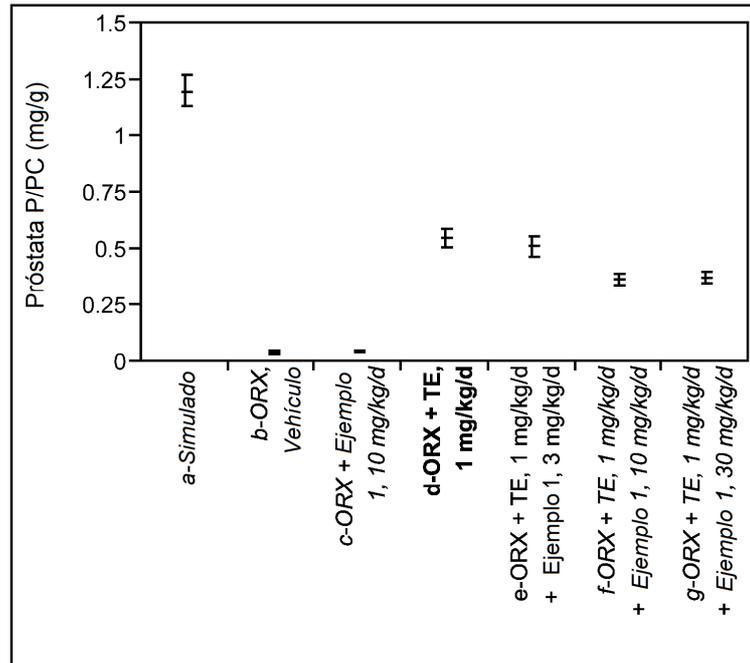


FIG. 4 de 11

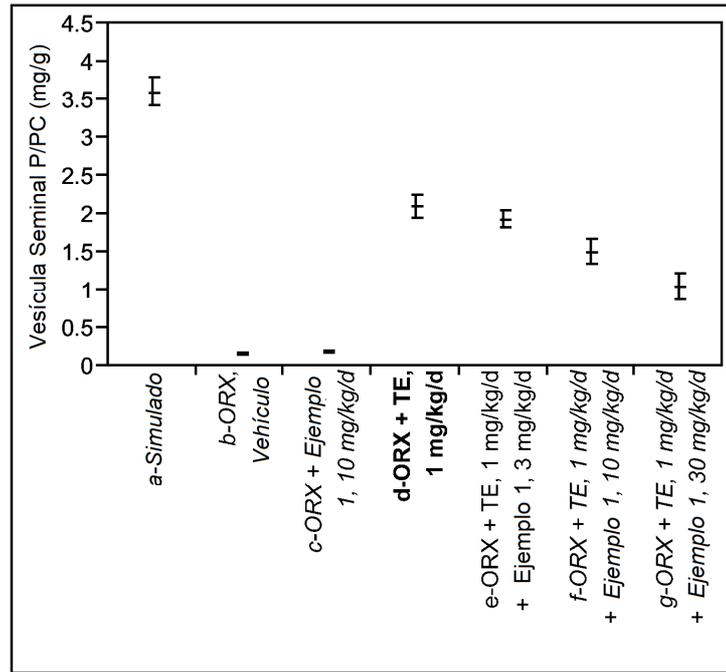


FIG. 5 de 11

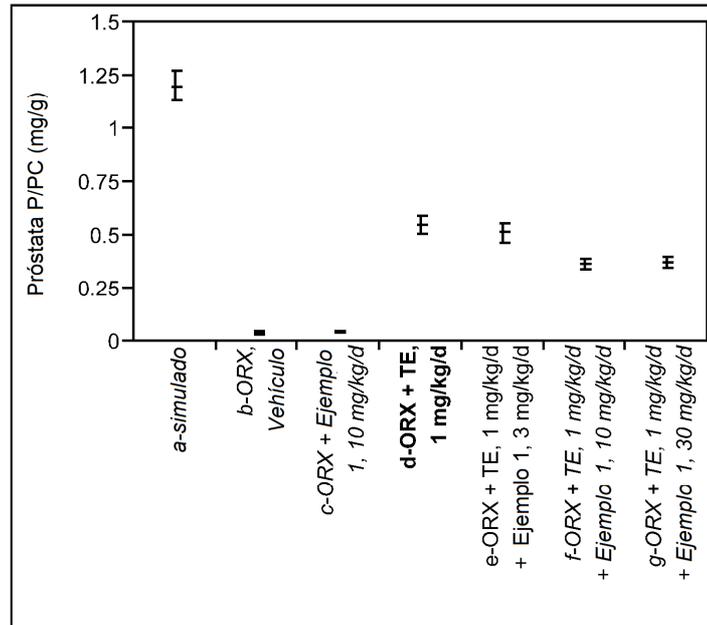


FIG. 6 de 11

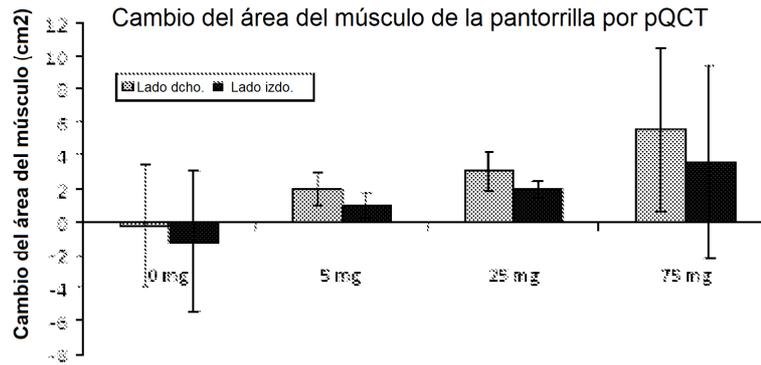


FIG. 7 de 11

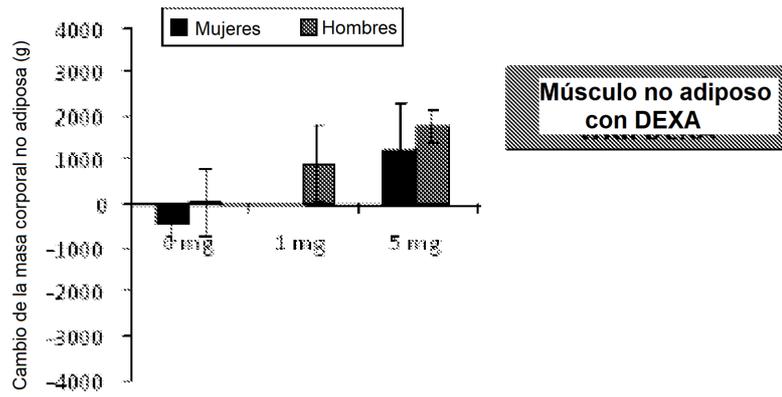


FIG. 8 de 11

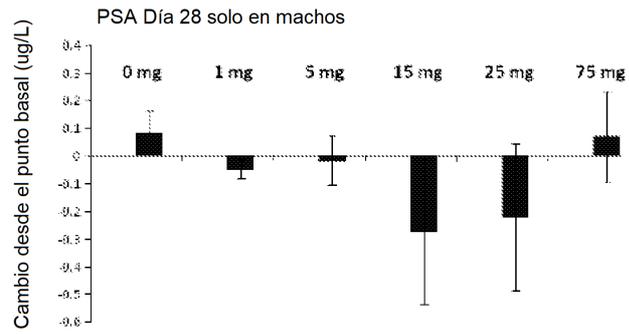


FIG. 9 de 11

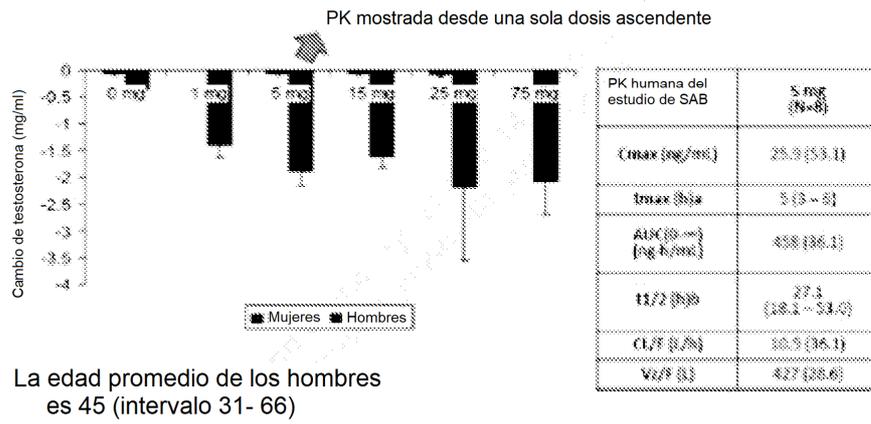


FIG. 10 de 11

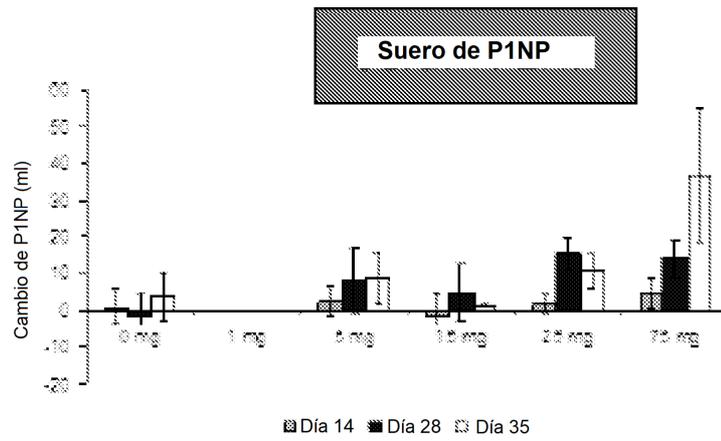


FIG. 11 de 11